

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4111482号  
(P4111482)

(45) 発行日 平成20年7月2日(2008.7.2)

(24) 登録日 平成20年4月18日(2008.4.18)

(51) Int.Cl. F I  
**C 1 2 N 15/09 (2006.01)** C 1 2 N 15/00 Z N A A  
**C 1 2 Q 1/68 (2006.01)** C 1 2 N 15/00 F  
 C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 7 (全 8 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2001-167331 (P2001-167331)</p> <p>(22) 出願日 平成13年6月1日(2001.6.1)</p> <p>(65) 公開番号 特開2002-355049 (P2002-355049A)</p> <p>(43) 公開日 平成14年12月10日(2002.12.10)</p> <p>審査請求日 平成14年10月31日(2002.10.31)</p> <p>前置審査</p>	<p>(73) 特許権者 899000057                  学校法人日本大学                  東京都千代田区九段南四丁目8番24号</p> <p>(74) 代理人 100101591                  弁理士 川俣 静子</p> <p>(72) 発明者 中山 智祥                  東京都千代田区九段南四丁目8番24号日                  本大学内</p> <p>審査官 田中 耕一郎</p>
---	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 循環器疾患の遺伝的要因を判定するための方法及びこれに使用されるオリゴヌクレオチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料から核酸を抽出し、配列表の配列番号 1 に示されるヒトナトリウム利尿ペプチド A 型受容体遺伝子のエキソン 3 (配列中、s は g または c を表す) の塩基番号 102 の部位を含む配列を増幅し、得られた増幅産物を分析することにより塩基番号 102 の部位が g か c かを決定することを含む本態性高血圧症または虚血性心疾患の遺伝的要因を判定するための方法。

【請求項 2】

配列番号 1 の配列 (配列中、s は g または c を表す) の一部であって、配列番号 1 の塩基番号 102 の部位を含んで連続する少なくとも 15 塩基の配列またはこれに相補的な配列からなる、請求項 1 記載の方法においてプローブとして使用されるオリゴヌクレオチド

10

【請求項 3】

請求項 1 記載の方法においてプライマーとして使用される配列番号 2 または 3 の配列からなるオリゴヌクレオチド。

【請求項 4】

配列番号 1 の配列 (配列中、s は g または c を表す) の一部であって配列番号 1 の塩基番号 102 の部位を含んで連続する少なくとも 16 塩基の配列を、1 塩基または数塩基の置換、欠失、付加を導入することにより、102 の部位が g または c のいずれか一方である場合にのみ特定の制限酵素による認識配列が生じるように増幅するための少なくとも 1

20

5塩基の配列からなる請求項1記載の方法においてプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチド。

【請求項5】

配列番号1の配列(配列中、sはgまたはcを表す)の一部であって配列番号1の塩基番号102の部位を含んで連続する少なくとも16塩基の配列を増幅するための、配列番号1の配列(配列中、sはgまたはcを表す)またはその上流領域の配列の連続する少なくとも15塩基の配列、または配列番号1の配列(配列中、sはgまたはcを表す)またはその下流領域の配列の連続する少なくとも15塩基の配列に相補的な配列からなる請求項1記載の方法においてプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチド。

【請求項6】

少なくとも、請求項2に記載のオリゴヌクレオチドの一またはそれ以上が基板に固定化されている請求項1の方法に使用されるDNAチップ。

【請求項7】

少なくとも、請求項2～5のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドの一またはそれ以上、及び/または請求項6に記載のDNAチップを含む請求項1の方法に使用されるキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明は循環器疾患の遺伝的要因を検出するための方法及びこれに使用されるオリゴヌクレオチドに関する。

【0002】

【従来の技術】

循環器疾患の発病には、いくつかの遺伝的因子と生活習慣等の非遺伝的因子とが関わっていると考えられる。

従って、循環器疾患を発病する可能性の高い遺伝的因子が明らかになれば、発病のメカニズムの解明に大きな役割を果たすと共に、その遺伝的因子の判定により循環器疾患に罹患する可能性の高い患者に対し、生活習慣等の非遺伝的因子を最小限とする指導を行い、発病の危険性を著しく低下させ得ると考えられる。

本発明の発明者は、22個のエキソンを有するヒトナトリウム利尿ペプチドA型受容体遺伝子のエキソン3における多型が、循環器疾患の発症に関連することを見出し、本発明を完成させた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明の目的は、ヒトナトリウム利尿ペプチドA型受容体遺伝子の多型の分析により循環器疾患の遺伝的要因を判定する方法を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】

第1に、本発明は、下記の方法に関する。

(1) 試料から核酸を抽出し、配列表の配列番号1に示されるヒトナトリウム利尿ペプチドA型受容体遺伝子のエキソン3(配列中、sはgまたはcを表す)の塩基番号102の部位を含む配列を増幅し、得られた増幅産物を分析することにより塩基番号102の部位がgかcかを決定することを含む循環器疾患の遺伝的要因を判定するための方法。

配列番号1に示す配列は、ヒトナトリウム利尿ペプチドA型受容体遺伝子のエキソン3の全配列であり、本発明の方法においては、該配列の塩基番号102の塩基がgであるかcであるかを検出し、c/cである場合及びcアレルを有する場合に循環器疾患に罹患する可能性が高いと判断する。

また、本発明は下記の方法のオリゴヌクレオチドに関する。

(2) 配列番号1の配列(配列中、sはgまたはcを表す)の一部であって、配列番号1の塩基番号102の部位を含んで連続する少なくとも10塩基の配列にハイブリダイズ

10

20

30

40

50

し得る(1)の方法においてプローブとして使用されるオリゴヌクレオチド。

(3) 配列番号1の配列(配列中、sはgまたはcを表す)の一部であって、配列番号1の塩基番号102の部位を含んで連続する少なくとも10塩基の配列を増幅するためのフォワードプライマーまたはリバースプライマーとして機能し得る(1)の方法に使用されるオリゴヌクレオチド。

(4) 配列番号1の配列(配列中、sはgまたはcを表す)の一部であって、配列番号1の塩基番号102の部位を含んで連続する少なくとも10塩基の配列を、1塩基または数塩基の置換、欠失、付加を導入することにより、102の部位がgまたはcのいずれか一方である場合にのみ特定の制限酵素による認識配列が生じるように増幅するためのフォワードプライマーまたはリバースプライマーとして機能し得る(1)の方法に使用されるオリゴヌクレオチド。

10

(5) (1)の方法に使用されるフォワードプライマーとリバースプライマーとして機能する一組のオリゴヌクレオチドであって、フォワードプライマーまたはリバースプライマーの一方が配列番号1の配列(配列中、sはgまたはcを表す)の一部であって、配列番号1の塩基番号102の部位を含んで連続する配列にハイブリダイズすることができ、他方が配列番号1の配列の他の部分にハイブリダイズすることができる一組のオリゴヌクレオチド。

さらに、本発明は、少なくとも、(2)のオリゴヌクレオチドの一またはそれ以上が基板に固定化されている(1)の方法に使用されるDNAチップに関する。

【0005】

20

また、本発明は、少なくとも、(2)~(5)のオリゴヌクレオチドの一またはそれ以上、及び/または上記DNAチップを含む(1)の方法に使用されるキットに関する。

なお、上記において、オリゴヌクレオチドは適宜標識されたものであってもよい。

【0006】

【発明の実施の形態】

本発明において、「循環器疾患の遺伝的要因を判定する」とは、被験者が循環器疾患の発症の危険性が高いことを示す対立遺伝子型を有するか否かを判定することを意味する。

すなわち、本発明の方法においては、該配列の塩基番号102の塩基がgであるかcであるかを検出し、特に、遺伝子型がc/cである場合及びcアレルを有する場合に循環器疾患が発症する可能性が高いと判定される。また、本発明において「循環器疾患」には、本態性高血圧症、脳梗塞、心筋梗塞及び狭心症等の虚血性心疾患等が含まれる。

30

上記、本発明の判定方法において、ヒトナトリウム利尿ペプチドA型受容体遺伝子(以下、場合よりNPR A遺伝子と記す)における多型の分析は、例えば多型を含む部分の配列を増幅し、対立遺伝子型を分析することからなる。また、ゲノムDNAの分析であっても、cDNAまたはmRNAの分析であってもよい。

本発明において使用される試料は、任意の生物学的試料、例えば血液、毛髪、組織片、尿等であり得る。

【0007】

(増幅)

多型を含む部分の増幅は、例えばPCRによって行われるが、他の公知の増幅方法、例えばNASBA、LCR、RCR等で行ってもよい。

40

プライマーの選択は、例えば、多型部分を含む10塩基以上の配列を増幅するように行い得る。増幅される配列は、10~100塩基、好ましくは10~50塩基であり得る。

また、プライマーは、試料が一の対立遺伝子型の場合にのみ増幅されるように、フォワードプライマー(以下、Fプライマーと記す)またはリバースプライマー(以下、Rプライマーと記す)の一方が多型部位にハイブリダイズするように選択してもよい。

プライマーは必要に応じて蛍光、RI等の適当な手段により標識され得る。

【0008】

(多型の分析)

多型の分析は、公知の方法を適宜選択して行い得る。分析方法の例を下記に示す。

50

#### a . ハイブリダイゼーション

多型の分析は、一の対立遺伝子型に特異的なプローブとのハイブリダイゼーションにより行うことができる。

プローブは、必要に応じて、蛍光、RI等の適当な手段により標識され得る。

プローブは、例えば多型部分を含む10塩基以上、好ましくは10~100塩基、より好ましくは10~50塩基の配列にハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチドである。また、多型部位がプローブのほぼ中心部に存在するようにプローブを選択するのが好ましい。本発明において、ハイブリダイゼーション条件は、対立遺伝子型を区別するのに十分な条件である。例えば、試料が一の対立遺伝子型の場合にはハイブリダイズするが、他の対立遺伝子型の場合にはハイブリダイズしないような条件、例えばストリンジェントな条件である。

10

本発明の方法においては、プローブの一端を基板上に固定化してなるDNAチップを用いてもよい。

#### 【0009】

#### b . 制限酵素断片長多型を利用する方法

多型の分析は、制限断片長多型を利用して行うこともできる。この方法は、多型部位がいずれの遺伝子型をとるかによって、制限酵素により切断されるか否かが異なってくる制限酵素で試料核酸を消化し、消化物の断片の大きさを調べることにより、該制限酵素で試料核酸が切断されたか否かを調べ、それによって試料の多型を分析する方法である。

この場合、もとの配列に制限部位がなくても、増幅工程で1もしくは数塩基が置換されるようにプライマーを選択し、上記配列においてsがgかcのいずれか一方である場合に、増幅産物において制限部位が提供されるようにしてもよい。

20

#### c . 配列決定

多型の分析を、増幅産物の配列決定により行ってもよい。

配列決定は、例えばジデオキシ法、Maxam-Gilbert法等の公知の方法により行い得る。

#### d . 変性勾配ゲル電気泳動

試料DNAまたはRNAの増幅産物を変性勾配ゲル電気泳動にかけることにより分析することもできる。

#### e . その他

SSCP (single-strand conformation polymorphism) 法、Allele Specific PCR法等を多型の分析に使用することもできる。

30

#### 【0010】

本発明は、上記多型の分析方法により分析した結果を、所望により他の多型分析、及び/または他の検査結果と合わせて、循環器疾患に罹患する可能性を判断することを含む循環器疾患の診断方法にも関する。また、本発明は、本態性高血圧症、脳梗塞、心筋梗塞、狭心症等の循環器疾患がナトリウム利尿ペプチドA型受容体に関連するものであるか否かを判定することを含む診断方法をも提供する。上記方法において、いくつかのヒトナトリウム利尿ペプチドA型受容体遺伝子の多型分析を組み合わせて利用することも可能である。さらに、上記方法において循環器疾患に関連する他の多型分析を組み合わせて利用することも可能である。

40

また、本発明は、上記診断方法による診断の結果に基づいて、さらに精密な検査を行うこと、投与すべき医薬を決定すること、循環器疾患の治療を行うこと、及び/または食餌内容等の生活習慣の改善を指導することを含む循環器疾患の予防または治療方法をも提供する。

#### 【0011】

上記本発明の方法においては、プライマーとして、配列番号1の配列(配列中、sはgまたはcを表す)の一部であって、配列番号1の塩基番号102の部位を含んで連続する少なくとも10塩基、好ましくは10~50塩基、例えば15~30塩基の配列を増幅するためのFプライマーまたはRプライマーとして機能し得るオリゴヌクレオチド、またはFプライマーとRプライマーからなる一組のプライマーであって、FプライマーまたはRプ

50

ライマーの一方が配列番号1の配列（配列中、sはgまたはcを表す）の一部であって、配列番号1の塩基番号102の部位を含んで連続する少なくとも10塩基、好ましくは10～50塩基、例えば15～30塩基の配列にハイブリダイズし、他方が配列番号1の配列の他の部分の少なくとも10塩基、好ましくは10～50塩基、例えば15～30塩基の配列にハイブリダイズする一組のプライマーを使用することができる。

#### 【0012】

この場合、PCR条件は、例えば下記のものであり得る。

プライマー濃度：0.1～1.0 μM

MgCl<sub>2</sub>濃度：0.7～1.5 μM

dNTP濃度：各100～200 μM

至適酵素量：0.5～2.5 U / 50 μl

鋳型ゲノムDNA量：50～500 ng

サイクル数：25～35サイクル

denature温度：94～99

denature時間：20～30秒

annealing温度：55～65

annealing時間：20～60秒間

extension温度：72～75

extension時間：20～180秒間

アガロースゲル濃度：0.4～2.0%

#### 【0013】

上記プライマーとしてのオリゴヌクレオチドは、配列番号1の配列の一部に相補的な配列を有していてもよく、また、上記プライマーとして機能し得る限り、該配列において1または数個の置換、欠失及び/または付加を含んでいてもよい。

上記方法においては、プローブとして配列番号1の配列（配列中、sはgまたはcを表す）の一部であって、配列番号1の塩基番号102の部位を含んで連続する少なくとも10塩基、好ましくは10～50塩基、例えば15～30塩基の配列にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを使用することができる。

該オリゴヌクレオチドは、配列番号1の配列の目的とする部位と相補的な配列を有していてもよく、またプローブとして機能し得る限り、即ち、目的の対立遺伝子型の配列とハイブリダイズするが、他の対立遺伝子型の配列とはハイブリダイズしない条件下でハイブリダイズする限り、該配列において1または数個の置換、欠失及び/または付加を含んでいてもよい。このプローブは、一端を各々基板に固定してなるDNAチップとして用いることもできる。この場合、DNAチップには、一の対立遺伝子型（即ちsがgまたはc）に対応するプローブのみが固定されていても、両方の対立遺伝子型に対応するプローブが固定されていてもよい。DNAチップには、本発明で検出できる多型と異なる多型を分析するためのプローブも共に固定され得る。

#### 【0014】

本発明は、上記で説明したプライマー、上記プローブとしてのオリゴヌクレオチド及び/または上記DNAチップを含む循環器疾患診断用キットにも関する。

キットは、さらに制限断片長多型法に使用される制限酵素、ポリメラーゼ、ヌクレオシド三リン酸、標識のための手段、緩衝液等、本発明の方法を実施するのに必要な他の要素を含んでいてもよい。

なお、本発明に使用されるプライマー及びプローブは市販のDNA合成機等により合成することができる。また、本発明において、ハイブリダイゼーションは、Sambrook, J. Fritsch, E.F., Maniatis T. (1989) Molecular Cloning. A laboratory manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New Yorkの記載を参考に行うことができる。また、PCR法は、下記の文献を参考に行うことができる：PCR Technology, J.A. Ehrlich編, Stockholm Press, New York (1989); Molecular Methods for Virus Detection, D.L. Wiedbrauk及びD.H. Farkas編, Academic Press, New York (1995)

10

20

30

40

50

. Nucleic Acid Hybridisation, B.D. Hames及びS.J. Higgins編, IRL Press, Oxford, Washington DC(1985) )。

本明細書において、塩基番号は添付の配列表に基づく。

【0015】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。しかしながら、これらは本発明を限定するものではない。

実施例 1

エキソン 3 の多型と循環器疾患との関連について調べるため、本態性高血圧と診断された患者 300 名、脳梗塞と診断された患者 138 名、心筋梗塞と診断された患者 187 名及び健常人 114 名を年齢を一致させて選択した。

各被験者の末梢血を採取し、標準方法(例えば Sambrook, J. Fritsch, E.F., Maniatis T. (1989) Molecular Cloning. A laboratory manual, 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York に記載)により、ゲノム DNA を抽出し、下記に示す方法によりナトリウム利尿ペプチド A 型受容体遺伝子のエキソン 3 の多型部位を増幅した。

200ng の上記ゲノム DNA、下記の配列を有する濃度 10 pmol/μl の F プライマー溶液及び R プライマー溶液各々 0.8 μl、ヌクレオチド三リン酸 (Takara 社製造) 各々 2.5 mM、2.5 mM の MgCl<sub>2</sub> 4 μl、Taq DNA ポリメラーゼ (Takara 社製) 0.2 U/40 μl、水 25.0 μl 及び 10 倍緩衝液 (Takara 社製) 4 μl の混合物計 40 μl の系にて、PCR 装置 (PerkinElmer GeneAmp9700) を用いて増幅した。PCR 条件は、95 で 3 分間、続いて 98 2.5 秒間、63 で 1 分間、72 で 1 分間のサイクルを 30 サイクル、その後、72 で 10 分間の後、4 に保温とした。

【0016】

プライマー配列

F プライマー : cccacagtactagggaaatagtcagc (配列番号 : 2)

R プライマー : taggaaggatggaggctggcagagg (配列番号 : 3)

得られた PCR 産物をエタノール沈殿により精製し、dry up ペレットにした後、制限酵素溶液 (10x 緩衝液 (第一化学) 5 μl、水 44 μl 及び制限酵素 Taq I (第一化学) 1 μl と反応させ、1.5% アガロースゲル電気泳動にかけた。

制限酵素 Taq I の認識配列は tcga であり、上記配列番号 1 の配列の塩基番号 102 の部位の塩基が c である場合は切断され、g である場合は切断されない。

上記の方法により、各試料を分析したところ、下記の表に示す結果が得られた。表中、g は上記配列番号 1 の配列の塩基番号 102 の部位が g である遺伝子型を意味し、c は、該塩基が c である遺伝子型を意味する。なお、被験者は全て日本人である。

【0017】

【表 1】

遺伝子型	健常者	本態性 高血圧症	脳梗塞	虚血性心疾患 (心筋梗塞・狭心症)
g/g	102	257	121	160
g/c	12	40	16	26
c/c	0	3	1	1

【0018】

従って、配列番号 1 の塩基番号 102 の遺伝子型が c/c である場合及び c アレルを有する場合に循環器疾患の発症の危険性が高いと判定することができる。

【0019】

## 【発明の効果】

本発明の方法により、循環器疾患の遺伝的要素を有するか否かが判定でき、これにより循環器疾患の危険性を予測することができる。さらに、その結果に基づき、食餌内容等の生活習慣の改善により循環器疾患の環境的要因を最低限に押さえる指導を行い、循環器疾患の予防または治療を行うことができる。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

〈110〉	Nihon university	
〈120〉	Method for determining genetic factor of circulatory organ disease and nucleotides used therefor	10
〈130〉	PANU007	
〈160〉	3	
〈210〉	1	
〈211〉	114	
〈212〉	DNA	
〈221〉	exon	20
〈400〉	1	
	gct gcc aaa atc att aca tat aaa gac cca gat aat ccc gag tac ttg	48
	gaa ttc ctg aag cag tta aaa cac ctg gcc tat gag cag ttc aac ttc	96
	acc ats gag gat ggc ctg	114
〈210〉	2	
〈211〉	25	
〈212〉	DNA	30
〈213〉	Artificial Sequence	
〈400〉	2	
	cccacagtac tagggaatag tcagc	25
〈210〉	3	
〈211〉	25	
〈212〉	DNA	
〈213〉	Artificial Sequence	40
〈400〉	3	
	taggaaggat ggaggctggc agagg	25

---

フロントページの続き

- (56)参考文献 Biochem. Biophys. Res. Commun., 246 (1998) p.736-739, 1998年  
第63会日本循環器学会総会・学術集会、63巻 supplement 1号、1999年、p.  
653, 1999年  
Circ. Res., 84 (1999) p.605-610, 1999年

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00-C12N 15/90

PubMed

JSTPlus(JDream2)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)