

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5749171号
(P5749171)

(45) 発行日 平成27年7月15日(2015.7.15)

(24) 登録日 平成27年5月22日(2015.5.22)

(51) Int.Cl.	F I	
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50	P
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48	Z
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	Z N A A
請求項の数 19 (全 31 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2011-533750 (P2011-533750)	(73) 特許権者	509131937
(86) (22) 出願日	平成21年10月30日 (2009.10.30)		ルクセンブルグ・インスティテュート・オブ・ヘルス
(65) 公表番号	特表2012-507026 (P2012-507026A)		ルクセンブルグ・L-1445・シュトラッセ・リュ・トーマス・エディソン・1A-B
(43) 公表日	平成24年3月22日 (2012.3.22)	(74) 代理人	100108453
(86) 国際出願番号	PCT/EP2009/064410		弁理士 村山 靖彦
(87) 国際公開番号	W02010/049538	(74) 代理人	100064908
(87) 国際公開日	平成22年5月6日 (2010.5.6)		弁理士 志賀 正武
審査請求日	平成24年10月26日 (2012.10.26)	(74) 代理人	100089037
(31) 優先権主張番号	61/109,649		弁理士 渡邊 隆
(32) 優先日	平成20年10月30日 (2008.10.30)	(74) 代理人	100110364
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 実広 信哉
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 バイオマーカー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

心臓病を進行させる危険性が増加している心筋梗塞患者を同定する方法であって、
 -梗塞後に、患者からの体液試料を、血管内皮増殖因子B(VEGFB)、トロンボスポンジン-1(THBS1)および胎盤増殖因子(PGF)のレベルについてアッセイするステップと、
 -VEGFB、THBS1およびPGFのレベルを、対照と比較するステップと、
 -前記比較に基づいて、患者が心臓病を進行させる危険性が増加しているかを決定するステップと
 を含む方法。

【請求項2】

対照が、種々の臨床成績を有する梗塞患者の集団から得ることができる参照値である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

対照が、前記患者からのさらなる試料からのVEGFB、THBS1およびPGFの対応するレベルである、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

さらなる試料が、患者からの先行試料であり、以下が、前記患者が前記心臓病に罹患する可能性の増加を示す、請求項3に記載の方法：

- アッセイした患者試料における、先行試料のVEGFBと比較してより低いレベルのVEGFB；
- アッセイした患者試料における、先行試料のTHBS1と比較してより高いレベルのTHBS1；お

よび

-アッセイした患者試料における、先行試料のPGFと比較してより高いレベルのPGF。

【請求項 5】

心臓病が、心筋梗塞、急性冠症候群、虚血性心筋症もしくは非虚血性心筋症であるか、または患者が、心不全もしくは心室リモデリングを進行させるかまたはそれに罹患する、請求項1から4のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

患者から採集される体液試料が、血液試料、組織液試料、血漿試料、血清試料または尿試料である、請求項1から5のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

アッセイされるVEGFB、THBS1およびPGFのレベルが、mRNAレベルまたは血漿タンパク質レベルである、請求項1から6のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

VEGFB、THBS1およびPGFのレベルが、心筋梗塞の日にアッセイされる、請求項1から7のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

決定が、最近傍統計解析比較法による、請求項1から8のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

1または複数のMI患者について、VEGFB、THBS1およびPGFのレベルまたは値の分析、ならびにその患者についての関連する臨床成績を含むデータを収集して、特定の臨床成績と関連するVEGFB、THBS1およびPGFについての特徴データを創出するステップをさらに含む、請求項1から9のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

分類器が、予後を決定するために用いられる、請求項1から10のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

心臓病を進行させる危険性が増加している心筋梗塞患者を同定する方法であって、
-MI後患者からの体液試料を、VEGFB、THBS1およびPGFのmRNAまたは血漿タンパク質レベルについて分析して、患者の特徴データを決定し、この特徴データを、前記患者における心不全の発症率に關係する特定の臨床成績と関連付け、この特徴データをデータベースに入力するステップと、

-前記分析を複数のMI後患者について反復して、HFとVEGFB、THBS1およびPGFのレベルとの關係に関する参照情報を含むようにデータベースに格納するステップと、

-予後が未知のMI後患者の特徴データを決定するステップと、

-前記患者からのVEGFB、THBS1およびPGFレベルについての特徴データを処理して、それをデータベース内の特徴データと比較するステップと、

-比較の結果に応じて、患者についての可能性のある予後を出力するステップとを含む方法。

【請求項 13】

心臓病の危険性の低下が、それぞれ照会した試料と比較して、比較的高いレベルのVEGFB mRNA(対数比>-1.4)、相対的に低いレベルのTHBS1 mRNA(対数比<0)および相対的に低いレベルのPGF mRNA(対数比<-0.1)を有する梗塞参照試料に關係して決定される、請求項1から12のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

比の値が、少なくとも1%、かつ50%までの量で変動する、請求項13に記載の方法。

【請求項 15】

BNPのレベルをアッセイするステップと、これをBNP参照試料と比較するステップとをさらに含む、請求項1から14のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】

心筋梗塞患者についての予後を確立する方法であって、

10

20

30

40

50

-梗塞後に、患者からの体液試料を、血管内皮増殖因子B(VEGFB)のレベルならびにトロンボスポンジン-1(THBS1)および胎盤増殖因子(PGF)のレベルについてアッセイするステップと、
 -VEGFB、THBS1およびPGFのレベルを、対照と比較するステップと、
 -前記比較に基づいて前記患者についての予後を決定するステップとを含む方法。

【請求項 17】

心臓病が進行している心筋梗塞患者についての予後を確立する方法であって、
 -梗塞後に、患者からの体液試料を、血管内皮増殖因子B(VEGFB)のレベルならびにトロンボスポンジン-1(THBS1)および胎盤増殖因子(PGF)のレベルについてアッセイするステップと、
 -予め構築された統計プログラム(「分類器」ともよばれる)に、VEGFB、THBS1およびPGFのレベルを問い合わせるステップと
 を含み、
 -高いレベルのVEGFBと低いレベルのTHBS1およびPGFとが、前記心臓病を進行させる可能性の減少と関連し、
 -分類器により、患者が前記心臓病を進行させる可能性が減少しているかが示される方法。

【請求項 18】

心臓病の危険性が低減している心筋梗塞患者を同定する方法であって、
 -梗塞後に、患者からの体液試料を、血管内皮増殖因子B(VEGFB)のレベルならびにトロンボスポンジン-1(THBS1)および胎盤増殖因子(PGF)のレベルについてアッセイするステップと、
 -VEGFB、THBS1およびPGFのレベルを、対照と比較するステップと、
 -前記比較に基づいて、患者が心臓病を発症する危険性が低減しているかを決定するステップと
 を含む方法。

【請求項 19】

MI患者からの特徴データを含むデータベース、ならびに前記データベースにアクセスしかつ/または前記データベースを操作し、かつクエリを処理するための少なくとも1つの比較デバイスを含むシステムであって、前記データが、MI後にアッセイされたVEGFB、THBS1およびPGFのレベルと一致する患者の臨床成績を含む、システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、特に患者が心筋梗塞(MI)に罹患した後の、患者における心不全(HF)もしくは心室リモデリングの危険性または重症度を評価するための新しいバイオマーカーのセットと、これらのバイオマーカーのレベルを測定するための診断キットとに関する。

【背景技術】

【0002】

心不全(HF)は、特異疾患ではなく、徴候および症状の寄せ集めであり、これらの徴候および症状は全て、必要に応じて心臓が心拍出量を適切に増加できないことを原因とする。患者は、息切れ、浮腫および疲労を典型的に示す。HFは、流行的な割合の疾患となり、成人集団の3%に影響する。HFの死亡率は、多くの形態の癌よりも悪く、5年間の生存率が30%未満である。心筋梗塞(MI)は、HFの主要な原因の1つである。63%の患者が、MIの後6年間にHFを発症する。左室リモデリングがHFに大きく寄与する。HFは老人においてより一般的になっているので、影響を受ける個体の数は、我々の加齢集団において上昇し続ける。

【0003】

過去10年間の多大な研究により、HFの病態生理の理解が進んでいる。同時に、多くの新しい治療標的が同定されているが、それらのうちのいくつかだけが潜在的に治療において

10

20

30

40

50

有用である。これらの標的のいくつかは、それらの予後因子としての価値が証明できた場合に、「予後バイオマーカー」または「バイオマーカー」とよばれる。

【0004】

バイオマーカーは、3つのカテゴリーに分類できる。見かけは健常な個体のケアを支援できるバイオマーカーは、「スクリーニングバイオマーカー」とよばれる。疾患の疑いがある患者で見られるバイオマーカーは、「診断バイオマーカー」とよばれ、顕性疾患の患者で見られるバイオマーカーは、「予後バイオマーカー」とよばれる。MIについてのトロポニンIおよびトロポニンTならびに心不全についての脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)のような診断バイオマーカーは臨床診療で用いられるが、個別の患者について治療を適応させるため(「個別化医療」)の予後バイオマーカーとしてのこれらのバイオマーカーの潜在的な使用は、まだ証明されなければならない。

10

【0005】

MIの後にHFを発生する傾向にある患者を初期に同定できるほど、治療をより効果的に調節できることに注目しなければならない。しかし、個別のバイオマーカーを用いる際の主な限界は、全ての患者がこのような危険因子を独立して示すことができるわけではないということである。よって、バイオマーカーの多重化および統合化が、MIの後にHFを発生する傾向にある患者の初期の同定に対して著しい利益を与え得ることが明らかになっている。

【0006】

増殖因子のサブファミリーである血管内皮増殖因子(VEGF)は、多くのファミリーからの多くのタンパク質をカバーする広い用語である。これらの増殖因子は、それらの血管新生特性について主に研究されている。種々の増殖因子が現在までに同定されており、それらの中の最もよく知られたものがVEGFAである。VEGFAは、しばしば単に「VEGF」とよばれる(Ferraraら「The biology of VEGF and its receptors」Nat Med.2003年6月;9(6):669~676頁)。本発明で提案されるバイオマーカーの1つであるVEGFBは、血管内皮増殖因子のファミリーの一部であるが、VEGFAとは区別される。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Ferraraら「The biology of VEGF and its receptors」Nat Med.2003年6月;9(6):669~676頁

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の目的は、次のとおりである。

1. 予後ツールを提供すること

本発明の目的は、生存率を改善し、悪化させるHFの発生を少なくするために、HFの出現の初期の予後のためのツールを提供することである。

【0009】

本発明の別の目的は、この予後ツールを用いて、心室リモデリングおよび心不全を発症する危険性がある患者を同定することである。

40

【0010】

本発明の別の目的は、この予後ツールを用いて、MI後の心室リモデリングおよびHFの発生をよりよく予防するために治療を調節することである。

【0011】

2. 新しい診断キットを提供すること

本発明の目的は、HFの出現の初期の予後を補助して生存を改善し、悪化させるHFの発生を少なくするために、生体液中のマーカー濃度を測定できる診断キットを提供することである。

【0012】

50

本発明の別の目的は、心室リモデリングおよびHFを発生する危険性がある患者を同定するための新しい診断キットを提供することである。

【0013】

本発明の別の目的は、MI後の心室リモデリングおよびHFの発生をよりよく予防するために治療を調節するための新しい診断キットを提供することである。

【0014】

さらに、患者がHFまたは心室リモデリングを発生する易罹患性についてのMI後の患者のスクリーニングにおいて用いることができるバイオマーカーを提供することも、本発明の目的である。

【0015】

驚くべきことに、我々は、次のタンパク質VEGFB、THBS1およびPGFのmRNAおよび血漿レベルがMI後に変動し、患者がHFおよび/または心室リモデリングを発生するようになる可能性についての優れた指標であることを見出した。

【0016】

これらのバイオマーカーは、よって、MI患者をスクリーニングし、そして、特に、MIに罹患した、HFおよび/または心室リモデリングを次に発生するようになる危険性が増加している患者を同定するための初期予後ツールをもたらすために用いることができる。これらの3つのバイオマーカーのレベルを測定するための診断キットも提供され、MIの関係において、HFおよび/または心室リモデリングの出現を予測するために有用である。

【課題を解決するための手段】

【0017】

第1の態様によると、本発明は、心臓病を発生する危険性が増加している心筋梗塞患者を同定する方法であって、

-梗塞後に、患者からの体液試料を、血管内皮増殖因子B(VEGFB)、トロンボスポンジン-1(THBS1)および/または胎盤増殖因子(PGF)のレベルについてアッセイするステップと、

-VEGFB、THBS1および/またはPGFのレベルを、既知の臨床成績を有する参照試料からのVEGFB、THBS1および/またはPGFの対応するレベルと比較するステップと、

-前記比較に基づいて、患者が心臓病を発生する危険性が増加しているかを決定するステップと

を含む方法を提供する。

【0018】

心臓病を発生する危険性が増加している心筋梗塞患者を同定する方法であって、

-梗塞後に、患者からの体液試料を、血管内皮増殖因子B(VEGFB)、トロンボスポンジン-1(THBS1)および/または胎盤増殖因子(PGF)のレベルについてアッセイするステップと、

-VEGFB、THBS1および/またはPGFのレベルを、対照とのVEGFB、THBS1および/またはPGFの対応するレベルと比較するステップと、

-前記比較に基づいて、患者が心臓病を発生する危険性が増加しているかを決定するステップと

を含む方法も提供される。

【0019】

いくつかの実施形態において、以下の少なくとも1つが、上記の患者が上記の心臓病に罹患する可能性の増加を示す。

-アッセイした患者試料における、VEGFB対照レベルと比較してより低いレベルのVEGFB;

-アッセイした患者試料における、THBS1対照レベルと比較してより高いレベルのTHBS1;および/または

-アッセイした患者試料における、PGF対照レベルと比較してより高いレベルのPGF。

【0020】

好ましくは、心臓病は、心筋梗塞、急性冠症候群、虚血性心筋症または非虚血性心筋症であり得る。より好ましくは、患者は、心不全を発生するようになるかまたは心不全に罹患するようになることがある。好ましくは、患者は、心室リモデリングを受けることがあ

10

20

30

40

50

る。多くの心筋梗塞患者は心室リモデリングを受け、その後または同時に、心不全として知られる病気を発生することが認識される。よって、心室リモデリングと心不全との間には明確な相関があり、好ましくは、心室リモデリングを受ける心筋梗塞患者は、心不全も発生する。

【 0 0 2 1 】

患者から採取される体液試料は、血液試料、組織液試料、血漿試料、血清試料または尿試料であることも好ましい。

【 0 0 2 2 】

好ましくは、アッセイされるVEGFB、THBS1および/またはPGFのレベルは、mRNAレベルである。これらは、赤血球および/または白血球中のmRNAをアッセイすることにより決定してよい。好ましくは、血液細胞は、白血球、好中球、好塩基球、好酸球、リンパ球、単球、血小板または赤血球である。

10

【 0 0 2 3 】

好ましくは、VEGFB、THBS1および/またはPGFは、血液細胞からのmRNAレベルで、mRNAを定量できる任意の技術、最も好ましくは定量PCR、最も好ましくはマイクロアレイにより測定し得る。VEGFB、THBS1および/またはPGFは、血漿中のタンパク質のレベルで、タンパク質を定量できる任意の技術、最も好ましくはELISAにより測定し得ることも好ましい。mRNAアッセイの結果は、より正確な評価のために、血漿タンパク質アッセイの結果と組み合わせ用いてよい。

【 0 0 2 4 】

20

好ましくは、PGFのレベルのみがアッセイされ、これは、好ましくは、配列番号7~9で示されるPGFについての配列のいずれかまたはその断片であり得る。THBS1のレベルのみがアッセイされることも好ましく、これは、配列番号4~6で示されるTHBS1についての配列のいずれかまたはその断片であり得る。より好ましくは、しかし、THBS1およびPGFの両方のレベルがアッセイされる。

【 0 0 2 5 】

VEGFBのレベルがアッセイされることが特に好ましく、これは、配列番号1~3で示されるVEGFBについての配列のいずれかまたはその断片であり得る。これは、単独またはTHBS1および/もしくはPGFとの組み合わせであり得る。VEGFBが、スプライシングバリエーションVEGFB186、スプライシングバリエーションVEGFB167のいずれかまたはその両方であり得ることが好ましい。

30

【 0 0 2 6 】

好ましくは、mRNAレベルは、心筋梗塞の日にアッセイされる。その他の好ましい実施形態において、アッセイのためのmRNAまたは血漿タンパク質試料は、患者から、心筋梗塞の次の日である第1日に得られる。好ましくは、患者から、梗塞後の第1日または第2日または第3日または第4日または第5日または第6日または第7日または1ヶ月までの任意のときに得られる後続の試料がアッセイされる。

【 0 0 2 7 】

好ましくは、後続の試料は患者から第1日に得られ、第1日からのアッセイ値が参照試料と比較される。しかし、後続の試料が患者から第1日に得られ、第1日からのアッセイ値が、梗塞の日からの試料中のアッセイレベルと比較されることが好ましい。このことは、VEGFBに関して最も好ましい。言い換えると、対照試料、最初のMI後試料および後続の試料がVEGFBのレベルについてアッセイされ、これらのVEGFBレベルが比較されることが特に好ましい。参照試料から第1日または第2日までのVEGFBレベルの増加は、患者が上記の病気を発生する危険性がより低いと同定することにおいて特に有用である。同様に、対照試料から第1日または第2日までのVEGFBレベルの減少は、患者が上記の病気を発生する危険性がより高いと同定することにおいて特に有用である。

40

【 0 0 2 8 】

しかし、VEGFBレベルを、第0日または第1日での最初のMI後試料から第1日または第2日での後続の試料(MI後)まで比較することも好ましい。なぜなら、第0日または第1日から第

50

1日または第2日までのVEGFBの増加は、懸案の病気を発生する危険性が低い患者を強く示すからである。第0日と第2日または第1日と第3日との間での測定されるVEGFBの変化は、特に好ましい。

【0029】

実際に、我々は、MI後の第0日と第1日での高EF群と低EF群との間で、血漿VEGFBレベルが同様であったことを見出した。しかし、第2日では、VEGFBレベルは高EF患者で増加し(第0日と比較して2倍)、低EF患者において下落した(第0日と比較して2.5倍)(図9)。これらのデータは、高EF患者におけるVEGFB mRNAの上方制御に従う(図8)。これらの結果は、MI後にVEGFB生成を増加できる患者が、好ましい成績を有する傾向がより高いことを示唆する。

10

【0030】

第0日または第1日から第1日または第2日、特に第0日から第2日までのVEGFBの減少は、懸案の病気を発生する危険性が上昇した患者を強く示す。

【0031】

本発明は、当該技術において時にそうであるようにバイオマーカーの存在または非存在だけよりもむしろ、あるバイオマーカーの発現または普及のレベルの変化を測定する。上記のレベルの変化を測定するために、参照点を確立する必要がある。これは、好ましくは、さらなる試料、特に、好ましくは梗塞の日(第ゼロ日)または梗塞後の1日目もしくは2日目に採取された、より初期の試料におけるレベルであり得る。好ましくは、対照試料は、梗塞の日のそれぞれVEGFB、THBS1またはPGFの基底レベルである。

20

【0032】

代わりに、対照は、既知の範囲の臨床成績を有する梗塞患者の集団から得ることができ、参照値であり得る。梗塞患者からのデータのデータベースを構築でき、年齢、性別などについて一旦校正したら、平均(適切であれば最頻値、平均値または中央値)の値または値の範囲を、梗塞後の特定の時間に測定し、既知の臨床成績(すなわち心不全またはそうでない)を有する、ある基準(例えば性別、体重および年齢)を有する患者について確認できる。アッセイした患者からのデータは、次いで、この参照値または範囲に対して比較して、アッセイされた患者が臨床成績の1つまたはその他を有する可能性を決定できる。例えば、梗塞後第1日に測定した55~60歳の男性梗塞患者の血漿中の「X」マイクログラム/ml付近より低いVEGFBレベルが心不全の50%の可能性を与えることが確立されたならば、アッセイされる試料は、対応する男性から第1日に採取でき、この値と比較して、この患者に50%の可能性が当てはまるかを決定できる。

30

【0033】

決定ステップは、適切な統計解析、例えばKstarおよびSVMプログラムのような「最近傍」比較法によることができる。特に好ましい例は、Wekaのようなデータマイニングプラットフォームを用いることである。この後に、好ましくは算術平均および相関係数を用いる非加重対グループ法を用いて実行する階層的クラスタリングを行ってよい。クラスタリングの視覚化を、次いで、GEPASを用いて行ってよい。所望により、統計的有意差検定、ピアソンの相関値およびグラフへのプロットを、Statisticaパッケージ(v.6.0)を用いて作製してよい。

40

【0034】

本方法は、1または複数のMI患者についてのデータを収集するステップもさらに含んでよく、該データは、好ましくは、3つのmRNAおよび/もしくは血漿タンパク質(VEGFB、THBS1および/もしくはPGF)の少なくとも1つ、好ましくはそのそれぞれのレベルまたは値ならびにその患者についての関連する臨床成績を含む。これは、特定の臨床成績と関連するVEGFB、THBS1および/またはPGFについての特徴/値のデータを創出するために用いられる。

【0035】

この後に、データベースに、各個体からのデータを格納してよい。これらの既知の値は、参照(または「既読」)試料と呼ぶことができる。

【0036】

50

「クエリ」または「未読」試料データ、すなわち最近梗塞した新しい患者からのデータを入力し、データベース内の参照データに対して照会する。クエリデータは、MIになったばかりで、心不全を発生する可能性を確立することを所望する患者から回収された試料から得られる。言い換えると、この患者についての臨床成績は未知であり、オペレータがこの患者の成績(MI後HFの危険性の増加または減少)を予測するようにプログラムに尋ねている。

【0037】

プログラムは、未読/クエリ試料のデータを、参照データセットと比較し、患者の臨床成績についてのその予測を行う。

【0038】

上記でmRNAについて言及する場合、血漿タンパク質レベルについても同じことが当てはまることが認識される。

【0039】

予後を決定するために、分類器が好ましい。分類器は、種々の方式で予測を行うことが公知であるPAM、KstarおよびSVMのようなプログラムを含んでよい。しかし、例えば「最近傍」を探索する場合に、「未読」試料中のmRNA(またはタンパク質)データと1または複数の「既読」データ点との比較が常にまだ存在する。KstarおよびSVMは、例えば、異なるアルゴリズムを用いるが、クエリデータまたは値を値の最近傍の参照セットと比較することによる類似の方式で本質的に作動する。

【0040】

よって、分類器はデータベースを検索し、クエリ/未読データを既知/既読データと比較することが好ましい。データベース内で「最も近い一致」(例えば3つ全てのmRNAまたは血漿タンパク質レベルを解析する場合の3-Dの意味において)を見出すと、プログラムは、その最も近い一致の臨床成績に基づいて、照会患者の臨床成績についてのその予測を行う。

【0041】

-MI後患者からの体液試料を、VEGFB、THBS1および/もしくはPGFのmRNAまたは血漿タンパク質レベルについて分析して、患者の特徴データを決定し、この特徴データを、前記患者における心不全の発生率に関係する特定の臨床成績と関連付け、この特徴データをデータベースに入力するステップと、

-前記分析を複数のMI後患者について反復して、HFの発生率とVEGFB、THBS1および/またはPGFのレベルとの関係に関する参照情報を含有するようにデータベースに格納するステップと、

-予後が未知のMI後患者の特徴データを決定するステップと、

-患者からのVEGFB、THBS1および/またはPGFレベルについての特徴データを処理して、それをデータベース内の特徴データと比較するステップと、

-比較の結果に応じて、予後が未知のMI後患者についての可能性のある予後を出力するステップと

を含む方法も提供される。

【0042】

これらのステップは、本発明の第1の態様による方法にも含まれてよい。

【0043】

可能性のある予後は、HFの危険性の増加または減少であり得、これは、次いで、その患者についての臨床医のさらなる禁じられた治療に影響し得る。予後および診断という用語は、そうでないと明確でない限りは、交換可能に用いてよい。

【0044】

MI患者からの特徴データを含むデータベースであって、特徴データが、本明細書に記載されるように、MI後にアッセイされたVEGFB、THBS1およびPGFのレベルの少なくとも1つ、好ましくはこれらの3つ全てと一致する患者の臨床成績を含むデータベースも提供される。本発明は、データベースにアクセスし、かつ/またはクエリを処理するためのコンピュータのような比較デバイスも提供する。本発明は、データベースと、データベースにアク

10

20

30

40

50

セスしかつ/またはそれを操作する少なくとも1つのコンピュータとを備えるシステムも提供する。Aまたはコンピュータは、試験される患者の特徴データを用いてデータベースに照会することを処理するかまたは管理するために用いてもよい。

【0045】

データベースは、中枢に、例えばサーバ内に保存され得るか、あるいは以下で述べるような、VEGFB、THBS1および/もしくはPGFのレベルをアッセイするために用いる実験室または現場の設備、あるいは上記の設備と連携するコンピュータ内に保持してよい。コンピュータは、サーバとともに中枢に、もしくは遠隔に、例えば中間の実験室にあってもよいが、または現場の設備内にあってもよい。

【0046】

患者からの試料をアッセイするための実験室または現場の設備を含み得るキットも提供される。設備は、データベースを含んでよいが、または分析の結果の表示装置または表示器を単純に含んでよい。設備は、データベースに遠隔的に、例えば、電信または無線通信のいずれかによるインターネットネットワークまたはインターネットを介して交信する能力を有してよい。

【0047】

本発明は、VEGFB、THBS1および/またはPGFレベルをアッセイし、好ましくは、例えばコードのような患者識別子を用いることによってレベルデータを患者と関連付けることにより、患者から特徴データを得る方法も提供する。

【0048】

患者からVEGFB、THBS1および/またはPGFレベルについての特徴データを受信して、それをデータベース内の特徴データと比較する方法も提供される。データは、受信装置により処理されるか、または処理装置に伝送してよい。

【0049】

よって、本発明は、患者からのVEGFB、THBS1および/またはPGFレベルについての特徴データを処理し、それをデータベース内の特徴データと比較する方法をさらに提供する。患者についての可能性のある予後は、比較の結果に応じて処理装置により出力され得、所望により、別のコンピュータおよび/もしくは上記のキットもしくは設備に、ネットワーク、インターネットを介して電信または無線伝送により伝送し得る。

【0050】

データベースは、ディスクまたはメモリデバイスのような搬送媒体上に保存してもよい。つまり、本発明は、患者からのVEGFB、THBS1および/またはPGFレベルについての特徴データを用いて照会があった場合に、患者がMI後HFを発生する可能性を決定するようにコンピュータを作動させるために配置されるデータベースを含む搬送媒体も提供する。

【0051】

VEGFB、THBS1および/またはPGFのレベルは、値または比率と考えることができ、容積または単位容積あたりの質量などである必要はない。

【0052】

好ましくは、参照試料は、患者と同様の人工統計学的、遺伝子型または表現型の群の患者からのものである。参照試料は、任意の数の以下の基準が満たされるならば、梗塞患者と同じ人工統計学的群にあると考えてよい:性別、年齢、人種または民族的背景および病歴。適切な遺伝子型または表現型の対照試料は、例えば、1または複数の遺伝子座、特に梗塞患者、心不全および/または心室リモデリングと関連することが知られているものにて患者の遺伝子型を決定することのような、任意の数の適切な選択基準に基づいて選択できる。

【0053】

遺伝子型の決定は、MMP-9(組織メタロプロテイナーゼ9)のヘモペキシンドメインの配列内のアミノ酸変化の存在を検出するステップを含んでよく、上記のドメイン内のアミノ酸変化の存在は、心筋梗塞後の上記の心臓病への易罹患性を示す。好ましくは、検出される配列は、MMP-9のヘモペキシンドメインの148位に相当する位置にグルタミン(Gln)または

10

20

30

40

50

アルギニン(Arg)アミノ酸残基のいずれかを含むかまたはコードする。好ましくは、検出される配列は配列番号13であり、これは、危険性のある(易罹患性)群(148位のアミノ酸にてArgを示す)からのMMP-9のヘモペキシンドメインのアミノ酸配列またはそれをコードするポリヌクレオチド配列である。MMP-9遺伝子のコード配列に存在する1塩基多型(SNP)は、心筋梗塞後の心不全について良好なまたは悪い予後の患者において異なる頻度で見出され、転写された活性なMMP-9タンパク質のヘモペキシンドメイン内の1アミノ酸変化を導いて、組織メタロプロテイナーゼ阻害物質1(TIMP-1)と結合するMMP-9上の部位の静電的变化をもたらし得る。このことは、TIMP-1がMMP-9活性の主要な阻害物質であるので、重要である。よって、懸案の患者が上記のSNPを有するかを決定し、次いで、もし有するならば、VEGFB、THBS1および/またはPGFのレベル(本発明のアッセイ試料中の)を、上記のSNPを有することがこれもまた知られている患者からの試料におけるレベルと比較すること、またはその逆は有用であり得る。

10

【0054】

好ましくは、心臓病の危険性の低下は、相対的に高いレベルのVEGFB mRNA(>-1.4)、相対的に低いレベルのTHBS1(<0)および/または相対的に低いレベルのPGF(<-0.1)をそれぞれ有する梗塞参照患者のものに関係して決定される。これらの値は、対数比(患者のRNA/参照RNA)として表される。逆のことは、心臓病を発生する危険性の増加について当てはまる。

【0055】

上記の値はTable4(表4)から導かれるが、これらは、少なくとも1または2%、より好ましくは少なくとも5%、より好ましくは少なくとも7%、より好ましくは少なくとも10%、より好ましくは少なくとも15%、より好ましくは少なくとも20%、より好ましくは少なくとも25%、より好ましくは少なくとも30%、より好ましくは少なくとも40%、さらに50%まで変動し得ることが好ましい。

20

【0056】

確立された唯一のHF(心不全)バイオマーカーは、プロBNP(脳性ナトリウム利尿ペプチド)であるので、本明細書に開示される3バイオマーカーのセットの予後性能を、NT-プロBNPの予後性能と比較した。MIの1日後に測定したNT-プロBNPの血漿レベルの予後性能は、中程度であった(AUC=0.63、Table5(表5))。よって、本明細書に開示される3つのバイオマーカーのセットは、NT-プロBNPの予後因子としての価値よりも明らかに性能が優れている。それにもかかわらず、精度を増加させるかまたは決定された予後を確認するかのいずれかのために、BNPも本発明の方法においてアッセイできることが好ましい。このBNPアッセイレベルは、本明細書で述べるBNP基底または参照レベルと比較してよい。

30

【0057】

プロBNPのヌクレオチドおよびタンパク質の配列を、配列番号10~11に示す。

【0058】

心筋梗塞患者についての予後を確立する方法であって、
-梗塞後に、患者からの体液試料を、血管内皮増殖因子B(VEGFB)のレベルならびにトロンボスポンジン-1(THBS1)および/または胎盤増殖因子(PGF)のレベルについてアッセイするステップと、
-VEGFB、THBS1および/またはPGFのレベルを、既知の臨床成績を有する参照試料からのVEGFB、THBS1および/またはPGFの対応するレベルと比較するステップと、
-前記比較に基づいて前記患者についての予後を決定するステップと
を含む方法も提供される。

40

【0059】

トロンボスポンジン-1(THBS1)および/または胎盤増殖因子(PGF)のレベルは、好ましくは、低い血漿レベルである。

【0060】

心筋梗塞患者についての予後を確立する方法であって、
-梗塞後に、患者からの体液試料を、血管内皮増殖因子B(VEGFB)のレベルならびにトロン

50

ボスポンジン-1(THBS1)および/または胎盤増殖因子(PGF)のレベルについてアッセイするステップと、

-VEGFB、THBS1および/またはPGFのレベルを、対照と比較するステップと、

-前記比較に基づいて前記患者についての予後を決定するステップと

を含む方法も提供される。

【0061】

このことは、VEGFB、THBS1および/またはPGFのレベルを、参照試料におけるVEGFB、THBS1および/またはPGFの対応するレベルと比較することにより達成することができ、ここで、以下の少なくとも1つが、上記の患者についての好ましくない予後の可能性の増加を示す。

-アッセイした患者試料における、VEGFB対照レベルと比較してより低いレベルのVEGFB;

-アッセイした患者試料における、THBS1対照レベルと比較してより高いレベルのTHBS1;および/または

-アッセイした患者試料における、PGF対照レベルと比較してより高いレベルのPGF。

【0062】

心筋梗塞患者についての予後を確立する方法であって、

-梗塞後に、患者からの体液試料を、血管内皮増殖因子B(VEGFB)のレベルならびにトロンボスポンジン-1(THBS1)および/または胎盤増殖因子(PGF)のレベルについてアッセイするステップと、

-予め構築された統計プログラム(「分類器」ともよばれる)に、VEGFB、THBS1およびPGFのレベルを問い合わせるステップと

を含み、

-高いレベルのVEGFBと低いレベルのTHBS1およびPGFとが、前記心臓病を発生する可能性の増加と関連し、

-分類器が、患者が前記心臓病を発生する可能性が増加しているかを指示する方法も提供される。

【0063】

トロンボスポンジン-1(THBS1)および/または胎盤増殖因子(PGF)のレベルは、好ましくは、低い血漿レベルである。

【0064】

好ましくない予後は、好ましくは、患者が上記の心臓病に罹患する可能性が増加していることである。

【0065】

本発明は、上記のステップを含む、心筋梗塞患者が心臓病を発生する可能性を決定する方法も提供する。

【0066】

別の態様によると、本発明は、心臓病を発生する危険性が低減している心筋梗塞患者を同定する方法であって、

-梗塞後に、患者からの体液試料を、血管内皮増殖因子B(VEGFB)、トロンボスポンジン-1(THBS1)および/または胎盤増殖因子(PGF)のレベルについてアッセイするステップと、

-VEGFB、THBS1および/またはPGFのレベルを、既知の臨床成績を有する参照試料からのVEGFB、THBS1および/またはPGFの対応するレベルと比較するステップと、

-前記比較に基づいて、患者の危険性が低減しているかを決定するステップとを含む方法を提供する。

【0067】

別の態様によると、本発明は、心臓病を発生する危険性が低減している心筋梗塞患者を同定する方法であって、

-梗塞後に、患者からの体液試料を、血管内皮増殖因子B(VEGFB)、トロンボスポンジン-1(THBS1)および/または胎盤増殖因子(PGF)のレベルについてアッセイするステップと、

-VEGFB、THBS1および/またはPGFのレベルを、対照からのVEGFB、THBS1および/またはPGF

10

20

30

40

50

の対応するレベルと比較するステップと、

-前記比較に基づいて、患者の危険性が低減しているかを決定するステップとを含む方法を提供する。

【0068】

この方法は、VEGFB、THBS1および/またはPGFのレベルを、参照におけるVEGFB、THBS1および/またはPGFの対応するレベルと比較するステップを含むように変更してよく、ここで、以下の少なくとも1つが、上記の心臓病に罹患する上記の患者の可能性の減少を示す：

- アッセイした患者試料における、VEGFB対照レベルと比較してより高いレベルのVEGFB；
- アッセイした患者試料における、THBS1対照レベルと比較してより低いレベルのTHBS1；および/または
- アッセイした患者試料における、PGF対照レベルと比較してより低いレベルのPGF。

10

【0069】

この方法は、
-予め構築された統計プログラム(「分類器」ともよばれる)に、VEGFB、THBS1およびPGFのレベルを問い合わせるステップ
を含むように変更してよく、ここで、
-高いレベルのVEGFBと低いレベルのTHBS1およびPGFとが、前記心臓病を発生する可能性の減少と関連し、
-分類器が、患者が前記心臓病を発生する可能性が減少しているかを指示する。

【0070】

本発明は、それぞれの患者が心臓病を発生することを有し得る危険性を評価するための患者について、心筋梗塞患者をスクリーニングする方法も提供する。これは、危険性の増加または低減であってよい。

20

【0071】

本発明の方法は、1または複数のバイオマーカーの測定を、MI後のよりよい臨床成績を相関させる。最も好ましくは、バイオマーカーはVEGFBであり、そのレベルがMI後の第1日に高い場合、この患者は、MI後のより好ましい臨床成績を有する。最も好ましくは、バイオマーカーはTHBS1であり、そのレベルがMI後の第1日に低い場合、この患者は、MI後のより好ましい臨床成績を有する。最も好ましくは、バイオマーカーはPGFであり、そのレベルがMI後の第1日に低い場合、この患者は、MI後のより好ましい臨床成績を有する。

30

【0072】

本発明の方法は、それらのレベルに依存してMI後のよりよい臨床成績を示し得る複数のバイオマーカーの組み合わせ評価を相関させることにより、MIの患者の予後を確立するために有用であることが認識される。

【0073】

本発明は、個別化医療の環境において用いてもよい。本発明のさらなる態様において、心臓病を発生する危険性がある患者を同定することに基づいて、MIの後の患者の治療ストラテジーを設定するかまたは改善する方法が提供される。これは、VEGFB、THBS1および/もしくはPGFの血液細胞mRNAレベルまたは血漿タンパク質レベルの分析によることができる。

40

【0074】

本発明において用いるための診断キットは、THBS1およびPGFについて、R&D Systems, Inc. から入手可能なもののように容易に入手可能である。しかし、VEGFBについて、以下に述べるように、我々独自の診断キットを構築する必要があった。実際に、唯一の商業的に入手可能なVEGFBキット(USCNLIFEから、VEGFB E0144h)は、低いVEGFB血漿レベルを検出するのに十分な感度を有していなかった。検出方法として増感化学発光を、そしてビオチン-ストレプトアビジンを用いる増幅ステップを用いて、我々のキットの検出限界は10pg/mLであったが、古典的な比色検出を用いるUSCNLIFEキットのものは、100pg/mL付近であることがわかった。

【0075】

50

よって、本発明は、試料中のVEGFBレベルをアッセイする方法であって、
 (a) 試料を、支持体に固定化された少なくとも1つの捕捉試薬と接触させて、固定化捕捉試薬-試料複合体を形成するステップと、
 (b) 試料を、少なくとも1つの固定化捕捉試薬から分離するステップと、
 (c) 固定化捕捉試薬-試料複合体を、VEGFBに特異的な二次抗体と接触させ、所望により、二次抗体を、二次抗体に特異的な三次抗体と接触させるステップと、
 (d) 二次抗体または三次抗体を、検出手段と複合したストレプトアビジンのような結合分子と接触させるステップと、
 (e) 捕捉試薬と結合した二次抗体または三次抗体のレベルを、検出手段を用いて測定するステップと
 を含む方法も提供する。

10

【0076】

好ましくは、捕捉試薬は、抗体、最も好ましくは、ヒトVEGFBに対するマウスモノクローナル抗体クローン58013と同じエピトープを認識するものであり、該モノクローナル抗体は、好ましくは、VEGFB167および/またはVEGFB186と特異的に結合する。

【0077】

好ましくは、二次抗体は、VEGFB167および/またはVEGFB186と特異的に結合するヤギポリクローナル抗体と同じエピトープを認識する抗体である。好ましくは、三次抗体は、二次抗体に特異的なビオチン複合抗体、例えばロバ抗ヤギAbである。好ましくは、検出手段は、アルカリホスファターゼ活性を含む。

20

【0078】

好ましい実施形態において、よって、本発明は、試料中のVEGFBレベルをアッセイする方法であって、
 (a) 試料を、固体支持体に固定化された少なくとも1つの捕捉試薬と接触させ、所望によりインキュベートして、固定化捕捉試薬-VEGFB複合体を形成するステップであって、捕捉試薬が、ヒトVEGFBに対するマウスモノクローナル抗体クローン58013と同じエピトープを認識する抗体であり、前記モノクローナル抗体が、VEGFB167およびVEGFB186と特異的に結合するステップと、
 (b) 試料を、固定化捕捉試薬から分離するステップと、
 (c) 固定化捕捉試薬-VEGFB複合体を、二次抗体と接触させるステップであって、二次抗体が、VEGFB167および/またはVEGFB186と特異的に結合するヤギポリクローナル抗体と同じエピトープを認識する抗体であるステップと、
 (d) 二次抗体を三次抗体と接触させるステップであって、三次抗体が、二次抗体に特異的なビオチン複合ロバ抗ヤギ抗体であるステップと、
 (e) 三次抗体を、アルカリホスファターゼと複合したストレプトアビジンと接触させるステップと、
 (f) 捕捉試薬と結合したVEGFB186またはVEGFB167のレベルを、検出可能な抗体についての検出手段を用いて測定するステップと
 を含む方法を提供する。

30

【0079】

さらに、我々は、生体液中のVEGFB186およびVEGFB167のレベルを測定するためのELISAキットと、MI後にHFを発生する危険性がある患者を同定するための診断ツールとしてのその使用とを提供する。

40

【0080】

キットは、好ましくは；
 (a) 支持体に固定化された少なくとも1つの捕捉試薬と、
 (b) VEGFB186および/またはVEGFB167に特異的な二次抗体と、
 (c) 所望により、二次抗体に特異的な三次抗体と、
 (d) 検出手段と複合したストレプトアビジンのような結合分子と、
 (e) 捕捉試薬と結合した二次抗体または三次抗体のレベルを、検出手段を用いて測定する

50

ための手段と
を含む。

【0081】

上記のように、好ましくは、捕捉試薬は抗体、最も好ましくは、ヒトVEGFBに対するマウスモノクローナル抗体クローン58013と同じエピトープを認識するものであり、該モノクローナル抗体は、好ましくは、VEGFB167および/またはVEGFB186と特異的に結合する。好ましくは、二次抗体は、VEGFB167および/またはVEGFB186と特異的に結合するヤギポリクローナル抗体と同じエピトープを認識する抗体である。好ましくは、三次抗体は、二次抗体に特異的なビオチン複合抗体、例えばロバ抗ヤギAbである。好ましくは、検出手段は、アルカリホスファターゼ活性を含む。

10

【0082】

上記の生物学的試料は、好ましくは、ヒト対象から単離されてよく、血漿または血清であってよい。固定化された捕捉試薬が、マイクロタイタープレート上に被覆されていることも好ましい。好ましくは、検出は、化学発光試薬により増幅される。精製ヒトVEGFB167を、抗原標準物質として供給してよい。

【0083】

我々は、我々のVEGFBキットを、我々が見出した唯一の商業的に入手可能なVEGFBキット(USCNLIFE VEGFB E0144h)と比較した。我々のキットはより感度が高く、よって、USCNLIFEキットよりもより多くの患者のVEGFBを測定することを可能にする。

【0084】

さらなる態様によると、本発明は、心臓病を発生する危険性が減少している心筋梗塞患者を同定する方法であって、

-梗塞後に、患者からの体液試料を、血管内皮増殖因子B(VEGFB)、トロンボスポンジン-1(THBS1)および/または胎盤増殖因子(PGF)のレベルについてアッセイするステップと、

-予め構築された統計プログラム(「分類器」ともよばれる)に、VEGFB、THBS1およびPGFのレベルを問い合わせるステップと

を含み、

-高いレベルのVEGFBと低いレベルのTHBS1およびPGFとが、前記心臓病を発生する可能性の減少と関連し、

-分類器が、患者が前記心臓病を発生する可能性が減少しているかを指示する方法を提供する。

20

30

【0085】

我々は、20を超える臨床パラメータと、4ヶ月および1年のフォローアップとを有する急性MI患者の大きいデータベースを有する。臨床パラメータの中でも、心臓が末梢動脈へ血液を供給する能力を表す心臓の駆出率(EF)を、梗塞の日と4ヶ月後と1年後とに心エコー検査により測定した。4ヶ月で40%のEFを有する患者はリモデリングに罹患するが、4ヶ月で>40%のEFを有する患者は正常に回復すると想定される。我々の実験室で行ったいくつかのプロトコルは、データベースを用いて、異なるアプローチでMI後のHFの出現の初期バイオマーカーを同定した。2つの基本的に異なるアプローチにより同定されたバイオマーカーを組み合わせ、最も予測が正確なバイオマーカーの組み合わせを、「予後セット」と規定した。

40

【0086】

最初のアプローチは、DNAマイクロアレイ技術を含んだ。循環血液細胞のバイオシグネチャーまたは遺伝子発現プロファイルを、MIの日に採集した血液試料から分析した。この技術により、極端な表現型を有する患者の2群、すなわちMI後の好ましい臨床成績を有する患者の1群(高EF群、EF>40%)と、MI後の好ましくない成績を有する1群(低EF群、EF<40%)の間で異なって調節される遺伝子の同定が可能になった。我々は、高EF群および低EF群のそれぞれから16名の32名の患者からの血液細胞のバイオシグネチャーを特徴決定した。SAMアルゴリズム(マイクロアレイの統計解析)および1.3の倍数変化を用いて、525個の遺伝子が、患者の2群の間で異なって発現されることがわかった(24.5%の過誤発見率(False

50

Discovery Rate))。これらの遺伝子のうち、9つがHFについて著しい予後因子としての価値を有した。

【0087】

2つ目のアプローチは、ヒトMIにおける血管新生のタンパク質間相互作用ネットワークのバイオインフォーマティクスによる特徴決定に基づいた。実際に、血管新生は、MI後に心臓で生じる有益な治癒プロセスの1つであり、血管新生における欠陥はHFを導き得る。ネットワークは、ヒトタンパク質参照データベースからのアノテートされたタンパク質間相互作用を用いて構築した。このネットワーク全体は、556のノード(すなわちタンパク質)および686のエッジ(すなわち相互作用)からなった。後続のネットワークに基づく解析および遺伝子発現解析の後に、38のネットワーク由来遺伝子が、著しい予後因子としての価値を示した。興味深いことに、遺伝子発現に基づく分類モデルをネットワークに基づく分類モデルと組み合わせると、それぞれのアプローチを別々に考慮するよりも大きく改善された予後因子としての価値を有する、低減された数の候補バイオマーカーが得られる。バイオマーカーの予後能力を示す曲線下面積(AUC)は、遺伝子発現に基づく分類モデルについて0.56~0.72であり、ネットワークに基づく分類モデルについて0.56~0.73であった。2つのモデルを組み合わせた場合に、0.82のAUCを有する3バイオマーカーのセット(すなわち、HFの出現についての強い予後因子としての価値を有する)が構築された。このセットを、ここでは「予後セット」と称する。これらの3つのバイオマーカーは、トロンボスポンジン-1(THBS1)、胎盤増殖因子(PGFまたはPIGF)および血管内皮増殖因子B(VEGFB)であった。THBS1が血管新生抑制特性を有するのに対して、VEGFBおよびPGFは、それらの血管新生促進能力のおかげで、血管内皮細胞の成長および増殖を刺激する。

10

20

【0088】

次いで、我々は、マイクロアレイによりmRNAレベルで観察された遺伝子発現の差が、タンパク質レベルで有効であることを確認した。この目的のために、3つのバイオマーカーの血漿レベルを、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)により測定した。これらの実験により、THBS1およびPGFのタンパク質レベルが、高EFと低EFの患者間で著しく区別可能であることが証明された。

【0089】

商業的に入手可能なVEGFB ELISAキットは我々の血漿試料中のVEGFBを検出するのに十分な感度がないことがわかったので、我々は、ヒト血漿のような生体液中のVEGFBの定量を可能にする我々独自のキットを設計した。

30

【0090】

「好ましい成績」により、これが、心不全のような心臓病を発生するようになり、かつ/または左室リモデリングに罹患するようになる患者の危険性がより低いことを意味すると理解される。左室リモデリングは適切でないと考えられているので、これは好ましくない。

【0091】

「好ましくない成績」により、これが、心不全のような心臓病を発生するようになり、かつ/または左室リモデリングに罹患するようになる患者の危険性がより高いことを意味すると理解される。

40

【0092】

心不全の危険性と左室リモデリングの危険性とは関連するが、これらは別々の病気であり、よって、患者は一方に罹患し得るが、他方には罹患し得ないことも理解される。よって、心不全または心室リモデリングのいずれかの危険性が増加することは好ましくない。

【0093】

配列表に示すRNA配列は、NCBIウェブサイトでこのように示されているので、チミン(T)を含むことが認識される。それぞれの場合において、Tをウラシル(U)で置き換えることが意図されることが明らかである。

【図面の簡単な説明】

【0094】

50

【図1】SAMアルゴリズムを用いて解釈されたマイクロアレイデータの図である。

【図2】ヒトMIにおける血管新生のタンパク質間相互作用ネットワークを示す。

【図3】遺伝子発現に基づく分類モデルとネットワークに基づく分類モデルとの組み合わせ解析に用いたストラテジーを示す。

【図4】高い(H)駆出率および低い(L)駆出率の患者間でのバイオマーカーの発現(マイクロアレイ)における差を示すヒートマップを示す。

【図5】駆出率とマイクロアレイおよびELISAにより評価したバイオマーカーの発現との間の関係を示す分位点-分位点プロットを示す。

【図6】駆出率とマイクロアレイおよびELISAにより評価したバイオマーカーの発現との間の関係を示す散布図を示す。

【図7】梗塞の日(第0日)とその後の日(第1日)との間のVEGFB血漿レベルの発展を示す。血漿VEGFBは、低EFの患者において第0日と第1日との間で減少する(-10%)が、高EFの患者はVEGFBレベルが増加する(+15.4%)。

【図8】A . 高EF患者および低EF患者についての定量PCRおよびマイクロアレイを用いるVEGFBの発現の値を示す。B . VEGFB発現と駆出率との間に観察された著しい相関を示す。

【図9】MI後の第0日、第1日および第2日での高EF群と低EF群との間のVEGFBレベルを示す。

【発明を実施するための形態】

【0095】

Table1(表1)は、VEGFB、THBS1およびPGFのmRNAレベルに基づく分類モデルの予測性能のまとめである。

【0096】

Table2(表2)は、本発明の根底にある実験において到達した結論のまとめである。

【0097】

Table3(表3)は、高EFの患者と低EFの患者との間のVEGFB、THBS1およびPGFのレベルを比較するために行った統計のまとめである。

【0098】

Table4(表4)は、2群における3つのバイオマーカーのmRNAレベル同士の比較の統計のまとめである。

【0099】

Table5(表5)は、NT-プロBNPの予測性能のまとめである。

【0100】

Table6(表6)は、高EF群と低EF群とで異なって発現された28個の血管新生遺伝子のリストである。

【0101】

Table7(表7)は、2つの機械学習モデルを用いる予測性能を示す。

【0102】

心不全(HF)は、心筋梗塞(MI)の主要な合併症である。最近のデータは、63%の患者がMIの後6年の間にHFを発生することを示す。血管新生は、MI後の心筋の修復に関与する重要な現象である。血管新生は、いくつかは血管新生促進性であり、その他のものは血管新生抑制性である多数の血管新生因子により支配されるバランスによりしっかりと調節されている。このバランスの調節解除は、不適切な血管新生をもたらすことができ、MIエピソード後のHFの発生のための舞台を設定できる。

【0103】

最近の報告は、MI後にHFに罹患する傾向にある患者の初期の同定が、個別の患者に対する治療ストラテジーの適応を著しく改善し得ることを明確に示している(「個別化医療」)。その他の多くの心血管疾患と同様に、HFは多因子疾患である。よって、MI後のHFの出現を予測するために単独バイオマーカーを用いることの価値は限定される。予後バイオマーカーの多重化が、よって、HFを精細に予測するために興味の対象であり得る。

【0104】

10

20

30

40

50

まず、我々は、予後バイオマーカーのセットを、循環血液細胞のバイオシグネチャーの解析により同定できると仮定した。次に、我々は、タンパク質間相互作用ネットワークに基づくアプローチも、HFの予後バイオマーカーを強調する潜在能力を有すると仮定した。そして第三に、我々は、これらの2つの独立したアプローチにより得られるデータの組み合わせが、それぞれのアプローチを別々に行うよりもより高いレベルの予後を達成することを可能にするかを試験した。

【0105】

この目的のために、我々は、MI後の好ましい成績を有する患者の1群(駆出率(EF)>40%)と、好ましくない成績を有する1群(EF 40%)との、MIの患者の2群(群あたりn=16)を選択した。「極端な表現型」を選択するこの戦略は、大きい標本サイズを必要とすることなく2群の間で異なって発現される遺伝子を見出す機会を増加させるために選択した。RNAを、これらの患者の末梢血から単離した全細胞から抽出した。バイオシグネチャーを、マイクロアレイプロファイリングにより決定した。いくつかの標準化、フィルタリングおよび統計的手順の後に、525遺伝子のセットが、患者の2群の間で異なって発現されることがわかった(倍数変化1.3;過誤発見率24.5%)。これらのうち、中程度の予後因子としての価値を有する47遺伝子のクラスタを、0.72の最大AUCを有する分類モデルにより同定した。これらの遺伝子のさらなるフィルタリングにより、同等の予後因子としての価値(AUC 0.68)を有する9遺伝子のクラスタがもたらされた。

【0106】

マイクロアレイ実験によりもたらされた遺伝子により可能になる予測の強度を増加させる試みにおいて、そしてMI後の心臓の修復における血管新生の重要性を考慮して、ヒトMIにおける血管新生のタンパク質間相互作用ネットワークを引きだした。このネットワークは、このプロセスに参与することが知られている遺伝子を抽出し、公共データベースからの(キュレーションされた)タンパク質間相互作用に対応させることにより組み立てた。このネットワークのクラスタ解析により、細胞成長および成長調節と著しく関連するモジュールが報告された。このクラスタ内で、38遺伝子が、EFクラス間で著しく異なって発現されることがわかった。これらの38遺伝子で構築した異なる独立した分類器により、マイクロアレイから得られたものと同程度で中程度の予後因子としての価値が報告された(最大AUC=0.73)。興味深いことに、これらの遺伝子をさらにフィルタリングすると(相関に基づく特徴選択)、より強い予後因子としての価値を有する3遺伝子のセットが得られた(事例に基づく学習機を用いてAUC=0.82、Table1(表1))。これらの3遺伝子、すなわちVEGFB、THBS1およびPGFを、ここでは、HFのバイオマーカーの新しい「予後セット」とみなす。これらの3つの遺伝子の発現差異を定量PCRにより確認した。さらに、3つのバイオマーカーの血漿レベルを測定した。

【0107】

ある研究結果において、我々は、血管内皮増殖因子B(VEGFB)の高いmRNAまたは血漿タンパク質のレベルとトロンボスポンジン-1(THBS1)および胎盤増殖因子(PGFまたはPIGF)の低い血漿レベルとを特徴とする、MIに対して著しい応答を開始する患者が、HFを発生し、かつ/または心室リモデリングを受ける易罹患性が低いことを示した。これらの3つのバイオマーカーの血漿レベルの測定は、よって、MI後のHFおよび/または心室リモデリングの出現を予測するための有用なツールとして貢献できる。

【0108】

10

20

30

40

【表1】

Table1. 3つのバイオマーカーの mRNA レベルに基づく分類モデルの予測性能

入力タイプ	分類モデル	標準精度* (%)	AUC*
SAMに基づくバイオマーカーのみ	K*	65	0.63
ネットワークに基づくバイオマーカー	K*	84	0.82
SAMに基づくバイオマーカーのみ	SVM	68	0.68
ネットワークに基づくバイオマーカー	SVM	75	0.75

* 1点除外交差確認に基づく。

用いた潜在的バイオマーカー: SAM 由来(9 遺伝子)およびネットワークに基づく(3 遺伝子)
。AUC:(ROC)曲線下面積;SVM:サポートベクターマシン。

10

【0109】

よって、我々は、3つのバイオマーカー、すなわちVEGFB、THBS1およびPGFのクラスタの測定に基づく、MI後にHFを発生する危険性がある患者を同定するための新しいストラテジーを提案する。これらの測定は、血液細胞から抽出したRNAまたは対応するタンパク質の血漿レベルから行うことができる。

【0110】

Table2(表2)は、本発明の背景にある具体的な研究結果をまとめる。

20

【0111】

【表2】

Table2. 3つのバイオマーカーの mRNA および血漿レベルと EF との関連。

	高 EF(好ましい成績)		低 EF(好ましくない成績)	
	mRNA	血漿	mRNA	血漿
VEGFB	高い	高い	低い	低い
THBSI	低い	低い	高い	高い
PGF	低い	低い	高い	高い

mRNA レベルは、MI の日に採集した血液試料においてマイクロアレイにより測定する。

血漿レベルは、MI の 1 日後に ELISA により測定する。

本明細書において引用する全ての参考文献は、本発明と矛盾しない範囲でその全体が本明細書に組み込まれる。

30

【0112】

本発明を、ここで、非限定的な実施例を伴って、さらに詳細に説明する。

【0113】

(実施例)

(実施例1)

患者および方法

患者

急性MIの患者を、最初の経皮的冠動脈形成で処置した。急性MIは、著しいST部分上昇および心筋酵素陽性を伴う<12時間の胸痛の存在により規定した。血液試料を、機械的再灌流のとき(マイクロアレイおよび定量PCR分析のため)およびMIの後の日(血漿レベル決定のため)に得た。全ての患者は、インフォームドコンセントに署名した。

40

【0114】

マイクロアレイ

心室リモデリングの関係における適切なバイオマーカーを検出する我々の機会を増やすために、我々は、MI後の「極端な」表現型を有する患者の2群、すなわち梗塞後に好まし

50

く発展した患者(EF 45%、平均61%)および好ましくなく発展した患者(EF 40%、平均33%)を選択した。各群は、16名の患者を含んでいた。

【0115】

トータルRNAを、全血細胞からPAXgene(商標)技術により抽出した。PAXgene(商標)血液RNAチューブ(PreAnalytix(登録商標)、BD Europe、Erembodegem、Belgium)に採集した血液を、-20℃にてRNA抽出まで保存した。抽出は、PAXgene(商標)血液RNAキット(Qiagen、Courtaboeuf、France)を製造者の使用説明に従って用いて行った。RNAの量は、ND-1000分光光度計(NanoDrop(登録商標) Technologies、Wilmington、USA)を用いて測定した。RNAの質は、2100 Bioanalyzer(登録商標)装置(Agilent Technologies、Massy、France)をRNA 6000ナノチップとともに用いて評価した。高品質のRNA($OD_{260}/OD_{280}>1.9$ および $OD_{260}/OD_{230}>1.7$)および未分解のRNAのみを、さらなる分析のために考慮した。

10

【0116】

11の株化細胞からのRNA混合物である共通参照RNA(Universal Human Reference RNA、Stratagene Europe、Amsterdam、The Netherlands)を患者のRNAとともに、以下の全てのステップにおいて、アレイ同士の相対的遺伝子発現レベルの比較のための内部参照標準物質を提供するために用いた。

【0117】

メッセンジャーRNAを、Amino Allyl MessageAmp(商標)キット(Ambion(登録商標)、Cambridgeshire、United Kingdom)を製造者のプロトコルに従って用いて、1µgのトータルRNAから開始して増幅した。5µgの各アミノアリルaRNAをCy3またはCy5(Amersham、Buckinghamshire、United Kingdom)を用いて標識した。アミノアリルaRNAとカップリングする色素を、ND-1000 NanoDrop(登録商標)分光光度計を用いて測定した。>5%の色素カップリング量を、さらなる分析のための必要条件とした。750ngの各アミノアリルaRNA標識Cy3またはCy5(参照RNAまたはドナーRNA)を組み合わせ、25,000遺伝子を含む全ゲノムオリゴヌクレオチドマイクロアレイ(Genomic Platform、Illkirch、France)にハイブリッド形成させた。患者あたりに4つのマイクロアレイをハイブリッド形成させ、色素交換を行った(2つのマイクロアレイで患者-Cy3/参照-Cy5および2つのマイクロアレイで患者-Cy5/参照-Cy3)。ハイブリッド形成ステップは、Agilent Technologiesシステムを用いて行った。簡単に、RNAを、断片化緩衝液を用いて断片化した後に、ハイブリッド形成緩衝液と混合した。マイクロアレイを、50mMホウ酸塩緩衝液pH=9.0中の50mMエタノールアミンを用いてブロックした。Agilentのハイブリッド形成チャンバおよび回転オープンを、60℃にて17時間、4rpmでのハイブリッド形成のために用いた。マイクロアレイを、6×SSC、0.005%Triton X-102中で10分間、0.1×SSC、0.005%Triton X-102中で5分間洗浄し、次いで、遠心分離により乾燥させた後に、Axon 4000BマイクロアレイスキャナおよびGenePix Pro 6(登録商標)ソフトウェア(Molecular Devices、Berks、UK)を用いてスキャンした。自己フォトマルチプライケータ(photomultiplier)増加調整および0.1%飽和スポットを、スキャン中に可能にした。

20

30

【0118】

それぞれの患者についての4つ全てのマイクロアレイのスポット認定および未処理データ定量は、MAIA(登録商標)フリーウェア(Institut Curie、France)を用いるバッチ解析で行った。このソフトウェアは、それぞれのスポットに、4つのマイクロアレイの中で「良好な質的スポット」の決定を可能にする9つの質的パラメータを割り当てる。良好スポットのみをさらなる解析のために維持する。Lowess非線形正規化ステップを、Acuity(登録商標)ソフトウェア(Molecular Devices)を用いて行って、一様でないCy3-Cy5分布を補った。Cy3/Cy5の正規化対数比を、後続のステップで用いた。フィルタリングステップを次いで行って、4つのうちの少なくとも3つのマイクロアレイに存在しなかった遺伝子を除いた。患者あたり4つのマイクロアレイのそれぞれにおける質および再現性を、ANOVA、相関係数およびAcuity(登録商標)ソフトウェアを用いて描いた自己組織化マップを用いて評価した。データは、ウェブベースのマイクロアレイデータマネージャーであるMEDIANTEに保存する。

40

50

【0119】

統計解析の前に、患者の少なくとも50%に存在しない遺伝子をフィルタリングして除去した。教師付き解析を、2つの相補的なアプローチを用いて行った。最初のアプローチは、遺伝子発現を、EF値のような外的変数と関連させるマイクロアレイの有意性解析(SAM)ソフトウェアを含んでいた。2クラスに対応のないアッセイを用いた。遺伝子欠落値の補完は、10の近傍を用いるK最近傍アルゴリズムにより行った。

【0120】

タンパク質間相互作用ネットワーク

心筋梗塞において血管新生と関連することが知られているコア遺伝子のセットを、Entrez遺伝子データベースから「ヒト(human)AND心臓(heart)AND血管新生(angiogenesis)AND心筋(myocardial)AND梗塞(infarction)」のクエリで検索した。これらのコア遺伝子と関連するアノテートされたタンパク質間相互作用をヒトタンパク質参照データベース(HPRD)から検索した。

10

【0121】

ネットワーククラスタ解析を実行して、潜在的な機能的ネットワークモジュールを同定した。クラスタを、(Cytoscapeプラグイン)MCODEネットワーククラスタリングアルゴリズムにより同定した。

【0122】

THBS1、PGFおよびNT-プロBNPについての生化学的アッセイ

THBS1およびPGFの血漿レベルを、46名の患者からの試料中で、Quantikine DTSP10およびDPG00キット(R&D Systems, Oxon, UK)をそれぞれ用いるELISAにより測定した。アッセイの検出限界は、THBS1について0.35ng/mL、およびPGFについて7p/mLであった。プロBNP(N末端-プロBNP、NT-プロBNP)の血漿レベルは、Elecys 2010免疫学的デバイス(Roche Diagnostics, Meylan, France)を用いて測定した。アッセイの検出限界は、20pg/mLであった。

20

【0123】

VEGFB診断キットの設定

サンドイッチELISAを開発して、VEGFB167およびVEGF-B186を検出した。マイクロタイタープレート(Lumitrac 600, Greiner, Belgium)を、100 μ lのマウス抗VEGF-Bモノクローナル抗体(PBS中に2 μ g/ml、MAB751, R&D systems, UK)で4 にて一晚被覆する。3回の洗浄の後に、プレートを1時間、300 μ lの5% BSA-PBSで500rpmおよび室温にてブロックする。標準曲線を、2000pg/ml ~ 15.6pg/mLまで、1% BSA-PBS中のヒトVEGFB167(751-VE, R&D Systems)を用いて作製する。ブロッキングの後に、プレートを3回洗浄し、100 μ lの血漿、ブランクまたは標準物質と2時間、500rpmおよび室温にてインキュベートする。3回の洗浄の後に、100 μ lのヤギポリクローナルVEGF-B抗体(1% BSA-PBS中に400ng/ml、AF751, R&D Systems)を各ウェルに加え、プレートを1時間、500rpmおよび室温にてインキュベートする。3回の洗浄の後に、100 μ lのビオチン複合ロバ抗ヤギ抗体(1% BSA-PBS中に1:27500、705-065-147, Jackson, USA)を各ウェルに加え、プレートを1時間、500rpmおよび室温にてインキュベートする。3回の洗浄の後に、100 μ lのアルカリホスファターゼ複合ストレプトアビジン(1% BSA-PBS中に2 μ g/ml、016-050-084, Jackson)を各ウェルに加え、プレートを1時間、500rpmおよび室温にてインキュベートする。プレートを、Tween 20を加えたTris緩衝食塩水(pH7.5)で4回洗浄した後に、ウェルあたり100 μ lのLumiphos 530(商標)(Lumigen, USA)と30分間、500rpm、室温にて光から保護してインキュベートする。化学発光を、Polarstar Optima(BMG Labtech, Paris, France)を用いて検出する。

30

40

【0124】

統計解析

入力各セットについて、異なる標準的統計機械学習分類器、例えばマイクロアレイの予測解析(PAM)、サポートベクターマシン(SVM)およびK*法を評価した。K*は、学習データセット中の最も関連する(または最近傍)の近傍により提供されるクラス情報に基づいて新しい標本を分類する事例に基づくモデルである。K*は、エントロピーに基づく距離測度を

50

用いて、近傍セットを推定する。モデルは、グローバルブレンド=20および欠落値を推定するための平均カラムエントロピー曲線を用いて実行した。

【0125】

ネットワークに基づく遺伝子データに対して、「最良優先探索」(BF)戦略を用いる、相関に基づく特徴選択(CFS)アルゴリズムを用いてさらなるフィルタリングを行った(図3)。CFSは、遺伝子-クラス相関を最大限にしながら遺伝子間相関を最小限にする特徴のサブセット(すなわち遺伝子)を見出すフィルタ特徴選択法である。フィルタ特徴選択法は、いずれの分類モデルからも独立して行われる。BF戦略は、サブセットバックトラックで強化したグリーディヒルクライミング(greedy hill-climbing)に基づいた。

【0126】

分類評価の結果を、1点除外交差確認(L00)戦略および10分割交差確認を用いて推定した。交差確認したROC(受信者動作特性曲線)の推定曲線下面積(AUC)を用いて、分類器の推定された分類性能をまとめた。

【0127】

EF群間の統計学的な差(バイオマーカーのそれぞれに基づく)を、スチューデントのt検定により実行し、ノンパラメトリック検定を用いて裏付けた。これらのバイオマーカーとEF値との相関は、標準的なピアソン係数を用いて推定した(Table2(表2))。

【0128】

ソフトウェア

機械学習モデルの実行および統計評価は、Weka(v.3.4)データマイニングプラットフォームを用いて行った。階層的クラスタリングは、算術平均および相関係数を用いる非加重対グループ法を用いて実行した。クラスタリングの視覚化は、GEPASを用いて行った。統計的有意差検定、ピアソンの相関値およびグラフへのプロットを、Statisticaパッケージ(v.6.0)を用いて作製した。

【0129】

結果

1.525遺伝子が、低EF群と高EF群との間で異なって発現されることを示すマイクロアレイの統計解析(SAM)プロット(図1)。1.3倍の倍数変化についての閾値を選択し、24.5%のFDRを得た。赤い点は、低EF群で上方制御される遺伝子を表し、緑は高EF群で上方制御される遺伝子を、黒い点は2つの群の間で倍数変化が<1.3である遺伝子を表す。

【0130】

2.ヒトMIにおける血管新生のタンパク質間相互作用ネットワーク(図2)。得られたネットワークは、556のノード(タンパク質)および686のエッジ(相互作用)からなった。ネットワークのクラスタ解析は、細胞成長および成長調節と関連する(遺伝子オントロジー)生物学的プロセスが高度に著しく過剰出現するネットワークのクラスタ(53タンパク質)の存在を一貫して強調した。

【0131】

3.図3は、遺伝子発現に基づく分類モデルとネットワークに基づく分類モデルとの組み合わせ解析が、遺伝子発現に基づく分類モデル単独(0.56<AUC<0.72)またはネットワークに基づく分類モデル単独(0.56<AUC<0.73)よりも高い予後因子としての価値(最大AUC=0.82)を有する3遺伝子の同定を可能にしたことを示す。現在までに得られた最高の予後性能(これら3遺伝子に基づく)が、事例に基づく学習モデルK*を用いて得られている。

【0132】

4.ヒートマップは、高い(H)駆出率および低い(L)駆出率の患者の間でのバイオマーカーの発現の差(マイクロアレイにより得られた)を示す(図4)。色(赤、ピンク、薄い青、濃い青)は、発現値の範囲を示す(高い、中程度、低い、最低)。白色は、検出不可能な値を示す。VEGFBは、高EFの患者の群において明らかにより多く発現され、THBS1およびPGFは、低EF群においてより多く発現される。

【0133】

5. 駆出率とマイクロアレイおよびELISAにより評価したバイオマーカーの発現との間の統

10

20

30

40

50

計的依存性を示す分位点-分位点プロット(図5)および散布図(図6)。ここに示される線形の関係は、これらの変数が類似のデータ分布に従うことを示唆する。スチューデントのt検定からの結果およびこれらのプロットに対応する線形相関係数を、Table3(表3)にまとめる。VEGFBはEFと正に相関するが、THBS1およびPGFはEFと負に相関する。THBS1およびPGFについてマイクロアレイとELISAとで調和した結果が得られる。VEGFB mRNAレベルは、マイクロアレイ技術により、低EF患者において低EF患者よりも著しくより高いことがわかった。

【 0 1 3 4 】

【表 3】

Table3

遺伝子	マイクロアレイ	血漿タンパク質
THBS1	t=2.4, p=0.02 r=-0.3, p=0.2	t=2.1, p=0.04 r=-0.2, p=0.1
PGF	t=2.8, p=0.01 r=-0.2, p=0.2	t=2.2, p=0.04 r=-0.2, p=0.2
VEGFB	t=3.1, p=0.004 r=0.3, p=0.05	t=-1.3, p=0.20 r=0.2, p=0.3

t: t 統計値

r: 線形相関係数

MI の日に採集した血液試料においてマイクロアレイにより測定した mRNA レベルと MI の1日後に ELISA により測定した血漿レベルとに対して行った統計。

【 0 1 3 5 】

6. 低EF患者と比較して高EF患者においてより高いレベルのVEGFB mRNAならびにより低いレベルのTHBS1およびPGF mRNAを示す、HF患者の2群における3つのバイオマーカーのmRNAレベルの記述統計(Table4(表4))。この表には、図5および6から決定される高EF(>40%)または低EF(<40%)のいずれかと関連するmRNAレベルの理論的閾値も示す。例えば、この研究において用いたHF患者の集団において、-1.4より高いVEGFB mRNAのレベルと、0より低いTHBS1 mRNAのレベルと、-0.1より低いPGF mRNAのレベルとを有する患者は、高いEFを有する傾向がより高かった。逆に、-1.4より低いVEGFB mRNAのレベルと、0より高いTHBS1 mRNAのレベルと、-0.1より高いPGF mRNAのレベルとを有する患者は、低EFを有する傾向がより高かった。言い換えると、バイオマーカーのレベルを、参照試料を、種々の臨床成績に対して校正した後にその参照試料と比較した。それぞれのバイオマーカー単独または2つのバイオマーカーの組み合わせよりもむしろ、3つのバイオマーカーの組み合わせが、EFとより正確に関連することに言及することが重要である。

【 0 1 3 6 】

10

20

30

【表4】

Table4. 2群における3つのバイオマーカーのmRNAレベルの記述統計。

	高 EF(好ましい成績)		低 EF(好ましくない成績)		T 統計値
	平均±SD (最小/最大)	閾値	平均±SD (最小/最大)	閾値	
VEGFB	-1.05±0.42 (-1.78 / -0.20)	>-1.4	-1.46±0.32 (-2.07 / -1.09)	<-1.4	t=3.1 p=0.004
THBS1	-0.13 ± 0.28 (-0.57 / 0.33)	<0	0.29±0.58 (-0.66 / 1.97)	>0	t=2.4 p=0.02
PGF	-0.19±0.10 (-0.34 / -0.03)	<0.1	-0.07±0.15 (-0.34 / 0.15)	>-0.1	t=2.8 p=0.01

t: t 統計値

p: 有意水準

SD: 標準偏差

【0137】

7.0.75のAUCが得られた分類器を構築するために用いた同じ32名の患者におけるMIの1日後に測定したVEGFB、THBS1およびPGFの血漿レベルを用いた分類器のさらなる試験。これは、分類器の予測性能が、他のタイプの測定をコードする異なるデータセット(例えば血漿レベル)を用いた場合であっても良好であることを示唆する。

【0138】

8.HFの確立された唯一のバイオマーカーはプロBNPであるので、本明細書に開示される3つのバイオマーカーの予後性能を、NT-プロBNPの予後性能と比較した。MIの1日後に測定したNT-プロBNPの血漿レベルの予後性能は、中程度であった(AUC=0.63、Table5(表5))。よって、本明細書に開示される3バイオマーカーのセットは、NT-プロBNPの予後因子としての価値よりも明らかに性能が優れている。

【0139】

【表5】

Table5. NT-プロ BNP の予測性能

入力タイプ	分類モデル	標準精度* (%)	AUC*
NT-プロ BNP	K*	50	0.52
NT-プロ BNP	SVM	63	0.63

* 1点除外交差確認に基づく。

AUC:(ROC)曲線下面積;SVM:サポートベクターマシン。

【0140】

(実施例2)

患者および方法

急性MIの患者を、国のMI登録簿に登録し、最初の経皮的冠動脈形成で処置した。急性MIは、著しいST上昇と、正常の上限の2倍を超えるクレアチンキナーゼおよびトロポニンIの増加を伴う<12時間の胸痛の存在により規定した。血液試料を、機械的再灌流のとき(RNAおよび血漿単離のため)、MIの1日後または2日後(血漿のため)に得た。プロトコルは、地域の倫理委員会により承認され、インフォームドコンセントを全ての対象から得た。

【0141】

290名のMI患者の検証コホートは、University Hospitals of Leicester NHS Trust (UK)で行った前向き研究からであった。心エコー検査を、退院時およびMIの6ヶ月後に行った

10

20

30

40

50

。LV拡張末期容積(LVEDV)は、心尖部二腔像および心尖部四腔像から2平面シンプソン変法を用いて推定した。LVリモデリングの程度を、退院時とフォローアップとの間のLVEDV(EDV)の変化から評価した。

【0142】

マイクロアレイ

全血液細胞のトランスクリプトームプロファイルを、25,000遺伝子を示すオリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いて得た。データは、遺伝子発現オムニバスデータベース(www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)で、受理番号GSE8723のもとで入手可能である。教師付き解析を、マイクロアレイの有意性解析(SAM)ソフトウェアを用いて行った。遺伝子セットにおける遺伝子オントロジー(GO)タームの過剰出現の統計的有意性を、DAVIDデータベースを用いて推定した。ヒートマップを、遺伝子セット強化解析(GSEA)ソフトウェアを用いて描いた。

10

【0143】

VEGFB発現の測定

MIの日に得た血液細胞におけるVEGFB mRNA発現を、定量PCRにより決定した。自家製のサンドイッチELISAを開発して、VEGFBの血漿レベルを測定した。

【0144】

患者分類モデル

サポートベクターマシン(SVM)およびK*コンピュータ分類モデルを評価して、VEGFB発現レベルの予後の有意性を検定した。SVM分類器の学習のためのSMO(逐次最小最適化)アルゴリズムを、以下のパラメータを用いて実行した:複雑度パラメータC=1.0、イプシロン=1.0E-12、多項式カーネルの指数=1.0。モデルは、グローバルブレンド=20および欠落値を推定するための平均カラムエントロピー曲線を用いて実行した。分類評価の結果は、1点除外交差確認(L00)ストラテジーを用いて推定した。受信者動作特性曲線下面積(AUC)を用いて、分類器の推定される分類性能をまとめた。

20

【0145】

統計解析

患者の2群の平均値間の比較を、ガウスデータについて対応のない両側t検定で、非ガウスデータについてマン-ホイットニー検定を用いて行った。カテゴリ変数を、フィッシャーの正確検定を用いて比較した。バイオマーカーのレベルとEFクラスとの相関を、スピアマン検定を用いて推定した。機械学習モデルの実行は、Weka(v.3.4)データマイニングプラットフォームを用いて行った。階層的クラスタリングは、算術平均および相関係数を用いる非加重対グループ法を用いて実行した。クラスタリングの視覚化は、GEPASを用いて行った。統計的有意差検定は、Statisticaパッケージ(v.6.0)を用いて作製した。P値<0.05を、統計的に有意とみなした。

30

【0146】

結果

患者の選択および特徴決定

我々は、機械的再灌流により処置された急性ST上昇MIを示す患者を登録した。トランスクリプトーム解析について、急性MIの16名の患者の2群を、MIの1ヶ月後のEFに基づいて選択した。患者の一方の群は、MI後に高EFとともに保存されたLV収縮機能を有し(>40%、中央値63%、範囲45~73)、他方の群は、低EFとともに損なわれたLV機能を有した(40%、中央値35%、範囲20~40)。

40

【0147】

血液細胞のトランスクリプトーム解析

再灌流時に単離された全血液細胞の遺伝子発現プロファイルを、25,000遺伝子のマイクロアレイを用いて得た。これらのうち、525遺伝子が、SAMにより、高EF患者と低EF患者との間で、1.3の倍数変化閾値および24.5%の過誤発見率で、異なって発現されることがわかった。226遺伝子は、高EF群において上方制御され、299遺伝子は、低EF群において上方制御された。525遺伝子のうち、GSEAは、患者の一方または他方の群と最も著しく関連する5

50

0遺伝子を検索した。

【0148】

MI後の臨床成績と関連する血管新生遺伝子

MI後の心臓修復において血管新生が重要な役割を演じ得るとの我々の作業仮説に従って、我々は、525遺伝子から、高EF患者と低EF患者との間で異なって発現される血管新生に
関係する遺伝子を同定することを目的とした。この目的のために、我々は、Entrez遺伝子
データベースから、以下のクエリを用いてヒトの血管新生に
関係することが知られている
494遺伝子のリストを検索した：「血管新生(angiogenesis)」AND「ホモ・サピエンス(homo
sapiens)」。525の異なって発現される遺伝子のうち、28が、この494血管新生遺伝子の
セットにおいて見出された：20は低EF群において上方制御され、8は高EF群において上方制
御された(Table6(表6))。

10

【0149】

【表6】

Table6. 高EF群と低EF群との間で異なって発現される28血管新生遺伝子のリスト。

低EF群において過剰発現

血管新生促進性 (n=15)	倍数変化	q 値(%)	血管新生抑制性 (n=6)	倍数変化	q 値(%)
BMX	1.90	11.36	CLU	1.50	4.97
PBEF1	1.73	20.21	THBS1	1.44	5.88
FOS	1.66	4.09	ITGB1	1.34	25.29
PFKFB3	1.65	0.00	MAPK14	1.31	24.72
CD55	1.65	5.53	STAT1	1.31	25.56
HIF1A	1.63	0.00	MME	1.31	20.21
IL8	1.59	7.51			
PTGS2	1.55	11.36			
TGFBR1	1.50	9.87			
THBS1	1.44	5.88			
SLC2A3	1.40	0.00			
ERO1L	1.32	28.34			
PLAUR	1.31	5.88			
ADM	1.31	25.06			
B2M	1.30	28.12			

20

30

低EF群において過小発現

血管新生促進性 (n=4)	倍数変化	q 値(%)	血管新生抑制性 (n=4)	倍数変化	q 値(%)
VEGFB	0.74	4.97	SOD1	0.70	11.36
RHOC	0.74	8.70	MAGED1	0.75	9.31
CX3CR1	0.76	17.27	ANXA2	0.76	17.27
ATP5B	0.80	21.32	BAI1	0.76	17.27

q 値：最低の過誤発見率であり、ここでは遺伝子は有意とよばれる(多数の遺伝子の解析に
適応された「p 値」と同様)。注：この表における遺伝子の合計数は、28である。なぜなら
トロンボスポンジン 1(THBS1)は血管新生促進性および血管新生抑制性の両方であるから
である。

40

【0150】

これらの28遺伝子を用いて描かれたヒートマップは、MI後の臨床成績が、血管新生につ
ながる明瞭なバイオシグネチャーと関連することを示した。

【0151】

このバイオシグネチャーが血管新生の刺激または抑制のいずれと関連するかを評価する
ための試みにおいて、我々は、Entrez遺伝子データベースに、MI患者の2群間で異なって
発現されることが見出された28血管新生遺伝子の血管新生促進または血管新生抑制の特性

50

について問い合わせた。Table6(表6)に示すように、既知の血管新生促進性因子と血管新生抑制性因子との間のバランスは、低EF患者について血管新生促進性の側に傾く傾向があるが、このことは、血管新生の刺激と関連するとだけ推測できる。

【 0 1 5 2 】

我々は、次いで、我々の調査をVEGFBにさらに狭めた。なぜなら、(1)高EF群において過剰発現される(そして、そのことにより心臓の好ましいリモデリングに關与する可能性がある)4つの血管新生促進性遺伝子のうち、VEGFBだけがEntrez遺伝子データベースにより、「血管新生(angiogenesis)ANDホモ・サピエンス(homo sapiens)AND心臓(heart)」のクエリを用いて検索され、(2)高EF患者と低EF患者におけるVEGFB発現の差が、血管新生促進性遺伝子のうちで最も著しかったからである(Table6(表6))。

10

【 0 1 5 3 】

VEGFBの発現は、MI後の成績と相關する

定量PCRを用いて、VEGFBについてのマイクロアレイデータを確認した。16名のMI患者の2群間の発現の値を、マイクロアレイと定量PCRとで比較した。両方の技術により、低EF患者と比較して、高EF患者におけるVEGFB mRNA発現のより高いレベルが報告された:マイクロアレイについて1.3倍($t=3.35$; $P=0.004$)、および定量PCRについて1.7倍($t=3.35$; $P=0.003$)(図8A)。図8Bは、VEGFB発現とEFとの間で観察された著しい相関を示す($r=0.39$; $P=0.03$)。よって、血液細胞におけるVEGFB発現は、MI後の成績と相關するとみられる。

【 0 1 5 4 】

VEGFBの血漿レベルは、MI後の臨床成績と相關する

20

我々は、次いで、2群、すなわちMIの1ヶ月後に保存されたLV機能(LVEF中央値57%、範囲45~89)および損なわれたLV機能(中央値37%、範囲17~44)を有する群に分けた140名のMI患者の血漿中のVEGFBを測定した。血液採集は、MIの日($n=77$)、MIの1日後($n=65$)またはMIの2日後($n=12$)に行った。血漿VEGFBレベルは、MI後の第0日および第1日にて、高EF群と低EF群との間で同様であった。しかし、第2日に、VEGFBレベルは高EF患者で増加し(第0日と比較して2倍)、低EF患者で低下した(第0日と比較して2.5倍)(図9)。これらのデータは、高EF患者におけるVEGFB mRNAの上方制御と一致する(図8)。これらの結果は、MI後にVEGFB生成を増加できる患者は、好ましい成績を有する傾向がより高いことを示唆する。

【 0 1 5 5 】

独立確認

30

290名のMI患者の独立コホートをを用いて、VEGFB血漿レベルとMI後のLVリモデリングとの関連をさらに研究した。この患者集団の臨床的特徴決定は、発表されている。平均血漿VEGFBは、EDV($n=138$)がこの期間にわたって下落した患者($n=138$)において、EDVが増加した患者($n=152$)と比較して64%高かった(U統計量=8128、 $P<0.001$)。これらのデータは、VEGFBがMI後のLVリモデリングと関連するという我々の観察結果を確認する。

【 0 1 5 6 】

VEGFBの予後性能

我々の結果は、VEGFBが、MI後のリモデリングの潜在的なバイオマーカーであり得ることを示唆した。いくつかのデータセット(マイクロアレイ、定量PCRまたは血漿の決定のいずれかにより得られた)を用いて構築された2つの機械学習モデルを用いて、VEGFBの予後性能を試験した。結果を、Table7(表7)に示す。最良の性能は、事例に基づく K^* 学習機を、32名の患者の試験コホートからマイクロアレイにより血液細胞において測定したVEGFB発現レベルを用いて構築した場合に達成された。このモデルは、75%の特異性(16名の低EF患者のうち12名が正しく分類された)、50%の感度(16名の高EF患者のうち8名が正しく分類された)、および62%の全体的な精度(32名の患者のうち20名が正しく分類された)に到達した。AUCは0.75であった。検証コホート(290名の患者)からの血漿VEGFBレベルを用いて構築した場合に、最大予後有意性は、0.52のAUCをもたらした。

40

【 0 1 5 7 】

【表 7】

Table7. VEGFB の予測性能。

		n	分類モデル	AUC	特異性 (%)	感度 (%)	精度 (%)
VEGFB (マイクロアレイ)	第 0 日	32	SVM	0.56	56	56	56
			K*	0.75	75	50	62
VEGFB (PCR)	第 0 日	32	SVM	0.68	94	44	69
			K*	0.68	56	56	56
VEGFB (血漿)	第 0 日	77	SVM	0.5	0	1	66
			K*	0.51	0	92	60
	第 1 日	65	SVM	0.5	0	1	66
			K*	0.47	0	87	57
	第 2 日	12	SVM	0.5	0	1	66
			K*	0.07	0	1	66

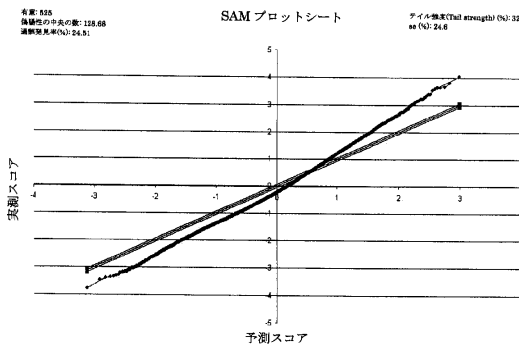
10

AUC: AUC:受信者動作特性(ROC)曲線下面積。

特異性は、正しく分類された低 EF 患者のパーセンテージを示す。感度は、正しく分類された高 EF 患者のパーセンテージを示す。精度は、正しく分類された高および低 EF 患者のパーセンテージを示す。

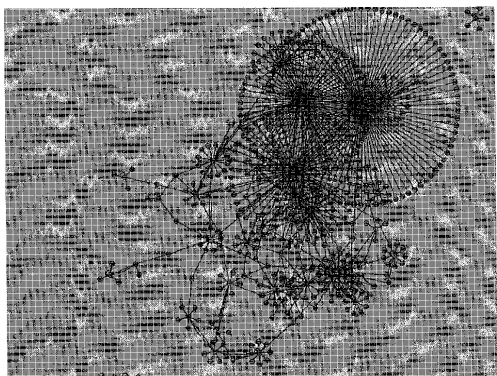
20

【図 1】



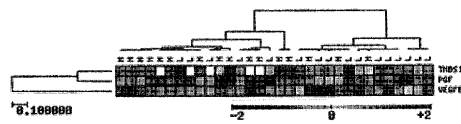
【図 2】

Figure 2

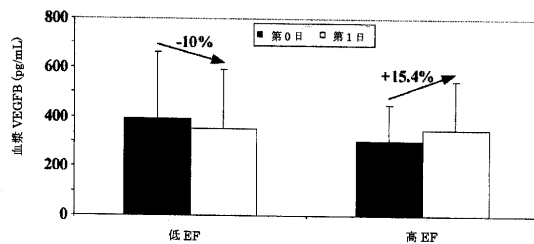


【図 4】

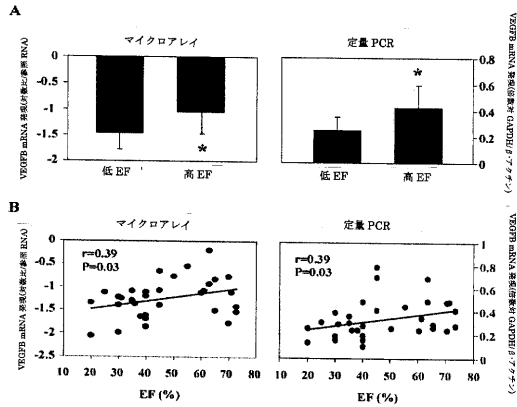
Figure 4



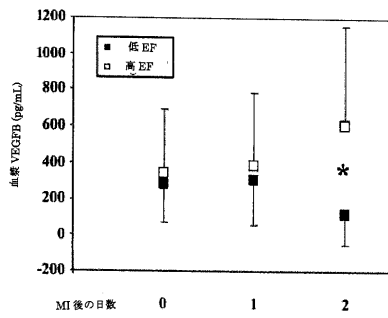
【図 7】



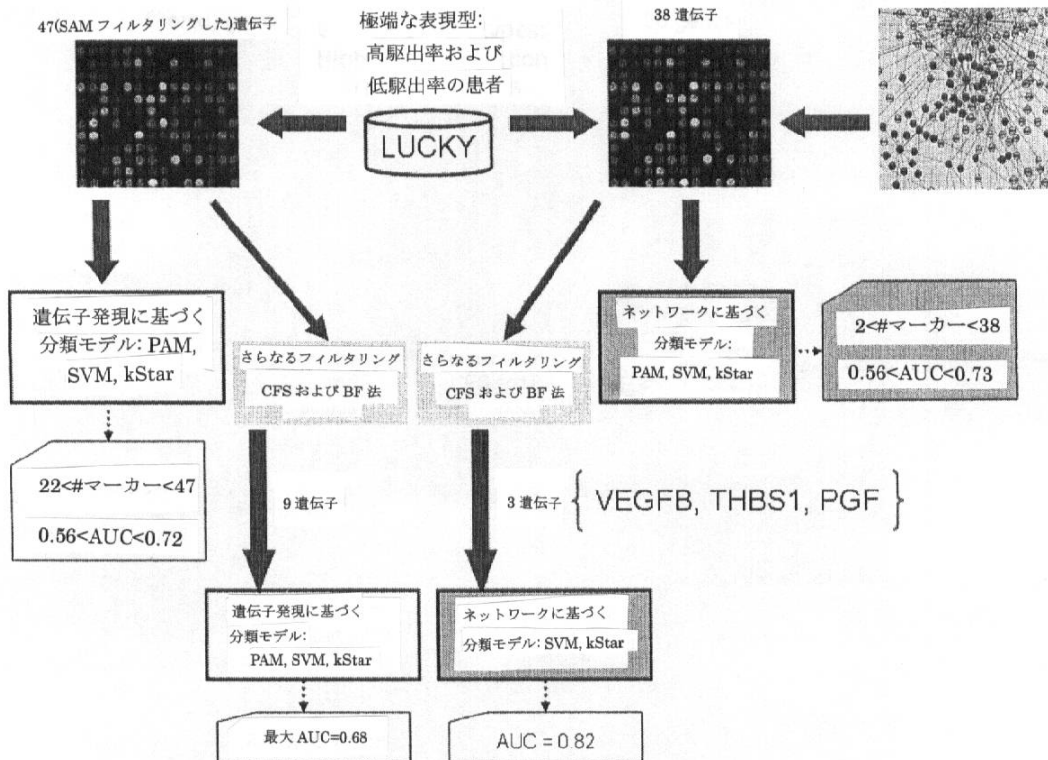
【 図 8 】



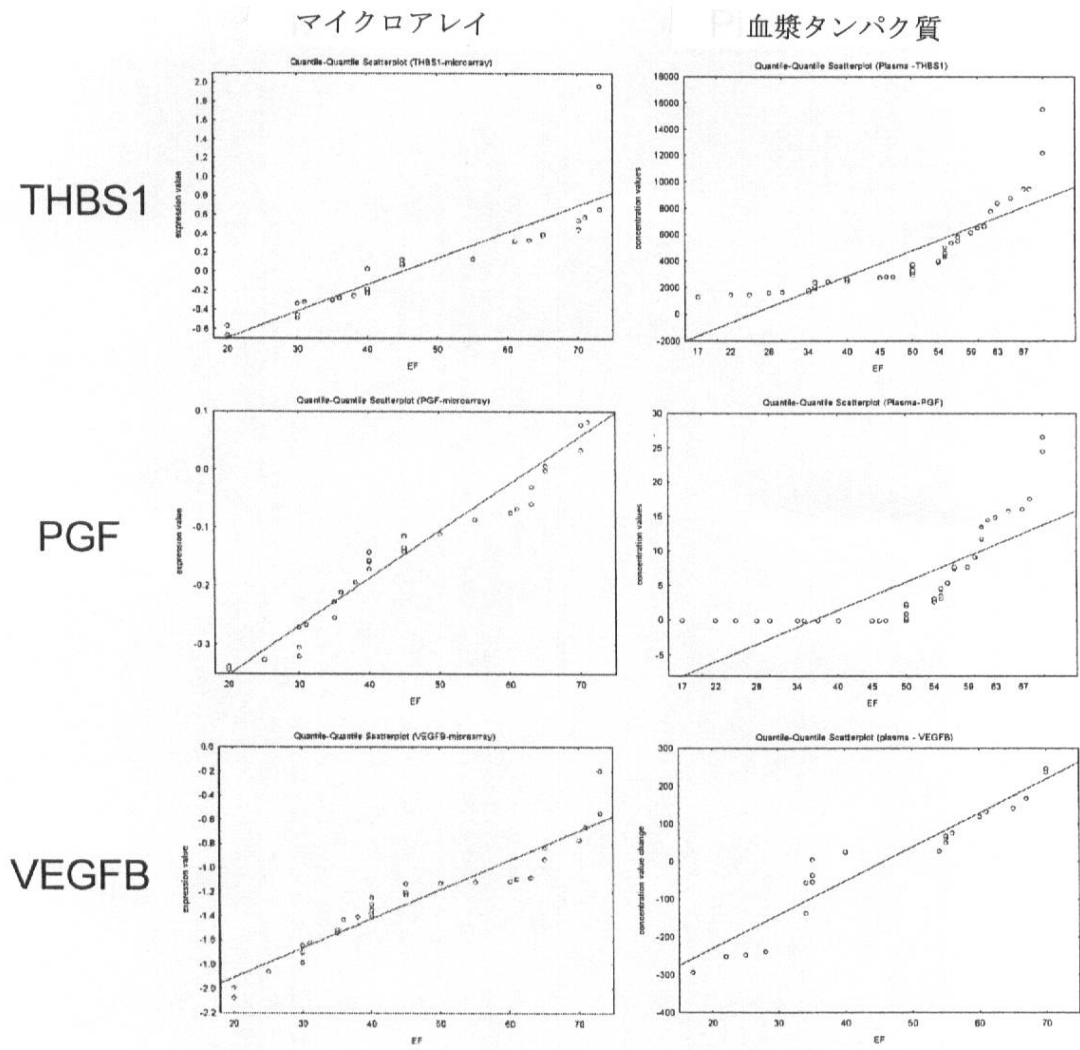
【 図 9 】



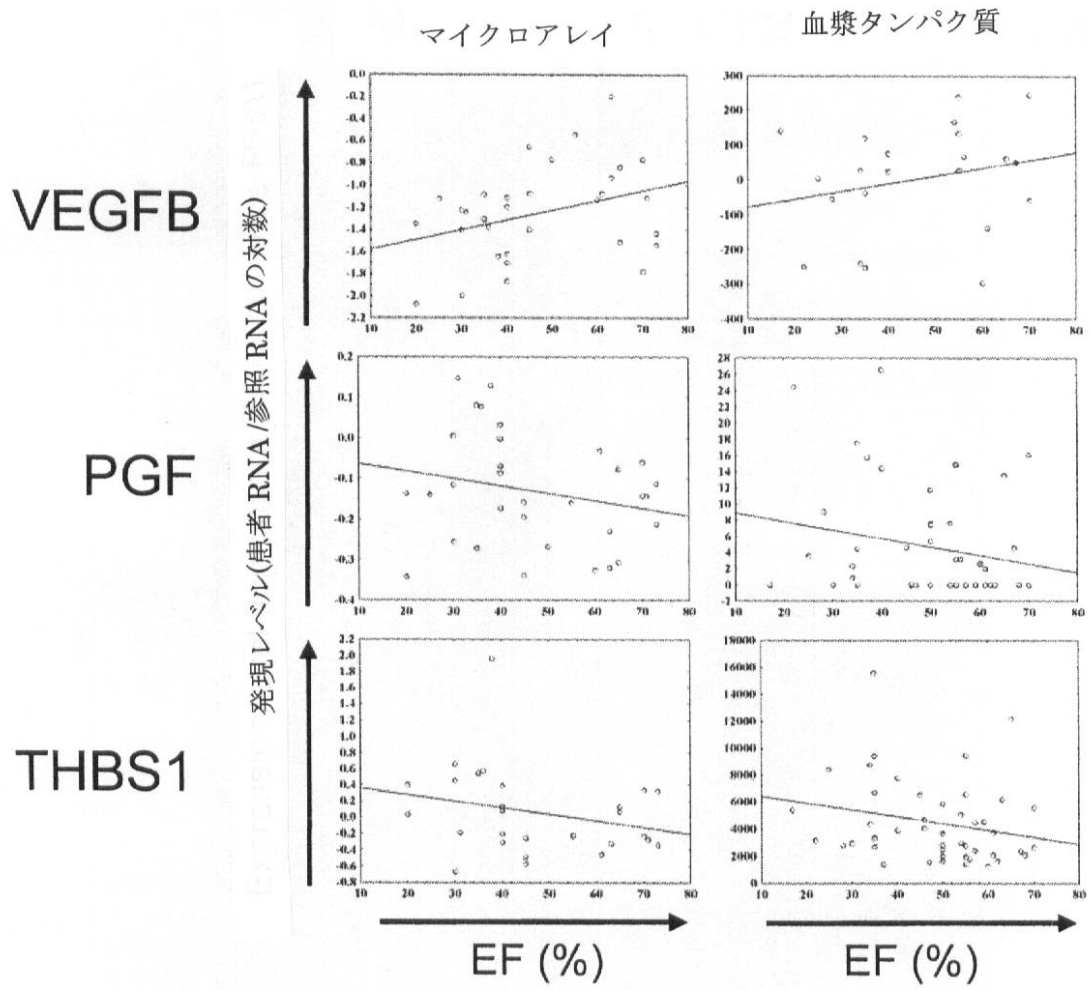
【 図 3 】



【図5】



【図6】



【配列表】

[0005749171000001.app](#)

フロントページの続き

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

- (72)発明者 イヴァン・デュヴォー
フランス・F - 5 7 3 3 0・ズフトゲン・リュ・プリンシパル・7 7
- (72)発明者 ダニエル・アール・ワグナー
ルクセンブルグ・L - 8 0 8 3・ベルトランジ・リュ・デュ・パルク・1 5
- (72)発明者 フランシスコ・アズアジェ
ルクセンブルグ・L - 8 0 1 0・ストラッセン・ルート・ダルロン・1 8 6
- (72)発明者 メラニ・ヴァーソート
ルクセンブルグ・L - 8 0 4 1・ストラッセン・リュ・デ・ロマン・3 7 - 3 9

審査官 赤坂 祐樹

- (56)参考文献 特表2006 - 5 0 8 3 6 7 (J P , A)
特表2005 - 5 0 5 5 1 0 (J P , A)
特表2004 - 5 1 3 3 2 8 (J P , A)

- (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
C 1 2 Q 1 / 6 8
C 1 2 N 1 5 / 0 9
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

专利名称(译)	生物标志物		
公开(公告)号	JP5749171B2	公开(公告)日	2015-07-15
申请号	JP2011533750	申请日	2009-10-30
[标]申请(专利权)人(译)	CENT DE RECH PUBLIC DE LA SANTE		
申请(专利权)人(译)	中心德Resherushe公共德拉圣		
当前申请(专利权)人(译)	卫生研究所卢森堡		
[标]发明人	イヴァンデュヴォー ダニエルアールワグナー フランシスコアズアジェ メラニヴァーソート		
发明人	イヴァン・デュヴォー ダニエル・アール・ワグナー フランシスコ・アズアジェ メラニ・ヴァーソート		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/50 G01N33/48 G01N33/53 C12Q1/68 C12N15/09		
CPC分类号	G16H10/60 G01N33/6893 G01N2333/475 G01N2800/325 G16H50/30		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/50.P G01N33/48.Z G01N33/53.D C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A		
代理人(译)	村山彦 渡边 隆		
优先权	61/109649 2008-10-30 US		
其他公开文献	JP2012507026A JP2012507026A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了一种鉴定具有增加的心脏病风险的心肌梗塞患者的方法。

(21) 出願番号	特願2011-533750 (P2011-533750)	(73) 特許権者	509131937
(66) (22) 出願日	平成21年10月30日 (2009.10.30)		ルクセンブルグ・インスティテュート・オブ・ヘルス
(65) 公表番号	特表2012-507026 (P2012-507026A)		ルクセンブルグ・L-1445・シュトラッセ・リュ・トーマス・エディソン・1A-B
(43) 公表日	平成24年3月22日 (2012.3.22)		
(86) 国際出願番号	PCT/EP2009/064410		
(87) 国際公開番号	WO2010/049538		
(87) 国際公開日	平成22年5月6日 (2010.5.6)	(74) 代理人	100108453
審査請求日	平成24年10月26日 (2012.10.26)		弁理士 村山 靖彦
(31) 優先権主張番号	61/109,649	(74) 代理人	100064908
(32) 優先日	平成20年10月30日 (2008.10.30)		弁理士 志賀 正武
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100089037
			弁理士 渡邊 隆
		(74) 代理人	100110364
			弁理士 吳広 信哉