

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-92503
(P2019-92503A)

(43) 公開日 令和1年6月20日(2019.6.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/6883 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6883 Z N A Z	4 B 0 6 3
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6851 Z	

審査請求 有 請求項の数 12 O L 外国語出願 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-217635 (P2018-217635)
 (22) 出願日 平成30年11月20日(2018.11.20)
 (31) 優先権主張番号 62/589,345
 (32) 優先日 平成29年11月21日(2017.11.21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 516070553
 チャン グァン メモリアル ホスピタル
 , カオシュン
 台湾, 83301 カオシュン シティ,
 ニャオソン ディストリクト ダビ ロード,
 No. 123
 No. 123, Dapi Rd. Niao
 sng Dist, Kaohsiung
 City 83301, Taiwan

(74) 代理人 110000671

八田国際特許業務法人
 (72) 発明者 ファン インーシェン
 台湾, カオシュン シティ, ニャオソン
 ディストリクト ダビ ロード, ナンバー
 123

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 川崎病の検出方法、そのためのキット及び川崎病の治療方法

(57) 【要約】

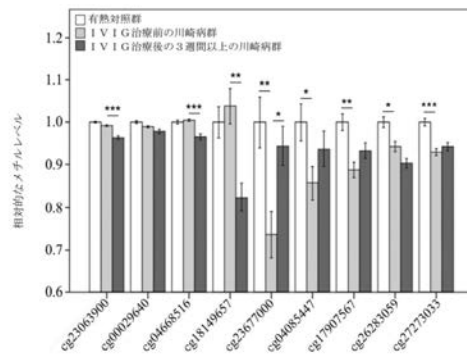
【課題】

川崎病を診断及び / 又は治療する新規バイオマーカー
 の使用方法を提供する。

【解決手段】

本発明の新規バイオマーカーは、非川崎病個体と比較
 して、川崎病個体での一部のC p G遺伝子座のシトシン
 メチル化状態の変化を示す。さらに、川崎病を検出する
 ため、一部のC p G遺伝子座のシトシンメチル化状態の
 変化に特異的な少なくとも1つのプライマー又は試薬を
 含むキットを提供する。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(a) 個体からのサンプルにおける SEQ ID No : 1、SEQ ID No : 2、SEQ ID No : 3、SEQ ID No : 4 又は SEQ ID No : 5 から選択される少なくとも 1 つの CpG ジヌクレオチドのシトシンメチル化状態を検出するステップと、

(b) 前記ステップ (a) での少なくとも 1 つの CpG ジヌクレオチドのシトシンメチル化が対照サンプル又は非川崎病サンプルのメチル化より低い場合、前記個体が川崎病に罹患したと特定されるステップと、

を含むことを特徴とする、個体における川崎病を検出するための方法。

10

【請求項 2】

ヘプシジンの発現レベルを測定するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ヘプシジンの発現レベルを ELISA 又はリアルタイム PCR を用いて測定することを特徴とする、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記サンプルは、生検材料、血液、血漿、血清、リンパ液、リンパ組織、脳脊髄液、骨髓、唾液、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記シトシンメチル化状態の検出のステップは、核酸増幅、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、メチル化特異的 PCR (MCP)、メチル化 - CpG アイランド回収アッセイ (MIRA)、重亜硫酸塩制限分析 (COBRA)、パイロシーケンス、一本鎖立体配座多型 (SSCP) 分析、制限分析及びマイクロアレイ分析からなる群から選択される 1 つ又は複数の方法を用いることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

SEQ ID No : 1、SEQ ID No : 2、SEQ ID No : 3、SEQ ID No : 4 又は SEQ ID No : 5 から選択される少なくとも 1 つの CpG ジヌクレオチドのシトシンメチル化状態を特異的に検出する少なくとも 1 つのプライマー又は試薬を備えることを特徴とする、川崎病を診断するためのキット。

30

【請求項 7】

前記プライマー又は試薬は、DNA 重合 (DNA polymerization)、DNA ハイブリダイゼーション工程 (DNA hybridization process) 又は DNA 重亜硫酸塩変換工程に使用されることを特徴とする、請求項 6 に記載のキット。

【請求項 8】

前記プライマー又は試薬は、亜硫酸水素ナトリウム、メチル化感受性酵素、メチル化依存性制限酵素又は PCR 試薬であることを特徴とする、請求項 6 に記載のキット。

【請求項 9】

ヘプシジンの発現レベルを測定する試薬をさらに備えることを特徴とする、請求項 6 に記載のキット。

40

【請求項 10】

前記試薬は、ELISA キット又はリアルタイム PCR であることを特徴とする、請求項 6 に記載のキット。

【請求項 11】

(a) 個体からのサンプルにおける SEQ ID No : 1、SEQ ID No : 2、SEQ ID No : 3、SEQ ID No : 4 又は SEQ ID No : 5 から選択される少なくとも 1 つの CpG ジヌクレオチドのシトシンメチル化状態を検出するステップと、

50

(b) 前記ステップ(a)での少なくとも1つのCpGジヌクレオチドのシトシンメチル化が対照サンプル又は非川崎病サンプルのメチル化より低い場合、前記個体が川崎病に罹患したと特定されるステップと、

(c) 川崎病の治療薬を投与するステップと、
を含むことを特徴とする、個体における川崎病を治療するための方法。

【請求項12】

ヘプシジンの発現レベルを測定するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項11に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2017年11月21日に出願された米国特許出願第62/589,345号の利益を主張し、その内容全体を参照により本明細書中に援用される。

【0002】

本発明は、CpGジヌクレオチドでのシトシン低メチル化による川崎病の検出方法及び川崎病の治療方法に関するものである。

【背景技術】

【0003】

川崎病(Kawasaki disease, KD)とは、病因不明の皮膚粘膜リンパ節症候群(mucocutaneous lymph node syndrome)とも称し、小血管と中血管の両方の血管壁(血管炎症)、特に冠状動脈に影響を与える小児急性血管炎症候群である。アジア人の子供たちに川崎病の発生率は、アメリカやヨーロッパの子供たちの10倍以上である。

20

【0004】

川崎病の初期症状や明らかな症状は、5日以上続く発熱である。治療しなければ、冠状動脈拡張、瘻孔形成、冠状動脈瘤(coronary artery aneurysms, CAA)および心筋梗塞を含む重篤な冠状動脈合併症につながる可能性がある。発熱から10日以内に川崎病を検出できれば、免疫グロブリン大量点滴静注療法(IVIg)により冠動脈病変の発生率を20~25%から3~5%に大幅に低下させることができる。

30

【0005】

川崎病の診断は、アメリカ心臓協会(American Heart Association, AHA)が2004年に提案された診断基準に基づいて、5日以上続く発熱、両眼の非化膿性結膜炎(bilateral nonsuppurative conjunctivitis)、粘膜の変化、手足の硬結血管性浮腫(indurative angioedema of the hands and feet)、不定形発疹(dysemorphous skin rashes)及び直径が1.5cm以上の急性の非化膿性頸部のリンパ節腫脹(acute nonpurulent cervical lymphadenopathy)という臨床診断が主な診断基準であるが、川崎病に対する実験室診断法が未だに確立されていない。

40

【0006】

しかし、AHAの基準は日本循環器学会のガイドラインと若干異なるので、川崎病の臨床診断が複雑になっている。また、伝染性疾病、例えばブドウ球菌又はレンサ球菌の感染は川崎病の症状に類似することもある。故に、臨床医師は、罹患した小児の川崎病を正確に診断して、且つ冠動脈疾患の予防のためにIVIgを速やかに投与することが困難である。

【発明の概要】

【0007】

本発明は、安価且つ正確な川崎病に対する実験室診断法の需要に応じて、これら及び他

50

の需要を満たすために提出したものである。

【0008】

一実施例では、本発明に開示された個体における川崎病を検出するための方法は、(a) 個体からのサンプルにおけるSEQ ID No: 1、SEQ ID No: 2、SEQ ID No: 3、SEQ ID No: 4又はSEQ ID No: 5から選択する少なくとも1つのCpGジヌクレオチドのシトシンメチル化状態を検出するステップと、(b) 前記個体は、対照サンプルと比較して、ステップ(a)での少なくとも1つのCpGジヌクレオチドのシトシン低メチル化を有する場合、個体が川崎病に罹患したと特定されるステップとを含む。

【0009】

もう一つの実施例では、本発明に開示された個体における川崎病を検出するための方法は、(a) SEQ ID No: 1、SEQ ID No: 2又はそれらの組合せから選択されるCpGジヌクレオチドのシトシンメチル化状態を検出するステップと、(b) ヘプシジン(hepcidin)の発現レベルを測定するステップとを含む。

【0010】

もう一つの実施例では、本発明に開示された川崎病に罹患した個体を治療するための方法は、本文に開示された方法により個体が川崎病に罹患したと特定されるステップと、川崎病の治療薬を投与するステップとを含む。

【0011】

本発明は、個体における川崎病を検出するためのキットも開示され、そのキットは、SEQ ID No: 1、SEQ ID No: 2、SEQ ID No: 3、SEQ ID No: 4又はSEQ ID No: 5から選択される少なくとも1つのCpGジヌクレオチドのシトシンメチル化状態を特異的に検出する少なくとも1つのプライマー又は試薬を備える。

【0012】

本発明は、個体における川崎病を検出するためのキットも開示され、そのキットは、(a) SEQ ID No: 1、SEQ ID No: 2又はそれらの組合せのCpGジヌクレオチドのシトシンメチル化状態を特異的に検出する少なくとも1つのプライマー又は試薬と、ヘプシジンの発現レベルを測定するための試薬とを備える。

【0013】

本発明は、さらに川崎病を検出するための本文に記述したキットの使用を提供する。

【0014】

本発明は、個体における川崎病検出用キットを製造するための少なくとも1つのCpGジヌクレオチドのシトシンメチル化状態を検出するプライマー又は試薬の使用も提供する。そのCpGジヌクレオチドは、SEQ ID No: 1、SEQ ID No: 2、SEQ ID No: 3、SEQ ID No: 4又はSEQ ID No: 5から選択されるものである。

【0015】

本出願で用いる「発明(invention)」、「当該発明(the invention)」、「この発明(this invention)」及び「本発明(the present invention)」という用語は、本出願の全ての主題及び後述する特許請求の範囲を代表することを意図するものである。これらの用語を含む記載は、本出願の主題又は後述する特許請求の範囲の解釈や範囲を限定するものではない。本出願における本発明の実施形態は、発明の概要に定義されるものではなく、後述する特許請求の範囲に定義されるものである。発明の概要は、本発明の様々な態様の上位概念であり、さらに後述する発明を実施するための形態に係る概念を導入するためのものである。発明の概要は、請求される主題の重要又は必要な特徴を特定する、または請求される主題の範囲を単独で判断することを意図するものではない。本出願の主題は、明細書全体、いずれ又は全ての図面、及び特許請求の範囲の適切な部分を参照して理解されるべきである。

【0016】

10

20

30

40

50

本発明は、添付の図面を参照して、下記の詳細な説明からより明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

本発明の例示的な実施例は、以下の図面を参照して、詳細に説明する。

【図1】図1は、Infinium Human Methylation 450 Bead Chip (Illumina, USA)により熱性対照サンプル18例、IVI G治療前の川崎病サンプル18例及びIVI G治療後の川崎病サンプル18例におけるcg 23677000 (SEQ ID NO: 1)、cg 04085447 (SEQ ID NO: 2)、cg 17907567 (SEQ ID NO: 3)、cg 26283059 (SEQ ID NO: 4)、cg 27273033 (SEQ ID NO: 5)、cg 23063900 (SEQ ID NO: 6)、cg 00029640 (SEQ ID NO: 7)、cg 04668516 (SEQ ID NO: 8)、cg 18149657 (SEQ ID NO: 9)のCpGジヌクレオチドの相対的なメチル化レベルを分析する棒グラフである。「***」、「**」及び「*」は、 $p < 0.001$ 、 $p < 0.01$ 及び $p < 0.05$ をそれぞれ示す。

10

【図2】図2は、標的特異的なInfinium Human Methylation 450 Bead Chipにより熱性対照サンプル113例、IVI G治療前の川崎病サンプル92例及びIVI G治療後の川崎病サンプル16例におけるcg 23677000及びcg 04085447のCpGジヌクレオチドのメチル化レベルを分析する棒グラフである。「***」は、 $p < 0.001$ を示す。

20

【図3】図3は、ELISAのBio-Plexシステムにより非川崎病の熱性対照($n = 113$)、IVI G治療前の川崎病サンプル92例及びIVI G治療後の川崎病サンプル16例における血漿ヘプシジンのレベルを分析する棒グラフである。各点は一個体を示す。「*」は、unpaired Student t testを用いて $p < 0.05$ を示す。

【図4A】～

【図4B】図4は、血漿ヘプシジンのレベルがDNAメチル化レベルと負の相関を示すように、それぞれcg 23677000及びcg 04085447でのCpGジヌクレオチドのメチル化レベルと血漿ヘプシジンのレベルとの散布図である(ピアソンの積率相関係数(Pearson's correlation coefficient))(それぞれ $N = 209$, $P < 0.001$)。

30

【発明を実施するための形態】

【0018】

本出願で用いる「一(a)」及び「一(an)」という用語は、1つ又は複数(即ち、少なくとも1つ)の態様を指す。

【0019】

「個体(subject)」という用語は、疑似の川崎病を患う脊椎動物を指す。個体としては、温血動物、例えば、哺乳動物、例えば、霊長類動物、好ましくはヒトである。非ヒト霊長類も個体に含まれる。「個体」という用語は、飼育動物、例えば、猫、犬等、家畜(例えば、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ等)及び実験動物(例えば、マウス、ウサギ、ラット、スナネズミ、モルモット等)が含まれる。

40

【0020】

本文に使用される「サンプル(sample)」という用語は、被検材料を含む組成物を指し、例えば、疑似の川崎病を患うヒト又は他の哺乳動物などの生体からの任意の材料を指す「生物学的サンプル(biological sample)」が含まれる。生物学的サンプルは、例えば、組織、細胞、細胞ペレット、細胞抽出物、外科用サンプル、生検又は細針吸引生検などの固体材料を含む任意の形態であってもよく、又は尿、全血、血漿又は血清などの生物学的液体、又は唾液などの、個体からの任意の他の液体サンプルであってもよい。

【0021】

50

遺伝子に適用される「メチル化レベル (methylation level)」という用語は、CpGコンテキストに存在する1つ又は複数のシトシン残基がメチル化基を有するか否かを指す。メチル化レベルは、サンプルにおいてシトシンのC5位又はN4位にメチル化基を有するか否かの細胞部分を指す。CpGジヌクレオチドのメチル化は、非コード転写制御配列 (例えば、プロモーター、エンハンサーなど) 又は関連遺伝子のイントロン及びエクソンを含むコード配列に存在することができる。

【0022】

「低メチル化 (hypomethylation)」という用語は、正常対照DNAサンプルにおいて対応のCpGジヌクレオチドに発現する5-mCytの量に対して、試験DNAサンプルのDNA配列内の1つ又は複数のCpGジヌクレオチドでの5-mCytの存在の減少に対応する平均メチル化状態を指す。

10

【0023】

CpG遺伝子座 (CpG locus) という用語は、CpGジヌクレオチド又はCpG部位を称する。

【0024】

本発明における全ての数字は、「約」という用語で修飾することができる。本発明に使用される「約」という用語は、特定の値 $\pm 15\%$ の偏差を含むことを指す。

【0025】

(川崎病の診断方法)

20

本発明の一部は、特定CpGジヌクレオチドの差異メチル化レベルに基づき、川崎病を予測する。本発明の一部の実施例は、個体が川崎病を有するか又は川崎病の発症リスクを有するかどうかを診断するための方法である。その方法は、(a) 個体のサンプルからのゲノムDNAを、表1に示されるメチル化と非メチル化CpGジヌクレオチドとを区別する少なくとも1つの試薬又は一連の試薬と接触させるステップと、(b) 個体のレベルは、非川崎病又は対照サンプルと比較して、表1に示される少なくとも1つのCpGジヌクレオチド又は遺伝子座のより低いメチル化レベルを有する場合、当該個体が川崎病を患う又は川崎病の発症リスクを有すると特定されるステップとを含む。

【0026】

もう一つの実施例では、前記方法は、個体から生物学的サンプルを得るステップと、個体からのサンプル中のDNA領域内の少なくとも1つのシトシンのメチル化レベルを測定するステップとを含む。そのDNA領域は、SEQ ID NO: 1~SEQ ID NO: 5からなる群から選択される配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%同一であり、又はSEQ ID NO: 1~SEQ ID NO: 5からなる群から選択される配列を含む。

30

【0027】

【表 1】

染色体位置、SEQ ID NO及びDNA配列を示す。

CpG 遺伝子座*	染色体/ 座標	SEQ ID NO	配列
cg23677000	19/35,7 73,317	1	tctgccggctgaggggtg acacaaacctgttccct gtcgctctgttcccgct tatctctcc[cg]cctt ttcggcgcacacacctt cttggaaatgagacaga gcaaaaggggagggggct cagac
cg04085447	19/3577 3328	2	aggggtgacacaaacctg ttccctgtcgctctgtt cccgcttatactctcccg ccttttcgg[cg]ccac caccttcttggaaatga gacagagcaaaaggggag ggggctcagaccaccgc ctccc
cg17907567	19/357 73474	3	gtcaactcgggtcccagac accagagcaagctcaag aCccagcagtgggacag ccagacaga[cg]gcac gatggcactgagctccc agatctggggccgcttgc ctcctgctcctcctcct cctcg
cg26283059	19/3577 3480	4	gctggcgaaggaggaggaa ggagcaggaggcaagcgc gcccaagatctgggagct cagtgccat[cg]tgcc gtctgtctggctgtccc actgctgggtcttgagc ttgctctgggtgtctggg accga
cg27273033	19/3577 3719	5	acctcaagtgggctgccc tgccctcaacctcccaaa gtgctgggattacaggc atgagccac[cg]tgcc ctgtcctgggttccctgtt cagctgcccagtaactcct gagacgtcctgagctct gctcag

*「遺伝子座 (CpG loci)」の欄は、メチル化の Illumina's® Golden Gate 及び Infinium® 分析により提供された参照番号である。

【0028】

一実施例では、以下の CpG 遺伝子座の少なくとも1つのメチル化レベルの減少（本明細書に記載又は当技術分野で公知の任意の方法によって決定することができる）は、当該個体が川崎病を患う又は川崎病の発症リスクを有することを示す：cg23677000

10

20

30

40

50

、c g 0 4 0 8 5 4 4 7、c g 1 7 9 0 7 5 6 7、c g 2 6 2 8 3 0 5 9又はc g 2 7 2 7 3 0 3 3。もう一つの実施例では、(本文に記載の任意の方法により)上記のC p G遺伝子座の少なくとも1つのメチル化レベルを測定することにより、個体が川崎病を患うかどうか又は川崎病の発症リスクを有すると特定する。一部の実施例では、ヘプシジンのレベルを測定する。一部の実施例では、2つ又は2以上のC p Gジヌクレオチドのメチル化レベル及び/又はヘプシジンのレベルの測定は、川崎病診断に対してより高い精度、感度又は特異性を提供する。

【0029】

一部の実施例では、表1で特定されるC p G遺伝子座から選択するDNA領域又はその一部(例えば、少なくとも1つのシトシン残基)内の染色体DNAのメチル化レベルを測定する。一部の実施例では、C p G遺伝子座の少なくとも20、50、100、200、500個又はそれ以上の隣接塩基対内の全シトシンのメチル化レベルをさらに測定する。例えば、c g 2 3 6 7 7 0 0 0でのシトシンのメチル化レベルを測定する。

10

【0030】

本発明の一部の実施例では、対照又は非川崎病のC p G遺伝子座のメチル化レベルを予め決定して正規化する。一般的に、対照のC p G遺伝子座は、既知且つ相対的な一定のメチル化レベルを有する。非川崎病又は対照サンプル中の所定のメチル化レベルは、非川崎病の代表的なプール(representative pool)からのものであり、非川崎病又は対照サンプル中のメチル化レベルの平均値、中央値又は他の統計的に操作され、他の要約され又は集約される代表的なものである。

20

【0031】

より低いメチル化レベル又は低メチル化は相対的な用語であり、川崎病サンプル中の表1のC p G遺伝子座のメチル化レベルと参照対照レベルのメチル化レベルとの比較により決定することができる。一部の実施例では、試験サンプル中の表1のC p G遺伝子座のメチル化レベルは、非川崎病又は対照個体より1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は100%も低いである。

【0032】

DNAのメチル化レベルを検出する任意の方法は、本発明の方法に使用されることができる。メチル化レベルの検出方法の非限定的な例には、メチル化感受性制限酵素分析、重亜硫酸塩(bisulfite)、二重硫酸塩(disulfite)、亜硫酸水素塩(hydrogen sulfite)又はそれらの組み合わせを含む試薬の処理による化学分析、又はパイロシーケンシング(pyrosequencing)が含まれる。

30

【0033】

亜硫酸水素ナトリウム(sodium bisulfite)をDNAと接触させる場合、非メチル化シトシンをウラシルに変換して、メチル化シトシンは修飾されない。他の実施例は、アレイベースのアッセイ、例えば、Illumina(R) Human Methylation 450 Bead Chip及びマルチプレックスPCRアッセイ(multiplex PCR assays)の使用を含む。

【0034】

定量的増幅方法(例えば、定量的PCR又は定量的線形増幅)は、制限消化後、増幅プライマーにより隣接される遺伝子座内においてインタクトなDNAの量を定量化するために使用される。定量的増幅の方法は、例えば、米国特許第6,180,349号;第6,033,854号;及び第5,972,602号に開示される。

40

【0035】

他のメチル化レベル検出方法としては、核酸増幅、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、メチル化特異的PCR(MCP)、メチル化-C p Gアイランド回収アッセイ(methylated-C p G island recovery assay, MIRA)、重亜硫酸塩制限分析(combined bisulfite-restriction analysis, COBRA)、一本鎖立体配座多型(SSCP)分析、制限分析及

50

びマイクロアレイ分析 (Lian ZQ et al, screening of significantly hypermethylated genes in breast cancer using microarray-based methylated-CpG island recovery assay and identification of their expression levels, International Journal of Oncology, 41: 629-638, 2012) が含まれるが、これらに限定されない。

【0036】

実施例では、本発明に記載の方法は、血漿ヘプシジンのレベルを測定することをさらに含む。血漿ヘプシジンのレベルの測定は、本明細書に記載又は当技術分野で公知の方法、例えば、酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) によって行うことができる。もう一つの実施例では、前記方法は、ヘプシジン miRNA 発現レベルを測定することをさらに含む。ヘプシジン miRNA の発現レベルの測定は、サンプル中に存在する miRNA 量を定量し、リアルタイム PCR (real-time PCR)、ノーザンブロット分析又は他の周知の技術などの当技術分野で公知又は本明細書に記載の方法によって行うことができる。ヘプシジン miRNA の発現レベルの測定は、成熟形態の miRNA 又は miRNA 発現と相関する前駆体形態の発現レベルを測定することを含む。

10

【0037】

特定の実施例では、少なくとも1つの miRNA の発現量はノーザンブロット分析により測定される。例えば、細胞の全 RNA を細胞から核酸抽出緩衝液の存在下でのホモジナイゼーションして、遠心分離により精製することができる。核酸が沈殿し、DNA をデオキシリボヌクレアーゼ (DNase) による処理および沈殿により除去する。続いてその RNA 分子を標準的な技術に従ってアガロースゲル上でのゲル電気泳動により分離し、ニトロセルロースフィルターに転写する。次いでその RNA を加熱によりそのフィルター上に固定 (immobilized) する。特定の RNA の検出および定量化は、問題の RNA に相補的な適切に標識された DNA または RNA 試薬を用いて達成される。例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook et al., eds., 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Chapter 7 を参照、その全開示を参照により援用する。

20

30

【0038】

一部の実施例では、ヘプシジンの miRNA を定量的 RT - PCR を用いて測定する。定量的 RT - PCR (qRT - PCR) は、ポリメラーゼ連鎖反応の産物の量を迅速に測定するために使用される、ポリメラーゼ連鎖反応の改変である。当技術分野において公知の qRT - PCR 法にいくつかの改変があり、アガロースゲル電気泳動、SYBR Green (二本鎖 DNA 色素) の使用、及び蛍光レポーター試薬の使用も含まれるが、これらに限定されない。

【0039】

川崎病及び非川崎病の個体中の表 1 に示される少なくとも1つの CpG 遺伝子座の差異メチル化レベルの同定はいくつかの方法でこの情報の使用が可能である。例えば、本文に開示される方法により川崎病の診断を確認される場合、個体を治療薬 (例えば、単回投与又は複数回投与の IVIG、アスピリン、抗 TNF - 薬、コルチコステロイド、シクロスポリン (cyclosporin)、IL - 1 阻害薬 (アナキンラ (anakinra) 及びカナキヌマブ (canakinumab))、シクロホスファミド (cyclophosphamide)、リツキシマブ (Rituximab)、トシリズマブ (Tocilizumab)、ペントキシフィリン (Pentoxifylline)、血漿分離交換法 (plasmapheresis) 又はそれらの組み合わせ) で迅速に治療することができる。もう一つの実施例では、特定の治療計画を評価することができる (例えば、治療は川崎病個体の冠状動脈合併症の予防に有効であるかどうかを確認する)。同様に、診断は、試験サンプル中の表 1 に示される少なくとも1つの CpG 遺伝子座のメチル化レベ

40

50

ルと非川崎病サンプルからの既知の発現プロファイルとの比較により行われる又は確認されることができ。また、これらのメチル化プロファイルは、川崎病のメチル化発現を増強する、又は予後不良プロファイルをより良好な予後プロファイルに変換する候補薬をスクリーニングすることができる。

(川崎病の診断のためのキット)

本発明は川崎病の診断に使用するためのキットも提供する。キットは、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4又はSEQ ID NO: 5から選択される少なくとも1つのCpGジヌクレオチドのシトシンメチル化状態を特異的に検出するための少なくとも1つのプライマー又は試薬を含む。

10

【0040】

一実施例では、メチル化レベルの検出のためのキットは、表1で特定されるCpG遺伝子座の1つ(又は表1のCpG遺伝子座と少なくとも90%同一の核酸配列)にハイブリダイズする、或いは表1で特定されるCpGの1つに隣接するDNAの領域にハイブリダイズする少なくとも1つのプライマー、亜硫酸水素ナトリウム、メチル化感受性、メチル化依存性制限酵素(methylation-dependent restriction enzyme)、又は増幅(例えばPCR)試薬から選択する少なくとも1つのメチル化検出試薬を含む。前記キットは、アッセイの使用に適したアッセイ装置の形態での固体支持体を提供することができる。前記キットは、川崎病診断のための検出可能な標識又は指示をさらに含むことができる。試験管、トランスファーピペットなどを含む、アッセイの実施のための他の材料もキットに含まれることができる。

20

【0041】

一部の実施例では、マイクロアレイの使用が望ましい。マイクロアレイは、複雑な生化学的試料の並行分析を可能にする、核酸、タンパク質、小分子、細胞または他の物質の微視的な整列したアレイである。マイクロアレイは、微細に尖ったピンによるスライドガラス上への印刷、予め作られたマスクを用いたフォトリソグラフィー(photolithography)、動的マイクロミラー装置(dynamic micromirror devices)を用いたフォトリソグラフィー、インクジェット印刷、または微小電極アレイ上での電気化学が含まれる様々な技術を用いて製作することができる。

30

【0042】

一実施例では、マイクロアレイは、表1中の少なくとも1つのCpG遺伝子座のメチル化状態を検出するための特異的プライマーオリゴヌクレオチドを含む。

【0043】

本発明の実施例は、下記の実例によっても説明され、それは如何なる形式でもその範疇に何らかの制限を加えると解釈されるべきではない。逆に、本発明の他の様々な実施形態、それらの変更、および等価物は、本明細書の記載を読んだ後に、本発明の趣旨から逸脱することなく様々な変更及び修正が可能であることは、当業者に明らかである。下記の実例に述べる研究において、別途説明されない限り、慣習的手順に従うべきである。いくつかの手順は、説明の目的で下文に記述する。

40

(実例に用いられる材料と方法の記述)

患者

台湾の高雄長庚記念小児病院からの合計259人の個体がこの研究に登録される。川崎病と診断される患者及び非川崎病(又は「FC」と診断される患者から全血試料を採取する。内科医師によって診断される臨床的な川崎病はこの研究の黄金律と考えられる。FCは5日間以上の発熱があるが、川崎病を患っていない患者である。それらの内、18人の個体は有熱対照群(発熱がある非川崎病患者)であり、他の18人の個体はIVIIG治療の前及びその3週間後に血液サンプルが採取される川崎病患者である。有熱対照群の患者は上部呼吸道感染症又は尿路感染症と診断される。

【0044】

実験デザイン

50

収集した全血サンプルを白血球(WBC)濃縮にし、続いてDNA単離を行う。Huang YH et al. (Oncotarget 2017, 8(7):11249-11258)に記載のように、DNAサンプルを重亜硫酸塩で処理する。

【0045】

Illumina M450K BeadChipによるDNAメチル化プロファイリング

DNAメチル化パターン(methylation patterns)のゲノム全体でのクリーニングを実施するため、Illumina HumanMethylation450 (M450K) BeadChip (Illumina, USA)を使用する。製造業者の指示に従って、200 ngの重亜硫酸塩変換したゲノムDNAを各M450K BeadChipアッセイに用いられる。各サンプル中の各CpGジヌクレオチドについてシトシンのメチル化百分率(値)を計算する。

10

【0046】

酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)によるヘプシジンの測定

血漿ヘプシジンのレベルをELISAキット(Bachem Bioscience, UKから市販されている)を用いて測定する。

【0047】

パイロシーケンス法によるDNAメチル化の検証

ゲノムDNA(0.5 μg)をEZ DNAメチル化キット(Zymo Research, USA)を用いて重亜硫酸塩修飾し、20 μlのTris緩衝液(10 mM)中に溶出させる。ポリメラーゼ連鎖反応は、25 ngの重亜硫酸塩変換DNA、1×PyroMark PCR Master Mix(Qiagen、ドイツ)及びビオチン化フォワードプライマーATTTTGTAGGTGAGGGTGATATAATTとリバースプライマーCCTCCCCTTTACTCTATCTCATを含む25 μlの反応混合物中で行う。以下のPCRパラメーターを使用する: 95 で5分の後、次に95 で30秒、52 で30秒、72で30秒の45サイクル及び72 で5分の最終伸長。増幅後、ビオチン化PCR産物を精製し、目的のCpG部位に隣接して結合するように設計されるシーケンシングプライマーTTTGTTTTAGTTTATTTTとインキュベートする。パイロシーケンスはPyroMark Q24機器(Qiagen)により行って、PyroMark Q24 1.010ソフトウェアでメチル化の定量を測定する。

20

30

【0048】

統計分析

全てのデータは平均値±標準誤差として表されている。定量データはStudent's t-test又はone-way ANOVAを用いて分析される。IVI G治療の前及びその後のデータは対応のあるpaired t-テスト(paired sample T-test)を用いて分析される。全ての統計分析は、Windows XPのSPSS 22.0版(SPSS, Inc., Chicago, USA)を用いて行われ、 $P < 0.05$ の両側P値は統計的に有意と見なす。

【0049】

結果

図1は、有熱対照サンプルと川崎病患者との以下のCpGジヌクレオチドが統計的に有意な低メチル化を示す: cg23677000、cg04085447、cg17907567、cg26283059及びcg27273033。

40

【0050】

CpGジヌクレオチドの低メチル化が川崎病と非川崎病患者とを十分に区別することを確実にするため、上記のメチル化の結果は、上位2つ(cg23677000及びcg04085447)のCpGジヌクレオチドの標的特異的な配列決定を用いてパイロシーケンスにより92人のIVI G治療前の川崎病患者、16人のIVI G治療後の川崎病患者及び113人の有熱対照群の各患者コホートで検証される。図2は、cg236770

50

00及びcg04085447の検証されるメチル化状態を示し、有熱対照群と比較して、IVI G治療前の川崎病患者でのcg23677000及びcg04085447は統計的に有意な低メチル化を示す(それぞれは $P < 0.001$ と $P < 0.001$)。図2は、川崎病患者でのcg23677000及びcg04085447のメチル化状態がIVI G治療の後に有意に増加することを示す(それぞれは $P < 0.001$ と $P < 0.001$)。メチル化分析の結果は、メチル化アレイとパイロシーケンスとの間で一致する。

【0051】

非川崎病患者の有熱対照群($n = 113$)及びIVI G治療前($N = 92$)とIVI G治療後($N = 16$)の川崎病患者での血漿ヘプシジンのレベルをELISAによってBio-plexシステムを用いて測定する。図3は、川崎病患者での血漿ヘプシジンのレベルは、有熱対照群と比較して有意に増加することを示す。

10

【0052】

図4A~図4Bは、血漿ヘプシジンのレベルとcg23677000及びcg04085447のメチル化状態との負の相関関係を示す(それぞれは、 $R = -0.311$, $p < 0.001$ 、 $R = -0.326$, $p < 0.001$)。

【0053】

サポートベクターマシン(Support vector machines, SVM)による分類モデル

Kuo HC et al. (The Journal of allergy and clinical immunology 2016, 138(4):1227-1230)に記載のSVM分類モデルは、有熱対照群と川崎病個体との区別のために開発される。cg23677000とcg04085447のメチル化百分率及び血漿ヘプシジンのELISAレベルは、SVM分類モデルのためのSVMベクターである。当該モデルは、66人の川崎病個体と74人の有熱対照個体をトレーニングセット(training set)とし、26人の川崎病個体と39人の有熱対照個体を盲検テストセット(blind test set)とする。3つのSVMベクトルのトレーニングセットは、5倍交差検証方針に基づいてSVMモデルの訓練に使用される。特定のパラメータ($cost = 2$ と $gamma = 1$)を与える。上記から導き出される川崎病に特異的なSVMのアライメントモデルを使用して、3つのSVMベクトルの感度、特異性及び精度を計算し、その結果は表2に示される。

20

30

【0054】

【表 2】

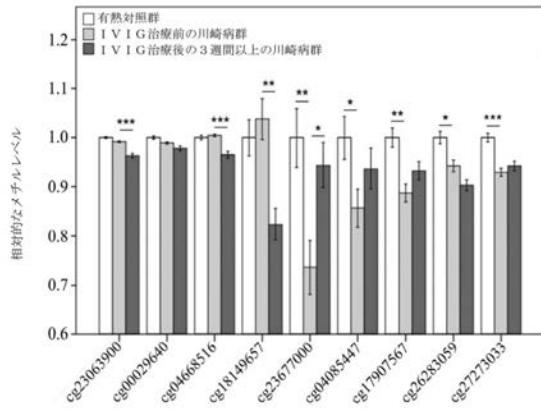
川崎病の診断における c g 2 3 6 7 7 0 0 0 と c g 0 4 0 8 5 4 4 7 のメチル化比率及び血漿ヘプシジンの E L I S A レベルの感度、特異性及び精度を示す。

川崎病のバイオマーカー	感度	特異性	精度	P 値
c g 2 3 6 7 7 0 0 0	7 6 . 2 5 %	5 5 . 4 0 %	0 . 6 9	0 . 0 0 0 1 5
c g 0 4 0 8 5 4 4 7	6 5 . 0 0 %	8 2 . 4 3 %	0 . 7 8	0 . 0 0 0 4 6
ヘプシジン	7 7 . 5 %	8 1 . 0 8 %	0 . 8 8	6 . 7 8 x 1 0 ⁻¹³
c g 2 3 6 7 7 0 0 0 +	8 8 . 7 5 %	9 5 . 9 5 %	0 . 9 6	
c g 0 4 0 8 5 4 4 7				
c g 2 3 6 7 7 0 0 0 +	9 6 . 2 5 %	9 8 . 6 5 %	0 . 9 9	
ヘプシジン				
c g 0 4 0 8 5 4 4 7 +	9 3 . 7 5	9 4 . 5 9 %	0 . 9 8	
ヘプシジン				
c g 2 3 6 7 7 0 0 0 +				
c g 0 4 0 8 5 4 4 7 +	1 0 0 %	1 0 0 %	1	
ヘプシジン				

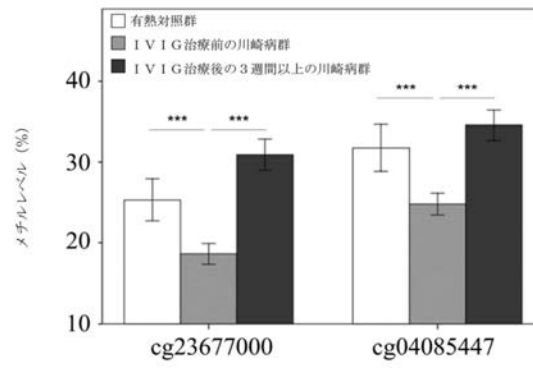
10

20

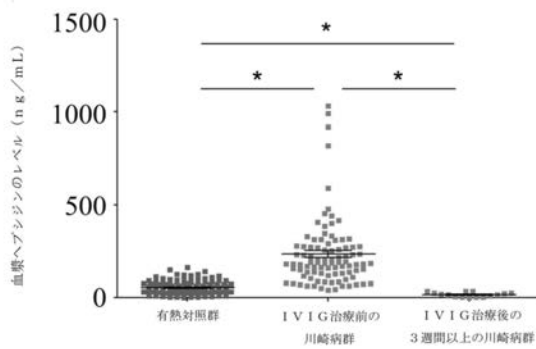
【 図 1 】



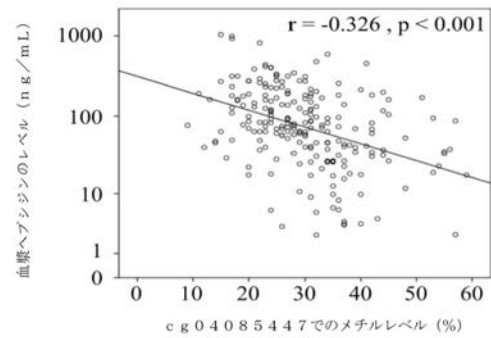
【 図 2 】



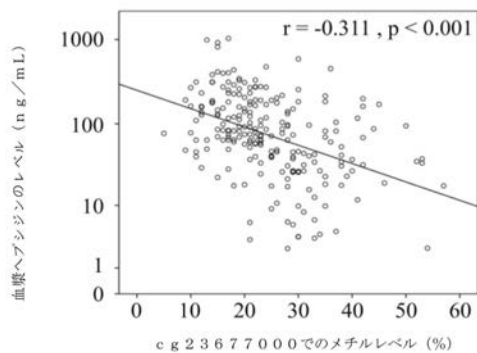
【 図 3 】



【 図 4 B 】



【 図 4 A 】



【配列表】

2019092503000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
		G 0 1 N	33/53	M

(72)発明者 クオ ホ - チャン

台湾, カオシュン シティ, ニャオソン ディストリクト ダビ ロード, ナンバー 1 2 3

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ42 QR08 QR55 QR62 QS25 QS36
4C084 AA17 ZA361 ZB111

【外国語明細書】

2019092503000001.pdf

2019092503000002.pdf

2019092503000003.pdf

2019092503000004.pdf

专利名称(译)	检测川崎病的方法，其试剂盒和治疗川崎病的方法		
公开(公告)号	JP2019092503A	公开(公告)日	2019-06-20
申请号	JP2018217635	申请日	2018-11-20
发明人	ファン イン-シェン クオ ホ-チャン		
IPC分类号	C12Q1/6883 A61K45/00 A61P9/00 A61P29/00 C12Q1/6851 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/505 A61K2039/55 A61P9/00 C07K16/06 C12Q1/6883 C12Q2600/154 C12Q2600/156 C07K16/18 C12Q1/6816 C12Q1/6851		
FI分类号	C12Q1/6883.ZNA.Z A61K45/00 A61P9/00 A61P29/00 C12Q1/6851.Z G01N33/53.D G01N33/53.M C12Q1/6883.ZZN.A		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS36 4C084/AA17 4C084/ZA361 4C084/ZB111		
优先权	62/589345 2017-11-21 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

[问题] 提供了一种使用新型生物标志物诊断和/或治疗川崎病的方法。[解决方案] 本发明的新型生物标志物显示出与非川崎病患个体相比，川崎病患个体中某些CpG基因座的胞嘧啶甲基化状态的变化。还提供了一种试剂盒，其包含至少一种对某些CpG基因座的胞嘧啶甲基化状态改变具有特异性的引物或试剂，用于检测川崎病。[选型图]图1

