

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-149078
(P2001-149078A)

(43) 公開日 平成13年6月5日(2001.6.5)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 M 1/00	A 2 G 0 4 5
C 1 2 M 1/00		C 1 2 Q 1/68	Z 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/50	P 4 B 0 2 9
G 0 1 N 33/50		C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 6 3

審査請求 有 請求項の数 4 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平11-334248

(22) 出願日 平成11年11月25日(1999.11.25)

(71) 出願人 391012394

東北大学長

宮城県仙台市青葉区片平2丁目1番1号

(72) 発明者 佐々木 英忠

宮城県仙台市太白区向山1-9-2

(72) 発明者 冲永 壮治

アメリカ合衆国、マサチューセッツ州

02215、ボストン、ブルックライン・

アベニュー 400、アパートメント 16

エー

(74) 代理人 100058479

弁理士 鈴江 武彦 (外5名)

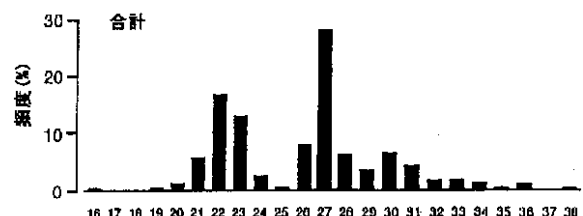
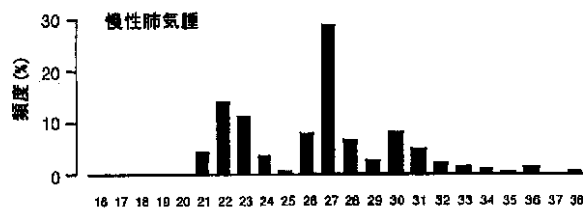
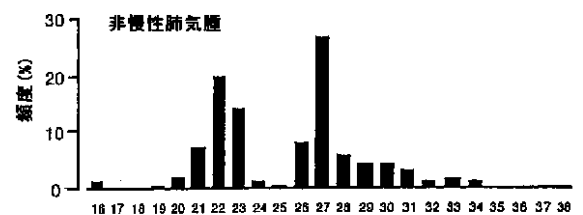
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 慢性肺気腫の発症リスクを予測する方法

(57) 【要約】

【課題】本発明は、被験者が慢性肺気腫を発症するリスクを予測する方法を提供することを目的とする。

【解決手段】前記課題を解決するために、ヘムオキシゲナーゼ-1の上流に位置するGT反復配列の反復回数を測定し、該反復回数が30回以上であれば被験者が慢性肺気腫を発症するリスクが高いと予測する方法を提供する。



(GT)n の反復数

【特許請求の範囲】

【請求項1】 被験者が慢性肺気腫を発症するリスクを予測する方法であって、

(a) ヘムオキシゲナーゼ-1遺伝子上流に位置するGT反復配列を含有する試料を前記被験者から準備する工程と、

(b) 前記試料中の前記GT反復配列の反復回数を決定する工程と、

(c) 反復回数が30回以上であれば、被験者が慢性肺気腫を発症するリスクが高いと予測する工程とを具備する方法。

【請求項2】 被験者が慢性肺気腫を発症するリスクを予測するためのデータを収集する方法であって、

(a) ヘムオキシゲナーゼ-1遺伝子上流に位置するGT反復配列を含有する試料を前記被験者から準備する工程と、

(b) 前記試料中の前記GT反復配列の反復回数を決定する工程と、を具備する方法。

【請求項3】 請求項1又は2に記載の方法であって、ステップ(b)におけるGT反復配列の反復回数の決定が、PCR増幅した前記GT反復配列を電気泳動にかけることによって行われることを特徴とする方法。

【請求項4】 被験者が慢性肺気腫を発症するリスクを予測するための装置であって、

(a) ヘムオキシゲナーゼ-1遺伝子上流に位置するGT反復配列を増幅するためのDNA増幅手段と、

(b) 前記GT反復配列の反復回数を決定するためのDNAサイズ決定手段と、を具備する装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、慢性肺気腫の発症リスクを予測する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】慢性肺気腫は、日本の社会環境の変化、喫煙習慣及び高齢化と共に増加しており、慢性の呼吸困難による日常生活の制限や気道感染に伴う呼吸不全をもたらすため、慢性肺気腫の発症要因と予防法の解明は緊急を要している。

【0003】喫煙は慢性肺気腫の主要なリスクファクターとされているが、喫煙者の慢性肺気腫への罹患率は10～15%にすぎないので、慢性肺気腫の発症には、喫煙以外の環境因子や遺伝因子が関与していると推定される。

【0004】慢性肺気腫の病因としては、プロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡説が提唱され、1-アンチトリプシン欠損症が報告されている。また、最近では、オキシダント・アンチオキシダントの不均衡による肺胞破壊説も提唱されている。

【0005】しかし、欧米で数パーセント存在する1-アンチトリプシン欠損症も日本では数例の報告のみみられるにすぎないので、少なくとも日本では1-アンチ

トリプシンの欠損が慢性肺気腫の主要な病因であるとは解し難い。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、慢性肺気腫の発症要因であるヘムオキシゲナーゼ-1をコードする遺伝子上流に位置するGT反復配列の反復回数を測定することによって、被験者が慢性肺気腫を発症するリスクを予測する方法に関する。さらに、本発明は、ヘムオキシゲナーゼ-1遺伝子のGT反復配列の反復回数を測定することによって、被験者が慢性肺気腫を発症するリスクを予測するための装置にも関する。

【0007】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決するために、本発明は、被験者が慢性肺気腫を発症するリスクを予測する方法であって、(a)ヘムオキシゲナーゼ-1遺伝子上流に位置するGT反復配列を含有する試料を前記被験者から準備する工程と、(b)前記試料中の前記GT反復配列の反復回数を決定する工程と、(c)反復回数が30回以上であれば、被験者が慢性肺気腫を発症するリスクが高いと予測する工程とを具備する方法を提供する。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明は、被験者の慢性肺気腫の発症リスクを予測するための方法に関する。

【0009】本発明は、ヘム代謝の初発反応を触媒するヘムオキシゲナーゼ-1(以下H0-1と略記する)の遺伝子上流に位置するGT反復配列の多型が慢性肺気腫の発症に関与していることを明らかにした本発明者らの疫学的研究に基づいてなされたものである。

【0010】より具体的には、本発明の方法は、H0-1遺伝子上流に位置するGT反復配列の反復回数を測定することによって、被験者が慢性肺気腫を発症するリスクを予測する。

【0011】ここで、「GT反復配列」とは、グアニン(G)とチミン(T)からなる反復単位が繰り返し存在する反復配列をいい、「反復回数」とは、GT反復配列中に存在する反復単位GTの個数をいう。

【0012】本発明の方法では、まず、H0-1遺伝子上流域に位置するGT反復配列を含む試料を準備する。このような試料は、本発明の方法を適用すべき被験者から採取した任意の生体成分、例えば血液であり得、核酸の抽出処理を施すことが好ましい。生体成分から核酸を抽出する方法は、当業者に周知であり、例えばフェノール抽出、エタノール沈殿等によって行う。

【0013】本発明の方法を適用すべき「被験者」はヒトを含む哺乳動物が好ましいが、GT配列の多型は哺乳類以外の多くの種について知られているので、H0-1を備えている動物種は全て「被験者」に含まれる。

【0014】なお、本明細書において、「試料を準備する」とは、本方法を実施する者が自ら前記試料の調製を

行う場合のみならず、既に調製された試料を入手する場合も含む。

【0015】試料を準備した後は、H0-1遺伝子の上流に位置するGT反復配列の反復回数を決定する工程を実施する。H0-1遺伝子の上流の配列（配列番号1）及び任意の反復配列の反復回数を測定する方法は周知であるから、当業者であれば、GT反復配列の反復回数は容易に測定できる。

【0016】反復配列の反復回数を測定する方法としては、ポリメラーゼ連鎖反応（以下PCRと称する）を利用する方法が好ましい。PCRを用いてGT反復配列の反復回数を測定するには、GT反復配列の上流及び下流に存在するユニークな配列からなるプライマー対を用いてGT反復配列を増幅した後、PCR生成物を電気泳動にかけて移動度を測定し得る。あるいは、測定する試料の数が多い場合には、DNAチップによってGT反復配列の反復回数を決定してもよい。

【0017】DNAチップを用いる場合には、CAの繰り返し単位からなるプローブが固相化されたチップにGT反復配列を含有する試料を注入した後、反復回数の差に応じた解離条件（解離温度等）の差を測定して、GT反復配列の反復回数を決定し得る。

【0018】さらに、必要であれば、GT反復配列の塩基配列を決定することにより、反復回数を決定してもよい。

【0019】下記の実施例において詳述されているように、H0-1遺伝子上流のGT反復配列の反復回数が30回以上である対立遺伝子を有する被験者は、慢性肺気腫に罹患するリスクが高い。従って、GT反復配列の反復回数を測定することによって、被験者の慢性肺気腫の発症リスクを予測することが可能になる。より詳細には、反復回数30回以上の対立遺伝子の存在と慢性肺気腫の発症との関連を調べた疫学調査では、オッズ比は2.4であった（すなわち、反復回数30回以上の対立遺伝子を有する者が慢性肺気腫に罹患するリスクは、そうでない者の約2.4倍である）。

【0020】さらに、本発明は、被験者が慢性肺気腫を発症するリスクを予測するためのデータを収集する方法にも関する。該方法の操作は、被験者の慢性肺気腫発症リスクを予測する方法の操作と同一である。該方法はデータを収集する方法であるから、該方法を実施する者は、医療機関に限定されない。

【0021】加えて、本発明は、H0-1遺伝子上流に位置するGT反復配列を特異的にPCR増幅するためのDNA増幅手段、及び増幅された反復配列の反復回数を決定するためのDNAサイズ決定手段を具備する装置も提供する。

【0022】前記DNA増幅手段は、被験者から採取した試料を収容するための反応セル、該反応セルを加熱するための加熱手段、及び前記反応手段の温度を調節するための温度調節手段を具備する。該DNA増幅手段及びその

使用方法は、PCRにおいて通常使用されるサーマルサイクラーと同一のものであり、当業者に周知である。

【0023】増幅されたGT反復配列のサイズは、DNAサイズ決定手段によって決定する。DNAサイズ決定手段は、電気泳動用のゲル、ゲルろ過、及び自動ヌクレオチド配列決定装置であり得るが、これらに限定されない。決定されたサイズから、GT反復配列の反復回数を知ることができる。

【0024】以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

【0025】[実施例1] 本実施例では、慢性肺気腫の発症リスクを予測する方法について説明を加える。

【0026】被験者（慢性肺気腫患者101名、同様の喫煙歴をもつ非肺気腫患者100名）から末梢血を採取してDNAを抽出した後、これを鋳型としてPCRを行った。

【0027】H0-1遺伝子上流に位置するGT反復配列（配列番号1の285～344）を増幅するためのプライマーとして、プライマーp1-s（配列番号1の249～268）とp1-as（配列番号1の356～375）、及びプライマーp2-s（GACGCGTGCAAGCAGTCAGCAGAGGAT）とプライマーp2-as（配列番号1の591～611）を作成した。

【0028】PCRによる増幅後、15%ポリアクリルアミドゲルの電気泳動を用いてPCR産物を増幅し、GT反復配列中の反復回数を決定した。

【0029】図1に結果を示す。

【0030】図1の上段、中断、及び下段は、それぞれ、非慢性肺気腫患者、慢性肺気腫患者、及びそれらの合計におけるGT反復配列の反復回数の分布を示している。

【0031】図1から明らかなように、該分布は、22、27、及び30の3ヶ所にピークを持っていた。そこで、GT反復配列の反復回数を25回未満、25回以上30回未満、30回以上という3つの群に分類し（以下、それぞれS、M、Lと表記する）、慢性肺気腫との関連を調べた。さらに、L型対立遺伝子が少なくとも一つ存在する第I群（L/L、L/M、L/S）と、L型遺伝子が存在しない第II群（M/M、M/S、S/S）に分類し、慢性肺気腫との関係を調べた。

【0032】下表1に示されているように、非慢性肺気腫患者（コントロール）では、L型遺伝子とそれ以外の遺伝子（すなわちM型遺伝子とS型遺伝子）とのオッズ比は、 $20/(88+92)=20/180$ 、慢性肺気腫患者（ケース）では、 $42/(93+67)=42/160$ であり、オッズ比は $(20/180)/(42/160)=2.4$ であった（ $p<0.004$ ）。従って、L型遺伝子を有する者は、そうでない者に比べて、慢性肺気腫に罹患するリスクが約2.4倍高い。なお、S型遺伝子に対するオッズ比、及びM型遺伝子に対するオッズ比は、それぞれ2.9（ $p<0.001$ ）、2.0（ $p<0.03$ ）であった。

【0033】

【表1】

対立遺伝子	非慢性肺気腫 (n=200)	慢性肺気腫 (n=202)	オッズ比(95%信頼区間)			
			対その他	対S型	対M型	対L型
L型 (30≦)	20(10%)	42(21%)	2.4 (1.3-4.1) ^{††}	2.9 (1.6-5.3) ^{**}	2.0 (1.1-3.6) [*]	1.0
M型 (25≦, <30)	88(44%)	93(46%)	1.1 (0.7-1.6)	1.5 (0.9-2.2)	1.0	
S型 (<25)	92(46%)	67(33%)	0.6 (0.4-0.9) [†]	1.0		

[†] p<0.02、^{††} p<0.004、^{*} p<0.03、^{**} p<0.03

【0034】また、表2から明らかなように、L型対立遺伝子が少なくとも一つ存在する遺伝子型からなる第I群(L/L、L/M、L/S)と、L型遺伝子が全く存在しない遺伝子型からなる第II群(M/M、M/S、S/S)のオッズ比も

2.4であった(p<0.008)。

【0035】

【表2】

遺伝子型	非慢性肺気腫 (n=100)	慢性肺気腫 (n=101)	オッズ比 (95%信頼区間)
I群(L/L L/M L/S)	20(20%)	38(38%)	2.4(1.3-5.7) [§]
II群(M/M M/S S/S)	80(80%)	63(62%)	

[§] p<0.008

【0036】以上の結果から、被験者が、H0-11の上流に位置するGT反復配列の反復回数が30回以上である対立遺伝子を少なくとも1つ有していれば、該被験者は慢性肺気腫を発生するリスクが大きいと予測できる。

【発明の効果】本発明の方法によれば、被験者が慢性肺気腫を発生するリスクを簡便且つ正確に予測できる。

【0038】

【配列表】

【0037】

SEQUENCE LISTING

<;110>; Tohoku University
 <;120>; Method for evaluating the risk of incidence of chronic pulmonary emphysema
 <;130>; Chronic Pulmonary Emphysema
 <;140>;
 <;141>;
 <;160>; 1
 <;170>; PatentIn Ver. 2.0
 <;210>; 1
 <;211>; 658
 <;212>; DNA
 <;213>; Homo sapiens
 <;220>;
 <;221>; repeat_region
 <;222>; (285)..(344)
 <;220>;
 <;221>; 5'UTR
 <;222>; (1)..(540)
 <;400>; 1
 ctaaatgtac atttaaagag ggtgtgagga cgcaagcagt cagcagagga ttccagcagg 60
 tgacatttta gggagctgga gacagcagag cctgggggttg ctaagttcct gatgttgccc 120
 accaggctat tgctctgagc agcgctgcct cccagcttcc tggaaacctc tgggacgcct 180
 ggggtgcatc aagtccaag gggacagga gcagaagggg gggctctgga aggagcaaaa 240
 tcacaccag agcctgcagc ttctcagatt tccttaaagg tttgtgtgt gtgtgtgtgt 300
 gtgtgtgtgt gtgtatgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgttttctc taaagtcct 360

```

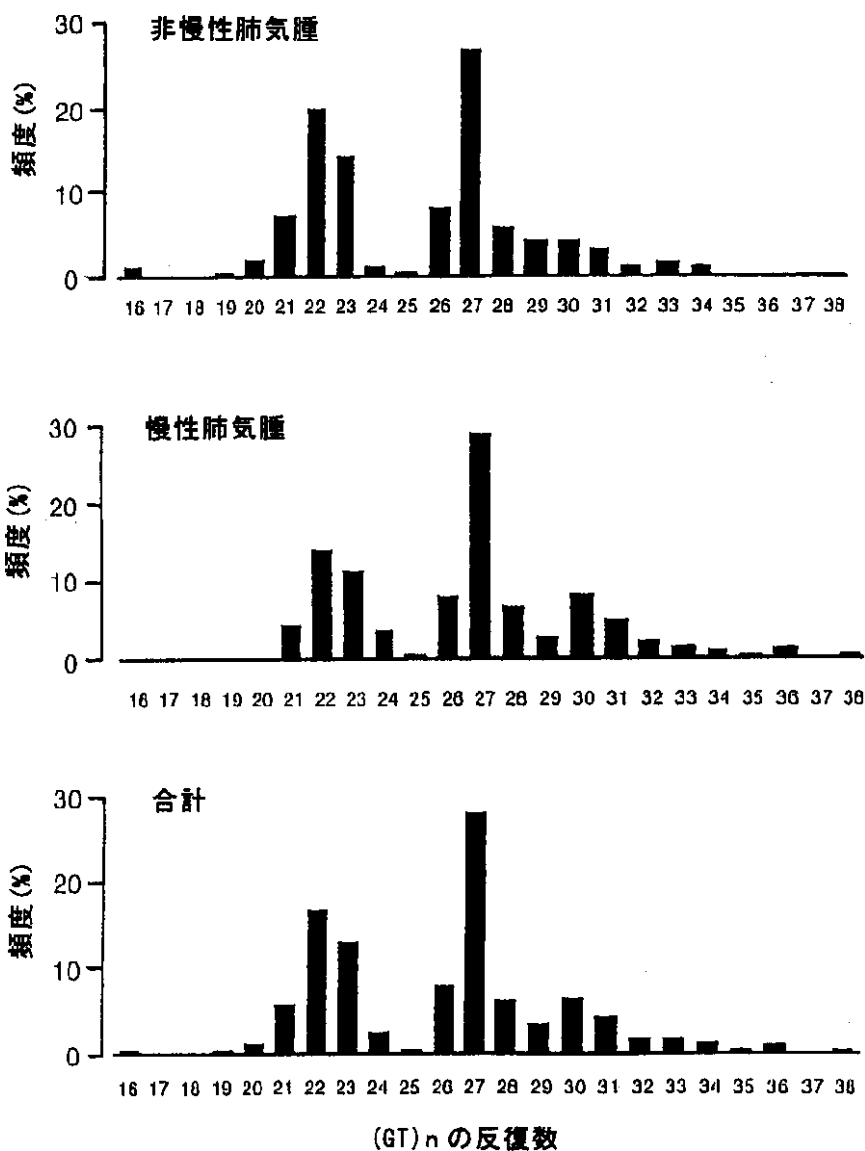
atggccagac ttgtttccc aagggtcata tgactgctcc tctccacccc aactggccc 420
ggggcgggct gggcgcgggc cctgcgggtg ttgcaacgcc cggccagaaa gtgggcatca 480
gctgttccgc ctggcccacg tgaccgcgag agcataaatg tgaccggccg cggctccggc 540
agtcaacgcc tgctctctct cgagcgtcct cagcgcagcc gccgcccgcg gagccagcac 600
gaacgagccc agcaccggcc ggatggagcg tccgcaaccc gacaggcaag cgcggggc 658

```

【図面の簡単な説明】 GT反復配列の反復回数の分布を示す図。

【図1】慢性肺気腫患者及び非慢性肺気腫患者における

【図1】



フロントページの続き

- (72)発明者 山谷 睦雄
宮城県仙台市青葉区木町16-2
- (72)発明者 中山 勝敏
宮城県仙台市青葉区柏木二丁目4-16-605

F ターム(参考) 2G045 AA26 CB02 DA13 FB01 FB05
4B024 AA11 CA01 CA20 HA11
4B029 AA07 AA23 BB20 CC01 FA15
4B063 QA13 QA19 QQ02 QQ08 QQ42
QQ57 QR08 QR32 QR40 QR62
QS16 QS25