

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5552211号
(P5552211)

(45) 発行日 平成26年7月16日(2014.7.16)

(24) 登録日 平成26年5月30日(2014.5.30)

(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 Q 1/68 A
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N 33/53 M
G O 1 N	37/00	(2006.01)	G O 1 N 37/00 1 O 2

請求項の数 7 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2007-552703 (P2007-552703)	(73) 特許権者	504238301 ビオメリュー
(86) (22) 出願日	平成18年1月30日(2006.1.30)		フランス国 エフ-69280 マルシー レトワール
(65) 公表番号	特表2008-528018 (P2008-528018A)	(74) 代理人	110000914 特許業務法人 安富国際特許事務所
(43) 公表日	平成20年7月31日(2008.7.31)	(72) 発明者	パシヨ, アレクサンドル フランス国 エフ-01400 スリニャ 、 ルモン
(86) 国際出願番号	PCT/FR2006/050070	(72) 発明者	モヌレ, ギョーム フランス国 エフ-69008 リヨン, アヴェニュー ジェネラル フレール 60
(87) 国際公開番号	W02006/079760		
(87) 国際公開日	平成18年8月3日(2006.8.3)		
審査請求日	平成20年12月2日(2008.12.2)		
(31) 優先権主張番号	0550267		
(32) 優先日	平成17年1月31日(2005.1.31)		
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		
前置審査			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 敗血症症候群の診断及び／又は予後診断方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の工程：

- a . 核酸を含む生物材料を生物試料から抽出する工程、
- b . 生物材料を、配列番号1～28のいずれか1つを有する核酸配列を有する標的遺伝子に特異的な試薬から選択される28個の特異的な試薬と接触させる工程、
- c . 前記標的遺伝子の28個の発現を分析する工程、及び
- d . 配列番号1～18の核酸配列を有する標的遺伝子の発現が、予後が良好な患者に由来する生物材料と比較して増加し、配列番号19～28の核酸配列を有する標的遺伝子の発現が、予後が良好な患者に由来する生物材料と比較して減少した場合に、予後不良であると判定する工程：

を含むことを特徴とする

敗血症症候群の予後の判定方法。

【請求項2】

以下の工程：

- a . 核酸を含む生物材料を生物試料から抽出する工程、
- b . 生物材料を、配列番号1、3、7、9～15及び17～28のいずれか1つを有する核酸配列を有する標的遺伝子に特異的な試薬から選択される22個の特異的な試薬と接触させる工程、
- c . 前記標的遺伝子の22個の発現を分析する工程、及び

d . 配列番号 1、3、7、9 ~ 15、及び 17 ~ 18 の核酸配列を有する標的遺伝子の発現が、予後が良好な患者に由来する生物材料と比較して増加し、配列番号 19 ~ 28 の核酸配列を有する標的遺伝子の発現が、予後が良好な患者に由来する生物材料と比較して減少した場合に、予後不良であると判定する工程：

を含むことを特徴とする

敗血症症候群の予後の判定方法。

【請求項 3】

生物試料は血液試料である

ことを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の判定方法。

【請求項 4】

工程 b . の特異的試薬は、少なくとも 1 つのハイブリダイゼーションプローブを含むことを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の判定方法。

【請求項 5】

前記少なくとも 1 つのハイブリダイゼーションプローブは基体上に固定されていることを特徴とする請求項 4 に記載の判定方法。

【請求項 6】

敗血症症候群の予後を判定するための、配列番号 1、3、7、9 ~ 15 及び 17 ~ 28 のいずれか 1 つを有する核酸配列を有する標的遺伝子に特異的なプローブから選択される 2 2 個のハイブリダイゼーションプローブを有する基体の使用。

【請求項 7】

敗血症症候群の予後を判定するための、配列番号 1、3、7、9 ~ 15 及び 17 ~ 28 のいずれか 1 つを有する核酸配列を有する標的遺伝子に特異的な 2 2 個の試薬の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、敗血症症候群の診断及び / 又は予後診断方法に関する。また、本発明は、敗血症症候群の診断及び / 又は予後診断用のキットにも関する。

【背景技術】

【0002】

感染に対する全身性の反応である敗血症症候群は、集中治療室における死亡の主原因の 1 つである。これは、細菌、ウイルス、真菌又は寄生虫による感染によって生じ得る。この敗血症症候群のうち、以下のものは、重篤度の順位が徐々に高くなる点で区別することができる：敗血症、重症敗血症及び敗血症ショック。そのため、1992年に、専門家らにより、これらの 3 つの臨床的な症候群を定義するための基準が提起された（非特許文献 1）：

- ・例えば、敗血症は、感染に関係する炎症性の全身反応である、
- ・重症敗血症は、少なくとも 1 つの臓器の機能不全を伴う敗血症である、
- ・敗血症ショックは、持続する低血圧症を伴い、以下によって定義することができる重症敗血症である：

特定の感染部位の存在、

以下の兆候の少なくとも 3 つによって現れる全身性の炎症反応：a) 体温が 38 度より高いか又は 36 度より低い；b) 心拍が 1 分間に 90 回より多い；c) 呼吸速度が 1 分間に 20 回より遅い；d) 白血球数が $12,000$ 個 / mm^3 より多いか又は $4,000$ 個 / mm^3 より少ない、

適切な充填 (filling) とバソプレッシン処理をしたにもかかわらず、低血圧症が持続する。

【0003】

一般的に、敗血症、重症敗血症及び敗血症ショックの兆候は類似しており、これらの 3 種類の症状の間の差は主として、全生体機能の乱れの程度に現れる。敗血症ショックにおいては、動脈圧の低下、頻脈、多呼吸、皮膚の赤い炎症、低体温又は高体温、体の震えが、

10

20

30

40

50

主に観察される。また、これらの兆候には「標的」臓器の機能不全も伴い、感染部位から離れた臓器の機能の機能障害が伴って（腎臓、肺、中枢神経系、消化器系及び造血系が罹患する場合が最も多い）、乏尿症（ $< 0.5 \text{ ml / kg / 時間}$ ）、腎不全、低酸素血症、血小板減少症、興奮及び混乱状態として現れる。

【0004】

敗血症の段階から重症敗血症の段階へ、さらに敗血症ショックの段階へという敗血症症候群の進行は体系的ではない。というのは、敗血症患者のおよそ64%しか重症敗血症を発症せず、また重症敗血症の患者の23%しか敗血症ショックへと進行しないからである。敗血症ショックというこの最終的な段階の前に、生理病理学的プロセスを妨害しそして変更させるために、患者は所定の処置をうけなければならない。したがって、十分な血流学的状態に回復させること、及び、効果的な換気を実際に実施する必要がある。さらに、ショックの対症療法及び抗生物質による処置（可能な限り早く、細菌学的データに適しているもの）を制御することも必要である。

10

【0005】

したがって、敗血症症候群、特に敗血症ショックを発症する患者は、比較的簡単な処置（例えば、細菌学的試験により感染源を示す前に、広域抗生物質での処置を設定すること）によって改善する可能性があるが、それよりはるかに重症の敗血症症候群を発症する他の患者には、強力で大規模な処置（例えば、注射費用が非常に高い活性化プロテインCの注射）が必要である。このような処置は高価であるだけでなく、患者は非常に重い副作用のリスク（血液凝固の問題など）にもさらされる。したがって、この処置は、上記の処置が確実に必要とされる予後不良の患者についてのみ提案されるべきである。

20

【0006】

結果として、敗血症症候群の初期診断は不可欠であり、それによって患者にとって適切な処置を提案することが可能となる。さらに、それぞれの患者に適切な処置を提供するためには、さらには可能な限り早く予後不良の敗血症症候群患者及び徹底的な治療を要する患者及び予後の良好な患者を区別するためには、敗血症症候群、特に敗血症ショックの予後診断が不可欠である。最後に、大きな臨床的兆候が現れる前に可能な限り早く介入できるようにするために、敗血症を発症する恐れのある患者、例えば、外科手術又は移植を受けた患者や免疫抑制患者を観察することも非常に有効である。

30

【0007】

現在、敗血症症候群、特に敗血症ショックの診断及び予後診断は、原則として、内臓の機能不全の数、対症療法に対する応答、及び、最初の感染部位と二次感染の可能性がある任意の部位とについて医学的及び/又は外科的治療を実施できる程度に基づいている。

【0008】

しかし、これには、進行した段階の敗血症症候群、特に敗血症ショックのみにしか適用できず、患者の生存可能性が減少するという欠点がある。また、敗血症症候群の診断及び予後診断は、この症候群に関係している特定のタンパク質又は可溶性因子の検出に基づいて実施することもできる。したがって、敗血症症候群の発症中に関与している特定のサイトカインをアッセイすることは、敗血症症候群を診断する手段となり得、また予後診断を形成する手段でもあり得る。

40

【0009】

また、IL-1（インターロイキン-1）の血漿含有量と予後不良の敗血症症候群との間に明確な相関関係があるということについて記載している文献がある（非特許文献2）。しかし、それ以外の文献では、IL-1と敗血症症候群の予後不良の間には相関関係がないことも見出されており、このことから、この要素は非常に多様であるということが示唆される。さらに、高投与量のTNF（腫瘍壊死因子）もまた予後不良に関係している（非特許文献3）。TNF、そしてIL-1は、敗血症状態が引き起こされた後に単球から放出される最初の2つの炎症性サイトカインである。

【0010】

上記以外に、血漿IL-10（インターロイキン-10）含有量は予後不良の敗血症患者

50

において高い一方、予後の良好な敗血症患者においては有意に減少しており、また正常な患者においては検出できないことを示した（非特許文献4）。IL-10は、TNF- α の生産及びIL-1 β の生産を阻害するため極めて重要な抗炎症性サイトカインであり、免疫麻痺状態の構築に関与している。しかし、こうしたIL-10含有量の増加は、敗血症ショック患者の80%においてしか検出できないため、この要素の検出だけでは敗血症ショック発症の予後診断としてはいまだ不十分である。

【0011】

特許文献1においては、ELISA型免疫ブロッティング技術によるHMG1（高移動性グループ1タンパク質）の血清濃度測定を含む、敗血症症候群の重篤度の予後診断方法が記載されている。HMG1は、TNF- α 及びIL-1 β とは異なって、敗血症症候群の後期炎症性媒介因子として記載されている。高濃度のHMG1は予後不良に関係し、血清HMG1濃度は正常な患者においては検出されない。一方、マウスにおけるHMG1遺伝子の転写後調節について記載されており、このことから、この遺伝子の発現はタンパク質レベルでしか分析するべきではないことが示唆される（非特許文献5）。

10

【0012】

特許文献2によれば、IL-10、TGF- β 、HMG1、T-bet、IL-1 β 、TNF- α 及びGATA-3から選択される少なくとも2つの標的遺伝子の発現を判定する、敗血症症候群の予後診断方法が提供されている。このようなパネルを使用することによって、予後の良好な患者と予後不良の患者とを80%を超える割合で分類することが可能となる。しかし、患者を可能な限り早く徹底して処置するためには、特に、予後不良の患者の分類に関して、分類割合をさらに高めることが必要であろう。

20

【特許文献1】米国特許第US-B-6,303,321号

【特許文献2】特許出願WO04/108957

【非特許文献1】R. C. Boneら, The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest 101(6):1644-1655, 1992

【非特許文献2】Thijs & Hack, Intensive Care Med 31: S258-263, 1995

30

【非特許文献3】Caseyら, Ann Intern Med. 1993. 119: 771-778

【非特許文献4】Van der Poll, J. Infect. Dis. 175: 118-122, 1997

【非特許文献5】Wangら, Science, 1999, 第285巻、248-251頁

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明は、敗血症症候群、例えば、具体的には、敗血症ショックの診断及び/又は予後診断のための新規で信頼できるツールを提供することによって、先行技術の欠点を解決することを提案する。

40

【課題を解決するための手段】

【0014】

驚くべきことに、本発明者らによって、以下の表1に示されるように、28個の遺伝子から選択した標的遺伝子の発現を分析することは、予後の良好な患者と予後不良の患者との区別に対して極めて関係が深いことが明らかになった。このようなパネルを使用することによって、特に、予後不良の患者を100%の割合で分類することが可能となる。

【0015】

表1 本発明の28種類の遺伝子のリスト

50

【 0 0 1 6 】

【 表 1 】

配列番号	遺伝子名	GENBANK番号
1	ケモカイン(C-X3-Cモチーフ)受容体1	NM_001337
2	T細胞受容体δ多様性3	X72501
3	KIAA0882タンパク質	NM_015130
4	T細胞リンパ腫侵襲及び転移1	NM_003253
5	インターロイキン1、β	NM_000576
6	カルボニルレダクターゼ1	NM_001757
7	TIRDメインを含む分子1	NM_182919
8	FYNチロシinkinナーゼプロトオンコジーン	NM_002037
9	ヘパラナーゼ	NM_006665
10	SRY(性決定領域Y)ボックス4	NM_003107
11	インターロイキン2受容体、β	NM_000878
12	Raft結合タンパク質	NM_015150
13	CGI-40タンパク質ヒトSID1膜貫通ファミリー、メンバー2	NM_015996
14	グルコース-6-ホスファターゼ触媒サブユニット3	NM_138387
15	マンノシダーゼα、クラス1Aメンバー2	NM_006699
16	骨髄分化一次応答遺伝子(88)	NM_002468
17	リボソームタンパク質L6	NM_000970
18	リボソームタンパク質L10a	NM_007104
19	sin3結合ポリペプチド、30kDa	NM_003864
20	有糸分裂活性化プロテインキナーゼ活性化プロテインキナーゼ2	NM_004759
21	プレセンリンエンハンサー2	NM_172341
22	仮想タンパク質LOC55924	NM_019099
23	溶質担体ファミリー39(亜鉛トランスポーターメンバー7)	NM_006979
24	グルタチオンペルオキシダーゼ3(血漿)	NM_002084
25	ヘモクロマトーシス	NM_000410
26	cfosプロモーターの転写活性化因子	NM_006365
27	ペルオキシソーム生合成因子6	NM_000287
28	ハンチンチン相互作用タンパク質	NM_005338

10

20

30

【 0 0 1 7 】

いくつかの変異体と同じ標的遺伝子について存在する場合もある。本発明は全ての変異体に関係している。これらの遺伝子に対して多様なイソ型が存在する場合には、上記の表に示されたものだけではなく、全てのイソ型が本発明に関係するということが明確に理解される。この点において、特に、配列番号8の標的遺伝子には3種類の変異体が存在する；上記の表には第1の変異体のみが示されているが、第2の変異体(Genbank登録番号NM_153047)及び第3の変異体(Genbank登録番号NM_153048)も同様に本発明の目的に関係しているということに注目すべきである。

【 0 0 1 8 】

同様に、配列番号20の標的遺伝子については2種類の変異体が存在している；上記の表には第1の変異体のみが示されているが、第2の変異体(Genbank登録番号NM_032960)も同様に本発明の目的に関係している。同様に、配列番号22の標的遺伝子については2種類の変異体が存在している；上記の表には第1の変異体のみが示されているが、第2の変異体(Genbank登録番号NM_198926)も同様に本発明の目的に関係している。最後に、配列番号25の標的遺伝子については11種類の変異体が存在している；上記の表には第1の変異体のみが示されているが、他の変異体(Genbank登録番号NM_139002；NM_139003；NM_139004；NM_139005；NM_139006；NM_139007；NM_139008；NM_139009；NM_139010；NM_139011)も同様に本発明の目的に関係

40

50

している。

【 0 0 1 9 】

この趣旨で、本発明は、
以下の工程：

- a . 生物材料を生物試料から抽出する工程、
- b . 生物材料を、配列番号 1 ~ 2 8 のいずれか 1 つを有する核酸配列を有する標的遺伝子に特異的な試薬から選択される少なくとも 1 つの特異的試薬と接触させる工程、
- c . 上記標的遺伝子の少なくとも 1 つの発現を判定する工程：

を含むことを特徴とする
患者に由来する生物試料に基づく敗血症症候群の診断 / 予後診断方法
に関する。

10

【 0 0 2 0 】

本発明の目的のために、用語「生物試料」は、以下に規定されるような生物材料を含んでいてよい、患者から採取した任意の試料を意味するものとする。この生物試料は具体的には、患者由来の血液、血清、唾液、組織又は循環細胞試料であってよい。この生物試料は、当業者に公知の任意の試料採取方法によって得られる。本発明の好ましい実施形態によれば、患者から採取する生物試料は血液試料である。

【 0 0 2 1 】

本発明の方法の工程 a) においては、生物材料を、当業者に周知の核酸抽出及び精製プロトコルのいずれかによって生物試料から抽出する。本発明において、用語「生物材料」は、標的遺伝子の発現を検出することが可能な任意の材料を意味するものとする。生物材料には、具体的には、タンパク質又は核酸、例えば、具体的には、デオキシリボ核酸 (D N A) 又はリボ核酸 (R N A) が含まれていてよい。核酸は、具体的には、R N A (リボ核酸) であってよい。本発明の好ましい実施形態によれば、工程 a) で抽出された生物材料には、核酸、好ましくは R N A が含まれ、さらに好ましくは総 R N A が含まれる。総 R N A には、トランスファー R N A 、メッセンジャー R N A (m R N A) (例えば、標的遺伝子から転写された m R N A であるが、任意の他の遺伝子から転写された m R N A であってもよい) 、及び、リボソーム R N A が含まれる。生物材料には、標的遺伝子に特異的な材料 (例えば、具体的には、標的遺伝子から転写された m R N A 、又は、これらの m R N A に由来するタンパク質) が含まれるが、これには、標的遺伝子に特異的ではない材料 (例

20

30

【 0 0 2 2 】

例えば、核酸の抽出は以下によって行うことができる：

- 患者の細胞に含まれる核酸を放出させるために、生物試料中に存在している細胞を溶解させることからなる工程。

例えば、複数の特許出願に記載されているような溶解の方法を使用することができる：

磁気による溶解と機械的溶解の組み合わせに関する W O 0 0 / 0 5 3 3 8

電氣的溶解に関する W O 9 9 / 5 3 3 0 4

機械的溶解に関する W O 9 9 / 1 5 3 2 1 。

40

【 0 0 2 3 】

当業者は、熱ショック若しくは浸透圧ショック、又は、グアニジウム塩等のカオトロピック剤を使用した化学溶解 (米国特許第 5 , 2 3 4 , 8 0 9 号) 等の他の周知の溶解方法を使用してもよい。

- 溶解工程で放出された他の細胞構成要素から核酸を分離するための精製工程。概してこの工程では核酸の濃縮が可能であり、かつ、この工程は D N A 又は R N A の精製に利用することができる。例えば、吸着又は共有原子価により必要に応じてオリゴヌクレオチドでコーティングされた磁性粒子 (この点で、米国特許第 4 , 6 7 2 , 0 4 0 号及び米国特許第 5 , 7 5 0 , 3 3 8 号を参照のこと) を使用可能であり、例えば、この磁性粒子に付着する核酸は洗浄工程によって精製することができる。引き続いて上記核酸の増幅が望まれ

50

る場合に、この核酸精製工程は特に有利である。この磁性粒子の特に有利な実施形態は、特許出願WO - A - 97 / 45202及びWO - A - 99 / 35500に記載される。核酸の精製方法の別の有利な例は、カラムの形態での、又は、不活性粒子 (Boom Rら、J. Clin. Microbiol.、1990、n°28(3)、p. 495~503)若しくは磁性粒子 (Merck社: Mag Prep (登録商標) Silica, Promega社: Magne Sil (商標) 常磁性粒子)の形態でのシリカの使用である。これ以外に、カラムにおける、又は、常磁性粒子型 (Whatman社: DEAE - magarose) (Levison PRら、J. Chromatography、1998、p. 337~344)におけるイオン交換樹脂に基づく方法も非常に広範に使用される。本発明に大いに関連している別の方法は、金属酸化物支持体 (Xtrana社: Xtra - Bind (商標) マトリックス)への吸着であるが、これに限定されない。

10

【0024】

生物試料からDNAを特異的に抽出したい場合、具体的にフェノール、クロロホルム及びアルコールを使用して抽出し、タンパク質を除去して、DNAを100%エタノールで沈殿させることができる。その後、DNAを遠心分離によってペレット化し、洗浄して再度溶解させることができる。

【0025】

続いて生物試料からRNAを抽出したい場合、具体的にフェノール、クロロホルム及びアルコールを使用して抽出し、タンパク質を除去して、RNAを100%エタノールで沈殿させることができる。その後、RNAを遠心分離によってペレット化し、洗浄して再度溶解させることができる。

20

【0026】

工程b)において、かつ、本発明において、用語「特異的試薬」は、上記で定義された生物材料と接触した場合に、上記標的遺伝子に特異的な材料と結合する試薬を意味するものとする。例えば、特異的試薬と生物材料が核酸起源である場合は、特異的試薬を生物材料と接触させることによって、特異的試薬を標的遺伝子に特異的な材料とハイブリダイズさせることができる。用語「ハイブリダイゼーション」は、適切な条件下で、2つのヌクレオチド断片が安定かつ特異的な水素結合で結合し、その結果、二本鎖の複合体を形成するプロセスを意味するものとする。この水素結合は、相補的塩基アデニン (A)とチミン (T) (又はウラシル (U))との間 (A - T結合を指す)、あるいは、相補的塩基グアニン (G)とシトシン (C)との間 (G - C結合を指す)の間に生じる。2つのヌクレオチド断片のハイブリダイゼーションが完全なものである場合 (この場合、相補的ヌクレオチド断片又は配列と呼ばれる)、すなわち、このハイブリダイゼーションの間に得られる二本鎖複合体は、A - T結合及びC - G結合のみを含む。このハイブリダイゼーションが部分的なものである場合 (この場合、十分に相補的なヌクレオチド断片又は配列と呼ばれる)、すなわち、得られた二本鎖複合体は、二本鎖複合体を形成できるA - T結合及びC - G結合を含むだけでなく、相補的塩基に結合しない塩基をも含む。2つのヌクレオチド断片の間のハイブリダイゼーションは、使用される作動条件及び特にストリンジェンシーに依存する。ストリンジェンシーは、特に2つのヌクレオチド断片の塩基組成に応じて、かつ、これら2つのヌクレオチド断片間のミスマッチの程度によって規定される。また、ストリンジェンシーは、ハイブリダイゼーション溶液中に存在するイオン種の濃度及び種類、変性剤の性質及び濃度、並びに/又は、ハイブリダイゼーション温度等の、反応パラメータにも依存するであろう。これらのデータは全て既知のものであり、当業者であれば適切な条件を決定することができる。一般的に、ハイブリダイズさせるヌクレオチド断片の長さによって、濃度約0.5~1Mの食塩水中におけるハイブリダイゼーション温度は約20~70、特に35~65である。配列又はヌクレオチド断片又はオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドは、リン酸エステル結合によりまとまっている一連のヌクレオチドモチーフであり、これはヌクレオチドモチーフにハイブリダイズ可能な天然の核酸の情報配列を特徴とするものであり、上記一連のヌクレオチドモチーフは、異なる構造のモノマーを含んでいてよく、かつ、天然の核酸分子から及び/又は遺伝子組換えによって及

30

40

50

びノ又は化学合成によって取得可能である。モチーフは、構成要素が糖、リン酸基及び窒素性塩基である天然の核酸ヌクレオチドであってよいモノマーの誘導体である；DNAにおいて、糖は2-デオキシリボースであり、RNAにおいて、糖はリボースである；DNA及びRNAのいずれの場合であるかによって、窒素性塩基がアデニン、グアニン、ウラシル、シトシン及びチミンから選択される；あるいは、モノマーは、これらの3つの構成要素の少なくとも1つが修飾されたヌクレオチドである；例えば、この修飾は、塩基のレベルで、イノシン、メチル-5-デオキシシチジン、デオキシウリジン、ジメチルアミノ-5-デオキシウリジン、ジアミノ-2,6-プリン、プロモ-5-デオキシウリジン又はハイブリダイゼーション可能な他の任意の修飾塩基等の修飾塩基によって、又は、糖のレベルで、例えばポリアミンによる少なくとも1つのデオキシリボースの置換によって（P. E. Nielsenら、Science、254、1497～1500（1991））、又は、リン酸基のレベルで、例えば具体的には二リン酸エステル、アルキルリン酸エステル、アリールリン酸エステル及びホスホロチオエートから選択されるエステルによるリン酸基の置換のいずれかで生じ得る。

10

【0027】

本発明の特定の実施形態によれば、特異的試薬は少なくとも1つの増幅プライマーを含む。本発明の目的のために、用語「増幅プライマー」は、酵素的重合（例えば酵素的増幅反応）を開始できる核モチーフを5～100、好ましくは核モチーフを15～30含むヌクレオチド断片を意味するものとする。用語「酵素的増幅反応」は、少なくとも1つの酵素の作用によってヌクレオチド断片の複数のコピーを生成するプロセスを意味するものとする。このような増幅反応は当業者に公知であり、具体的には下記の技術を挙げることができる：

20

【0028】

- 米国特許第4683195号、米国特許第4683202号及び米国特許第4800159号に記載されるPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）；
- 例えば欧州特許出願第0201184号に開示されるLCR（リガーゼ連鎖反応）；
- 国際特許出願WO90/01069に記載されるRCR（修復連鎖反応（repair chain reaction））；
- 国際特許出願WO90/06995による3SR（自立配列複製（self sustained sequence replication））；
- 国際公開WO91/02818によるNASBA法（核酸配列増幅法）
- 米国特許第5399491号によるTMA法（転写介在増幅法）。

30

【0029】

酵素による増幅がPCRである場合は、特異的試薬には、標的遺伝子に特異的な少なくとも2つの増幅プライマーが含まれ、これらによって標的遺伝子に特異的な材料の増幅が可能となる。したがって、標的遺伝子に特異的な材料には、好ましくは、標的遺伝子に由来するメッセンジャーRNAの逆転写によって得られる相補的DNA（この場合、標的遺伝子特異的cDNAと呼ばれる）、又は、標的遺伝子に特異的なcDNAの転写によって得られる相補的RNA（この場合、標的遺伝子特異的cRNAと呼ばれる）が含まれる。酵素による増幅が、逆転写反応後に実施されるPCRである場合には、RT-PCRと呼ばれる。

40

【0030】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、工程b)の特異的試薬は、少なくとも1つのハイブリダイゼーションプローブを含む。

【0031】

用語「ハイブリダイゼーションプローブ」は、標的遺伝子に特異的な物質と共に所定の条件下でハイブリダイゼーション複合体を形成するためのハイブリダイゼーション特異性を有するヌクレオチドモチーフを少なくとも5、例えば核モチーフを5～100、特に核モチーフを10～35含むヌクレオチド断片を意味するものとする。

【0032】

50

本発明においては、標的遺伝子に特異的な材料は、標的遺伝子に由来するメッセンジャーRNAに含まれるヌクレオチド配列（この場合、標的遺伝子特異的mRNAと呼ばれる）、上記メッセンジャーRNAの逆転写によって得られた相補的DNAに含まれるヌクレオチド配列（この場合、標的遺伝子特異的cDNAと呼ばれる）、あるいは、上記のように、上記cDNAの転写によって得られた相補的RNAに含まれるヌクレオチド配列（この場合、標的遺伝子特異的cRNAと呼ばれる）であってよい。

【0033】

ハイブリダイゼーションプローブは、その検出のためのマーカを含んでいてよい。用語「検出」は、物理的方法による直接的検出、又は、標識を使用する検出方法による間接的検出のいずれかを意味するものとする。核酸の検出のために、多くの検出方法が存在する [例えば、Krickaら, *Clinical Chemistry*, 1999, No. 45(4), p. 453-458、又は、Keller G.H.ら, *DNA Probes*, 2nd ed., Stockton Press, 1993, section 5 and 6, p. 173-249を参照のこと]。用語「標識」は、検出可能なシグナルを発生可能なトレーサーを意味するものとする。これらのトレースとしては、例えば比色法、蛍光又は発光により検出され得るシグナルを生じる酵素が挙げられ、例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ又はグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ；蛍光、ルミネセンス又は染料化合物等の発色団；電子顕微鏡法によって又は導電率等のそれらの電気的性質によって、電流測定法又はボルタンメトリー法によって、あるいはインピーダンス測定によって検出可能な、高電子密度の基；回折、表面プラズモン共鳴若しくは接触角変動のような光学的方法により、又は、原子力顕微鏡、トンネル効果などの物理的方法により検出され得る基； ^{32}P 、 ^{35}S 又は ^{125}I 等の放射性分子が含まれるが、これらに限定されない。

【0034】

本発明の目的のために、ハイブリダイゼーションプローブは「検出」プローブであってもよい。この場合、「検出」プローブは、上記に定義されるような標識によって標識される。検出プローブは、具体的には、Tyagi & Kramer (*Nature biotech*, 1996, 14: 303~308)によって記載されるような「分子ビーコン (molecular beacon)」検出プローブであってよい。この「分子ビーコン」は、ハイブリダイゼーション中に蛍光を発する。分子ビーコンはステムループ型構造を有し、フルオロフォア及び「クエンチャー」基を含む。特異的なループ配列とその相補的な標的核酸配列とが結合することにより、適切な波長での励起の間にステムの立体構造の消失及び蛍光シグナルの放出が引き起こされる。

【0035】

ハイブリダイゼーション反応の検出のためには、直接的（具体的には、標的配列の中に標識を取り込ませることによる）又は間接的（具体的には、上記で定義されたような検出プローブを使用することによる）に標識された標的配列を使用することができる。具体的には、ハイブリダイゼーション工程の前に、例えば、酵素による増幅反応の間に標識されたデオキシリボヌクレオチド3リン酸を使用して、標的配列を標識及び/又は切断することからなる工程を実行することができる。切断は、具体的には、イミダゾール又は塩化マンガンの作用によって行うことができる。また、増幅工程の後に、例えば、PCT特許出願WO91/19812号に記載されたサンドウィッチハイブリダイゼーション技術により検出プローブをハイブリダイズすることによって、標的配列を標識することができる。核酸を標識するための別の特定の好ましい方法は、フランス国出願FR2780059号に記載される。

【0036】

本発明の好ましい実施形態によれば、検出プローブはフルオロフォア及びクエンチャーを含む。本発明の更に好ましい実施形態によれば、ハイブリダイゼーションプローブはFAM (6-カルボキシフルオレゼン) 又はROX (6-カルボキシ-X-ローダミン) フルオロフォアをその5'末端に含み、クエンチャー (ダブシル) をその3'末端に含む。

ハイブリダイゼーションプローブは、「“捕捉”プローブ」であってもよい。この場合、“捕捉”プローブは、固定されているか、又は、任意の適切な手段で、すなわち、直接的に又は間接的に、例えば共有結合又は吸着により、固相基体上に固定されていてよい。必要に応じて化学修飾した合成材料又は天然材料を固相支持体として用いることができ、特に、セルロース系材料などの多糖類（例えば、紙、酢酸セルロース及びニトロセルロース又はデキストランなどのセルロース誘導体、特にスチレン系モノマーに基づくポリマー、コポリマー、綿などの天然繊維、並びに、ナイロンなどの合成繊維；シリカ、水晶、ガラス又はセラミックなどの無機材料；格子；磁性粒子；金属誘導体、ゲルなどが挙げられる。固相基体は、マイクロタイタープレート、PCT特許出願WO-A-94/12670号に記載の膜、又は、粒子の形態であってもよい。さらに、基体上に（それぞれが標的遺伝子に特異的な）いくつかの異なる捕捉プローブを固定することもできる。特に、多くのプローブを固定できるバイオチップを基体として使用してもよい。

10

【0037】

用語「“バイオチップ”」は、多数の捕捉プローブが所定の位置に結合した、小さな固相基体を意味するものとする。バイオチップ又はDNAチップの概念は、1990年代初頭から始まった概念である。これは、マイクロエレクトロニクス、核酸化学、画像分析及び情報技術を統合した複数の学科の技術に基づくものである。作動の原理は、分子生物学：ハイブリダイゼーション現象、すなわち、2つのDNA及び/又はRNA配列の塩基の相補性による対形成を基礎にして構築される。バイオチップ法は、固相基体に結合した捕捉プローブの使用に基づくものであり、蛍光色素で直接的に又は間接的に標識された標的ヌクレオチド断片の試料が上記プローブに作用する。捕捉プローブは、基体又はチップ上に特異的に位置しており、それぞれのハイブリダイゼーションにより、標的ヌクレオチド断片に関連して、情報の特定の一部が得られる。得られた情報が蓄積されることによって、例えば、1つ又はそれ以上の標的遺伝子の発現レベルを定量できる。標的遺伝子の発現を分析するため、標的遺伝子の全て又は一部に対応して、mRNAに転写される、多数のプローブを有する基体を調製することができる。本発明の目的のために、用語「低密度基体」は、プローブを50未満含む基体を意味するものとする。本発明の目的のために、用語「中密度基体」は、プローブを50～10,000含む基体を意味するものとする。本発明の目的のために、用語「高密度基体」は、プローブを10,000より多く含む基体を意味するものとする。

20

30

【0038】

その後、分析対象である、標的遺伝子に特異的なcDNA又はcRNAを、例えば特異的な捕捉プローブとハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーション後、基体又はチップを洗浄し、標識されたcDNA又はcRNA/捕捉プローブ複合体を、例えば蛍光色素型の標識と結合した、高親和性のリガンドを用いて顕現化する。蛍光を例えばスキャナで読み取り、蛍光分析を情報技術により処理する。例えば、アフィメトリクス社により開発されたDNAチップを挙げることができる（“Accessing Genetic Information with High-Density DNA arrays”, M. Cheeら, Science, 1996, 274, 610-614, “Light-produced oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis”, A. Caviani Peaseら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 5022-5026）。

40

【0039】

この技術において、捕捉プローブは一般的に大きさが小さく、約25ヌクレオチドである。バイオチップの他の例は、G. Ramsayによる刊行物であるNature Biotechnology, 1998, No. 16, p. 40-44; F. Ginot, Human Mutation, 1997, No. 10, p. 1-10; J. Chengら, Molecular diagnosis, 1996, No. 1(3), p. 183-200; T. Livacheら, Nucleic acids Research,

50

1994, No. 22 (15), p. 2915 - 2921; J. Chengら, Nature Biotechnology, 1998, No. 16, p. 541 - 546、又は、米国特許US - A - 4, 981, 783号、米国特許US - A - 5, 700, 637号、米国特許US - A - 5, 445, 934号、米国特許US - A - 5, 744, 305号及び米国特許US - A - 5, 807, 522号に記載される。固相基体の主な特徴は、捕捉プローブの標的ヌクレオチド断片へのハイブリダイゼーション特性を保持する一方、検出方法についてはバックグラウンドノイズが最小であるものでなければならない。

【0040】

主要な3種の構成は、プローブを基体上に固定できるか否かによって識別できる。

【0041】

まず第1に、予め合成されたプローブを正確に配置することからなる第1の技術がある。プローブの結合は、マイクロピペット又はマイクロドットによる、あるいは、インクジェットデバイスによる、直接的な移動によって実施される。この技術によって、数塩基(5から10)から、上限で比較的大きな60塩基(プリント)から数百塩基(マイクロデポジション)までの範囲の大きさを有するプローブの結合が可能となる。

【0042】

プリントは、インクジェットプリンターによって使用される方法の適用である。4000滴/秒に達し得る速度の非常に小さい流体スフェア(容量<1nl)の推進に基づく。プリントにおいて、流体を放出するシステムとそれを沈着させる表面との間は全く接触しない。

【0043】

マイクロデポジションは、スライドガラスの表面に長さ数十~数百塩基のプローブを結合させることからなる。これらのプローブは、通常は、データベースから抽出し、増幅して精製した産物の形態である。この技術により、 4 cm^2 に少し満たない表面積上のDNAに、認識領域と呼ばれるおよそ10000個のスポットを有するマイクロアレイと呼ばれるチップを得ることができる。しかし、直径0.5~1mmで最大密度25スポット/ cm^2 の、通常はPCRで増幅した産物を有する、「マイクロアレイ」と呼ばれるナイロンメンブレンの使用を忘れてはならない。この非常に柔軟な技術は、多くの研究室で使用されている。本発明においては、後者の技術はバイオチップに含まれると考えられる。しかし、国際特許出願番号WO - A - 00 / 71750及びFR00 / 14896の場合のように、特定の容量の試料をマイクロ滴定プレートの底のそれぞれのウェルに沈着させることができ、また、別の国際特許出願FR00 / 14691に記載されているように、互いに異なる特定の数の液滴を1つの同じペトリ皿の底に沈着させることもできる。

【0044】

基体又はチップにプローブを結合させるための第2の技術は、*in situ*合成と呼ばれる。この技術によれば、チップの表面に短いプローブが直接製造される。これは、*in situ*オリゴヌクレオチド合成(具体的には、国際特許出願番号WO89 / 10977及び同WO90 / 03382を参照のこと)に基づき、そして、オリゴヌクレオチド合成装置によるプロセスに基づく。これは、反応チャンバーを移動させることからなり、ここでは、オリゴヌクレオチド伸張反応はガラス表面に沿って起こる。

【0045】

最後に、第3の技術は、フォトリソグラフィーと呼ばれる。これは、アフィメトリクス社によって開発されたバイオチップに関係しているプロセスである。これもまた*in situ*合成である。フォトリソグラフィーは、マイクロプロセッサ技術に由来する。チップの表面は、光で活性化させることができる光解離性の化学基の結合によって改良される。一旦照射されると、これらの基は、オリゴヌクレオチドの3'末端と反応することができる。所定の形状のマスクでこの表面を保護することによって、4種類のヌクレオチドの1つ又は他のものへの結合が望ましいチップ領域を選択的に照射し、これにより、活性化させることができる。様々なマスクの連続的な使用によって、保護/反応のサイクルを交互に行うことが可能となり、したがって、およそ数十マイクロ平方メートル(μm^2)の

10

20

30

40

50

スポット上にオリゴヌクレオチドプローブを製造できる。この解析によって、数平方センチメートル (cm^2) の表面領域上に最大で数十万のスポットを作成することができる。フォトリソグラフィは、平行してバルクで、わずか $4 \times N$ 回のサイクルで N 体 ($N\text{-mer}$) のチップを作成することが可能であるという利点を有する。これらの技術の全てを本発明とともに使用することができる。本発明の好ましい実施形態によれば、上記で定義された工程 b) の少なくとも 1 つの特異的試薬には、基体上に固定化することが好ましい少なくとも 1 つのハイブリダイゼーションプローブが含まれる。この基体は、好ましくは、上記で定義された低密度、高密度又は中密度の基体である。

【0046】

多数のプローブを含む、基体上でのこれらのハイブリダイゼーション工程は、上記で定義されたように酵素による増幅反応工程によって、標的の遺伝物質の量を増加させることができる。

10

【0047】

工程 c) においては、標的遺伝子の発現の判定は、当業者に公知の任意のプロトコルによって行うことができる。

【0048】

一般的には、標的遺伝子の発現は、所定の瞬間に標的遺伝子から転写された mRNA (メッセンジャー RNA) を検出すること、又は、これらの mRNA に由来するタンパク質を検出することによって分析することができる。

【0049】

本発明は、好ましくは、当業者に周知のプロトコルのいずれかにしたがう、この標的遺伝子に由来する mRNA の検出による標的遺伝子の発現の判定に関する。本発明の具体的な実施形態によれば、いくつかの標的遺伝子の発現は、いくつかの異なる mRNA (それぞれの mRNA が標的遺伝子に由来する) の検出によって同時に判定される。

20

【0050】

特異的試薬に少なくとも 1 つの増幅プライマーが含まれる場合は、本発明の方法の工程 c) において、以下の方法において標的遺伝子の発現を判定することが可能である：

【0051】

1) 生物材料として、上記に示された生物試料から総 RNA (トランスファー RNA (tRNA)、リボソーム RNA (rRNA) 及びメッセンジャー RNA (mRNA) を含む) が抽出された後、逆転写工程が、上記 mRNA の相補的 DNA (すなわち cDNA) を得るために実施される。例えば、この逆転写反応は逆転写酵素を使用して行うことができ、これによって、RNA 断片から相補的 DNA 断片を得ることができる。具体的には、AMV (鳥類筋芽細胞腫ウイルス (Avian Myoblastosis Virus)) 又は MMLV (マウス白血病ウイルス (Moloney Murine Leukemia Virus)) に由来する逆転写酵素を使用することができる。より具体的に mRNA の cDNA だけを得たい場合には、この逆転写工程を、チミン塩基のみを含むヌクレオチド断片 (ポリ T) の存在下で実施する。チミン塩基のみを含むヌクレオチド断片は、mRNA のポリ A 配列に対して相補性によってハイブリダイズし、その結果、ポリ T - ポリ A 複合体が形成され、これは、その後、逆転写酵素によって実施される逆転写反応の開始点として作用する。次いで、標的遺伝子に由来する mRNA に相補的な cDNA (標的遺伝子特異的 cDNA) 及び標的遺伝子以外の遺伝子に由来する mRNA に相補的な cDNA (標的遺伝子に特異的ではない cDNA) が得られる。

30

40

【0052】

2) 標的遺伝子に特異的な増幅プライマーを、標的遺伝子特異的 cDNA 及び標的遺伝子に特異的ではない cDNA と接触させる。標的遺伝子に特異的な増幅プライマーは標的遺伝子特異的 cDNA とハイブリダイズし、そして標的遺伝子に由来する mRNA を起源とする cDNA の既知長さの所定領域が特異的に増幅される。標的遺伝子に特異的ではない cDNA は増幅されないが、多量の標的遺伝子特異的 cDNA が得られる。本発明においては、無差別に、「標的遺伝子特異的 cDNA」又は「標的遺伝子に由来する mRNA を

50

起源とする cDNA」と呼ばれる。この工程は、具体的には、PCR型の増幅反応によって、又は、上記で定義された他の任意の増幅技術によって行うことができる。PCRによっては、いくつかの異なる cDNA（それぞれが異なる標的遺伝子に特異的である）を、いくつかの対の異なる増幅プライマー（それぞれが標的遺伝子に特異的である）を使用することによって同時に増幅することも可能であり、したがって、多重増幅と呼ばれる。

【0053】

3) 標的遺伝子の発現は、上記工程2)で得られた標的遺伝子特異的 cDNAを検出及び定量することによって判定される。この検出は、それらの大きさにしたがって標的遺伝子特異的 cDNAの電気泳動後に行うことができる。移動用のゲル及び媒体はエチジウムブロマイドを含むものであってよく、これによって、所定の移動時間の経過後に、UV（紫外線）照射台の上にゲルを置き、光シグナルの放射によって標的遺伝子特異的 cDNAを直接検出することができる。標的遺伝子特異的 cDNAの量が多ければ多いほど、この光シグナルは明るくなる。これらの電気泳動技術は当業者に周知である。また、標的遺伝子特異的 cDNAは、飽和まで増幅反応を実施することによって得られた定量範囲により、検出及び定量することもできる。種々の工程（逆転写、PCRなど）中に観察され得る酵素効率の変動性を考慮するためには、様々な患者グループにおける標的遺伝子の発現を、様々な患者グループ間で発現が類似している「ハウスキーピング」遺伝子の発現を同時に判定することによって標準化することができる。このように、ハウスキーピング遺伝子の発現に対する標的遺伝子の発現の割合を明確にすることによって（すなわち、ハウスキーピング遺伝子特異的 cDNAの量に対する標的遺伝子特異的 cDNAの量の割合を明確にすることによって）、種々の実験の間でのあらゆる変動性が補正される。当業者は、以下の刊行物を具体的に引用することができる：Bustin SA, J Mol Endocrinol, 2002, 29: 23-39; Giulietti A Methods, 2001, 25: 386-401。

【0054】

特異的試薬に少なくとも1つのハイブリダイゼーションプローブが含まれる場合は、標的遺伝子の発現は以下の方法で決定することができる。

【0055】

1) 生物材料として、上記に示す生物試料から総RNAを抽出した後、逆転写工程を上記のように実施して、標的遺伝子に由来する mRNAに相補的な cDNA（標的遺伝子特異的 cDNA）、及び、標的遺伝子以外の遺伝子に由来する mRNAに相補的な cDNA（標的遺伝子に特異的ではない cDNA）を得る。

【0056】

2) cDNAの全てを基体と接触させる。基体上には、発現の分析が望まれる標的遺伝子に対して特異的な捕捉プローブが固定されていて、これによって、標的遺伝子特異的 cDNAと捕捉プローブとの間でのハイブリダイゼーション反応が実施され、標的遺伝子に特異的ではない cDNAは捕捉プローブにハイブリダイズしない。ハイブリダイゼーション反応は、上記に示される全ての材料を含む固体の基体上で実施することができる。好ましい実施形態によれば、ハイブリダイゼーションプローブは基体上に固定される。好ましくは、基体は、上記で定義されたような低密度、高密度又は中密度の基体である。ハイブリダイゼーション反応は、上記に記載されたように、標的遺伝子特異的 cDNAの酵素による増幅からなる工程によって進行させることができ、その結果、多量の標的遺伝子特異的 cDNAが得られ、そして標的遺伝子特異的 cDNAが標的遺伝子に特異的な捕捉プローブにハイブリダイズできる可能性が高くなる。

【0057】

ハイブリダイゼーション反応は、例えば増幅反応用の標識デオキシリボヌクレオチド3リン酸を使用して、上記に記載されたような標的遺伝子特異的 cDNAを標識及び/又は切断することからなる工程によっても進行させることができる。切断は、具体的には、イミダゾール及び塩化マンガンによって行うことができる。標的遺伝子特異的 cDNAはまた、例えば、文献WO-A-91/19812に記載されているサンドイッチハイブ

10

20

30

40

50

リダイゼーション技術にしたがって標識されたプローブにハイブリダイズさせることによって、増幅工程の後で標識することもできる。核酸の標識及び/又は切断のための他の好ましい具体的方法は、国際出願番号WO 99 / 6 5 9 2 6、同WO 0 1 / 4 4 5 0 7、同WO 0 1 / 4 4 5 0 6、同WO 0 2 / 0 9 0 5 8 4、同WO 0 2 / 0 9 0 3 1 9に記載されている。

【 0 0 5 8 】

3) 続いて、ハイブリダイゼーション反応の検出からなる工程を実施する。検出は、基体を用いることによって行うことができ、基体の上では、標的遺伝子に特異的な捕捉プローブが、標識で標識された「検出」プローブと接触している標的遺伝子特異的 c D N A とハイブリダイズさせられ、そして、標識によって放射されるシグナルが検出される。標的遺伝子特異的 c D N A が標識で予め標識されている場合は、標識によって放射されるシグナルが直接検出される。

10

【 0 0 5 9 】

本発明の方法の工程 b) において接触させる少なくとも 1 つの特異的試薬に少なくとも 1 つのハイブリダイゼーションプローブが含まれる場合は、標的遺伝子の発現は以下の方法で判定することもできる。

【 0 0 6 0 】

1) 生物材料として、上記に示された生物試料から総 R N A を抽出した後、上記に記載されたように逆転写工程が実施され、これによって生物材料の m R N A の c D N A が得られる。c D N A の相補的 R N A の重合が、続いて、T 7 ポリメラーゼ酵素を使用して実施される。T 7 ポリメラーゼ酵素は、プロモーターの制御下で機能し、これによって、DNA 鋳型から相補的 R N A を得ることが可能となる。次いで、標的遺伝子に特異的な m R N A の c D N A の c R N A (この場合、標的遺伝子特異的 c R N A と呼ばれる) 及び標的遺伝子に特異的ではない m R N A の c D N A の c R N A が得られる。

20

【 0 0 6 1 】

2) c R N A の全てを基体と接触させる。基体上には、発現の分析が望まれる標的遺伝子に特異的な捕捉プローブが固定されていて、これによって、標的遺伝子特異的 c R N A と捕捉プローブとの間でハイブリダイゼーション反応が実施され、標的遺伝子に特異的ではない c R N A は捕捉プローブにハイブリダイズしていない。いくつかの標的遺伝子の発現を同時に分析したい場合には、いくつかの異なる捕捉プローブ(それぞれが標的遺伝子に特異的である)を基体上に固定することができる。ハイブリダイゼーション反応はまた、上記に記載されたような、標的遺伝子特異的 c R N A を標識及び/又は切断することからなる工程によっても進行させることができる。

30

【 0 0 6 2 】

3) 続いて、ハイブリダイゼーション反応の検出からなる工程を実施する。検出は基体を用いて行うことができ、基体の上で、標的遺伝子に特異的な捕捉プローブと、標識で標識された「検出」プローブと接触している標的遺伝子特異的 c R N A とをハイブリダイズさせて、標識により放射されるシグナルを検出する。標的遺伝子特異的 c R N A が標識で予め標識されている場合は、標識によって放射されるシグナルが直接検出される。c R N A の使用は、多数のプローブをハイブリダイズさせるバイオチップ型の基体を使用する場合には特に有効である。

40

【 0 0 6 3 】

本発明の具体的な実施形態によれば、工程 B 及び C が同時に実施される。この好ましい方法は、具体的には、「リアルタイム N A S B A」によって行うことができる。このグループでは、N A S B A 増幅技術と「分子ビーコン」を使用するリアルタイム検出が 1 工程にまとめられている。N A S B A 反応はチューブの中で実施され、1 本鎖 R N A を生じる。特異的「分子ビーコン」はこれと同時にハイブリダイズすることができ、蛍光シグナルを生じることができる。新しい R N A 分子の形成は、蛍光読取装置のシグナルを持続的に確認することによってリアルタイムで測定される。R T - P C R 増幅とは異なり、N A S B A 増幅は、試料中において、D N A の存在下で起こり得る。したがって、R N A 抽出中に

50

DNAが実際に完全に排除されていることを確認する必要はない。

【0064】

次いで、配列番号1～28のいずれか1つから選択された標的遺伝子の発現の分析によって、敗血症候群の診断/予後診断用のツールを得ることが可能となる。

【0065】

好ましくは、配列番号1、2、4～8、11及び16の標的遺伝子によって、2つのグループの患者を区別することが可能となる。

【0066】

例えば、予後診断が不明の患者における標的遺伝子の発現を分析し、そして予後が良好な(GP)患者における標的遺伝子についての既知の平均発現値と、予後不良(PP)の患者における標的遺伝子についての既知の平均発現値とを比較することによって、適切な処置を患者に提供することが可能である。

10

【0067】

別の好ましい実施形態によれば、工程b)において、配列番号1～28のいずれか1つを有する核酸配列を有する標的遺伝子に特異的な試薬から選択される、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、少なくとも20個、少なくとも21個、少なくとも22個、少なくとも23個、少なくとも24個、少なくとも25個、少なくとも26個、少なくとも27個の特異的な試薬と生物材料を接触させ、そして工程c)において、上記標的遺伝子の少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、少なくとも20個、少なくとも21個、少なくとも22個、少なくとも23個、少なくとも24個、少なくとも25個、少なくとも26個、少なくとも27個の発現を判定する。

20

【0068】

さらに具体的には、本発明者らによって、上記で定義されたような28種類の遺伝子のパネルの発現の同時分析は、GP患者とPP患者との区別に対して関連性が高いことが明らかにされた。これに関して、本発明は、

30

以下の工程：

- a. 生物材料を生物試料から抽出する工程、
- b. 生物材料を、配列番号1～28のいずれか1つを有する核酸配列を有する標的遺伝子に特異的な試薬から選択される少なくとも28個の特異的な試薬と接触させる工程、
- c. 上記標的遺伝子の少なくとも28個の発現を判定する工程：

を含むことを特徴とする

上記で定義された方法にも関する。

【0069】

これに関して、配列番号1、3、7、9～15及び17～28の遺伝子を含む22個の特異的な遺伝子パネルの発現によって、良好な結果を得ることが可能となる。なぜなら、これによって、予後の良好な患者のうちの92%、そして予後不良の患者の100%を正確に分類することが可能となるからである。これに関して、本発明は、

40

以下の工程：

- a. 生物材料を生物試料から抽出する工程、
- b. 生物材料を、配列番号1、3、7、9～15及び17～28のいずれか1つを有する核酸配列を有する標的遺伝子に特異的な試薬から選択される少なくとも22個の特異的な試薬と接触させる工程、
- c. 上記標的遺伝子の少なくとも22個の発現を判定する工程：

50

を含むことを特徴とする

患者に由来する生物試料に基づく敗血症症候群の診断 / 予後診断方法に関する。

【0070】

診断ツールを得る場合には、限られた遺伝子のパネルの使用が特に適している。実際、約20個の遺伝子の発現を分析する際には、DNAチップの特注による製造は必要なく、またこの分析は、PCR又はNASBA技術によって、あるいは、低密度チップ技術によって直接行うことができ、こうすることによって、相当な経済的価値が提供され、かつ、実施が簡易になる。

【0071】

また、本発明は、配列番号1～28のいずれか1つを有する核酸配列を有する標的遺伝子に特異的なプローブから選択される少なくとも28個のハイブリダイゼーションプローブを含む、上記で定義されたような基体にも関する。

10

【0072】

本発明の別の実施形態によれば、基体は、配列番号1、3、7、9～15及び17～28のいずれか1つを有する核酸配列を有する標的遺伝子に特異的なプローブから選択される少なくとも22個のハイブリダイゼーションプローブを含む。

【0073】

本発明の別の実施形態によれば、基体は、配列番号1～28のいずれか1つを有する核酸配列を有する少なくとも1つの標的遺伝子に特異的な少なくとも1つのハイブリダイゼーションプローブを含み、好ましくは、配列番号1、2、4～8、11及び16のいずれか1つを有する核酸配列を有する少なくとも1つの標的遺伝子に特異的な少なくとも1つのハイブリダイゼーションプローブを含む。

20

【0074】

最後に、本発明は、敗血症症候群の診断 / 予後診断用の、上記で定義されたような基体の使用に関する。

【0075】

また、本発明は、敗血症症候群の診断 / 予後診断用の、上記で定義されたような、配列番号1～28のいずれか1つを有する核酸配列を有する標的遺伝子に特異的な少なくとも28個の試薬の使用にも関する。好ましくは、本発明は、敗血症症候群の診断 / 予後診断用の、上記で定義されたような、配列番号1、3、7、9～15及び17～28のいずれか1つを有する核酸配列を有する標的遺伝子に特異的な少なくとも22個の試薬の使用に関する。

30

【0076】

また、本発明は、敗血症症候群の診断 / 予後診断用の、上記で定義されたような、配列番号1、2、4～8、11及び16のいずれか1つを有する核酸配列を有する標的遺伝子に特異的な少なくとも1つの試薬の使用にも関する。

【0077】

最後に、本発明は、上記で定義されたような基体を含む、敗血症症候群の診断 / 予後診断用のキットに関する。

【0078】

また、本発明は、敗血症症候群の診断 / 予後診断用のキットであって、敗血症症候群の診断 / 予後診断用の、上記で定義されたような、配列番号1～28のいずれか1つを有する核酸配列を有する標的遺伝子に特異的な少なくとも28個の試薬を含むことを特徴とするキットに関する。好ましくは、本発明は、敗血症症候群の診断 / 予後診断用のキットであって、敗血症症候群の診断 / 予後診断用の、上記で定義されたような、配列番号1、3、7、9～5及び17～28のいずれか1つを有する核酸配列を有する標的遺伝子に特異的な少なくとも22個の試薬を含むことを特徴とするキットに関する。

40

【0079】

また、本発明は、敗血症症候群の診断 / 予後診断用のキットであって、敗血症症候群の診断 / 予後診断用の、上記で定義されたような、配列番号1、2、4～8、11及び16の

50

いずれか1つを有する核酸配列を有する標的遺伝子に特異的な少なくとも1つの試薬を含むことを特徴とするキットにも関する。

【0080】

言うまでもなく、本明細書中で上記に示される定義は全て、本発明の実施形態の全てに適用される。

【0081】

(図面の説明)

添付の図面は説明用の例示であって、本質的に何ら限定的なものではない。これによって、本発明をより完全に理解することが可能となるであろう。

【0082】

図1は、アフィメトリクスパイオチップ上の29個のプロープのセットを用いて測定した本発明の28個の遺伝子の発現を使用する、13人のPP患者(NSとも呼ばれる)と26人のGP患者(Sとも呼ばれる)から得られた38の血液の試料の階層的クラスタ分析を示す。Spofireソフトウェアの階層的クラスタ機能を使用して、縦列方向でPP患者とGP患者を整理し、横列方向で遺伝子を整理することによって、比較可能な発現特性を有する患者又は遺伝子の位置を隣接させる。個人の相関係数を、複数の遺伝子及び患者についての類似度指数として使用した。続いて、最初に、計算上の平均を使用する非加重結合法(unweighted pair group method using arithmetic average、UPGMA)、クラスタ解析法、そして次に、全ての試料の平均値を使用することによって、患者と遺伝子とをそれぞれ体系化することが可能となった。結果は、《Affy》ソフトウェアで標準化したアフィメトリクス蛍光レベルに対応していた。遺伝子間での発現の本質的な差を考慮するために、低中心の正常基準(reduced centered normal law)を適用することによって、個々の遺伝子の発現のレベルを標準化した。白色は、低レベルの発現を示し、灰色は中間のレベルの発現を示し、黒色は高レベルの発現を示す。系統樹(dendogram)の枝の高さは、発現特性間での類似性の指数を示す。

【0083】

図2は、敗血症ショック患者の血液中のCX3CR1 mRNAの定量を示す。遺伝子の発現レベルは、50人の敗血症ショック患者(19人のPPと21人のGP)及び21人の正常なボランティアにおいて、定量的RT-PCRによって測定した。PPIBハウスキーピング遺伝子の発現のレベルに対して、結果を標準化した。結果は、中央値、第25百分位数、第75百分位数で示した。GPとPPの間での統計学的比較は、ノンパラメトリックMann-Whitney試験によって行った。

【0084】

図3は、敗血症ショック患者の血液中で定量したCX3CR1 mRNAの定量を示す。遺伝子の発現レベルを、37人の敗血症ショック患者(12人のPPと21人のGP)において定量的RT-PCRによって測定した。それぞれの患者について、PAX遺伝子試料を、D1とD3の間で、またD4とD10の間で得た。PPIBハウスキーピング遺伝子の発現レベルに対して、結果を標準化した。PP及びGPにおける、D1~D3の間及びD4~D10の間でのCX3CR1の遺伝子発現レベルの展開を、ノンパラメトリックWilcoxon試験によって行った。

【発明を実施するための最良の形態】

【0085】

以下の実施例は説明のために提供され、本質的に何ら限定的なものではない。これによって、本発明をより完全に理解することが可能となるであろう。

【0086】

実施例1：敗血症症候群の診断/予後診断のための発現特性の調査

生物試料の特性；敗血症症候群を発症している、Lyon-Sud hospital centerの外科又は内科集中治療室の患者について研究を行った。研究に含めるためには、患者は以下の基準を満たしている必要があった：年齢が18歳を超える；先に記載

10

20

30

40

50

したコンセンサス会議による敗血症ショックの存在；併存疾患（転移性のガン、悪性血液疾患、I型糖尿病、慢性的な肝臓病理、慢性腎不全、AIDS）がないこと。研究の目的は、敗血症ショックによって誘導される遅発性死亡を研究することであったので、症候群の最初の48時間以内に死亡した患者は研究から除外した。実施した全ての患者について処置は同じとした。

【0087】

カテコールアミンの最初の投与日を敗血症ショックのD1として、それぞれの患者を、最長で28日間観察した。この期間に観察された死亡に基づいて、患者（PP）10人のグループと患者（GP）21人のグループについて研究を実施した。続いて、本発明の遺伝子パネルを、同じ基準に基づいて、採用した2つのグループの患者（PP患者3人の1つのグループとGP患者4人の1つのグループ）を使用して盲検を用いて確認した。ゲノム分析を、D2とD4の間で得られた試料を使用して行った。グループ全体の人口統計学的特徴を以下の表に示す。

【0088】

【表2】

	GP		PP		計 n=38 (%)	P ^a
	実施 n=21 (%)	試験 n=4 (%)	実施 n=10 (%)	試験 n=3 (%)		
男性	13 (62)	2 (50)	7 (70)	1 (33)	23 (61)	0.930
女性	8 (38)	2 (50)	3 (30)	2 (67)	15 (39)	
年齢(歳) ^b	67 (49-71)	71 (66-75)	68 (57-79)	78 (63-80)	67 (54-78)	0.371
投与時のSAPS II ^b	48 (40-55)	45 (37-52)	61 (59-73)	61 (60-72)	55 (42-61)	<0.001
ICU入院期間 ^b	12 (10-26)	32 (28-34)	9 (8-14)	4 (4-10)	12 (9-25)	0.013
COPD	1 (5)	2 (50)	3 (30)	1 (33)	7 (18)	0.203
MacCabe&Jackson標準	0	7 (33)	1 (25)	0	8 (21)	0.045
1	9 (43)	2 (50)	9 (90)	1 (33)	21 (55)	
2	5 (24)	1 (25)	0	2 (67)	8 (21)	
3	0	0	1 (10)	0	1 (3)	
微生物学的確認された診断	15 (71)	4 (100)	7 (70)	3 (100)	29 (76)	>0.999
グラム(-)バチルス	8 (38)	1 (25)	3 (30)	3 (100)	15 (39)	0.950
グラム(+)球菌	7 (33)	1 (25)	5 (50)	1 (33)	14 (37)	
真菌	6 (29)	1 (25)	3 (30)	1 (33)	11 (29)	
感染型						
地域感染型	7 (33)	4 (100)	5 (50)	1 (33)	17 (45)	0.900
病院感染型	14 (67)	0 (0)	5 (50)	2 (67)	21 (55)	
感染部位						
肺	6 (29)	2 (50)	8 (80)	1 (33)	17 (45)	0.061
腹部	12 (57)	1 (25)	2 (20)	2 (67)	17 (45)	
その他	3 (14)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	4 (11)	

【0089】

^a：生存者（n=25）と非生存者（n=13）の全人数の比較

^b：中央値（Q1 - Q3）

COPD：慢性閉塞性肺疾患

【0090】

生物試料からの生物材料（総RNA）の抽出：

試料を、PAXGene（登録商標）Blood RNAチューブ（PreAnalytiX社 アメリカ合衆国フランクリンレイクス）の中に直接回収した。血液試料を採取して細胞の全溶解物を得る工程の後、チューブを室温に4時間置き、その後、生物材料の抽出までの間、-20℃で保存した。より具体的には、このプロトコルでは、製造業者による推奨を見てPAXGene Blood RNA（登録商標）キット（PreAnalytiX社）を使用して、総RNAを抽出した。簡単に説明すると、チューブを遠心分離

10

20

30

40

50

して(10分間、3000g)、核酸のペレットを得た。このペレットを洗浄し、タンパク質の消化に必要なプロテイナーゼKを含むバッファー中にとった(10分間、55)。さらに遠心分離(5分間、19,000g)して細胞の破片を除去し、エタノールを添加して核酸結合条件を最適化した。総RNAは、PAXGene RNAスピカラムに特異的に結合し、そしてその後の溶出の前に、混入しているDNAの消化をRNaseを含まないDNaseセット(キアゲン社、英国クローリー)を使用して行った。総RNAの性質をAGILENT 2100バイオアナライザー(Agilent Technologies社、ドイツ国Waldbronn)を用いて分析した。総RNAには、トランスファーRNA、メッセンジャーRNA(mRNA)及びリボソームRNAが含まれている。

10

【0091】

cDNAの合成、cRNAの入手、cRNAの標識及び定量：本発明にしたがって標的遺伝子の発現を分析するために、上記のように精製した総RNAの中に含まれているmRNAの相補的DNA(cDNA)を、5µgの総RNAから、400ユニットのSuperScriptII逆転写酵素(Invitrogen社)と100pmolのT7プロモーターを含むポリTプライマー(T7-オリゴ(dT)24-プライマー、Proligo社、フランス国パリ)を使用して得た。このように得られたcDNAを、次いで、フェノール/クロロホルムで抽出し、酢酸アンモニウムとエタノールで沈殿させ、そして24µlのDEPC水に再溶解させた。続いて、この精製したcDNA溶液20µlを、上記のようなT7ポリメラーゼのプロモーターを特異的に認識するT7 RNAポリメラーゼを使用して、*in vitro*転写に供した。この転写によって、cDNAのcRNAを得ることが可能となる。この転写は、Bioarray High Yield RNA Transcript Labeling Kit(Enzo Diagnostics社、ニューヨーク州ファーマントン)を使用して行った。これにより、cRNAを得ること可能となるだけでなく、cRNAの合成の間にビオチン化シチジン塩基及びウリジン塩基を取り込ませることも可能となる。

20

【0092】

精製したcRNAを、続いて、分光光度分析によって定量し、そしてcRNA溶液を、cRNAが1µg/µlの濃度となるように調整した。続いて、これらのcRNAの切断からなる工程を、94で35分間、断片化バッファー(トリス酢酸40mM、pH8.1、酢酸カリウム100mM、酢酸マグネシウム30mM)を使用して行うことによって、cRNAを加水分解し、35~200bpの断片を得た。この断片化が成功したことを、1.5%のアガロースゲル電気泳動によって確認した。

30

【0093】

PP患者とPG患者の間での発現特性の差異の実証：

これについては、それぞれの試料に由来する20µgの断片化cRNAをハイブリダイゼーションバッファー(アフィメトリクス社)に添加し、この溶液200µlを、発現用チップ(Human Genome U133A GeneChip(登録商標)(アフィメトリクス社))と45で16時間接触させた。発現用チップには、アフィメトリクス社のインターネットサイト上に記載されているアフィメトリクス社のプロトコルにしたがって、およそ14500個の遺伝子を提示する22283グループのプローブが含まれている。ハイブリダイゼーション及び洗浄能力を最良とするために、ビオチン化した(bioB、bioC、bioD及びcre)「対照」RNAと記載されるRNAとオリゴヌクレオチド(オリゴB2)とをハイブリダイゼーションバッファーの中に含めた。ハイブリダイゼーション工程の後、チップ上にハイブリダイズしたビオチン化cRNAの溶液を、ストレプトアビジン-フィコエリスリンの溶液を使用して視覚化し、その後、シグナルを抗ストレプトアビジン抗体を使用して増幅した。ハイブリダイゼーションは、「GeneChipハイブリダイゼーションオープン」(アフィメトリクス社)において実施し、アフィメトリクス社のプロトコルのEuk GE-WS2V4プロトコルにしたがった。洗浄と視覚化の工程は、「Fluidics Station 450」(アフィメトリク

40

50

ス社)を用いて行った。続いて、それぞれのU133AチップについてAgilent G2500A Gene Array Scannerを用いて解像度3ミクロンで分析し、チップ上でハイブリダイズした領域を正確に示した。このスキャナーを用いることによって、落射蛍光顕微鏡技術を使用してアルゴンレーザーで励起させた後に、蛍光分子によって放射されるシグナルを検出することが可能となる。このようにして、結合したcRNAの量に比例するシグナルを、それぞれの点について得た。続いて、シグナルをMicroarray Suite 5.0ソフトウェア(MAS5.0、アフィメトリクス社)を使用して分析した。

【0094】

様々なチップを使用することによって得られる変動を防ぐために、全体的な標準化アプローチを、MAS5.0ソフトウェア(アフィメトリクス社)を使用して行った。これによって、統計学的アルゴリズムにより遺伝子が発現されているかどうかを定義することが可能となる。複数のチップを互いに比較するため、生のデータ(「CELL」ファイル)を、「R」ソフトウェアの「Affy」パッケージ(Gautier, L.ら, Bioinformatics(2004), p. 307-315)を使用して、等量分類(quantile normalization)工程によって処理した。U133Aチップ上に示したそれぞれの遺伝子は、25個のオリゴヌクレオチドのプロープの11種類の対によってカバーされた。用語「プロープの対」は、標的遺伝子に由来するcRNAの1つと完全にハイブリダイズする(したがって、PM又は完全適合プロープと呼ばれる)第1のプロープと、プロープの中心部分が適合していないことを除いては第1のプロープと同じである第2のプロープ(したがって、MM又は不適合プロープと呼ばれる)を意味するものとする。非相補性配列の2つのヌクレオチド断片間におけるハイブリダイゼーションに対応するバックグラウンドノイズを概算するため、個々のMMプロープを使用した(Affymetrix technical note "Statistical Algorithms Reference Guide"; Lipshutzら, (1999) Nat. Genet. 1 Suppl., 20-24)。研究した38個の試料について、発現した遺伝子の平均値は $38.1 \pm 4.2\%$ と示された。

【0095】

発現データの分析は、Microsoft Excelソフトウェア、functional genomics V7.1ソフトウェアについてのSpotfire判定サイト(Spotfire AB, スウェーデン・イエーテボリ)、及び、統計学的アルゴリズム: 遺伝的アルゴリズム(Gautier, L.ら, Bioinformatics(2004), p. 307-315; Ooi, C.H. 及び Tan, P. Bioinformatics(2003), p. 37-44)を使用して行った。チップの、およそ14500個の遺伝子を示すプロープの22283のグループに基づいて、本発明者らは、PP患者とGP患者の区別を可能にする関連遺伝子を正式に選択した。

【0096】

これについて、最初の工程は、全ての患者グループの間で同等の発現レベルを示す遺伝子を排除することからなるものであった。4つの工程を行った:

- 全ての患者において発現していない遺伝子を排除した(MAS5.0ソフトウェア);
- 蛍光中央値が2つのグループにおいて30未満であった遺伝子を排除した;
- 2つのうち1つのグループにおいて患者の少なくとも30%において発現していなかった遺伝子を排除した;
- GP患者とPP患者の間での発現中央値の比が $0.77 \sim 1.3$ であった遺伝子を排除した。

【0097】

これらの条件検索の適用に続いて、プロープの2216のグループを選択し、遺伝的アルゴリズム(Genetic Algorithm)を用いた多様性分析の作業ベースとして使用した。

【0098】

10

20

30

40

50

得られた結果：28個の遺伝子のリストを特定した。BP患者と比較してPP患者において観察されたこれらの遺伝子個々の発現の増加又は減少を表2に示す。

【0099】

表2 PP患者とGP患者において異なって発現していた28個の遺伝子のリスト
【表3】

配列番号	遺伝子名	略称	GP患者における発現に対するPP患者における発現
1	ケモカイン(C-X3-Cモチーフ)受容体1	CX3CR1	増加*
2	T細胞受容体δ多様性3	TRDD3	増加 [£]
3	KIAA0882タンパク質	KIAA0882	増加
4	T細胞リンパ腫侵襲及び転移1	TIAM1	増加 [£]
5	インターロイキン1、β	IL1B	増加*
6	カルボニルレダクターゼ1	CBR1	増加 [£]
7	TIRドメインを含む分子1	TRIF	増加*
8	FYNチロシンキナーゼプロトオンコジーン	FYN	増加 [£]
9	ヘパラナーゼ	HPSE	増加
10	SRY(性決定領域Y)ボックス4	SOX4	増加 [£]
11	インターロイキン2受容体、β	IL2RB	増加*
12	Raft結合タンパク質	RAFTLIN	増加
13	CGI-40タンパク質ヒトSID1膜貫通ファミリー、メンバー2	CGI-40 SIDT2	増加
14	グルコース-6-ホスファターゼ触媒サブユニット3	G6PC3	増加
15	マンノシダーゼ、α、クラス1Aメンバー2	MANIA2	増加
16	骨髄分化一次応答遺伝子(88)	MYD88	増加*
17	リボソームタンパク質L6	RPL6	増加
18	リボソームタンパク質L10a	RPL10a	増加
19	sin3結合ポリペプチド、30kDa	SAP30	減少
20	有糸分裂活性化プロテインキナーゼ活性化プロテインキナーゼ2	MAPKAPK2	減少
21	プレセンリンエンハンサー2	PEN2	減少
22	仮想タンパク質LOC55924	LOC55924	減少
23	溶質担体ファミリー39(亜鉛トランスポーターメンバー7)	SLC39A7	減少 [£]
24	グルタチオンペルオキシダーゼ3(血漿)	GPX3	減少 [£]
25	ヘモクロマトーシス	HFE	減少
26	cfosプロモーターの転写活性化因子	CROC4	減少
27	ペルオキシソーム生合成因子6	PEX6	減少
28	ハンチンチン相互作用タンパク質		減少

【0100】

*と

【0101】

【数1】

£

の印は、それぞれ、ボンフェローニ(Bonferroni)補正又はベンジャミニ(Benjamini)及びホッホバーグ(Hochberg)補正を用いたT検定にしたがった、2つのグループ間における統計学的な差異をそれぞれ示す。これは、単離したこれらの遺伝子が、敗血症症候群の診断/予後診断に非常に関連性が深いことを示している。

【0102】

定量的RT-PCRによる確認

別の分子生物学的技術によってこれらの結果を確認するために、特定の遺伝子を定量的RT-PCRによってアッセイした。簡単に説明すると、逆転写(RT)反応を最終容量20μlで行った。総RNA(1μg)を1μlのポリTと共に、50μM及び1μlのdNTP混合物(ThermoScript(登録商標)RT-PCRシステム、Invitrogen社)で混合し、その後、65℃で5分間インキュベートした。氷中での冷却の後、溶液を、4μlの5×cDNA合成バッファー、1μlのRNase out(40U/μl)、1μlのDEPC処理水、及び、1μlのThermoScript R

10

20

30

40

50

T (15 U/μl) (これらの製品は全て、ThermoScript (登録商標) RT-PCRシステム (Invitrogen社) による) と混合した。逆転写を50 で1時間行い、その後、85 で5分間インキュベートすることによって停止させた。最後に、cDNA溶液のそれぞれを、DEPC水溶液中に1/10になるように希釈した。

【0103】

目的の遺伝子のそれぞれについては、標準物を、飽和するまで行ったPCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 増幅によって調製した。得られたアンプリコンを精製し (PCR精製キット、Qiagen社)、そして特有のアンプリコンの存在を、アガロースゲル電気泳動とエチジウムブロマイド染色によって確認した。

【0104】

シクロフィリン (cycophilin) BをコードするペプチジルプロピルイソメラーゼB (PPIB) 《ハウスキーピング》遺伝子からなる標準物は、Search-LC (ドイツ国ハイデルベルク) から入手した。

【0105】

リアルタイムPCRによるmRNAの発現の分析

配列番号1、5、11及び16の標的遺伝子のmRNAを、LightCycler (登録商標) (Roche社) を使用して定量的リアルタイムPCRによって定量した。PCR反応は、Fast-Start (登録商標) DNA Master SYBR Green IリアルタイムPCRキット (Roche Molecular Biochemicals) を使用して行った。個々のPCRは、1μlのLC-Fast Start Reaction Mix SYBR Green I、1μlのLC-Fast Start DNA Master SYBR Green I/Enzyme (Taq DNAポリメラーゼ、反応バッファー及びデオキシヌクレオチド3リン酸混合物を含む)、MgCl₂ (最終濃度3mM)、センスプライマーとアンチセンスプライマー (最終濃度0.5μM)、並びに、10μlのcDNA溶液を含む、最終容量20μlで行った。95 で10分間の変性工程の後、増幅を、40サイクルの「タッチダウン」PCRプロトコル (95 で10秒間、68~58 での10秒間のハイブリダイゼーション、その後、72 で16秒間の伸張) によって行った。それぞれのサイクルの終わりに、SYBR Greenによって放射された蛍光を測定した。

【0106】

増幅の特異性を確認するために、PCR産物を融解曲線分析 (LightCycler (登録商標) - Roche社) に体系的に供した。このために、PCR産物を、0.1 / 秒の増分で、58から98 まで温度を上昇させて処理した。個々のPCR産物について、曲線の分析において、特異的な融点を特徴とする1つのピークが得られた。

【0107】

PPIBハウスキーピング遺伝子とIL-1 遺伝子 (配列番号5) の定量に必要なプライマーの組み合わせは、Search-LC (ドイツ国ハイデルベルク) から入手した。PPIBについては、Genbank登録番号はM60857であり、105~338位の領域を増幅させた。IL-1 については、Genbank登録番号はM15330であり、438~642位の領域を増幅させた。配列番号1、11及び16の標的遺伝子を定量的に決定するために使用したプライマーの対、参照として使用したGenbank配列、並びに、アンプリコンの位置を以下の表に記載する。

【0108】

10

20

30

40

【表 4】

標的遺伝子の配列番号			アンプリコン
1	センスプライマー 5'→3' アンチセンスプライマー 5'→3'	SEQ ID No. 29 TGA CTGGCAGATCCAGAGGTT SEQ ID No. 30 GTAGAATATGGACAGGAACAC	164 塩基
11	センスプライマー 5'→3' アンチセンスプライマー 5'→3'	SEQ ID No. 31 CCTGAAGTGTAACACCCAGAG SEQ ID No. 32 TCCTCTCCAGCACTTCTAGT	162 塩基
16	センスプライマー 5'→3' アンチセンスプライマー 5'→3'	SEQ ID No. 33 TGCTGGAGCTGGGACCCAGCATTGAGGAGGA SEQ ID No. 34 TCAGACACACACAACCTTCAGTCGATAG	280 塩基

【0109】

PPIBハウスキーピング遺伝子のmRNAの量に対する標的mRNAの量を、LightCycler Relative Quantification Software (Roche Molecular Biochemicals)を用いた比較定量技術によって分析した。LightCycler (登録商標) (Roche社)の「Second Derivative Maximum Method」を使用して、個々の試料について横断点(Cp)を自動で決定した。Cpの値は、蛍光がバックグラウンドのノイズとは有意に異なる場合のサイクル数と定義した。

【0110】

ひと続きの5種類の10倍希釈をそれぞれの標準物について4つずつ行い、これによって、コピー数の対数の関数としてCpを表す検量線を作成した。標準希釈物を最適化して、これによって、検量線が標的遺伝子とハウスキーピング遺伝子についての予想される発現レベルをカバーできるようにした。標的遺伝子とハウスキーピング遺伝子についてのPCR効率を示す比較用検量線を作成し、これを使用して、LightCycler Relative Quantification Software (Roche Molecular Biochemicals)を用いて定量を行った。

【0111】

定量的RT-PCRによる配列番号1、5、11及び16の標的遺伝子のmRNAの定量的決定について得られた結果を、以下の表3に示す。結果は25個の試料についてのものである(8人のPPと17人のGP)。最初に、バイオチップについて、次に、定量的RT-PCR技術について得られた結果の相関関係を、Spearmanの相関試験によって確立した。

【0112】

表3 アフィメトリクスと定量的RT-PCRの間での4つの遺伝子の発現レベルの比較

【0113】

【表 5】

遺伝子の略称	GPについてのアフィメトリクスの中央値	PPについてのアフィメトリクスの中央値	GPについてのRT-PCRの中央値	PPについてのRT-PCRの中央値	Spearman 相関係数:r	Spearman 試験による有意性の程度:p
CX3CR1	582.965	92.995	0.04295	0.00663	0.94	<0.001
IL-1β	227.64	113.4	0.329	0.18	0.83	<0.001
IL-2Rβ	204.86	131.965	0.00075	0.00024	0.76	<0.001
MyD88	2644.03	1986.315	0.0351	0.0294	0.56	<0.01

【0114】

分析した4つの遺伝子について、有意な相関関係がアフィメトリクス社の結果と定量的RT-PCRの結果の間で観察された。これによって、本発明の遺伝子の関連性が確認された。

【0115】

上の段落に記載したプロトコルと同じプロトコルにしたがうことにより、50人の敗血症ショックの患者(19人のPPと21人のGP)から得た血液試料から、CX3CR1 mRNAを定量した。血液試料は、ショックの開始後の最初の72時間の間に採取し、そ

の後、第2の試料を、症候群の経過の間に採取した。CX3CR1の発現のレベルを、PPIBハウスキーピング遺伝子の発現レベルに対して標準化した。結果を図2に示す。GPとPPの間での比較を、ノンパラメトリックMann-Whitney試験を使用して行った。したがって、予後不良の要素としてCX3CR1 mRNAの発現を分析することが特に有効である。

【0116】

CX3CR1 mRNAの発現レベルは、PP患者においては、経時的に有意な減少を示した。結果を図3に示す。経時的な発現の変化を、Wilcoxon試験を使用して試験した。

【0117】

したがって、この予後不良を確認するためには、経時的なCX3CR1 mRNAの発現を追跡することが特に有効である。

【0118】

遺伝子のパネルの発現の分析

本発明者らはまた、いくつかの遺伝子の発現の同時分析がGP患者とPP患者を区別することに極めて関連性が深いことも明らかにした。

【0119】

このように、本発明者らは、上記の28個の遺伝子の発現の同時分析が、GPグループとPPグループの2つを区別することに極めて関連性が深いことを明らかにした。

【0120】

結果を図1に示す。このリストにより、1つのグループのGP患者に由来する試料のうちの88%、そして他方のグループのPP患者に由来する試料の100%を正確に分類することが可能となる。

【0121】

加えて、本発明者らは、上記に記載した28個のうち、配列番号1、3、7、9~15及び17~28の遺伝子の発現の同時分析もまた、GPグループとPPグループの2つを区別することに極めて関連性が深いことを明らかにした。

【0122】

結果を図2に示す。このリストにより、1つのグループのGP患者に由来する試料のうちの92%、そして他方のグループのPP患者に由来する試料の100%を正確に分類することが可能となる。

【0123】

上記の28個の遺伝子のうち、配列番号1、2、4~8、11及び16の9個の遺伝子のそれぞれにより、2つのグループの患者を区別することが可能となる。表4は、ボンフェローニ(Bonferroni)補正又はベンジャミニ(Benjamini)及びホッホバーグ(Hochberg)補正を用いたT検定(T-test)を使用して計算したp値を示す。これらの遺伝子は全て、PPと比較するとGPにおいて過剰発現されていた。

【0124】

表4 患者の2つのグループを区別するための遺伝子

【0125】

【表6】

遺伝子名	遺伝子記号	ボンフェローニ補正	BHFDR補正	倍数変化
ケモカイン(C-X3-Cモチーフ)受容体1	CX3CR1	6.3E-05	6.3E-05	8.33
T細胞受容体δ多様性3	TRDD3	>0.05	4.4E-02	4.00
T細胞リンパ腫侵襲及び転移1	TIAM1	>0.05	2.7E-02	2.08
インターロイキン1、β	IL1B	4.9E-02	9.7E-03	2.08
カルボニルレダクターゼ1	CBR1	>0.05	2.8E-02	1.89
TIRドメイン含有アダプター誘導インターフェロン-β	TRIF	5.3E-04	2.6E-04	1.72
FYNチロシンキナーゼプロトオンコジーン	FYN	>0.05	2.7E-02	1.67
インターロイキン2受容体、β	IL2RB	4.3E-02	9.7E-03	1.52
骨髄分化一次応答遺伝子(88)	MYD88	3.5E-02	9.7E-03	1.37

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

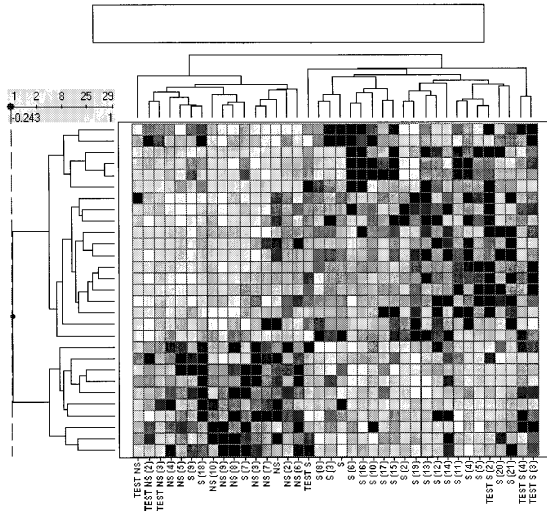
【 0 1 2 6 】

【図1】図1は、アフィメトリクスパイオチップ上の29個のプロープのセットを用いて測定した本発明の28個の遺伝子の発現を使用する、13人のPP患者（NSとも呼ばれる）と26人のGP患者（Sとも呼ばれる）から得られた38の血液の試料の階層的クラスタ分析を示す。

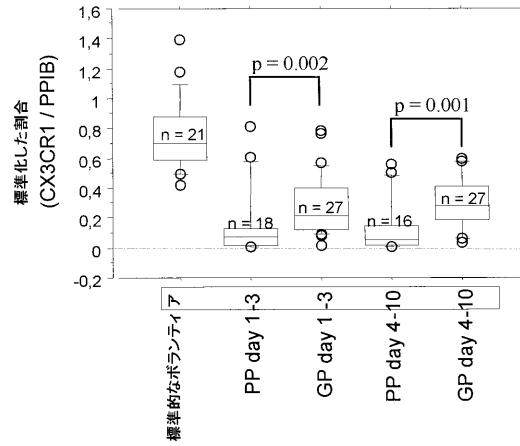
【図2】図2は、敗血症ショック患者の血液中のCX3CR1 mRNAの定量を示す。

【図3】図3は、敗血症ショック患者の血液中で定量したCX3CR1 mRNAの定量を示す。

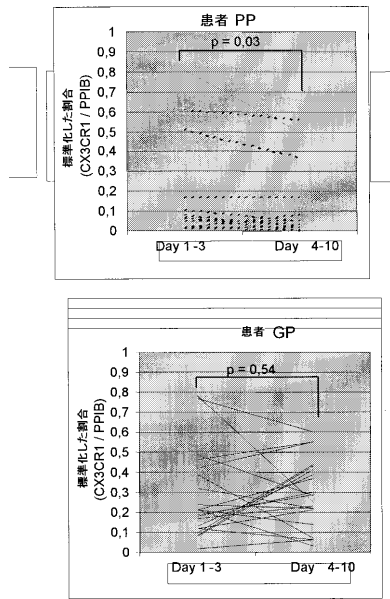
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



【 配列表 】

0005552211000001.app

0005552211000002.xml

フロントページの続き

(72)発明者 ルパブ, アラン

フランス国 エフ - 6 9 2 3 0 サン - ジェニ - ラヴァル, リュ エドゥアール ミヨー 2 6

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 欧州特許第 0 1 3 1 0 5 6 7 (E P , B 1)

GeneChip(R) Human Genome Arrays, Data Sheet, Affymetrix, 2004

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

专利名称(译)	脓毒症综合征的诊断和/或预后的方法		
公开(公告)号	JP5552211B2	公开(公告)日	2014-07-16
申请号	JP2007552703	申请日	2006-01-30
[标]申请(专利权)人(译)	生物梅里埃公司		
申请(专利权)人(译)	生物梅里埃		
当前申请(专利权)人(译)	生物梅里埃		
[标]发明人	パシヨアレクサンドル モヌレギョーム ルパプアラン		
发明人	パシヨ, アレクサンドル モヌレ, ギョーム ルパプ, アラン		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/118 C12Q2600/158 G01N33/56911 G01N33/6893 G01N2800/26		
FI分类号	C12N15/00.ZNAA C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N37/00.102		
优先权	2005050267 2005-01-31 FR		
其他公开文献	JP2008528018A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

诊断/预测来自患者样品的败血症综合征，包括从样品中提取生物材料 (A)；用至少一种对具有核酸序列 (1) - (28) (再现) 和确定至少一种TG的表达的靶基因 (TG) 特异的试剂 (R) 进行处理 (A) 是新的。对于包含至少一种针对特定TG的杂交探针的新方法的试剂盒，包括独立权利要求。

配列番号	遺伝子名	GENBANK番号
1	ケモカイン(C-X3-Cモチーフ)受容体1	NM_001337
2	T細胞受容体多様性3	X72501
3	KIAA0882タンパク質	NM_015130
4	T細胞リンパ腫優襲及び転移1	NM_003253
5	インターロイキン1 β	NM_000576
6	カルボニルレダクターゼ1	NM_001757
7	TIRドメインを含む分子1	NM_182919
8	FYNチロシンキナーゼプロトオンコジーン	NM_002037
9	ヘパラーゼ	NM_006665
10	SRV(性決定領域Y)ボックス4	NM_003107
11	インターロイキン2受容体、 β	NM_000878
12	Raft結合タンパク質	NM_015150
13	CGI-40タンパク質ヒトSID1膜貫通ファミリー、メンバー2	NM_015996
14	グルコース-6-ホスファターゼ触媒サブユニット3	NM_138387
15	マンノシダーゼ α 、クラス1Aメンバー2	NM_006699
16	骨髄分化一次応答遺伝子(88)	NM_002468
17	リボソームタンパク質L6	NM_000970
18	リボソームタンパク質L10a	NM_007104
19	sin3結合ポリペプチド、30kDa	NM_003864
20	有糸分裂活性化プロテインキナーゼ活性化プロテインキナーゼ2	NM_004759
21	プレセンリンエンハンサー2	NM_172341
22	仮想タンパク質LOC55924	NM_019099
23	溶質担体ファミリー39(亜鉛トランスポーターメンバー7)	NM_006979
24	グルタチオンペルオキシダーゼ3(血漿)	NM_002084
25	ヘモクロマトーシス	NM_000410
26	cfosプロモーターの転写活性化因子	NM_006365
27	ペルオキシソーム生成因子6	NM_000287
28	ハンチンチン相互作用タンパク質	NM_005338