

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-540433

(P2013-540433A)

(43) 公表日 平成25年11月7日(2013.11.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4B024
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4B063
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 J	
G01N 33/566 (2006.01)	G01N 33/566	
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-528112 (P2013-528112)
 (86) (22) 出願日 平成23年9月6日 (2011.9.6)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年4月17日 (2013.4.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2011/006583
 (87) 国際公開番号 W02012/033324
 (87) 国際公開日 平成24年3月15日 (2012.3.15)
 (31) 優先権主張番号 10-2010-0088905
 (32) 優先日 平成22年9月10日 (2010.9.10)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

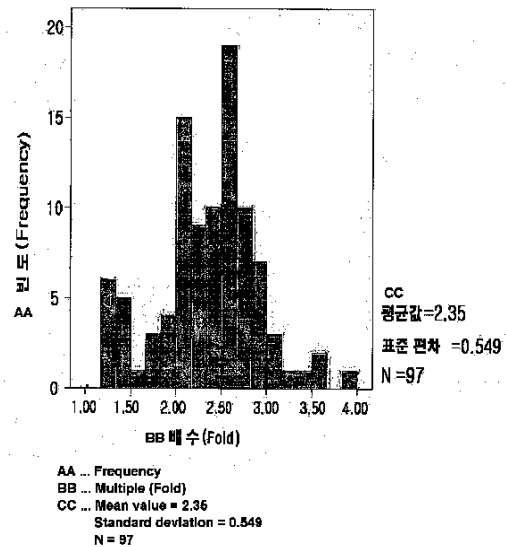
(71) 出願人 510231569
 ユニバーシティ-インダストリー コオペ
 レーション グループ オブ キョンヒ
 ユニバーシティ
 UNIVERSITY-INDUSTRY
 COOPERATION GROUP
 OF KYUNG HEE UNIVER
 SITY
 大韓民国、446-701 キョンギード
 、ヨンジン、ギフン-グ、ソチョン-ドン
 1、キョンヒ ユニバーシティ グロー
 バル キャンパス

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血清内ダイオキシン類の新規生物学的検出方法、及びその代謝症候群及び関連症状に対する診断的使用

(57) 【要約】

本発明は、新しい血清内ダイオキシン類の生物学的検出方法、及びその代謝症候群及び関連症状に対する診断的使用に関するもので、具体的にダイオキシン反応要素、プロモーター、及びレポーター遺伝子が作動可能に連結された遺伝子構築物を含有する組換えベクターに形質転換された細胞と血清全体を使用することで、ルシフェラーゼ活性を測定して血清内ダイオキシン含量と身体変数間の有意な相関性を確認し、血清からダイオキシンを精製するための前処理過程が求められる既存の方法を改善して、血清全体を使用することによって多数の試料を極少量でも容易かつ正確に分析することができるので、ダイオキシン類化合物によって発現が調節される組換えレポーター遺伝子を含有する形質転換細胞株を全血清で処理する本発明の検出システムは、血清内ダイオキシンの生物学的検出に有用で、このような方法を用いて血清内に存在するダイオキシンのようなPOPsの有無を正確に検出することで、特定POPsと患者の疾病因子間の相関性を研究して、これを疾病の発病予測及び治療可否の判定に有用できる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1) 1個以上の配列番号1で表されるダイオキシン反応要素(dioxin-responsive element, DRE)、プロモーター、及びレポーター遺伝子が作動可能に連結された遺伝子構築物を含む組換えベクターを宿主細胞に導入して形質転換細胞を製造する工程と、

2) 工程1)で製造された形質転換細胞を被検者の血清で処理した後、培養する工程と、

3) 工程2)で培養された形質転換細胞内のレポーター遺伝子によって発現されるタンパク質の発現の有無を検出する工程、及び

4) 前記工程3)でレポーター遺伝子の発現が検出された場合、血清にダイオキシン類化合物が含まれると判定する工程

とを含む、血清内ダイオキシン類化合物の検出方法。

【請求項 2】

前記ダイオキシン類化合物が、ポリ塩化ジベンゾダイオキシン類(polychlorinated dibenzodioxins; PCDDs)、ポリ塩化ジベンゾフラン類(Polychlorinated dibenzofurans; PCDFs)、ポリ塩化ビフェニル類(PCBs)、多環芳香族炭化水素類(Polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs)、フラボノイド類及び農薬(pesticides)からなる群から選択されることを特徴とする、請求項1に記載の検出方法。

【請求項 3】

前記工程1)のダイオキシン反応要素が、3ないし4個含まれることを特徴とする、請求項1に記載の検出方法。

【請求項 4】

前記工程1)のプロモーターが、マウス乳癌ウイルス(Mouse Mammary Tumor Virus, MMTV)プロモーター、SV40プロモーター、及びサイトメガロウイルス(cytomegalovirus, CMV)プロモーターからなる群から選択されることを特徴とする、請求項1に記載の検出方法。

【請求項 5】

前記工程1)のレポーター遺伝子が、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ及び - ガラクトシダーゼからなる群から選択されることを特徴とする、請求項1に記載の検出方法。

【請求項 6】

前記工程1)の宿主細胞が、哺乳動物の腫瘍細胞株であることを特徴とする、請求項1に記載の検出方法。

【請求項 7】

前記宿主細胞が、マウスの肝臓癌細胞株であることを特徴とする、請求項6に記載の検出方法。

【請求項 8】

前記工程2)の血清が、全血清(total serum)であることを特徴とする、請求項1に記載の検出方法。

【請求項 9】

前記工程2)の血清が、形質転換細胞に処理する前に加熱不活性化(heat activation)することを特徴とする、請求項1に記載の検出方法。

【請求項 10】

1) 1個以上の配列番号1で表されるダイオキシン反応要素(DRE)、プロモーター、及びレポーター遺伝子が作動可能に連結された遺伝子構築物を含む組換えベクターを宿主細胞に導入して形質転換細胞を製造する工程と、

2) 工程1)で製造された形質転換細胞を糖尿病または代謝症候群が疑われる被検者の血清で処理した後、培養する工程と、

3) 工程2)で培養された形質転換細胞内のレポーター遺伝子によって発現されるタンパク質の発現の有無を検出する工程、及び

10

20

30

40

50

4) 前記工程3)でレポーター遺伝子発現が検出された場合、糖尿病または代謝症候群の発病可能性があると判定する工程

とを含む、糖尿病または代謝症候群の発病可能性予測方法。

【請求項11】

1) 1個以上の配列番号1で表されるダイオキシン反応要素(DRE)、プロモーター、及びレポーター遺伝子が作動可能に連結された遺伝子構築物を含有する組換えベクターを宿主細胞に導入して形質転換細胞を製造する工程と、

2) 工程1)で製造された形質転換細胞を糖尿病または代謝症候群に対する治療を受けた被検者の血清で処理した後、培養する工程と、

3) 工程2)で培養された形質転換細胞内のレポーター遺伝子によって発現されるタンパク質の発現レベルを検出する工程、及び

4) 前記工程3)で検出されたレポーター遺伝子の発現レベルが治療を受けていない血清で処理した対照群と比べて減少した場合、糖尿病または代謝症候群が緩和、改善または治療されたと判定する工程

とを含む、糖尿病または代謝症候群の予後モニタリング方法。

【請求項12】

前記工程2)の血清が、全血清であることを特徴とする、請求項10または11に記載の方法。

【請求項13】

前記工程2)の血清が、形質転換細胞を処理する前に加熱不活性化されることを特徴とする、請求項10または11に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血清内ダイオキシン類の新規生物学的検出方法、及びその代謝症候群及び関連症状に対する診断的使用に関するものである。

【背景技術】

【0002】

残留性有機汚染物質(persistent organic pollutants, POPs)は、自然界に存在しないかまたは極めて微量のみ存在し、大部分は人間が必要のために作り出した人為的有機化学物質であって、ダイオキシンがその代表的な例である。POPsが体内に流入すると容易には分解及び排泄されずに組織内に蓄積される。最近このような産業副産物、殺虫剤または薬品などを含む環境性化合物が、人間及び多様な野生種に潜在的な内分泌攪乱影響を与えることに対する世間の関心が高まった。そして、現在、ダイオキシン類、塩化ビフェニル類、有機リン剤など各種POPsの血中濃度がインシュリン抵抗症、糖尿病、肥満、異常脂質血症または高血圧の発生と関連性があることが報告されている(非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3)。

【0003】

一方、POPsの代表物質の一つであるダイオキシン系化合物は、環境ホルモン(environmental hormone)または内分泌攪乱物質(endocrine disrupter)と呼ばれ、世界的に問題視されている。特に、2,3,7,8-テトラクロロジベンゾパラダイオキシン(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD)は、環境ホルモンの中で最も毒性が強く、人間が合成した物質の中で最も毒性が強い化合物であって、化学的に非常に安定的で自然環境ではほとんど半永久的に存在し、体内に流入すると脂肪組織に蓄積して一部は小便及び胆汁に排泄されるが、容易には排泄または分解されないことが知られている。TCDDを処理したマウスで肝臓内ユビキノン(CoQ)が減少し、ATPの生成が抑制され(非特許文献4)、TCDDはAhR依存的ROSの生成を誘導してミトコンドリア膜電位(m)の減少を引き起こすことにより、ミトコンドリアの機能を抑制して糖尿病を含む代謝症候群を誘発し得ることが報告された。

【0004】

10

20

30

40

50

ダイオキシンが細胞内に流入すると、ダイオキシンは細胞質内に存在するダイオキシン受容体（アリル炭化水素受容体(Arylhydrocarbon receptor), AhR) に特異的に結合する。このダイオキシン受容体複合体は、核内に流入して核内でA R N T (AhR 核輸送体(nuclear translocator)) と結合してD N A 結合型に変わる。変換されたD N A 結合型複合体は、特異遺伝子に強く結合するが、この特異結合遺伝子がダイオキシン反応要素(Dioxin Responsive Element, D R E) であり、D R E にダイオキシン複合体が結合すると近接した反応遺伝子であるP 4 5 0 1 A 1 が活性化されてシトクロムP 4 5 0 1 A 1 酵素群の合成が誘導されて、これら合成された酵素によってダイオキシンの毒性が発現される。

【0005】

ヒトの血清内に存在するP O P s の中で、T C D D と同じ系統の化合物(TCDD Equivalent, T C D D E q) の濃度を測定することで、P O P s によって誘発される疾病を有した患者を分類して、それら物質の除去と治療効果との相関性などの分析を実施することができる。ダイオキシンを測定する方法としては、器機分析法がよく用いられている。現在まで報告されたT C D D E q 分析方法としては、ガスクロマトグラフィ/質量分析技法(GC/MS) 及び細胞基盤分析法(cell-based assay) がある。前記GC/MS方法は、T C D D のような汚染物質の各種類別の濃度及び存在の有無の測定が可能であるが、高効率分析(ハイスループットアッセイ) のためには高い費用負担が伴い、分析のために多量の血清試料(25~200ml) が必要とされる。一方、細胞基盤分析法としては、C A L U X (Chemically Activated Luciferase Expression) 分析法が従来から知られているが、これは生物学的定量法であって遺伝子組換えを通じて構築された細胞を用いて、ダイオキシン存在時にルシフェラーゼが分泌するシステムを通じてダイオキシン類化合物を検出することができる。D R E 及びルシフェラーゼ遺伝子を有する細胞がダイオキシンの露出すると、細胞内のAhR、A R N T と結合したダイオキシンは核内のD R E に結合し、それによってルシフェラーゼ発現遺伝子が誘導されながら露出したダイオキシンの量に比例して細胞内でルシフェラーゼが合成される。したがって、このルシフェラーゼの活性度変化をダイオキシンの検索指標に活用することになる。このような方法は、ダイオキシン類似化合物の測定が可能で、T C D D 等価(TCDD Equivalency, T E Q) を測定することができる。しかし、現在の技術は分析時間が長く、ヒトの血清試料からヘキサンなどを使用して抽出または精製する過程が必要であり、多量の血清が必要となるのが実情である(最小1ml、一般的に10~20ml) 。また、一時的にトランスフェクションする細胞株を使用すると、各分析間の偏差が大きくて信頼性に問題が発生し、試料の個数が多くなるほど処理速度及び信頼度はさらに減少するようになる。同時に、試料からダイオキシンを抽出する過程が必要である。すなわち、試料に有機溶媒を処理して脂肪を抽出して活性化した酸性シリカゲルカラムに通過させる脂肪精製過程を経てダイオキシンを抽出するものである。したがって、このようなダイオキシンの抽出及び精製過程のため、T C D D 標準物質の分析値と血清中のT E Q を定量した値に差がでるようになる(非特許文献5) 。

【0006】

このように、既存の方法は高価の分析装置を必要とし、高度の試料精製のための複雑な前処理過程、それによる多量の有機溶媒、放射線標識物質など有毒試薬が必要となり分析時間も長いので、時間、労働力、検査費などの節減のためには、高い検出感度が保障されながら簡単な前処理、短時間内の検査及び定量が可能な生物学的検査法の開発及び応用が求められている。

【0007】

それで、本発明者らは、既存のP O P s 測定方法の問題点を改善した容易で正確な高効率のP O P s 検出方法を開発しようと研究した結果、血清試料使用時に血清からダイオキシンを精製するための前処理過程が求められる既存の測定方法とは異なり、全血清を使用することによって多数の試料を容易に正確に分析することができるのみならず、少量の血清試料を使用しても正確な分析が可能な差別化された生物学的検出方法を確立し、同時に、世界的に変異遺伝子及びそれを用いた発明が特許対象として許容されているので、D R

E 遺伝子を用いてダイオキシン類化合物の有無を判定することができることを明らかにすることによって本発明を完成した。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Lee DHら,Diabetes Care,2006年,第29(7)巻,p.1638-44

【非特許文献2】Lee DHら,Diabetes Care,2007年Mar,第30(3)巻,p.622-8

【非特許文献3】Lee DHら,Diabetologia,2007年Sep,第50(9)巻,p.1841-51

【非特許文献4】Toxicol.Appl.Pharmacol.2006年,第217巻,p.363

【非特許文献5】Michael,H.ら,Toxicol.Sciences,2000年,第54巻,p.183-193

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の目的は、血清内ダイオキシン類の新規生物学的検出方法、及びその代謝症候群及び関連症状に対する診断的使用を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0010】

前記目的を達成するために、本発明は、

1) 1個以上の配列番号1で表されるダイオキシン反応要素(dioxin-responsive element, DRE)、プロモーター、及びレポーター遺伝子が作動可能に連結された遺伝子構築物を含む組換えベクターを宿主細胞に導入して形質転換細胞を製造する工程、

20

2) 工程1)で製造された形質転換細胞を被検者の血清で処理した後、培養する工程、

3) 工程2)で培養された形質転換細胞内のレポーター遺伝子によって発現されるタンパク質の発現の有無を検出する工程、及び

4) 前記工程3)でレポーター遺伝子の発現が検出された場合、血清にダイオキシン類化合物が含まれると判定する工程を含む、血清内ダイオキシン類化合物の検出方法を提供する。

【0011】

また、本発明は、

1) 1個以上の配列番号1で表されるダイオキシン反応要素(DRE)、プロモーター、及びレポーター遺伝子が作動可能に連結された遺伝子構築物を含む組換えベクターを宿主細胞に導入して形質転換細胞を製造する工程、

30

2) 工程1)で製造された形質転換細胞を糖尿病または代謝症候群が疑われる被検者の血清で処理した後、培養する工程、

3) 工程2)で培養された形質転換細胞内のレポーター遺伝子によって発現されるタンパク質の発現の有無を検出する工程、及び

4) 前記工程3)でレポーター遺伝子発現が検出された場合、糖尿病または代謝症候群の発病可能性があると判定する工程を含む、糖尿病または代謝症候群の発病可能性予測方法を提供する。

【0012】

40

同時に、本発明は、

1) 1個以上の配列番号1で表されるダイオキシン反応要素(DRE)、プロモーター、及びレポーター遺伝子が作動可能に連結された遺伝子構築物を含む組換えベクターを宿主細胞に導入して形質転換細胞を製造する工程、

2) 工程1)で製造された形質転換細胞を糖尿病または代謝症候群に対する治療を受けた被検者の血清で処理した後、培養する工程、

3) 工程2)で培養された形質転換細胞内のレポーター遺伝子によって発現されるタンパク質の発現レベルを検出する工程、及び

4) 前記工程3)で検出されたレポーター遺伝子の発現レベルが治療を受けていない血清で処理した対照群と比べて減少した場合、糖尿病または代謝症候群が緩和、改善または

50

治療されたと判定する工程

を含む、糖尿病または代謝症候群の予後モニタリング方法を提供する。

【発明の効果】

【0013】

本発明の環境ホルモン検出方法は、測定前に血清からダイオキシンを精製する過程が必要な既存の測定方法より改善されたもので、血清全体を使用することによって労動力及び時間を節減して、多数の試料を容易かつ正確に高い効率で分析することができ、ヘキサンの抽出する前処理過程がないので少量の血清試料を使用しても分析が可能であるので、血清内環境ホルモンの生物学的検出に有用に用いることができ、同時に、血清内に存在するダイオキシンのようなPOPsの存在有無を正確に判断することによって、特定POPsと患者の疾病因子間の相関性を研究して、それを疾病の発病予測及び治療の有無を判定することに有用に用いることができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】pCYP1A1-lucベクターのクローニングを示した図である。

【図2】pCYP1A1-lucを安定的に発現するHepa1C1c7細胞株のコロニーを示した図である。

【図3】pCYP1A1-lucを安定的に発現するHepa1C1c7細胞株において、インドール3カルビノールに対する反応検査結果を示した図である。

【図4】pCYP1A1-lucを安定的に発現するHepa1C1c7細胞株において、2,3,7,8-テトラクロロジベンゾパラダイオキシン(TCDD)に対する反応検査結果を示した図である。

20

【図5】ダイオキシン倍数誘導値の分布を示した図である。

【図6】直線回帰法によって、ヒトの体重によるその血清内ダイオキシンの倍数誘導を分析した図である。

【図7】直線回帰法によって、ヒトのbmiによるその血清内ダイオキシンの倍数誘導を分析した図である。

【図8】直線回帰法によって、ヒトのwcによるその血清内ダイオキシンの倍数誘導を分析した図である。

【図9】直線回帰法によって、ヒトのsbpによるその血清内ダイオキシンの倍数誘導を分析した図である。

30

【図10】直線回帰法によって、ヒトのtgによるその血清内ダイオキシンの倍数誘導を分析した図である。

【図11】直線回帰法によって、ヒトのfbsによるその血清内ダイオキシンの倍数誘導を分析した図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

以下、本発明を詳しく説明する。

【0016】

本発明は、環境ホルモンによって発現が調節される組換えレポーター遺伝子を含む形質転換細胞を用いた血清内環境ホルモンの生物学的検出方法を提供する。

40

【0017】

具体的に、前記検出方法は、

1) 1個以上の配列番号1で表されるダイオキシン-反応要素(dioxin-responsive element, DRE)、プロモーター、及びレポーター遺伝子が作動可能に連結された遺伝子構築物を含む組換えベクターを宿主細胞に導入して形質転換細胞を製造する工程、

2) 工程1)で製造された形質転換細胞を被検者の血清で処理した後、培養する工程、

3) 工程2)で培養された形質転換細胞内のレポーター遺伝子によって発現されるタンパク質の発現の有無を検出する工程、及び

4) 前記工程3)でレポーター遺伝子の発現が検出された場合、血清にダイオキシン類

50

化合物が含まれると判定する工程を含むことが好ましいがそれに限定されない。

【0018】

前記ダイオキシン類化合物は、ポリ塩化ジベンゾダイオキシン類 (polychlorinated dibenzodioxins; PCDDs)、ポリ塩化ジベンゾフラン類 (Polychlorinated dibenzofurans; PCDFs)、ポリ塩化ビフェニル類 (PCBs)、多環芳香族炭化水素類 (Polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs)、フラボノイド類または農薬 (pesticides) に属するすべての化合物であることが好ましいがそれに限定されず、前記DREに結合して転写活性に影響を及ぼす環境ホルモンならすべて可能であり、ダイオキシンと類似の機能を有する化合物をすべて含むことができる。

10

【0019】

前記方法において、前記工程1)のダイオキシン反応因子は1個以上含まれ、3ないし4個であることが最も好ましいが、それに限定されない。

【0020】

前記方法において、前記工程1)のプロモーターは、マウス乳癌ウイルス (Mouse Mammary Tumor Virus, MMTV) プロモーター、SV40プロモーター、サイトメガロウイルス (cytomegalovirus, CMV) プロモーターからなる群から選択されるいずれか一つであることが好ましく、グルココルチコイド反応因子部位を除去したMMTV由来のプロモーターであることがさらに好ましいが、それに限定されない。

20

【0021】

前記プロモーターは、エンハンサー部位がない最小プロモーターであり得、レポーター遺伝子の転写活性レベルは、最小プロモーターの上部に隣接したエンハンサーまたはシス反応要素によって決定され得るので、転写活性に影響を及ぼす他の要素の効果は完全に除去することができる。

【0022】

前記方法において、前記工程1)のレポーター遺伝子はルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ及びβ-ガラクトシダーゼからなる群から選択されるいずれか一つであることが好ましく、活性分析の取り扱いやすさ及び敏感度の面でルシフェラーゼを用いることがさらに好ましいが、それに限定されない。

30

【0023】

前記形質転換細胞は、安定に発現する形質転換された細胞で、形質転換されたレポーターベクターが宿主の染色体に挿入されて宿主細胞の遺伝的レパートリーの安定した一部になるということを意味し、これによって形質転換されたレポーターベクター内の遺伝子の安定した発現が、最小30世代に渡って可能になり得る。

【0024】

前記工程1)の宿主細胞は真核細胞で、哺乳動物の細胞であることが好ましく、哺乳動物の腫瘍細胞株であることがさらに好ましく、マウスの肝臓癌細胞株、例えば、Hepa1c1c7であることがさらに好ましいが、それに限定されない。

【0025】

ダイオキシンが細胞内に流入すると、ダイオキシンは細胞質内に存在するダイオキシン受容体 (Arylhydrocarbon receptor, AhR) に特異的に結合して、核内に流入したダイオキシン受容体複合体は、核内でARNT (AhR nuclear translocator) と結合してDNA結合型に変わるので、前記ARNT及びAhRを内因的に発現する細胞なら何でも前記宿主細胞として使用可能である。

40

【0026】

前記形質転換は、電気穿孔法、原形質融合、リン酸カルシウム (CaPO₄) 沈澱法、塩化カルシウム (CaCl₂) 沈澱法、シリコンカーバイド繊維を用いた攪拌またはリポフェクタミン媒介方法などを用いて行なうことができるが、それに限定されない。

【0027】

50

既存のダイオキシン類化合物の測定方法は、試料に有機溶媒を処理して脂肪を抽出して脂肪精製過程を経てダイオキシンを抽出する前処理過程が必要であるが、前記方法において、前記工程 2) の血清は全血清 (total serum) であり、血清全体を使用することができる。

【 0 0 2 8 】

前記血清は、形質転換細胞に処理する前に形質転換細胞に対する血清の安全性のために加熱不活性化 (heat activation) することが好ましいが、それに限定されない。

【 0 0 2 9 】

本発明の具体的な実施例において、4個の配列番号 1 で表されるダイオキシン反応要素 (D R E) 結合部位 (5 ' - T N G C G T G - 3 ') を含有するマウス C Y P 1 A 1 プロモーター、及びマウス乳癌ウイルス (M M T V) の長い末端反復 (L T R) を含有する組換えレポーター遺伝子ベクターを製造し (図 1 参照)、これをマウス肝臓癌細胞株である H e p a 1 c 1 c 7 に形質転換して、前記組換えレポーター遺伝子を安定的に発現する細胞株を製造した (図 2 参照)。前記製造された細胞株を対象に、2,3,7,8 - テトラクロロジベンゾ - p - ダイオキシン (T C D D) に対する反応検査を実施した。その結果、T C D D を処理しない対照群に比べて 1 0 ないし 1 0 0 0 p M 濃度の T C D D を処理した場合、顕著にルシフェラーゼ活性が増加することが示された (図 4 参照)。そして、前記組換えレポーター遺伝子を安定的に発現する細胞株は T C D D に反応してルシフェラーゼ活性を効果的に示すことを確認した。

10

【 0 0 3 0 】

本発明者らは、前記製造された細胞株を用いて、ヒトの血清試料内に存在するダイオキシン存在の有無を検出し、ダイオキシン程度と身体計測変数間の相関関係を分析した。血清試料を準備するために、97名の成人から得た血清試料を 6 5 で 3 0 分間熱処理不活性化 (heat inactivation) して、細胞培養に対する安全性を付与する。前記熱処理不活性化は、血清を加熱して生物学的活性を消失させることを意味し、血清中には細胞増殖因子や血清タンパク質の外に体液性免疫を担当する因子の一つとして補体を含んでいる。多様な補体の中には、培養細胞を認識して細胞毒性を示すものが含まれていて、血清をそのまま培地に入れて培養に使用すると細胞増殖が抑制されたり死滅したりすることがあるので、安全性のために熱不活性化を実施した。

20

【 0 0 3 1 】

前記のように準備した血清試料 1 0 μ l を前記組換えレポーター遺伝子を安定的に発現する細胞株に処理してルシフェラーゼ分析を実施して、ルシフェラーゼ活性と身体計測変数間の相関性を分析した結果、97名のヒト血清試料に対するルシフェラーゼの倍数誘導値は 2 . 0 0 ないし 3 . 0 0 倍数区間に大部分分布し、約 2 . 5 0 ないし 2 . 6 5 倍数に最も高い割合で存在することが示された。倍数誘導値の平均値は約 2 . 3 5 倍数であることが確認された (図 5 参照)。

30

【 0 0 3 2 】

また、直線回帰法 (linear regression) によってヒトの体重、体質量指数 (b m i)、腰まわり (waist circumference, w c)、収縮期血圧 (s b p)、拡張期血圧 (d b p)、中性脂肪 (トリグリセリド, T G)、または空腹時の血糖 (f b s) 指数とダイオキシンとの間に有意的な相関性があることを確認し、前記変数値が増加するほどダイオキシンの倍数値も増加する傾向を示した (図 6 ないし 1 1 参照)。ダイオキシン倍数誘導値は、非飲酒及び非喫煙者に比べて飲酒及び喫煙者からさらに高く測定され、多変量解析を通じて相関性がある変数にすべて補正した結果、飲酒の有無のみが有意的な相関性が維持されることを確認した。また、耐糖能障害 (I G T) 及び空腹血糖障害 (I F G) からなる糖調節障害 (I G R)、糖尿病 (D M)、及び正常耐糖能 (N G T) において、N G T の血清に比べて I G R または D M の血清でルシフェラーゼ分析値が高く、I G R 及び D M 間には有意な差がなかった。代謝症候群要素 (M e t S component) 個数によるダイオキシン倍数誘導を分析した結果、M e t S 要素数が増える程ダイオキシン倍数誘導値が増加し、M e t S 患者においては正常に比べてダイオキシン倍数誘導値が顕著に増加したこと

40

50

が示された。同時に、ダイオキシン倍数誘導の増加が代謝症候群または糖尿病に対する危険度にどのような相関性を有するのかを分析した結果、ダイオキシンの倍数誘導値が1増加する度に代謝症候群及び糖尿病危険がそれぞれ19.7倍及び11.9倍増加することが分析され、それをbmi指数に補正しても倍数誘導値が1ずつ増加する度に代謝症候群及び糖尿病がそれぞれ1.3倍及び8.7倍に増加し、年齢、性別及びbmiで補正しても倍数誘導値が増加すれば代謝症候群または糖尿病も増加することが確認された。

【0033】

このような結果を通じて、本発明と以前の報告の技術的特徴及び効果を比較してみると、下記の表1のように、先行文献ではCALUX分析システムを使用するため、ヘキサンのような有機溶媒を使用して血清からダイオキシンを抽出する前処理過程が伴った。一方、本発明は血清を簡単な加熱不活性化した後にすぐに分析することによって時間、費用及び労働力の節減という長所があった。また、分析に必要な血清の量においても、本発明のシステムでは先行文献に比べて約1/1000程度の血清で分析可能であることが確認され、さらに多い量を使用した先行文献と類似の感度を有する高効率の分析システムであることを立証した。

【表1】

	CALUX 分析システム(1)	CALUX 分析システム(2)	高感度 CALUX 分析システム
文献	Garrison PM ら, Fund. Appl. Toxicol. 1996 年, 第 30 巻, p. 194-203	Han D ら, BioFactors, 2004 年, 第 20 巻, p. 11-22	本発明
形質転換	一時的(Transient)	安定的(Stable)	安定的(Stable)
ベクター	pGudLuc1.1	pGL2-basic	pGL3-basic
血清の前処理	ヘキササン抽出後 DMSO に溶解	ヘキササン抽出後 DMSO に溶解	加熱不活性化
分析に使用した血清の量	10~20ml	1~10ml	10 μ l
スクリーニングシステム	24 ウェル分析システム	96 ウェル分析システム	96 ウェル分析システム
細胞株	Hepalclc7 マウス肝臓癌細胞株	H1L1.6 マウス肝臓癌細胞株	Hepalclc7 マウス肝臓癌細胞株
ヒト血液での感度	1pM~1nM	1pM~1nM	1pM~1nM

【0034】

したがって、前記ダイオキシン類化合物の検出方法として確認されたダイオキシン類の血清内含量と身体の変数の間には有意な相関性があることを確認したので、試料からダイオキシンを精製するための前処理過程が求められる既存の測定方法と異なり、血清全体を使用することによって労働力及び時間を節減して多数の試料を容易かつ正確に分析することができるのみならず、少量の血清試料を使用しても正確な分析が可能なので、環境ホルモンによって発現が調節される組換えレポーター遺伝子を含む形質転換細胞株及び全血清(total serum)は、血清内環境ホルモンの生物学的検出に有用である。

【0035】

また、本発明はダイオキシン類化合物によって発現が調節される組換えレポーター遺伝子を含む形質転換細胞を用いた、糖尿病または代謝症候群の発病可能性予測方法を提供する。

【0036】

具体的に、前記予測方法は、

1) 1個以上の配列番号1で表されるダイオキシン反応要素(DRE)、プロモーター、及びレポーター遺伝子が作動可能に連結された遺伝子構築物を含有する組換えベクターを宿主細胞に導入して形質転換細胞を製造する工程と、

2) 工程1)で製造された形質転換細胞を糖尿病または代謝症候群が疑われる被検者の血清で処理した後、培養する工程と、

3) 工程2)で培養された形質転換細胞内のレポーター遺伝子によって発現されるタンパク質の発現の有無を検出する工程、及び

4) 前記工程3)でレポーター遺伝子の発現が検出された場合、糖尿病または代謝症候群の発病可能性があると判定する工程

とを含むことが好ましいが、それに限定されない。

10

【0037】

同時に、本発明はダイオキシン類化合物によって発現が調節される組換えレポーター遺伝子を含有する形質転換細胞、及び全血清を用いた糖尿病または代謝症候群の予後モニタリング方法を提供する。

【0038】

具体的に、前記予後予測方法は、

1) 1個以上の配列番号1で表されるダイオキシン反応要素(DRE)、プロモーター、及びレポーター遺伝子が作動可能に連結された遺伝子構築物を含有する組換えベクターを宿主細胞に導入して形質転換細胞を製造する工程と、

2) 工程1)で製造された形質転換細胞を糖尿病または代謝症候群に対する治療を受けた被検者の血清で処理した後、培養する工程と、

3) 工程2)で培養された形質転換細胞内のレポーター遺伝子によって発現されるタンパク質の発現レベルを検出する工程、及び

4) 前記工程3)で検出されたレポーター遺伝子の発現レベルが治療を受けていない血清で処理した対照群と比べて減少した場合、糖尿病または代謝症候群が緩和、改善または治療されたと判定する工程

とを含むことが好ましいが、それに限定されない。

20

【0039】

前記方法において、前記工程1)のダイオキシン反応因子は1個以上含まれ、3ないし4個であることが最も好ましいが、それに限定されない。

30

【0040】

前記工程1)のプロモーターは、MMTV(Mouse Mammary Tumor Virus)プロモーター、SV40プロモーター、CMV(cytomegalovirus)プロモーターからなる群から選択されるいずれか一つであることが好ましく、MMTV由来のプロモーターであることがさらに好ましいが、それに限定されない。

【0041】

前記工程1)のレポーター遺伝子は、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ及び β -ガラクトシダーゼからなる群から選択されるいずれか一つであることが好ましく、活性分析の取り扱いやすさ及び敏感度の面でルシフェラーゼを用いることがさらに好ましいが、それに限定されない。

40

【0042】

前記工程1)の宿主細胞は真核細胞で、哺乳動物の細胞であることが好ましく、哺乳動物の腫瘍細胞株であることがさらに好ましく、マウス肝臓癌細胞株、例えばHepa1c1c7であることがさらに好ましいがそれに限定されず、ARNT及びAhRを内因的に発現する細胞であれば何でも前記宿主細胞として使用可能である。

【0043】

前記形質転換は、電気穿孔法、原形質融合、リン酸カルシウム(CaPO_4)沈澱法、塩化カルシウム(CaCl_2)沈澱法、シリコンカーバイド繊維を用いた攪拌またはリポ

50

フェクタミン媒介された方法などを用いて行なうことができるが、それに限定されない。

【0044】

前記方法において、前記工程2)の血清は全血清であり、血清からダイオキシン類化合物を精製する前処理過程なしに、血清全体を使用することができる。

【0045】

前記血清は、形質転換細胞に処理する前に形質転換細胞に対する血清の安全性のために加熱不活性化することが好ましいが、それに限定されない。

【0046】

本発明者らは、ダイオキシン反応要素(DRE)結合部位、マウス乳癌ウイルス(MMTV)由来のプロモーター、その下部にルシフェラーゼ遺伝子を含む組換えレポーター遺伝子ベクターが安定的に形質転換された細胞株を製造して、ヒトの血清内に存在するダイオキシンの有無と身体計測変数間の相関関係を分析した結果、ヒトの体重、bmi、wc、sbp、dbp、tgまたはfbs変数とダイオキシンの間に有意な相関性があることを確認し、耐糖性障害(IGT)及び空腹血糖障害(IFG)からなる糖調節障害(IGR)、糖尿病(DM)、及び正常耐糖能(NGT)とダイオキシン含量間の有意な相関性を立証し、特に、NGTの血清に比べてIGRまたはDM患者の血清においてルシフェラーゼ分析値が高いことを確認した。また、代謝症候群要素(MetS component)数が増加するほどダイオキシン倍数誘導値が増加し、MetS患者は正常人に比べてダイオキシン倍数誘導値が顕著に高いことを確認し、ダイオキシン倍数誘導の増加が代謝症候群または糖尿病に対する危険度を増加させることを確認した。

10

20

【0047】

したがって、ダイオキシン類の血清内含量と糖尿病または代謝性症候群間には有意な相関関係があることを確認したので、環境ホルモンによって発現が調節される組換えレポーター遺伝子を含む形質転換細胞株及び全血清を用いた前記ダイオキシン類化合物の検出方法は、糖尿病または代謝症候群の発病可能性及び予後の予測に有用である。

【0048】

以下、本発明を下記の実施例及び実験例によって詳細に説明する。

【0049】

但し、下記の実施例及び実験例は本発明の内容を例示するだけのものであって、発明の範囲が実施例及び実験例に限定されるのではない。

30

【実施例1】

【0050】

組換えレポーター遺伝子を安定的に発現する細胞株の製造

<1-1>組換えレポーター遺伝子ベクターの製造

pGudLuc1.1ベクターから、4個のDRE結合部位(AhR結合部位)(5'-TNGCGTG-3')を有しているマウスCYP1A1プロモーター(482bp)、及びグルココルチコイド応答エレメント部位を除去したマウス乳癌ウイルス(MMTV)の長い末端反復(LTR)を含む1.8kbのウイルスプロモーター断片をHindIII制限酵素で切断した後、HindIIIで切断したpGL3-basicベクターのHindIII部位にクローニングしてpCYP1A1-lucベクターを製造した(Hanら,BioFactors,2004年,第20巻,p.11-22)。プロモーターの方向はシーケンシングで確認した(図1)。

40

【0051】

<1-2>組換えレポーター遺伝子を発現する形質転換細胞株の製造

1×10^5 のマウス肝臓癌細胞株であるHepa1c1c7を6ウェルプレートに分注して、24時間培養して50%の密度になるようにした。前記実施例<1-1>で製造したpCYP1A1-lucベクター $2 \mu\text{g}$ とpcDNA3.1ベクター $0.5 \mu\text{g}$ を、血清及び抗生物質を含まない $100 \mu\text{l}$ のMEM-培地に添加して $10 \mu\text{l}$ のSuperfect(Qiagen)と混合した後、常温で10分間反応させた。その後、10%牛胎児血清(FBS)及び1%ペニシリン/ストレプトマイシン(P/S)を含んだ 600μ

50

1のMEM - 培地を入れて混合した後、DPBSで洗浄したHepa1c1c7細胞に700 μ lのSuperfect-DNA反応液を入れて、37 $^{\circ}$ Cで3時間培養した。培養後、前記細胞をDPBSで洗浄し、10%FBS及び1%P/Sを含んだ新鮮な2mlのMEM - 培地に交換した。24時間後からG418 300 μ gを添加して、約3週間G418抵抗性細胞を選別した。コロニーが生成されると、それぞれのコロニーを60mm培養プレートに移した(図2)。

【実施例2】

【0052】

組換えレポーター遺伝子を発現する形質転換細胞株に対する反応検査

<2-1>インドール3カルビノールを使用した反応検査

前記実施例<1-2>で製造したpCYP1A1-lucを安定的に発現する細胞株を60mm培養ディッシュに 1×10^5 の細胞数で分注して、48時間培養した。培養48時間後、0.5%charcoal-stripped FBSを含みフェノールレッドがないDMEM培地に交換して、インドール3カルビノールを0、0.01、0.1、1、10、及び100 μ Mの濃度でそれぞれ4、8または24時間処理した。それぞれの処理時間後、細胞を回収してルシフェラーゼ分析を行なった。

【0053】

その結果、図3のように、0.001ないし10 μ M濃度のインドール3カルビノール処理群は無処理群より濃度依存的にルシフェラーゼ活性が増加し、特に100 μ M濃度では約3倍以上ルシフェラーゼ活性が増加した。ここで、処理時間による有意な差は示されなかった(図3)。

【0054】

<2-2>2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン(TCDD)を使用した反応検査

前記実施例<1-2>で製造したpCYP1A1-lucを安定的に発現する細胞株を60mm培養ディッシュに 2×10^5 の細胞数で分注して、24時間培養した。培養24時間後、0.5% charcoal-stripped FBSを含みフェノールレッドがないDMEM培地に交換して、2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン(TCDD)を0、0.1、1、10、100、及び1000pMの濃度でそれぞれ4または8時間処理した。それぞれの処理時間後、細胞を回収してルシフェラーゼ分析を行なった。

【0055】

その結果、図4のように、0.1または1pMのTCDDを処理した場合には、TCDDを処理しない対照群と類似のレベルのルシフェラーゼ活性を確認したが、10ないし1000pMのTCDDに対しては、対照群に比べて顕著にルシフェラーゼ活性が増加したことが示され、処理時間が長いほどルシフェラーゼ活性が多少増加したが顕著な差はなかった(図4)。

【実施例3】

【0056】

ヒトの血清内に存在するダイオキシンの検出

<3-1>ヒト血清試料の準備

97名の成人から得た血清試料は、65 $^{\circ}$ Cで30分間熱不活性化して前処理した。このような過程は一般的な細胞培養方法において、熱処理による不活性化によって細胞培養に対する安全性を付与する。

【0057】

<3-2>ヒトの血清内ダイオキシンの検出及び身体変数による相関関係分析

前記実施例<1-2>で製造したpCYP1A1-lucを安定的に発現する細胞株 5×10^4 を96ウェルプレートに分注後、24時間培養した。培地をフェノールレッドがない90 μ l DMEM培地に交換して、最終濃度10%のヒト血清試料10 μ lを添加した後、24時間処理した。その後、各ウェルにある細胞をルシフェラーゼ lysis buffer (Promega)で溶解した。各ウェルの細胞溶解物を1 μ lずつ96ウェルに移して、タンバ

10

20

30

40

50

ク質をBCA法で定量した。残りの細胞溶解物は、Promegaルシフェラーゼ分析キットを用いたルシフェラーゼ分析に用いた。ルシフェラーゼ活性はタンパク質濃度に補正し、倍数誘導 (fold induction) または%対照群としてその結果を表示した。

【0058】

その結果、図5のように、97名のヒト血清試料に対する倍数誘導値は、2.00ないし3.00倍数区間に大部分分布してその外の区間では比較的low、約2.50ないし2.65倍数に最も高い割合で存在することが示された。倍数誘導値の平均は、約2.35倍数であることが確認された(図5)。

【0059】

また、ダイオキシンと多くの身体変数との相関関係を分析した結果、それぞれの変数に対するr及びP値が下記の表2のように示された。特に、図6ないし11のように、直線回帰法によってヒトの体重、体質量指数(bmi)、腰まわり(wc)、収縮期血圧(sbp)、拡張期血圧(dbp)、中性脂肪(TG)、または空腹時の血糖(fbs)指数とダイオキシンとの間に有意な相関性があることを確認し、前記変数値が増加するほどダイオキシンの倍数値も増加する傾向を示した(図6ないし11)。

【表2】

	r	P 値
年齢	0.0747397	0.466872841
体重	0.3287115	0.001011469
体質量指数(bmi)	0.3385887	0.000740128
腰まわり(wc)	0.4194761	2.0988E-05
収縮期血圧(sbp)	0.3163346	0.001596079
拡張期血圧(dbp)	0.2696278	0.007568065
血清クレアチン (serum creatinine, cr)	0.1057983	0.302361753
白血球数値(wbc)	0.185271	0.06924526
got	-0.058096	0.571911012
gpt	0.0216235	0.833487555
コレステロール(chol)	0.1860382	0.068080471
中性脂肪(tg)	0.2508027	0.013218103
高密度脂タンパク(hdl)	-0.1656577	0.104886065
低密度脂タンパク(ldl)	0.1170971	0.253347357
空腹時の血糖(fbs)	0.2320468	0.022191056
糖化血色素(hb1c)	0.1845205	0.070400124

【0060】

また、飲酒及び喫煙の有無を基準に血清試料のダイオキシン倍数値を分析した結果、下記の表3及び表4のように、ダイオキシン倍数誘導値は飲酒及び喫煙者からさらに高く測定されることが確認された。

【表3】

	飲酒有無	N	平均	標準偏差	平均の標準誤差
倍数 (fold)	無	43	2.1425	0.49264	0.07513
	有	50	2.5111	0.54727	0.07740
* P=0.001					

【表 4】

	喫煙有無	N	平均	標準偏差	平均の標準誤差
倍数 (fold)	無	64	2.2448	0.55652	0.06956
	有	29	2.5652	0.49577	0.09206
* P=0.009					

【 0 0 6 1 】

また、多変量分析を実施した結果、下記の表 5 のように、相関性ある変数をすべて入力して補正した場合、飲酒有無のみが有意な相関性が維持されることを確認した。

10

【表 5】

モデル		非標準化係数		標準化係数	t	Sig.
		B	標準誤差	Beta	B	標準誤差
1	(Constant)	0.396	0.534		0.742	0.460
	bmi	0.031	0.017	0.188	1.878	0.064
	sbp	0.006	0.004	0.171	1.666	0.099
	喫煙有無	0.090	0.125	0.076	0.719	0.474
	飲酒有無	0.290	0.108	0.263	2.682	0.009
	tg	0.000	0.001	0.086	0.834	0.407
	fbs	0.002	0.003	0.068	0.660	0.511

20

【 0 0 6 2 】

また、正常耐糖能 (NGT)、耐糖能障害 (IGT) 及び空腹血糖障害 (IFG) からなる糖調節障害 (IGR)、及び糖尿病 (DM) によって、ダイオキシリンに対するルシフェラーゼを分析した結果、下記の表 6 のように、NGT の血清に比べて IGR または DM の血清でルシフェラーゼ分析値が高く、IGR 及び DM 間には有意な差がなかった。

【表 6】

	NGT N=50		IGR N=24		DM N=23		IGR vs. NGT	DM vs. NGT	DM vs. IGT
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	P 値	P 値	P 値
年齢	44.1	10.3	49.0	9.3	49.3	8.5	0.052	0.037	0.894
bmi	23.2	3.5	24.7	3.1	25.6	2.4	0.084	0.004	0.246
Wc	80.8	7.8	85.7	9.2	87.3	7.6	0.022	0.002	0.508
sbp	116.5	11.4	130.1	16.4	129.7	16.9	0.000	0.000	0.930
dbp	68.5	8.3	76.0	9.7	77.3	11.6	0.001	0.000	0.677
bun	14.4	3.7	14.1	3.5	14.5	3.5	0.705	0.868	0.635
Cr	0.8	0.2	0.8	0.2	0.9	0.1	0.771	0.111	0.140
Hb	14.5	1.5	14.3	1.7	14.6	1.6	0.500	0.771	0.426
wbc	6.3	1.6	6.5	1.5	6.1	1.3	0.551	0.669	0.341
plt	22.7	4.8	24.0	5.5	24.0	4.9	0.289	0.290	0.978
got	23.4	6.1	23.6	7.4	25.1	7.2	0.880	0.296	0.495
gpt	23.5	8.2	23.3	13.8	27.7	17.5	0.935	0.159	0.333
ggt	27.5	17.1	40.5	39.8	56.3	43.6	0.052	0.005	0.202
chol	198.1	31.9	193.0	34.7	217.6	38.0	0.531	0.025	0.025
Tg	112.2	95.2	144.9	118.5	171.9	80.1	0.206	0.011	0.367
hdl	59.8	14.2	56.0	14.9	53.6	12.7	0.299	0.081	0.558
ldl	115.9	30.3	108.0	35.1	129.6	32.4	0.322	0.083	0.034
fbs	90.0	5.6	104.5	4.3	114.5	37.1	0.000	0.005	0.211
hba1c	6.1	0.2	6.1	0.3	7.1	1.2	0.692	0.001	0.001
倍 数 (calux)	2.05	0.47	2.58	0.42	2.77	0.46	0.000	0.000	0.152

10

20

30

【 0 0 6 3 】

また、代謝症候群要素 (MetS component) 個数によるダイオキシン倍数誘導を分析した結果、下記の表 7 及び表 8 のように、MetS 要素数が増えるほどダイオキシン倍数誘導値が増加することを確認し、MetS 患者においては正常に比べてダイオキシン倍数誘導値が顕著に増加したことが示された。

【表 7】

MetS 要素数	平均	N	標準偏差
0.00	2.0191	25	0.47701
1.00	2.1790	23	0.44884
2.00	2.4048	24	0.43824
3.00	2.8263	16	0.47832
4.00	2.7213	6	0.71194
5.00	2.6845	2	0.17577
合計	2.3461	96	0.54742

* P < 0.001、直線回帰方法

10

【表 8】

	MetS 可否	N	平均	標準偏差	平均の標準誤差
倍数	.00	72	2.1987	0.47686	0.05620
	1.00	24	2.7882	0.51367	0.10485

* P < 0.001、t test

20

【 0 0 6 4 】

同時に、ダイオキシン倍数誘導の増加が代謝症候群または糖尿病に対する危険度にどのような相関性を有するのかを分析した結果、下記の表 9 ないし表 11 のように、ダイオキシン倍数誘導値が 1 増加する度に代謝症候群及び糖尿病危険がそれぞれ 1.97 倍及び 1.19 倍増加することが分析された。これを b m i 指数に補正しても倍数誘導値が 1 ずつ増加する度に代謝症候群及び糖尿病がそれぞれ 1.3 倍及び 8.7 倍に有意に増加することが示され、年齢、性別及び b m i で補正しても代謝症候群または糖尿病が増加することが確認された。

【表 9】

			B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
代謝症候群	Step 1(a)	fold	2.981	0.776	14.742	1	0.000	19.701
		Constant	-8.565	2.033	17.750	1	0.000	0.000
糖尿病	Step 1(a)	fold	2.478	0.686	13.066	1	0.000	11.920
		Constant	-7.374	1.802	16.742	1	0.000	0.001

30

【表 10】

			B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
代謝症候群	Step 1(a)	fold	2.577	0.808	10.160	1	0.001	13.154
		bmi	0.260	0.109	5.701	1	0.017	1.298
		Constant	-14.037	3.266	18.475	1	0.000	0.000
糖尿病	Step 1(a)	fold	2.173	0.702	9.574	1	0.002	8.788
		bmi	0.101	0.097	1.077	1	0.299	1.106
		Constant	-9.137	2.656	11.836	1	0.001	0.000

40

【表 1 1】

			B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
代謝 症候 群	Step 1(a)	fold	2.422	0.837	8.375	1	0.004	11.264
		bmi	0.294	0.116	6.426	1	0.011	1.342
		年齢	0.040	0.031	1.727	1	0.189	1.041
		性別	0.260	0.642	0.163	1	0.686	1.296
		Constant	-16.789	4.135	16.488	1	0.000	0.000
糖 尿 病	Step 1(a)	fold	1.961	0.707	7.701	1	0.006	7.105
		bmi	0.103	0.102	1.026	1	0.311	1.109
		年齢	0.036	0.029	1.536	1	0.215	1.037
		性別	-.437	0.591	0.547	1	0.459	0.646
		Constant	-9.753	3.244	9.041	1	0.003	0.000

10

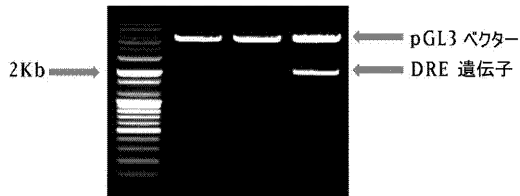
【産業上の利用可能性】

【0065】

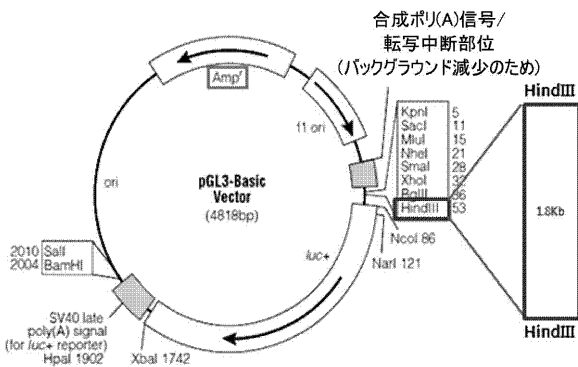
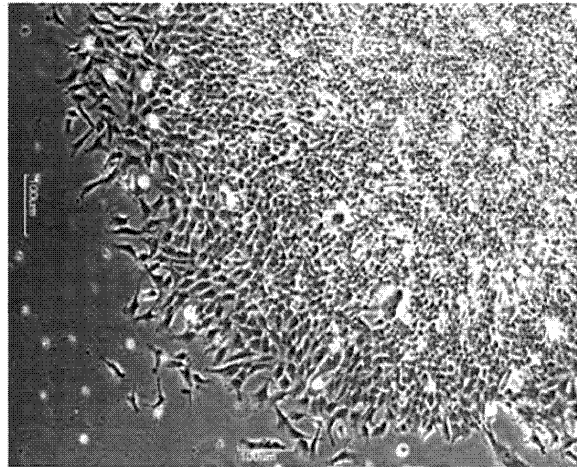
前記のように、ダイオキシン類化合物によって発現が調節される組換えレポーター遺伝子を含む形質転換細胞株を全血清 (total serum) で処理する本発明の検出システムは、血清内ダイオキシンを容易かつ正確に高効率で検出することができるので、ダイオキシン類化合物と患者の疾病因子間の相関性を基にして、疾病の発病予測及び治療可否判定のための診断技術分野に利用できる。

20

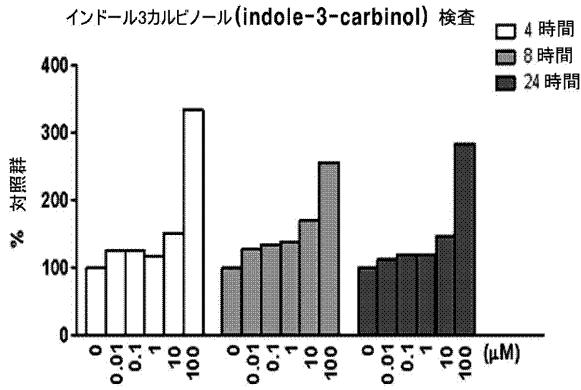
【図 1】



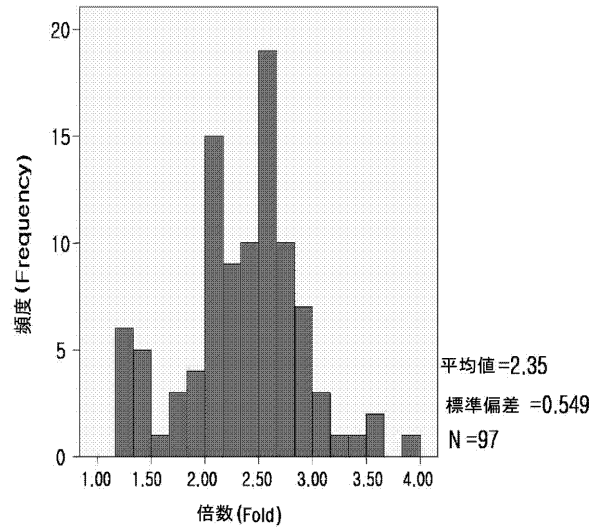
【図 2】



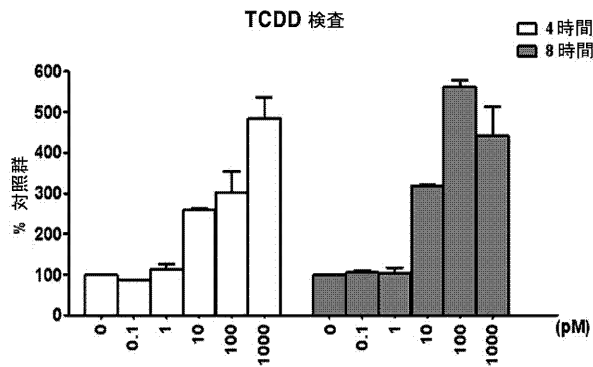
【 図 3 】



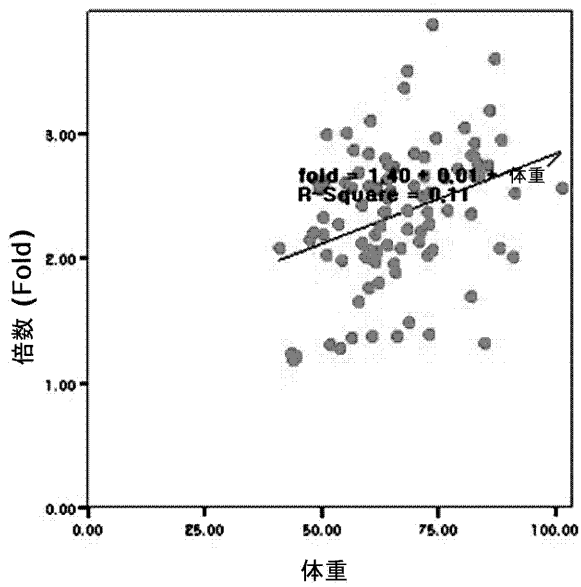
【 図 5 】



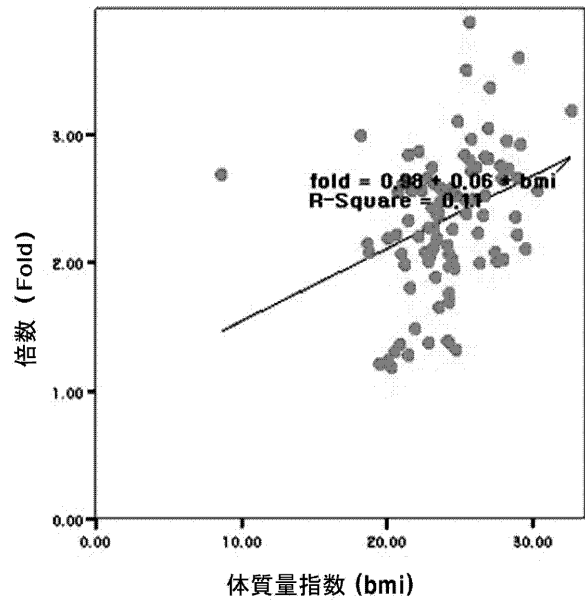
【 図 4 】



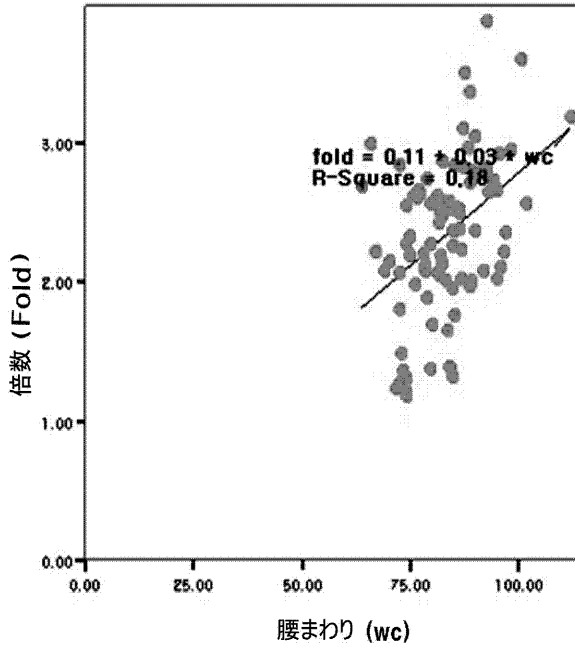
【 図 6 】



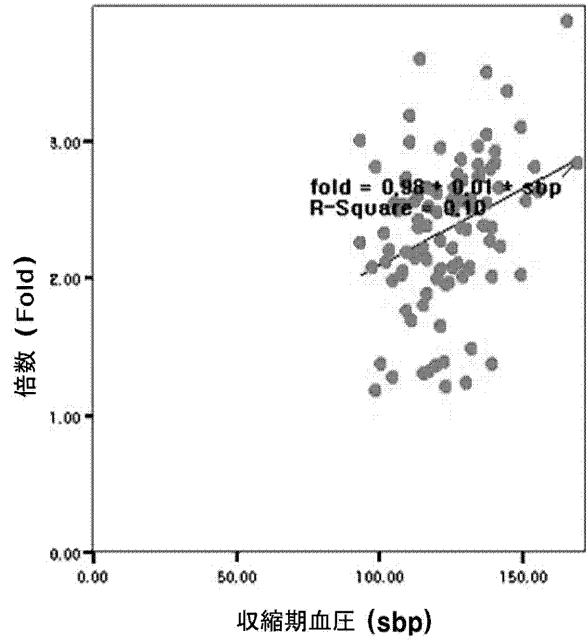
【 図 7 】



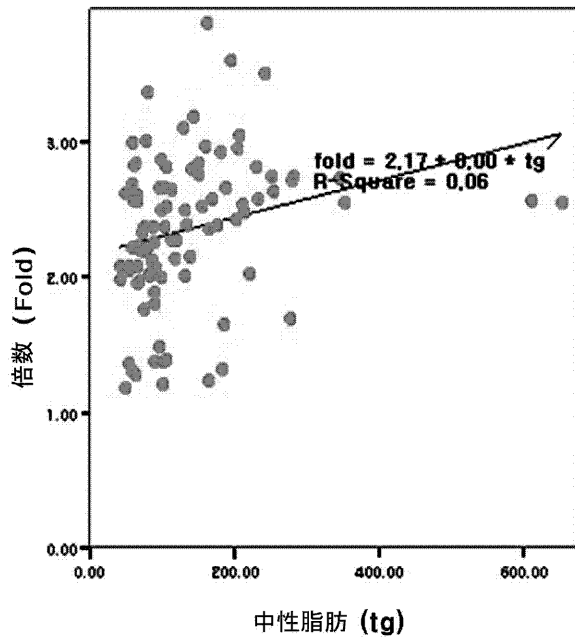
【 図 8 】



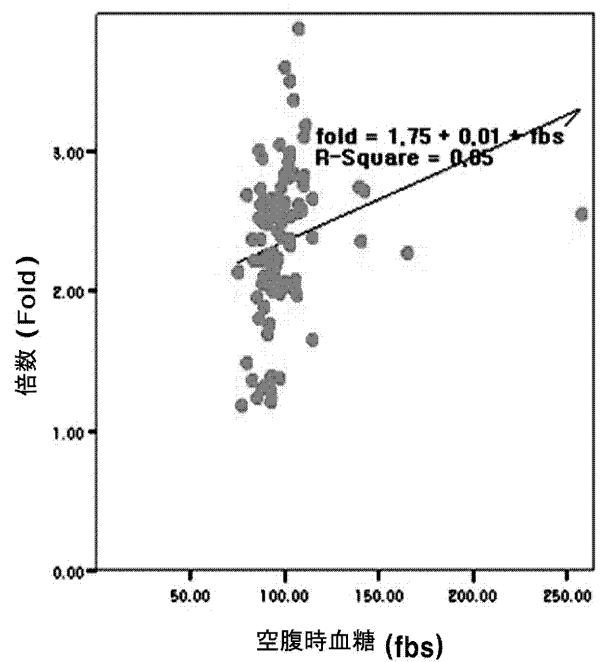
【 図 9 】



【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



【配列表】


2013540433000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/006583

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/85(2006.01)i, C12Q 1/66(2006.01)i</i> 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) C12Q 1/68; C07O 319/02; C12Q 1/66 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & Pubmed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 05854010 A (DENISON, M. et al.) 29 December 1998 See column 5, lines 42-55; column 14, line 6 - column 15, line 38; Fig.1.	1-9
A	MURK, A. J. et al. "The CALUX (Chemical-activated luciferase expression) assay adapted and validated for measuring TCDD equivalents in blood plasma" Environmental Toxicology and Chemistry. Vol.16 (8), pp.1583-1589 (August 1997) See abstract.	1-9
A	VONDRACEK, J. et al. "Monitoring river sediments contaminated predominantly with polycyclic aromatic hydrocarbons by chemical and in vitro bioassay techniques" Environmental Toxicology and Chemistry. Vol.20 (7), pp.1499-1506 (July 2001) See abstract.	1-9
A	KR 10-2001-0046920 A (POSTECH FOUNDATION) 15 June 2001 See abstract.	1-9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 18 APRIL 2012 (18.04.2012)		Date of mailing of the international search report 18 APRIL 2012 (18.04.2012)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/006583**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **10-13**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The claims pertain to a diagnostic method of diseases, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest



- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2011/006583

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 05854010 A	29.12.1998	CA 2200678 C	05.06.2007
KR 10-2001-0048920 A	15.06.2001	NONE	

국제 조사 보고서		국제출원번호 PCT/KR2011/006583
A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) <i>C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/85(2006.01)i, C12Q 1/66(2006.01)i</i>		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류물 기재) C12Q 1/68; C07O 319/02; C12Q 1/66 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & Pubmed		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 05854010 A (DENISON, M. 외 2명) 1998.12.29 See column 5, lines 42-55;column 14, line 6- column 15, line 38; Fig.1.	1-9
A	MURK, A. J. et al. 'The CALUX(Chemical-activated luciferase expression) assay adapted and validated for measuring TCDD equivalents in blood plasma' Environmental Toxicology and Chemistry. Vol.16(8),pp.1583-1589(August 1997) 초록 참조.	1-9
A	VONDRACEK, J. et al. 'Monitoring river sediments contaminated predominantly with polyaromatic hydrocarbons by chemical and in vitro bioassay techniques' Environmental Toxicology and Chemistry. Vol.20(7), pp.1499-1506 (July 2001) 초록 참조.	1-9
A	KR 10-2001-0046920 A (학교법인 포항공과대학교) 2001.06.15 초록 참조.	1-9
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2012년 04월 18일 (18.04.2012)		국제조사보고서 발송일 2012년 04월 18일 (18.04.2012)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 김지윤 전화번호 82-42-481-8288 

국제 조사 보고서

국제출원번호

PCT/KR2011/006583

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

- 1. 청구항: 10-13
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉, 상기 청구항은 질병의 진단방법에 해당하므로 PCT Art. 17(2)(a)(i) 및 Rule 39.1(iv)에 의하여 조사대상에 해당하지 않습니다.
- 2. 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
- 3. 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

- 1. 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
- 2. 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
- 3. 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
- 4. 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

- 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2011/006583

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 05854010 A	1998.12.29	CA 2200678 C	2007.06.05
KR 10-2001-0046920 A	2001.06.15	없음	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/66 (2006.01)	C 1 2 Q	1/66	
C 1 2 Q 1/42 (2006.01)	C 1 2 Q	1/42	
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q	1/48	Z
C 1 2 Q 1/34 (2006.01)	C 1 2 Q	1/34	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), EP(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, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, I D, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, 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, 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

(71)出願人 513057418
 リー, ホン キュ
 大韓民国 1 4 0 - 0 3 0 ソウル, ヨンサン - ク, イチョン - ドン, バンド アパートメント
 ナンバー 2 - 2 1 1

(74)代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔

(74)代理人 100118773
 弁理士 藤田 節

(74)代理人 100122389
 弁理士 新井 栄一

(74)代理人 100111741
 弁理士 田中 夏夫

(74)代理人 100171505
 弁理士 内藤 由美

(72)発明者 リー, ホン キュ
 大韓民国 1 4 0 - 0 3 0 ソウル, ヨンサン - ク, イチョン - ドン, バンド アパートメント
 ナンバー 2 - 2 1 1

(72)発明者 キム, ヨンミ
 大韓民国 1 3 5 - 5 1 9 ソウル, カンナム - ク, テチ 2 - ドン, ウスン 2 - チャ アパー
 トメント ナンバー 2 0 5 - 9 0 1

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA01 CA09 CA11 CA20 DA02 EA04 FA02 GA11
 HA09 HA11
 4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ26 QQ30 QQ33 QR77
 QS05 QS16 QS38 QX02

【要約の続き】

【選択図】図5

专利名称(译)	新的生物检测血清二恶英的方法及其对代谢综合征和相关症状的诊断用途		
公开(公告)号	JP2013540433A	公开(公告)日	2013-11-07
申请号	JP2013528112	申请日	2011-09-06
[标]申请(专利权)人(译)	庆熙大学校产学协力团 Rihonkyu		
申请(专利权)人(译)	ユニバー花旗海运コオpe口粮ofギョンヒユニバー花旗集团 李香队列		
[标]发明人	リーホンキュ キムヨンミ		
发明人	リー,ホン キュ キム,ヨンミ		
IPC分类号	C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/566 C12N15/09 C12Q1/66 C12Q1/42 C12Q1/48 C12Q1/34		
CPC分类号	C12Q1/66 C12Q1/6897 G01N33/5308 G01N2800/04 C12N2015/8572 G01N33/5067		
FI分类号	C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.J G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12Q1/66 C12Q1/42 C12Q1/48.Z C12Q1/34		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA09 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ26 4B063/QQ30 4B063/QQ33 4B063/QR77 4B063/QS05 4B063/QS16 4B063/QS38 4B063/QX02		
代理人(译)	荒井英一 内藤由美		
优先权	1020100088905 2010-09-10 KR		
其他公开文献	JP5736458B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种在生物学上检测血清中二恶英的新方法及其在代谢综合征和相关病症中的诊断用途，其中二恶英响应元件，启动子和报告基因可操作地连接。通过使用含有基因构建体和全血清的重组载体转化的细胞，荧光素酶活性得以测定，以证实血清二恶英含量与人体变量之间存在显著相关性。改进了需要预处理步骤进行纯化的现有方法，并允许通过使用全血清轻松、准确地分析整个样品，即使是非常少量的样品也是如此，因此表达受到二恶英的调节。在本发明中，用全血清处理含有要治疗的重组报告基因的转化细胞系。该系统可用于血清中二恶英的生物检测，并且通过使用这种方法通过精确地检测血清中二恶英样POP的存在或不存在，可以检测特定POP与患者的疾病因子之间的差异。可用于预测疾病发作和确定治疗是否适当。 [选择图]图5

