

(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2015-144586  
(P2015-144586A)

(43) 公開日 平成27年8月13日(2015.8.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12Q 1/68 (2006.01)</b>	C12Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 A	4 B O 6 3
<b>C12N 15/113 (2010.01)</b>	C12N 15/00 G	
	C12N 15/00 F	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2014-19146 (P2014-19146)  
(22) 出願日 平成26年2月4日(2014.2.4)

(71) 出願人 504136568  
国立大学法人広島大学  
広島県東広島市鏡山1丁目3番2号  
(74) 代理人 110001427  
特許業務法人前田特許事務所  
(72) 発明者 亀井 直輔  
広島県広島市南区霞一丁目2番3号 広島  
大学病院 未来医療センター内  
(72) 発明者 越智 光夫  
広島県広島市南区霞一丁目2番3号 国立  
大学法人広島大学大学院医歯薬保健学研究  
院内

最終頁に続く

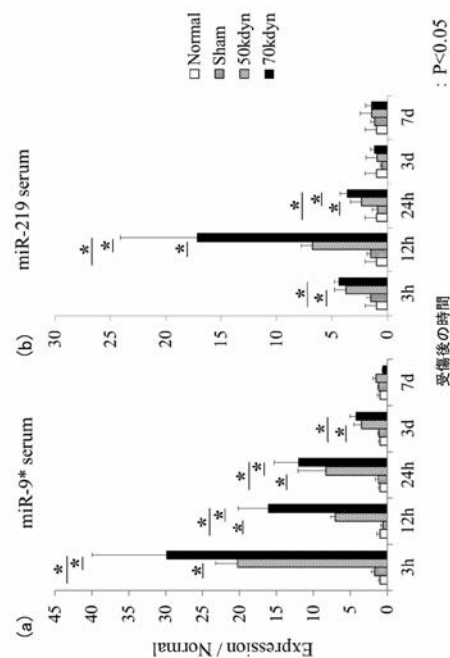
(54) 【発明の名称】 急性期脊髄損傷の予後予測マーカー

(57) 【要約】

【課題】 脊髄損傷後急性期であっても高感度な予後予測を可能とする急性期脊髄損傷の予後予測マーカーを提供する。

【解決手段】 miR-9\*、miR-219、及びmiR-384-5pの少なくとも何れか一つを有する。miR-9\*の場合、受傷後3時間~24時間の被験者のmiR-9\*の発現量を検出し、受傷後3時間では、被験者のmiR-9\*の発現量が健常者のmiR-9\*の発現量と比較して25倍未満の場合、急性期脊髄損傷の予後が良好であると予測し、被験者のmiR-9\*の発現量が健常者のmiR-9\*の発現量と比較して25倍以上の場合、急性期脊髄損傷の予後が不良であると予測する。受傷後12~24時間では、被験者のmiR-9\*の発現量が健常者のmiR-9\*の発現量と比較して10倍未満の場合、急性期脊髄損傷の予後が良好であると予測し、被験者のmiR-9\*の発現量が健常者のmiR-9\*の発現量と比較して10倍以上の場合、急性期脊髄損傷の予後が不良であると予測する。

【選択図】 図3



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

miR-9\*、miR-219、及びmiR-384-5pの少なくとも何れか一つを有することを特徴とする急性期脊髄損傷の予後予測マーカー。

**【請求項 2】**

miR-9\*、miR-219、及びmiR-384-5pからなることを特徴とする請求項 1 に記載の急性期脊髄損傷の予後予測マーカー。

**【請求項 3】**

被験者の脊髄損傷の急性期におけるmiR-9\*、miR-219、又はmiR-384-5pの発現量を健常者の対応するmiRの発現量とを比較して、その差異の程度から予後が良好又は不良であると予測することを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の急性期脊髄損傷の予後予測マーカー。

10

**【請求項 4】**

受傷後3時間～24時間の被験者のmiR-9\*の発現量を検出し、

受傷後3時間では、被験者のmiR-9\*の発現量が健常者のmiR-9\*の発現量と比較して25倍未満の場合、急性期脊髄損傷の予後が良好であると予測し、

被験者のmiR-9\*の発現量が健常者のmiR-9\*の発現量と比較して25倍以上の場合、急性期脊髄損傷の予後が不良であると予測すること、

また、受傷後12～24時間では、被験者のmiR-9\*の発現量が健常者のmiR-9\*の発現量と比較して10倍未満の場合、急性期脊髄損傷の予後が良好であると予測し、

20

被験者のmiR-9\*の発現量が健常者のmiR-9\*の発現量と比較して10倍以上の場合、急性期脊髄損傷の予後が不良であると予測することを特徴とする請求項 1 乃至 3 の何れか 1 項に記載の急性期脊髄損傷の予後予測マーカー。

**【請求項 5】**

受傷後12時間～24時間の被験者のmiR-219の発現量を検出し、

受傷後12時間では、被験者のmiR-219の発現量が健常者のmiR-219の発現量と比較して10倍未満の場合、急性期脊髄損傷の予後が良好であると予測し、

被験者のmiR-219の発現量が健常者のmiR-219の発現量と比較して10倍以上の場合、急性期脊髄損傷の予後が不良であると予測すること、

また、受傷後24時間では、被験者のmiR-219の発現量が健常者のmiR-219の発現量と比較して3倍未満の場合、急性期脊髄損傷の予後が良好であると予測し、

30

被験者のmiR-219の発現量が健常者のmiR-219の発現量と比較して3倍以上の場合、急性期脊髄損傷の予後が不良であると予測することを特徴とする請求項 1 乃至 3 の何れか 1 項に記載の急性期脊髄損傷の予後予測マーカー。

**【請求項 6】**

受傷後3時間～12時間の被験者のmiR-384-5pの発現量を検出し、

受傷後3時間では、被験者のmiR-384-5pの発現量が健常者のmiR-384-5pの発現量と比較して25倍未満の場合、急性期脊髄損傷の予後が良好であると予測し、

被験者のmiR-384-5pの発現量が健常者のmiR-384-5pの発現量と比較して25倍以上の場合、急性期脊髄損傷の予後が不良であると予測すること、

40

また、受傷後12時間では、被験者のmiR-384-5pの発現量が健常者のmiR-384-5pの発現量と比較して10倍未満の場合、急性期脊髄損傷の予後が良好であると予測し、

被験者のmiR-384-5pの発現量が健常者のmiR-384-5pの発現量と比較して10倍以上の場合、急性期脊髄損傷の予後が不良であると予測することを特徴とする請求項 1 乃至 3 の何れか 1 項に記載の急性期脊髄損傷の予後予測マーカー。

**【請求項 7】**

前記発現量の検出は、PCR法による検出であることを特徴とする請求項 3 乃至 6 の何れか 1 項に記載の急性期脊髄損傷の予後予測マーカー。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】**

50

## 【 0 0 0 1 】

本発明は、急性期脊髄損傷の予後予測マーカーに関する。

## 【 背景技術 】

## 【 0 0 0 2 】

転落や交通事故などの外傷によって起こる脊髄損傷では、四肢の運動や感覚機能が失われるため、日常生活に重大な障害を来す。さらに高齢化に伴って、転倒などの軽微な外傷でも脊髄損傷を来す患者が増加している。これまで脊髄損傷に対して唯一保険適用が認められていたステロイド大量療法は、その有効性が疑問視されるようになり、さらに重篤な副作用を起こすリスクの高さから、徐々に臨床における適用が減少傾向であり、現時点の臨床において脊髄損傷に対する確立された治療法は存在しない。しかし、脊髄損傷の治療開発研究は盛んに行われており、少なくとも脊髄損傷後の急性期～亜急性期では、実験的に有効性を示す治療アプローチが数多く報告されており、急性期脊髄損傷に対する顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）の投与をはじめとする臨床研究も開始されている。一方、基礎研究においても慢性期では有効な治療法がほとんど存在せず、脊髄損傷急性期における治療の実現性が最も高いと言える。

10

## 【 0 0 0 3 】

しかし、数多くの治療アプローチが研究され、実験的に有効性が明らかになっているにも関わらず、臨床での新規治療が普及しない原因の一つとして、急性期における脊髄損傷の予後予測が困難であることが挙げられる。脊髄損傷の重症度は四肢における運動・感覚の麻痺の程度で評価されるが、急性期において四肢麻痺が重篤であっても、その後の経過で麻痺が自然に回復する症例と回復しない症例が存在する。つまり、脊髄損傷急性期に治療介入して四肢麻痺の回復が得られても、その回復が治療の効果であるのか自然回復であるのか明らかにすることが非常に難しく、治療の有効性をなかなか証明できないのが現状である。実際の臨床における脊髄損傷の麻痺の程度やその後の回復パターンは様々であり、治療の有効性を統計学的に証明するためには非常に大規模な臨床研究が必要になるという問題がある。

20

## 【 0 0 0 4 】

そこで、急性期に予後を予測するための新しい検査方法の開発が求められており、最近では血液バイオマーカーにも注目が集まっている。これまでに脊髄損傷のバイオマーカーとして、神経特異的な蛋白であるpNF-Hの血液中への流出をとらえる方法が唯一報告されている（非特許文献1，非特許文献2）。

30

## 【 0 0 0 5 】

しかし、この方法は蛋白をELISA法で検出する方法であるが、完全麻痺と不全麻痺との鑑別はできるものの、不全麻痺の中での軽症と重症との鑑別は困難なことが報告されており、その感度は高いとは言えない。また、その血中への流出には神経損傷の程度だけでなく、血液脊髄関門の機能にも影響をうけるという問題がある。さらに、完全麻痺と不全麻痺との鑑別が可能なタイミングも損傷後18時間以降であり、ステロイド大量療法の様に損傷後8時間をゴールデンタイムとするような急性期の治療のためのバイオマーカーとして有用性が高いとは言えない。

## 【 先行技術文献 】

40

## 【 非特許文献 】

## 【 0 0 0 6 】

【 非特許文献 1 】 Ueno T et al. "Hyperphosphorylated neurofilament NF-H as a biomarker of the efficacy of minocycline therapy for spinal cord injury" Spinal Cord 49(3):333-336, 2011

【 非特許文献 2 】 Hayakawa K et al. "Phosphorylated neurofilament subunit NF-H as a biomarker for evaluating the severity of spinal cord injury patients, a pilot study" Spinal Cord 50(7):493-496, 2012

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

50

## 【 0 0 0 7 】

本発明はかかる問題点に鑑みてなされたものであって、脊髄損傷後急性期であっても高感度な予後予測を可能とする急性期脊髄損傷の予後予測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 】

## 【 0 0 0 8 】

本発明にかかる急性期脊髄損傷の予後予測マーカーは、miR-9\*、miR-219、及びmiR-384-5pの少なくとも何れか一つを有することを特徴とする。

## 【 発明の効果 】

## 【 0 0 0 9 】

本発明にかかるバイオマーカーによれば、脊髄損傷後急性期に高感度に予後予測が可能である。

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 1 0 】

【 図 1 】 脊髄損傷後の後肢機能評価を示すBMSスコア図である。

【 図 2 】 血清中のマイクロRNAの網羅的解析を示す図である。

【 図 3 】 ( a ) はmiR-9\*の血清での経時的発現変化を示す図であり、( b ) はmiR-219の血清での経時的発現変化を示す図である。

【 図 4 】 miR-384-5pの血清での経時的発現変化を示す図である。

【 図 5 】 ( a ) は炎症に関連が深いmiR-146a-5pの発現を示す図であり、( b ) は炎症に関連が深いmiR-155の発現を示す図である。

## 【 発明を実施するための形態 】

## 【 0 0 1 1 】

以下、添付の図面を参照して本発明の実施形態について具体的に説明するが、当該実施形態は本発明の原理の理解を容易にするためのものであり、本発明の範囲は、下記の実施形態に限られるものではなく、当業者が以下の実施形態の構成を適宜置換した他の実施形態も、本発明の範囲に含まれる。

## 【 0 0 1 2 】

本発明にかかる急性期脊髄損傷の予後予測マーカーは、miR-9\*、miR-219、及びmiR-384-5pの少なくとも何れか一つを有する。急性期脊髄損傷の予後予測は、miR-9\*、miR-219、及びmiR-384-5pの何れか一つを検出することにより可能であるが、より正確に予後予測をするためにはmiR-9\*、miR-219及びmiR-384-5pの全てを検出することが好ましい。

## 【 0 0 1 3 】

脊髄損傷は、脊柱に強い外力が加えられることにより脊椎を損壊し、脊髄に損傷をうける病態であり、本発明における脊髄損傷には、脊髄が横断的に離断して神経伝達機能が完全に絶たれた状態である完全型脊髄損傷と、脊髄の一部が損傷、圧迫等を受けて一部機能が残存するものである不完全型脊髄損傷との双方が含まれる。本発明における急性期脊髄損傷において、急性期とは、一般的に受傷後3~4週間以内と考えられている。

## 【 0 0 1 4 】

miR-9\*は、下記に示す配列を有している。

## 【 0 0 1 5 】

AUAAAGCUAGUAACCGAAAGU・・・(配列番号1)

miR-219は、下記に示す配列を有している。

## 【 0 0 1 6 】

UGAUUGUCCAAACGCAAUUCU・・・(配列番号2)

miR-384-5pは、下記に示す配列を有している。

## 【 0 0 1 7 】

UGUAAACAAUCCUAGGCAAUGU・・・(配列番号3)

本発明にかかるバイオマーカーは、miR-9\*、miR-219及びmiR-384-5pのいずれも小さな塩基配列であり、細胞からエクソソームに包まれて末梢血中へ放出される際に血液脊髄関

10

20

30

40

50

門を素通りでき、血液脊髄関門損傷を原因とする血中流出の虞が少ないため、血液脊髄関門の影響を受けず、脊髄組織損傷の状態をダイレクトに反映させることが可能となる。またPCR法による高感度測定が可能であることから高感度なマーカーである。

【0018】

miR-9\*、miR-219又はmiR-384-5pの発現量の測定は、特に限定されるものではなく、単にmiR-9\*、miR-219又はmiR-384-5pの有無を検出するものであってもよく、またmiR-9\*、miR-219又はmiR-384-5pの発現量を相対的又は絶対的に決定するものでもよい。

【0019】

本発明者らは、脊髄損傷の急性期において、被験者の血中のmiR-9\*、miR-219、及びmiR-384-5pの発現量が健常者の血中の対応するmiRの発現量と比較して増大しており、その被験者の血中のmiR-9\*、miR-219、及びmiR-384-5pの発現量の程度を検出することにより急性期脊髄損傷の予後を予測できることを新知見として見だし、かかる事実に基づいて本発明を完成させた。

10

【0020】

即ち、後述の実施例にて示されているように、健常なマウス群（Normal）、軽度の脊髄損傷を加えたマウス群（50kdyn）、強度の脊髄損傷を加えたマウス群（70kdyn）を用い、real-time PCRにてmiR-9\*、miR-219、及びmiR-384-5pの発現量につき経時的な発現を評価したところ、軽度の脊髄損傷を加えたマウス群（50kdyn）及び強度の脊髄損傷を加えたマウス群（70kdyn）の何れにおいても、健常なマウス群（Normal）よりmiR-9\*、miR-219、及びmiR-384-5pの発現量が増加しており、更に、強度の脊髄損傷を加えたマウス群（70kdyn）は軽度の脊髄損傷を加えたマウス群（50kdyn）よりもmiR-9\*、miR-219、及びmiR-384-5pの発現量が増大していることを見いだした。

20

【0021】

この事実により、本発明においては、被験者の脊髄損傷の急性期におけるmiR-9\*、miR-219、又はmiR-384-5pの発現量を測定し、miR-9\*、miR-219、又はmiR-384-5pの発現量が、所定値未満の場合は急性期脊髄損傷の予後が良好であると判断可能であり、一方、所定値以上の場合は急性期脊髄損傷の予後が不良であると判断することが可能である。なお、ここで健常者とは、脊髄損傷状態が発生しておらず、更に特定の疾患も抱えておらず、日常生活行動に支障のない人を意味する。

【0022】

具体的には、miR-9\*の場合、受傷後3時間～24時間の被験者のmiR-9\*の発現量を検出し、受傷後3時間では、被験者のmiR-9\*の発現量が健常者のmiR-9\*の発現量と比較して25倍未満の場合、急性期脊髄損傷の予後が良好であると予測し、被験者のmiR-9\*の発現量が健常者のmiR-9\*の発現量と比較して25倍以上の場合、急性期脊髄損傷の予後が不良であると予測する。受傷後12～24時間では、被験者のmiR-9\*の発現量が健常者のmiR-9\*の発現量と比較して10倍未満の場合、急性期脊髄損傷の予後が良好であると予測し、被験者のmiR-9\*の発現量が健常者のmiR-9\*の発現量と比較して10倍以上の場合、急性期脊髄損傷の予後が不良であると予測する。

30

【0023】

また、miR-219の場合、受傷後12時間～24時間の被験者のmiR-219の発現量を検出し、受傷後12時間では、被験者のmiR-219の発現量が健常者のmiR-219の発現量と比較して10倍未満の場合、急性期脊髄損傷の予後が良好であると予測し、被験者のmiR-219の発現量が健常者のmiR-219の発現量と比較して10倍以上の場合、急性期脊髄損傷の予後が不良であると予測する。受傷後24時間では、被験者のmiR-219の発現量が健常者のmiR-219の発現量と比較して3倍未満の場合、急性期脊髄損傷の予後が良好であると予測し、被験者のmiR-219の発現量が健常者のmiR-219の発現量と比較して3倍以上の場合、急性期脊髄損傷の予後が不良であると予測する。

40

【0024】

また、miR-384-5pの場合、受傷後3時間～12時間の被験者のmiR-384-5pの発現量を検出し、受傷後3時間では、被験者のmiR-384-5pの発現量が健常者のmiR-384-5pの発現量と比

50

較して25倍未満の場合、急性期脊髄損傷の予後が良好であると予測し、被験者のmiR-384-5pの発現量が健常者のmiR-384-5pの発現量と比較して25倍以上の場合、急性期脊髄損傷の予後が不良であると予測する。受傷後12時間では、被験者のmiR-384-5pの発現量が健常者のmiR-384-5pの発現量と比較して10倍未満の場合、急性期脊髄損傷の予後が良好であると予測し、被験者のmiR-384-5pの発現量が健常者のmiR-384-5pの発現量と比較して10倍以上の場合、急性期脊髄損傷の予後が不良であると予測する。

【0025】

なお、本発明にかかる急性期脊髄損傷の予後予測マーカーの中で、特にmiR-9\*及びmiR-219のようなマイクロRNAの塩基配列は種を越えて完全に保存されており、動物を用いた実験結果がヒトに反映されやすいという利点も備えている。

【実施例】

【0026】

マウスの脊髄損傷モデルを用いた血中バイオマーカーの実験を行った。脊髄損傷は第10胸椎椎弓を切除し、圧センサー付きの専用のインパクトを用いて、一定の圧力で脊髄を挫滅させることで作製した。次の4群を作製した(それぞれをn=8)。1. 全く何もしない群(Normal)、2. 椎弓切除のみを行った群(Sham)、3. 50kdynの圧で挫滅した群(50kdyn)、4. 70kdynの圧で挫滅した群(70kdyn)。

【0027】

それぞれの歩行時の後肢の動きをBasso Mouse Scale (BMS)を用いて評価した。BMSとは、マウスの脊髄損傷モデルにおける歩行時の後肢の動きを9点満点で点数化した評価基準であり、具体的な評価は下記に示す通りとした。

【0028】

- 0点 全く足関節が動かない
- 1点 少し足関節が動く
- 2点 良く足関節が動く
- 3点 足底を地面につける又は足背でステップする
- 4点 足底でときどきステップする
- 5点 頻繁に足底でステップするが前肢との協調運動がない
- 6点 頻繁に足底でステップし、ときどき前肢との協調運動がある
- 7点 頻繁に足底でステップし、ほとんど前肢との協調運動がある  
ひどい体幹の不安定性がある
- 8点 頻繁に足底でステップし、ほとんど前肢との協調運動がある  
軽い体幹の不安定性がある
- 9点 正常

それぞれの歩行時の後肢の動きをBMSにて損傷3時間後から損傷42日まで経時的に評価したところ、Normal群やSham群では全く動きに異常がなかったが(スコアが9点満点)、50kdyn群では3時間後には後肢が全く動かず、12時間以降から徐々に回復を認めたが、最終的なスコアは7点程度であった。さらに、70kdyn群では損傷後12時間まで後肢が全く動かず、24時間後より徐々に回復したものの常に50kdyn群よりも機能は下回り、最終的なスコアは4点程度であった(図1)。

【0029】

これらのマウスにおいて損傷12時間後に末梢血を採取し、血清からRNAを抽出した。マイクロRNAのアレイカードを用いて主要なマイクロRNAを網羅的に評価したところ、Normal群とSham群で発現量がほとんど変わらずに、50kdyn群で発現量が上昇し、70kdyn群でさらに発現量が多いバイオマーカーの候補をmiR-9\*, miR-219, miR-384-5pの3つに絞った(図2)。

【0030】

さらにreal-time PCRを用いてこれらのマイクロRNAの経時的な発現を評価したところ、図3(a)に示すようにmiR-9\*は損傷後3時間、12時間及び24時間で70kdyn, 50kdyn, shamの順に発現量が有意に高く、図3(b)に示すようにmiR-219は損傷後12時間、24時間で

10

20

30

40

50

同様の傾向を示した。またmiR-384-5pは損傷後3時間、12時間で同様の傾向を示した（図4）。

【0031】

これらのマイクロRNAの発現はNormal群とSham群との間で有意差が無いことから、筋肉や骨の損傷による炎症に関連した反応は示さないことが分かる。さらに炎症に関連が深いと報告されているmiR-146a-5pやmiR-155の発現も評価した。図5（a）に示すようにmiR-146a-5pについては同様の傾向は示さなかった。また図5（b）に示すようにmiR-155についても同様の傾向は示さなかった。このようにmiR-9\*、miR-219、miR-384-5pの上昇は炎症に反応したのではなく、脊髄損傷に特異的に反応したものと考えられた。

【0032】

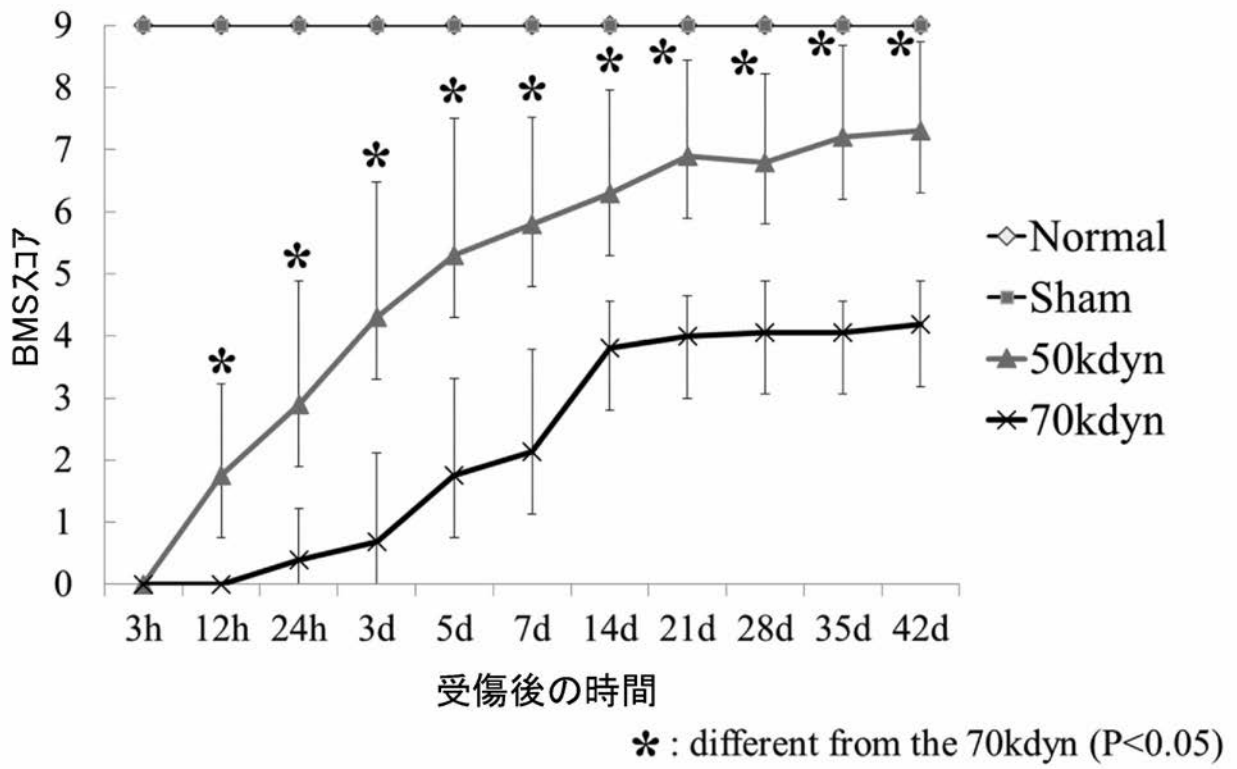
これらのことから、miR-9\*、miR-219及びmiR-384-5pは急性期脊髄損傷の予後予測バイオマーカーとして有望であり、今後の脊髄損傷治療の開発に寄与すると考えられる。

【産業上の利用可能性】

【0033】

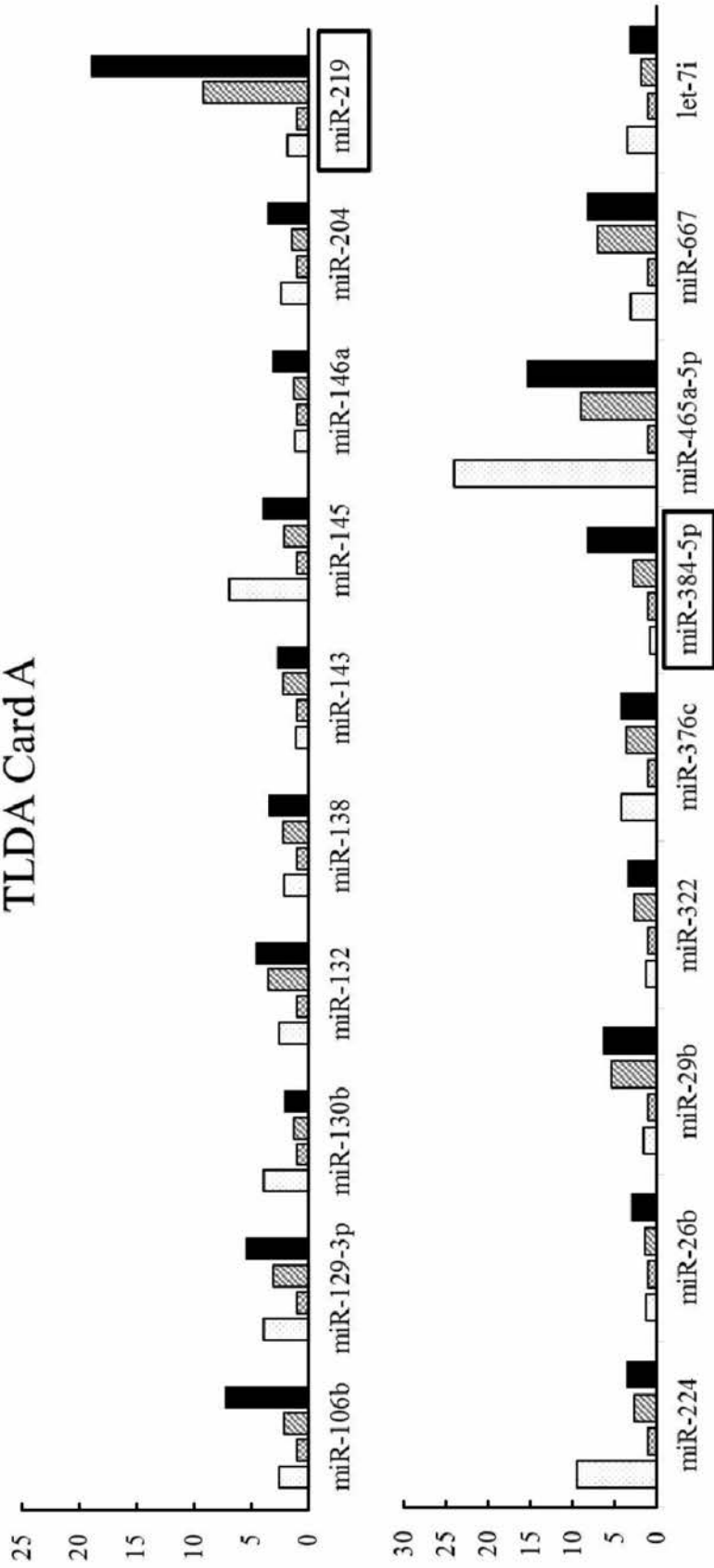
急性期脊髄損傷の予後予測マーカーとして利用できる。

【 図 1 】

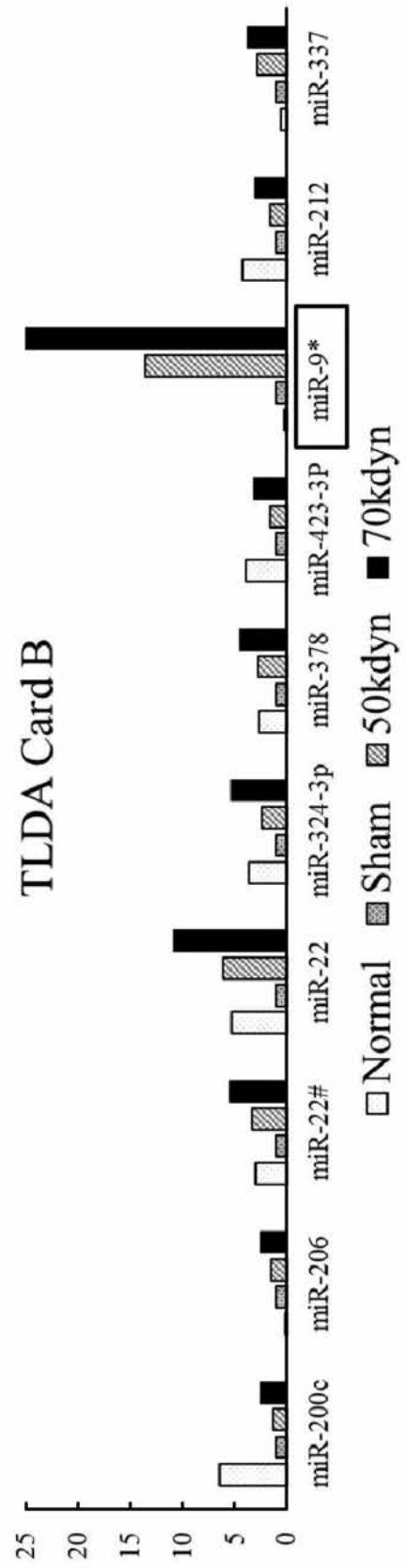




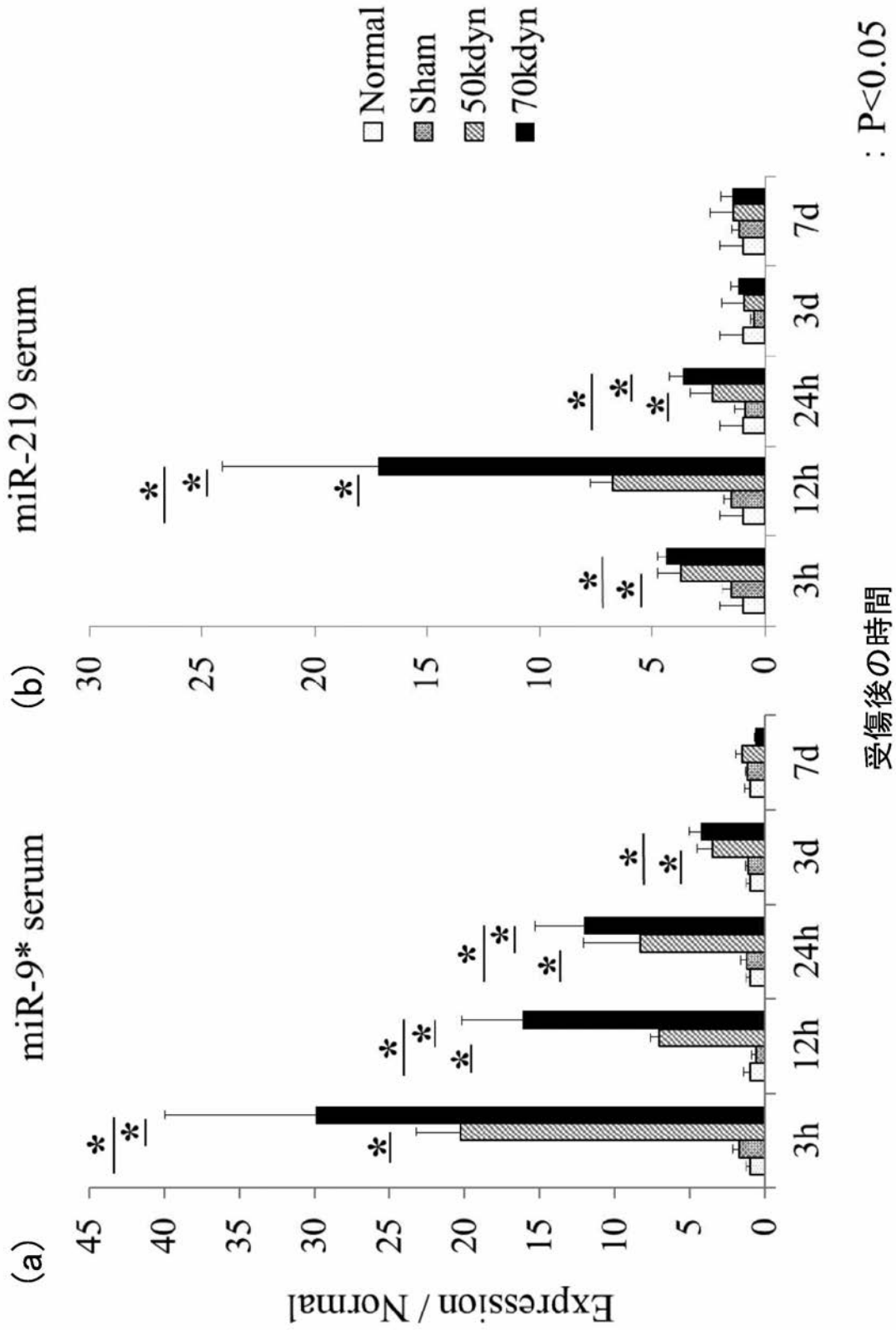
### TLDA Card A



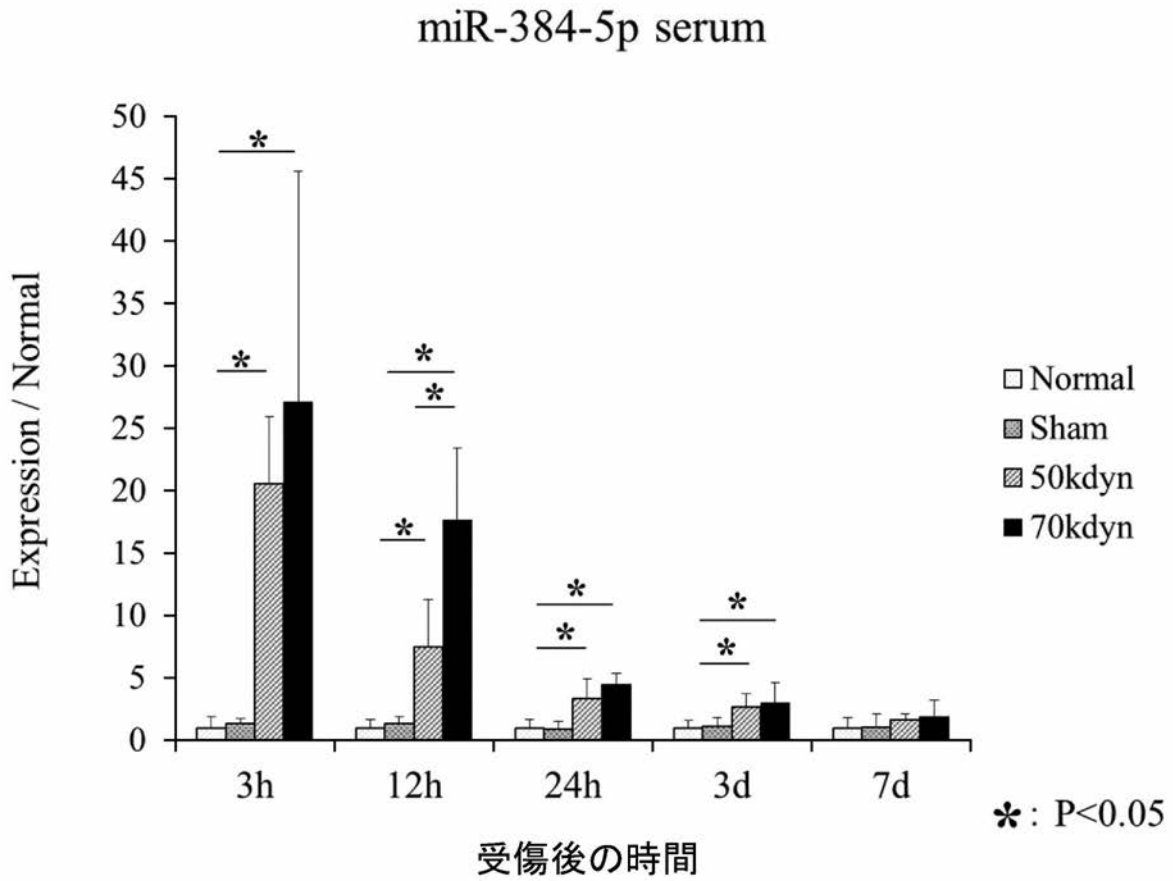
### TLDA Card B



【 図 3 】



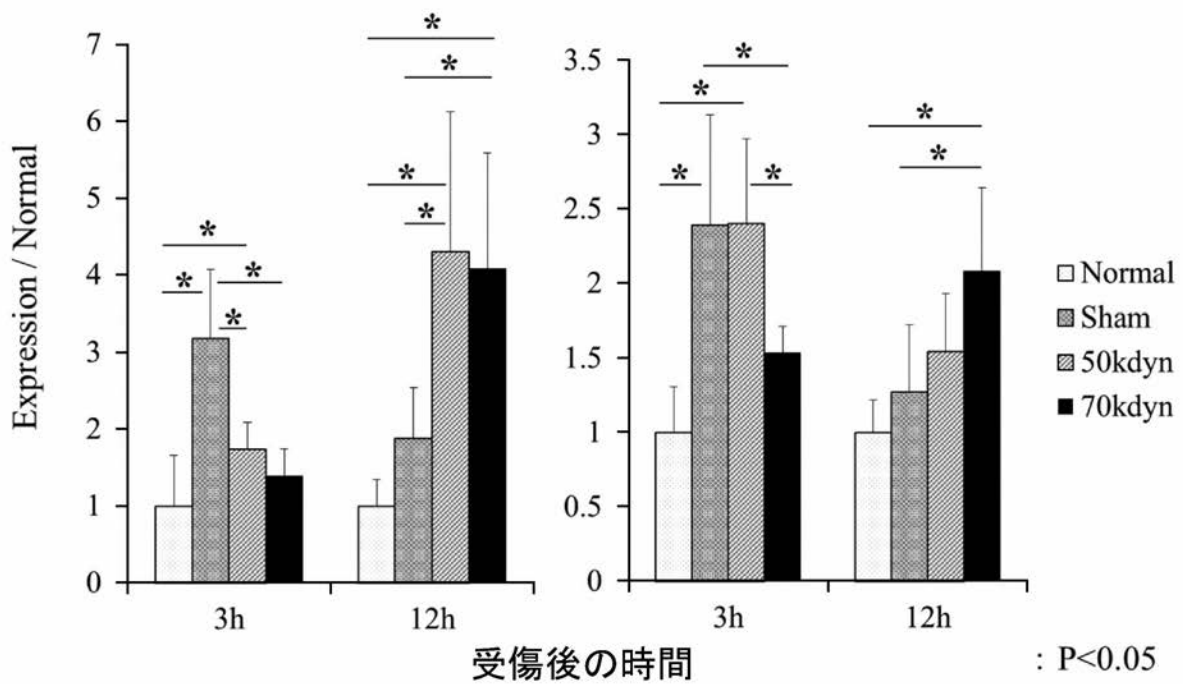
【 図 4 】



【 図 5 】

(a) miR-146a-5p serum

(b) miR-155 serum



【 配列表 】

---

フロントページの続き

(72)発明者 蜂須賀 晋

広島県広島市南区霞一丁目2番3号 国立大学法人広島大学大学院医歯薬保健学研究科内

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA11 CA20 HA11

4B063 QA01 QA05 QA13 QA19 QQ03 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55

QR62 QS25 QX01