

(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2004-81156

(P2004-81156A)

(43) 公開日 平成16年3月18日(2004.3.18)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00 A	4 B O 2 9
C 1 2 M 1/34	C 1 2 M 1/34	4 B O 5 0
C 1 2 N 9/04	C 1 2 N 9/04 E	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/32	C 1 2 Q 1/32	4 H O 4 5
審査請求 未請求 請求項の数 25 O L (全 24 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2002-249326 (P2002-249326)

(22) 出願日 平成14年8月28日 (2002.8.28)

(71) 出願人 502313347

太田 成男

東京都町田市本町田 1 7 5 4 - 3 5

(71) 出願人 502312753

鈴木 吉彦

東京都品川区東五反田 3 - 2 - 7

(74) 代理人 100107179

弁理士 平井 昭光

(72) 発明者 太田 成男

東京都町田市本町田 1 7 5 4 - 3 5

(72) 発明者 鈴木 吉彦

東京都品川区東五反田 3 - 2 - 7

F ターム (参考) 4B024 AA11 CA01 HA12

4B029 AA07 AA23 BB16 BB20 CC03

FA13

最終頁に続く

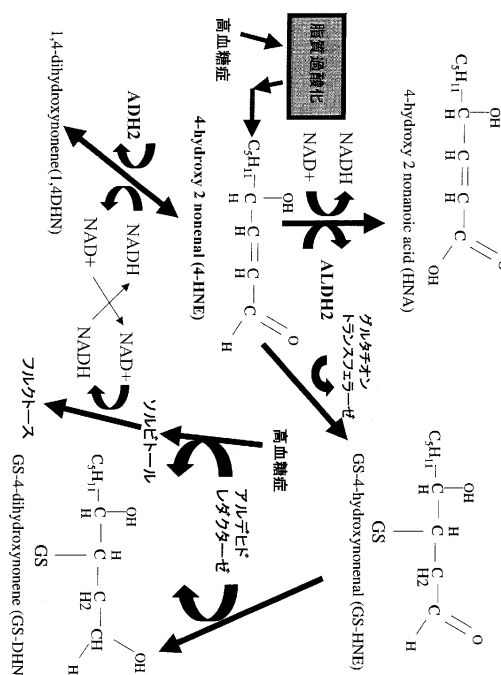
(54) 【発明の名称】 糖尿病および糖尿病関連疾患の予測のためのマーカーおよび個体分類方法

(57) 【要約】

【課題】糖尿病および糖尿病合併症の診断並びに治療薬の評価に有用なヒトの分類方法を提供する。

【解決手段】ALDH2およびADH2の活性の高低を基準にして、高活性型ALDH2および高活性型ADH2（グループ1）と、高活性型ALDH2および低活性型ADH2（グループ2）と、低活性型ALDH2および高活性型ADH2（グループ3）と、低活性型ALDH2および低活性型ADH2（グループ4）とに分類する。これらの分類により、細胞質およびミトコンドリアにおけるアルデヒド量を予測でき、これを基に、糖尿病および合併症の発症リスク等を予測できる。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

糖尿病および糖尿病合併症の診断並びに治療薬の評価のための複合遺伝子マーカーであって、高活性型若しくは低活性型のアルデヒド脱水素酵素 2 (ALDH2) をコードする遺伝子および高活性型若しくは低活性型のアルコール脱水素酵素 2 (ADH2) をコードする遺伝子を含む複合遺伝子マーカー。

【請求項 2】

診断対象の個体を、下記表 1 の 4 つのグループに分類するための請求項 1 記載の複合遺伝子マーカー。

(表 1)

10

グループ 1 : 高活性型 ALDH2 および高活性型 ADH2 を有するグループ

グループ 2 : 高活性型 ALDH2 および低活性型 ADH2 を有するグループ

グループ 3 : 低活性型 ALDH2 および高活性型 ADH2 を有するグループ

グループ 4 : 低活性型 ALDH2 および低活性型 ADH2 を有するグループ

【請求項 3】

グループ 1 から 4 に分類された各個体の細胞質 (厳密には細胞質内にミトコンドリアも含まれるため、ここで表現する細胞質とは細胞質サイトゾルの意味だが、以下では細胞質として簡略し表現する) およびミトコンドリアのアルデヒド量を、下記表 2 に記載のように予測するための請求項 2 記載の複合遺伝子マーカー。

(表 2)

20

	細胞質 アルデヒド量	ミトコンドリア アルデヒド量
グループ 1	低濃度	低濃度
グループ 2	高濃度	低濃度
グループ 3	低濃度	高濃度
グループ 4	高濃度	高濃度

30

【請求項 4】

高活性型 ALDH2 遺伝子は、478 番目アミノ酸のコドンが GAA (Glu) である ALDH2¹ 遺伝子のホモ接合体であり、

低活性型 ALDH2 遺伝子は、478 番目のアミノ酸のコドンが AAA (Lys) である ALDH2² 遺伝子のホモ接合体若しくは ALDH2¹ 遺伝子と ALDH2² 遺伝子のヘテロ接合体であり、

高活性型 ADH2 遺伝子は、β2 サブユニットをコードする ADH2² 遺伝子のホモ接合体であり、

低活性型 ADH2 遺伝子は、前記 ADH2² 遺伝子のホモ接合体以外の ADH2 遺伝子の接合体である請求項 1 から 3 のいずれかに記載の複合遺伝子マーカー。

40

【請求項 5】

診断対象となる個体が、モンゴロイド民族である請求項 2 から 4 のいずれかに記載の複合遺伝子マーカー。

【請求項 6】

糖尿病発症可能性および発症年齢の予測、ミトコンドリア遺伝子変異予測、神経障害の予測、網膜障害の予測、腎障害の予測、心臓障害の予測および脳機能障害の予測からなる群から選択されるいずれか一つの予測に使用される請求項 1 から 5 のいずれかに記載の複合遺伝子マーカー。

【請求項 7】

アルドース還元酵素阻害剤、Protein Kinase C 阻害剤、Advance 50

d glycation end - products 阻害剤、メチルコバラミン製剤、インスリン抵抗性改善薬、血糖降下剤および抗酸化剤からなる群の少なくとも一つの薬剤の各個体における薬効を予測するために使用される請求項 1 から 6 のいずれかに記載の複合遺伝子マーカー。

【請求項 8】

請求項 1 から 7 のいずれかに記載の複合遺伝子を検出するための複合プローブであって、A L D H 2 遺伝子の塩基配列の一部若しくは全部と相補的な配列を有し、かつ前記遺伝子の高活性型と低活性型を区別して検出可能な D N A プローブと、A D H 2 遺伝子の塩基配列の一部若しくは全部と相補的な配列を有し、かつ前記遺伝子の高活性型と低活性型とを区別して検出可能な D N A プローブとを含む複合プローブ。

10

【請求項 9】

請求項 8 記載の複合プローブを有する D N A マイクロアレイ。

【請求項 10】

請求項 1 から 7 のいずれかに記載の複合遺伝子マーカーを検出する方法であって、制限断片長多型 (R F L P) 分析を利用した方法。

【請求項 11】

請求項 10 記載の検出方法に使用するキットであって、

A D L H 2 遺伝子および A D H 2 遺伝子を P C R で増幅する際に使用するプライマー、D N A ポリメラーゼおよび d N T P と、

A L D H 2 遺伝子の高活性型と低活性型を区別できる制限酵素と、

A D H 2 遺伝子の高活性型と低活性型を区別できる制限酵素とを含むキット。

20

【請求項 12】

糖尿病および糖尿病合併症の診断若しくは治療薬の評価のための複合酵素マーカーあって、高活性型若しくは低活性型のアルデヒド脱水素酵素 2 (A L D H 2) および高活性型若しくは低活性型のアルコール脱水素酵素 2 (A D H 2) を含む複合酵素マーカー。

【請求項 13】

診断対象の個体を、上記表 1 の 4 つのグループに分類するための請求項 12 記載の複合酵素マーカー。

【請求項 14】

グループ 1 から 4 に分類された各個体の細胞質およびミトコンドリアのアルデヒド量を、上記表 2 に記載のように予測するための請求項 13 記載の複合酵素マーカー。

30

【請求項 15】

高活性型 A L D H 2 のアミノ酸配列では、478 番目アミノ酸が G l u であり、

低活性型 A L D H 2 のアミノ酸配列では、478 番目のアミノ酸が L y s であり、

高活性型 A D H 2 は、 β 2 サブユニットのホモダイマーであり、

低活性型 A D H 2 は、 β 2 サブユニットのホモダイマー以外のダイマーである請求項 12 から 14 のいずれかに記載の複合酵素マーカー。

【請求項 16】

診断対象となる個体が、モンゴロイド民族である請求項 12 から 15 のいずれかに記載の複合酵素マーカー。

40

【請求項 17】

糖尿病発症可能性および発症年齢の予測、ミトコンドリア遺伝子変異予測、神経障害の予測、網膜障害の予測、腎障害の予測、心臓障害の予測および脳機能障害の予測からなる群から選択されるいずれか一つの予測に使用される請求項 12 から 16 のいずれかに記載の複合酵素マーカー。

【請求項 18】

アルドース還元酵素阻害剤、Advanced glycation end - products 阻害剤、Protein Kinase C 阻害剤、メチルコバラミン製剤、インスリン抵抗性改善薬、血糖降下剤および抗酸化剤からなる群の少なくとも一つの薬剤の各個体における薬効を予測するために使用される請求項 12 から 17 のいずれかに記載

50

の複合酵素マーカー。

【請求項 19】

請求項 12 から 18 のいずれかに記載の複合酵素マーカーを検出するための試薬であって、
高活性型若しくは低活性型 A L D H 2 と特異的に反応する抗体と、
高活性型若しくは低活性型 A D H 2 と特異的に反応する抗体とを含む試薬。

【請求項 20】

抗体がモノクローナル抗体である請求項 19 記載の試薬。

【請求項 21】

糖尿病および糖尿病合併症の診断若しくは治療薬の評価のための個体分類方法であって、
請求項 1 から 20 のいずれかに記載のマーカーを用いて、個体を上記表 1 の 4 つのグループに分類する方法。 10

【請求項 22】

グループ 1 から 4 に分類された各個体の細胞質およびミトコンドリアのアルデヒド量を、
上記表 2 に記載のように予測するための請求項 21 記載の分類方法。

【請求項 23】

分類対象となる個体が、モンゴロイド民族である請求項 21 または 22 に記載の分類方法。

【請求項 24】

糖尿病発症可能性および発症年齢の予測、ミトコンドリア遺伝子変異予測、神経障害の予測、
網膜障害の予測、腎障害の予測、心臓障害の予測および脳機能障害の予測からなる群
から選択されるいずれか一つの予測のために使用される請求項 21 から 23 のいずれかに
記載の分類方法。 20

【請求項 25】

アルドース還元酵素阻害剤、Advanced glycation end-products 阻害剤、Protein Kinase C 阻害剤、メチルコバラミン製剤、
インスリン抵抗性改善薬、血糖降下剤および抗酸化剤からなる群の少なくとも一つの薬剤
の各個体における薬効を予測するために使用される請求項 21 から 24 のいずれかに記載
の分類方法。

【発明の詳細な説明】 30

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、糖尿病および糖尿病合併症の診断並びに治療薬の評価のための複合遺伝子マーカー、複合酵素マーカーおよび個体分類方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

糖尿病は、慢性の全身性代謝障害を引き起こす疾患であり、高血糖、糖尿、体タンパク質の崩壊、ケトシス（ケトン血症）およびアシドーシスを呈し、病状が進行すると、神経障害、網膜障害、腎障害若しくは心臓障害等の合併症がおこる。糖尿病は、現代の飽食の時代を反映して、国民的疾患となっており、その有効な予防法および治療法の確立が望まれている。糖尿病の診断方法としては、経口ブドウ糖負荷試験（OGTT）が、一般的であり、その他、1, 5 - A G、フルクトサミン（糖化アルブミン）、H b A 1 c 等が診断の指標とされている。他方、近年のゲノム研究の進展と相俟って、疾患を遺伝子レベルで理解するための研究が盛んになっており、そのなかでも遺伝子の多型を分析して、個体レベルでの発症リスク等を予測する試みがなされている。例えば、アルコール性疾患では、その病因の理解を深めるために、アルデヒド脱水素酵素 2（A L D H 2）遺伝子とアルコール脱水素酵素 2（A D H 2）遺伝子の多型の組み合わせが利用されている（参考文献：A r u k o r u K e n k y u t o Y a k u b u t s u I s o n 1995 F e b ; 30 (1) : 33 - 42 等）。また、非活性型 A L D H 2 遺伝子の多型分析により、アルコールを多量に摂取する人のガン発生のリスクを予測できることが報告されている 40 50

(参考文献: Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev 1996; 5: 99-102等)。この他にも、アルコール摂取の心筋梗塞への影響がADH3遺伝子の多型分析で調べられている(N Engl J Med, Vol. 344, No. 8 p549-555)。アルツハイマー病については、本発明者により、ALDH2遺伝子とアポリポロタンE(APOE)遺伝子の多型により、発症リスクを予測することが提案されている(特開2001-299397号公報)。しかしながら、糖尿病については、遺伝子レベルでの理解が十分とはいえず、糖尿病および合併症の診断や治療薬の評価等の遺伝子レベルでの実施は、十分ではない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、このような事情に鑑みなされたもので、遺伝子レベルでの糖尿病の理解に基づいたマーカーであって、糖尿病および糖尿病合併症の診断並びに治療薬の評価等に有用なマーカーの提供を、その目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、糖尿病を遺伝子レベルで理解するために、ALDH2遺伝子およびADH2遺伝子の多型をそれぞれ高活性型と低活性型に分け、個体を下記の表1に記載の4つのグループに分類するという着想を得た。そして、この着想をさらに発展させ、各グループについて、細胞質およびミトコンドリアのアルデヒド濃度を下記表2に示すように予想する理論を構築した。そして、この理論の検証を行ったところ、後述のように、糖尿病のメカニズム等を理論的に説明することが可能であることを突き止めた。そして、この理論に基づき、ALDH2遺伝子およびADH2遺伝子の多型およびこれらの多型に応じて発現した酵素自身が、糖尿病および糖尿病合併症の診断並びに治療薬の評価のマーカーとして有用であることを見出し、本発明に到達した。遺伝子多型は、個体が存在する間(生まれてから死ぬまで)、変化しないから、本発明の基礎となる前記理論によれば、糖尿病発症以前の体の状態も予測でき、さらには、先祖若しくは子孫への遺伝的な予測も可能である。

【0005】

(表1)

グループ1: 高活性型ALDH2および高活性型ADH2を有するグループ
 グループ2: 高活性型ALDH2および低活性型ADH2を有するグループ
 グループ3: 低活性型ALDH2および高活性型ADH2を有するグループ
 グループ4: 低活性型ALDH2および低活性型ADH2を有するグループ

【0006】

(表2)

	細胞質 アルデヒド量	ミトコンドリア アルデヒド量
グループ1	低濃度	低濃度
グループ2	高濃度	低濃度
グループ3	低濃度	高濃度
グループ4	高濃度	高濃度

【0007】

すなわち、本発明の複合遺伝子マーカーは、糖尿病および糖尿病合併症の診断並びに治療薬の評価のための複合遺伝子マーカーであって、高活性型若しくは低活性型のALDH2をコードする遺伝子および高活性型若しくは低活性型のADH2をコードする遺伝子を含む複合遺伝子マーカーである。

【0008】

また、本発明の複合酵素マーカーは、糖尿病および糖尿病合併症の診断若しくは治療薬の評価のための複合酵素マーカーあって、高活性型若しくは低活性型のALDH2および高活性型若しくは低活性型のADH2を含む複合酵素マーカーである。

【0009】

さらに、本発明の個体分類方法は、前記本発明のマーカーを用いて、個体を上記表1の4つのグループに分類する方法である。

【0010】

前記の両複合マーカーにより、診断対象の個体を、上記表1の4つのグループに分類することができ、分類された各個体の細胞質およびミトコンドリアのアルデヒド量を、上記表2に記載のように予測することができる。前記分類はモンゴロイド民族に適しており、特に日本人に最適であるから、本発明において、前記個体は、モンゴロイド民族が好ましく、より好ましくは日本人である。また、前記個体は、例えば、健康人、糖尿病患者あるいはブドウ糖負荷試験における境界型領域に属する人等である。この予測に基づけば、糖尿病および糖尿病合併症の診断並びに治療薬の評価を行うことが可能となる。前記診断としては、例えば、糖尿病発症可能性および発症年齢の予測、ミトコンドリア遺伝子変異予測、神経障害の予測、網膜障害の予測、腎障害の予測、心臓障害の予測および脳機能障害の予測等がある。前記治療薬の評価としては、例えば、アルドース還元酵素阻害剤、Advanced glycation end-products 阻害剤、Protein Kinase C 阻害剤、メチルコバラミン製剤、インスリン抵抗性改善剤、経口血糖降下剤（スルフォニルウレア系薬剤を含む）および α -lipoic acidなどを含む抗酸化剤等の医薬の薬効を各個体毎に予測すること等がある。前記インスリン抵抗性改善薬としては、PPAR γ 受容体に作用をもつと考えられサイアゾリジン系の薬剤等がある。本発明のマーカーや分類方法により、個体の体質を評価すれば、薬剤についての感受性を予測でき、その個体が、responder、mild responder若しくはnon-responderであるかを判断して薬剤を投与できる。したがって、本発明により、糖尿病および糖尿病合併症においてテーラーメイド医療が実施可能となる。

【0011】

【発明の実施の形態】

つぎに、本発明について詳しく説明する。

【0012】

ALDH2は、細胞のミトコンドリア内に存在するアルデヒド脱水素酵素のアイソザイムの一つである。ALDH2遺伝子はヒト染色体の12q24に存在し、そのexon12に位置する478番アミノ酸(Glu)のコドンGAAにおいて、GからAへの点変異(AAA; Lys)の多型があり、正常なタイプ(G)をALDH2¹遺伝子といい、活性欠損遺伝子(A)をALDH2²という。本発明において、ALDH2の高活性型および低活性型の基準は、特に制限されず、マーカーの用途等に応じ適宜決定できる。例えば、ALDH2¹遺伝子にコードされた酵素はアセトアルデヒドを酢酸に変換する活性が高く、これに対して、ALDH2²遺伝子にコードされた酵素はアセトアルデヒドを酢酸に変換する酵素活性がほとんどない。また、この酵素はテトラマー(4量体)を形成し、そのうちALDH2²遺伝子にコードされるタンパク質が一つでも含まれると酵素活性を失う。したがって、本発明のマーカーにおいて、例えば、ALDH2¹遺伝子のホモ接合体およびその酵素(478番目のアミノ酸がGlu)を高活性型と定義することができ、それ以外の場合、すなわち、ALDH2²遺伝子/ALDH2¹遺伝子のヘテロ接合体およびALDH2²遺伝子/ALDH2²遺伝子のホモ接合体と、それらの酵素(487番目のアミノ酸がLys)とを、低活性型と定義することができる。但し、この定義は、本発明において一例に過ぎない。

【0013】

ADHは、分子量が約40kDaのサブユニット2個からなるダイマーであり、構成するサブユニットの違いから複数のアイソザイムが知られている。これまで同定されたヒトA

DH遺伝子は、I第4染色体(4q21-25)に存在する。ADHは、生化学的特性からIからIV型に分類される。一般に、経口摂取されるアルコールの代謝にかかわるのはI型であり、これはエタノールなどの短鎖のアルコールを加水分解し、ピラゾールで不活化されるという特徴を持つ。I型ADHには、ADH1、ADH2、ADH3の3つのアイソザイムが存在し、これらは独立した遺伝子座の産物である。本発明のADH2は、I型であり細胞質に存在する。日本人における遺伝子多型は、ADH2、ADH3双方の遺伝子に存在する。ADH2のサブユニットには $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ の3つがあり、 $\beta 1$ はADH¹遺伝子、 $\beta 2$ はADH²遺伝子、 $\beta 3$ はADH³遺伝子にそれぞれコードされている。ADH2の多型は、一塩基点変異により、補酵素との相互作用部位であるZnとNAD結合部位のアミノ酸が変化することによって生じる。アミノ酸レベルで見ると、 $\beta 2$ は、 $\beta 1$ の47番目のアルギニンがヒスチジンに変異したものである。これらの酵素活性には違いがあり、 $\beta 2\beta 2$ のホモ接合体は、 $\beta 1\beta 1$ のホモ接合体より、生理的条件下で高い活性を示す。特に $\beta 2\beta 2$ は、 $\beta 1\beta 1$ に対して*in vitro*で40倍のVmax値を持ち、*superactive ADH*と言われている。日本人においては、*superactive ADH*が一般的である。本発明のADH2の高活性型および低活性型を区別する基準は、特に制限されず、マーカーの用途等により適宜決定される。例えば、高活性型は、前記*superactive ADH*をコードする遺伝子($\beta 2$ サブユニットをコードするADH²遺伝子のホモ接合体)およびその酵素($\beta 2$ のホモダイマー)と定義し、低活性型は、前記遺伝子以外の遺伝子(ADH²遺伝子のホモ接合体以外のADH2遺伝子)およびその酵素($\beta 2$ ホモダイマー以外のダイマー)と定義できる。但し、この基準は、本発明の一例に過ぎない。

10

20

【0014】

つぎに、本発明の複合遺伝子マーカーは、例えば、プローブ、制限断片長多型(RFLP)分析、ミスマッチPCR法を利用した方法により検出できる。

【0015】

前記プローブは、例えば、ALDH2遺伝子の塩基配列の一部若しくは全部と相補的な配列を有し、かつ前記遺伝子の高活性型と低活性型を区別して検出可能なDNAプローブと、ADH2遺伝子の塩基配列の一部若しくは全部と相補的な配列を有し、かつ前記遺伝子の高活性型と低活性型とを区別して検出可能なDNAプローブとを含む複合プローブ等がある。また、この複合プローブを、DNAマイクロアレイ(DNAチップを含む)に適用すれば、多数の個体サンプルにおいて、本発明の複合遺伝子マーカーを効率よく検出できる。

30

【0016】

前記RFLP分析を利用した方法は、例えば、所定のプライマー、DNAポリメラーゼ、dNTP等を用いて、ADLH2遺伝子およびADH2遺伝子をPCRで増幅し、増幅産物を、制限酵素で処理し、アガロース電気泳動等で断片長を比較する方法である。この方法は、キット化することができる。このキットは、ADLH2遺伝子およびADH2遺伝子をPCRで増幅する際に使用するプライマー、DNAポリメラーゼおよびdNTPと、ALDH2遺伝子の高活性型と低活性型を区別して切断する制限酵素と、ADH2遺伝子の高活性型と低活性型を区別して切断する制限酵素とを含む。

40

【0017】

ALDH2遺伝子のPCRのためのプライマーとしては、例えば、5'-CAAAATTA CAGGGTCAAGGGCT-3'(sense)と5'-CCACACTCACAGTTTCTCTT-3'(antisense)の組み合わせ等があり、前記制限酵素としては、例えば、MboII等がある。

【0018】

ADH2遺伝子のPCRのためのプライマーとしては、例えば、5'-AATCTTTTCTGAATCTGAACAG-3'(sense)と5'-GAAGGGGGGTCAC CAGGTG-3'(antisense)の組み合わせ等があり、前記制限酵素としては、例えば、MaeIII等がある。

50

【0019】

この他に、本発明の遺伝子マーカーは、Allele-Specific PCR増幅法（ミスマッチPCR法）あるいはTaqMan PCR法等によっても検出できる。

【0020】

本発明の複合酵素マーカーは、抗体を含む試薬で検出可能である。この試薬としては、例えば、高活性型若しくは低活性型ALDH2と特異的に反応する抗体と、高活性型若しくは低活性型ADH2と特異的に反応する抗体とを含む試薬等がある。前記抗体としては、モノクローナル抗体若しくはポリクローナル抗体がある。抗体は、通常の方法で作成できる。例えば、抗体を作成するには、アミノ酸配列が異なる領域のペプチドを化学合成し、蛋白などの高分子に共有結合で結合し、家兎やマウスなどに免疫することによって、ALDH2¹とALDH2²にそれぞれコードされる蛋白を識別する抗体、あるいはADH2β1とADH2β2にそれぞれコードされる蛋白を識別する抗体を作成することができる。免疫したマウスの脾臓細胞とミエロマ細胞を融合すると、それぞれの前記蛋白を識別するモノクローナル抗体を作成することができる。ただし、この作成法は一例をしめしたものであって、この方法にかぎらずそれぞれを識別できる抗体は作成できる。

10

【0021】

（本発明の分類方法の基礎理論）

つぎに、本発明の基礎となる前記分類について、前記表1、表2および図1～5を参照して詳しく説明する。

【0022】

（本発明の分類概念）

前記表1の4つのグループは、前記表2に示すような細胞質およびミトコンドリアのアルデヒド量をとると推察される。まず、アルデヒドの代謝に着目すると、グループ4では、ALDH2およびADH2の双方とも低活性であるため、アルデヒド体が代謝を受けにくくなり、ミトコンドリア内および細胞質内に蓄積しやすくなる。これに対し、グループ1では、前記両酵素共に高活性であるため、アルデヒドが代謝を受けやすく、細胞質内およびミトコンドリア内にアルデヒドが蓄積し難い。グループ2では、ALDH2が高活性であるから、ミトコンドリア内のアルデヒドの蓄積は少なく、ADH2が低活性であるから、細胞質のアルデヒドの蓄積が多い。グループ3は、アルデヒドの蓄積において、グループ2と反対の傾向を示す。つぎに、図1に示すように、高血糖により脂質の過酸化が起こると、アルデヒド（図1では、4-hydroxy 2-nonenal：4-HNE）が細胞内に蓄積する。アルデヒドは、ALDH2およびADH2によりカルボン酸（図1では、4-hydroxy 2-nonanoic acid：HNA）とアルコール（図1では、1,4-dihydroxynonene：1,4DHN）に代謝され、その際、ALDH2ではNAD⁺が消費されてNADHが生じ、ADH2ではNADHが消費されNAD⁺が生成する。ADH2が触媒する反応は可逆反応であり、NADHが高濃度の条件下であってはじめて、4-HNEは1,4DHNに変換される。ADH2の酵素反応の際に必要なNADHは、高血糖によりポリオール代謝が亢進する際に生じるNADHで賄われる。

20

30

【0023】

（グループ4の特徴）

図2に、グループ4のアルデヒド代謝を中心とした糖尿病の代謝図を示す。上述のように、このグループでは、アルデヒド（図2では、4-HNE）が高濃度で存在する。高血糖であれば、ポリオール代謝が亢進してNADHが産生されるが、ADH2が低活性であるため、NADHをあまり消費することができず、これが活性酸素種（ROS）発生の一要因となる。また、アルデヒドが高濃度で存在することは、ミトコンドリア膜に障害を与え、ミトコンドリア内での酸化リン酸化（OXPHOS）が減少することになり、ATPが低下してしまう。また、ROSの発生は、ミトコンドリアDNAに損傷を起こし、アポトーシスを誘導し、エネルギー生成（ATP）が低下し、代謝に悪影響を及ぼす。さらに、ミトコンドリア膜からのフリーラジカル産生を亢進させ、脾臓のβ細胞からのインスリ

40

50

ン分泌を低下させる。また、これらのミトコンドリの特性（体質）は、母系遺伝によって子孫に遺伝され、また糖尿病の発症年齢が若くなるという現象が生じる。また、グループ 4 では、アルデヒドが細胞質およびミトコンドリアに高濃度で蓄積することから、他の毒性物質（アルコール等）に対する感受性が増加する。4 - H N E の神経内蓄積は、N a - K A T P a s e を阻害し、神経の酸化ストレスに対する感受性を高め、神経に対し障害を惹起しやすくなる。その結果、糖尿病の患者において、末梢神経障害のような神経障害がおきやすくなる。

【0024】

（グループ 1 の特徴）

図 3 に、グループ 1 のアルデヒド代謝を中心とした糖尿病の代謝図を示す。上述のように、このグループでは、アルデヒド（図 3 では、4 - H N E ）が低濃度となる。高血糖であれば、ポリオール代謝が亢進して N A D H が産生されるが、A D H 2 が高活性であるため、N A D H が消費され、活性酸素種（R O S ）もあまり発生しない。また、アルデヒドが低濃度であるため、ミトコンドリア内での酸化リン酸化（O X P H O S ）にもあまり影響はない。また、R O S があまり発生しないため、ミトコンドリア D N A の損傷も少なく、損傷したとしても修復され、正常細胞が増殖することとなる。一方、アルデヒドが低濃度であることは、4 ? H N E が低濃度になりやすく、低濃度の 4 ? H N E は、P r o t e i n K i n a s e C （アイソザイムである β I、 β I I ）の活性を増加させ、これによって虚血（血管障害）を起こし、網膜症や腎症（タンパク尿等）等の合併症が生じやすくなる。

10

20

【0025】

（アルコール代謝と糖尿病との関係）

糖尿病患者においては、アルコールを日常的に飲み続けている患者が多い。そうした患者においては、アルコールがアセトアルデヒドに代謝され、さらにアセトアルデヒドが酢酸に代謝される際に、N A D ⁺ が補酵素として利用され、N A D H に還元される事により、N A D H / N A D ⁺ 比が上昇しやすくなる。しかも、糖尿病患者は高血糖を有しているため、図 2 に示すように、肝臓や末梢神経内などにおいて N A D H / N A D ⁺ 比が上昇し、それが維持される。したがって、糖尿病患者がアルコールを摂取すると、高血糖の影響とアルコール摂取の影響とは、相乗効果をもって現れる。その結果、末梢神経細胞内において、図 2 で示すような 4 - H N E の代謝分解が抑制された均衡状態（アルデヒドの高濃度蓄積状態）になりやすい。本発明の分類を基に考えると、グループ 3 と 4 とでは、ミトコンドリア内にアルデヒド体が蓄積する傾向となる。4 - H N E はアルコールを飲む量に比例して蓄積されることが考えられるため、グループ 3 と 4 において、飲酒をしている糖尿病患者では、アルコール摂取量に比例して、末梢神経に障害が起こると予測できる。

30

【0026】

（ポリオール代謝と遺伝子多型）

ポリオール代謝は、グルコースからソルビトールを経てフルクトースに変換される経路である。図 4 に示すように、高血糖状態では、ポリオール代謝が亢進し、神経細胞内において、N A D H / N A D ⁺ 比が上昇し、また、N A D P H が減少して、N A D P が増加する。その結果、一酸化窒素（N O ）が減少して組織が虚血状態になりやすく、還元型グルタチオン（G S D ）が減少し、酸化型グルタチオンが増加する傾向となる。このことは、酸化ストレスを亢進させ、フリーラジカルの発生を高めることになる。このフリーラジカル産生増加が脂質過酸化を亢進させ、4 - H N E やその他の脂質過酸化による毒性アルデヒドを増やし、これが細胞毒性を起こし、またミトコンドリア機能に対して障害を及ぼす。図 4 に示すように、A L D H 2 および A D H 2 が毒性アルデヒドを消去するため、糖尿病により高血糖状態になっても、生体的平衡（ホメオスターシス）を維持できる。しかし、A L D H 2 遺伝子および A D H 2 遺伝子は多型を示すため、毒性アルデヒドの消去にも個体によって程度に差が生じ、これが糖尿病および糖尿病合併症の発症等に影響を及ぼす。本発明の分類方法やマーカーは、A L D H 2 遺伝子および A D H 2 遺伝子の多型から、細胞質およびミトコンドリアにおけるアルデヒド量を予測するから、この予測を基に、さ

40

50

らに糖尿病および糖尿病合併症の発症等を予測できる。

【0027】

(アルドース還元酵素)

アルドース還元酵素は、アルデヒド還元酵素の一種であり、ポリオール代謝では、ブドウ糖をソルビトールに変換する。高血糖によるポリオール代謝の亢進は、神経障害を引き起こすおそれがある。したがって、アルドース還元酵素の阻害剤（インヒビター）は、糖尿病性神経障害に対する治療薬として有効であり、実際に臨床で使用されている。図4に示すように、アルデヒド還元酵素阻害剤は、グルコースからソルビトールへの代謝を阻害し、それによって、ソルビトールが減少し、結果として、フルクトースも減少する。その結果、 NADH/NAD^+ 比等の酸化還元状態が変わる。また、 NADP の生成も抑制するから、一酸化窒素の低下も抑制し、組織が虚血に陥ることを防止すると考えられている。一方、アルドース還元酵素は、図4に示すように、アルデヒドの代謝にも関与する。したがって、高血糖状態になってポリオール代謝の亢進によりアルドース還元酵素の需要が高まったり、またインヒビターによってアルドース還元酵素が阻害されたりすると、毒性アルデヒドの代謝に悪影響がでるおそれがある。実際、様々な種類のアルドース還元酵素阻害剤が、開発され、臨床応用が試みられたが、臨床治験の段階で副作用が確認されるなどから、開発が中止されている薬剤も多い。その副作用が特定臓器において、なぜ起こるのかの原因は解明されていない。しかし、アルドース還元酵素阻害剤が、上記で論じた毒性アルデヒドの影響を、ある特定臓器において強めたり、弱めたりしている可能性もある。また、一方、本発明者等が論文で報告している糖尿病患者の2例においては、アルドース還元酵素阻害剤を服薬すると、四肢のしびれを強く感じるがあった（鈴木吉彦，松岡健平，「Aldose reductase inhibitor 投与後下肢異常感覚が出現した症例 Epalrestat Responderか？」，現代医療27巻増刊IV Page 3417-3420 (1995.11)）。この2例は、グループ4に属しており、このようにALDH2の低活性およびADH2の低活性の組み合わせが、アルドース還元酵素阻害剤の作用に対して強く影響を及ぼしうる群は、本分類のなかのいずれかの分類に傾向として集中しうる可能性がある。つまり、このように、アルドース還元酵素阻害剤の生体への作用を考える上でも、ALDH2遺伝子およびADH2遺伝子の多型によりアルデヒドの代謝を考慮した本発明の分類方法およびマーカーは重要な意義を有する。本発明の分類方法およびマーカーを使用すれば、アルドース還元酵素阻害剤の生体への感受性を予め予測することができる。あるいは、副作用がoccurしやすい患者を予め予測し、投薬の対象から除外することによって、アルドース還元酵素阻害剤は、副作用の少ない安全な薬剤として、糖尿病患者に服薬を勧めることができるようになる。

【0028】

(AGEに対する影響)

細胞質内やミトコンドリア内で蓄積されたアルデヒド体は、他の物質と結合し、advanced glycation end-products（以下、AGEと略す）を生じやすくなる。あるいは、例えば、上記で示した4-HNEは、システインなどが有するSH基と結合し、そのSH基を有するたんぱく質の機能を低下させる場合もある。本分類によって、毒性アルデヒドが、組織内で及ぼすAGE作成あるいは、特定の部位への攻撃を、あらかじめ予測し、それによって治療法の選択に役立てることが可能である。また、AGE阻害剤は、体内に蓄積したAGEの生成を抑制することを目的として、糖尿病性合併症の予防薬として開発中であるが、それら薬剤の効果判定において、上記で示したグループ1から4の分類は、薬剤効果の反応性を決定する要因になりうるものである。

【0029】

(酸化還元状態)

NADH/NAD^+ 比等の酸化還元状態は、ミトコンドリア内のMn-SODの活性に影響を及ぼす。また、 NADPH/NADP 比等も、脂質過酸化などの誘導に影響を及ぼす。すなわち、細胞内の酸化還元状態は、様々な酵素反応や酵素活性を調節し、それによって酸化ストレスを調節することが知られている。例えば、Mn-SODはミトコンドリ

10

20

30

40

50

ア内における酸化ストレスを消去するのに重要な酵素である。また、スーパーオキシドと一酸化窒素は容易に反応しペルオキシナイトライトという反応性の高い物質にかわるが、Mn-SODはミトコンドリア内のペルオキシナイトライトの生成を阻止している可能性も示唆されている。また、Mn-SODの転写や翻訳の両段階においては酸化還元調節を受けており、外的刺激に対応してMn-SODの酵素活性は速やかに上昇し、このメカニズムによりミトコンドリアを保護している。一方、グルタチオンペルオキシダーゼの一種についても、その酵素に結合する蛋白質の中には、酸化還元状態によって、核に移行し転写因子として働くものがある。このようなことから、アルデヒド体の多少で規定されるミトコンドリア内のNADH/NAD⁺比の高低は、Mn-SODの転写や翻訳、グルタチオンペルオキシダーゼ等の過酸化物質無毒化酵素などの作用に影響を及ぼすと推定される 10

【0030】

(ピルビン酸および乳酸の産生と、NADH/NAD⁺比)

NADH/NAD⁺比の変化は、ピルビン酸と乳酸との産生に影響を及ぼす。一般に、NADH/NAD⁺比の上昇は、乳酸を増やしピルビン酸を減少させる(図4参照)。ピルビン酸は、細胞膜を自由に通過できるので、ミトコンドリア機能の低下した細胞は、ピルビン酸が供給されることによって、過還元状態を是正されていると推察できる。また、ピルビン酸は、過酸化水素と非酵素的に反応し、脱炭酸されて酢酸となるので、抗酸化剤としての作用もある。糖尿病においては、ポリオール代謝系の亢進によってピルビン酸が低下するため、このような作用が障害されやすいと考えられる。このピルビン酸の産生を左右するのが、NADH/NAD⁺比、つまり酸化還元状態であるが、図4に示すように、この酸化還元状態が、ALDH2遺伝子とADH2遺伝子との多型によりアルデヒド量の多少を介して調節を受けるとすると、糖尿病患者における高血糖の程度と併行する可能性 20

【0031】

(高血糖状態および正常血糖状態)

糖尿病患者では、高血糖状態を長期間持続している場合が多い。このような患者において、糖尿病に関する正しい教育指導を受け、食事療法や運動療法を遵守し、また血糖降下剤などの経口糖尿病治療薬などを治療的介入を受けると、血糖値は下がり、正常人と同じレベル(空腹時血糖値が100mg/100ml前後)に落ちつくものである。こうした治療介入を急激に起こすことにより、それまで高血糖状態で均衡を保っていた状態(高血糖時のホメオスターシス:図4参照)が、正常血糖のホメオスターシス(図5参照)に変化することになる。血糖値が正常レベルになることは、良いことであるが、それが急激であると、様々な不都合が生じると予測される。例えば、ポリオール代謝が低下してNADPが低下し、一酸化窒素(NO)が増加するが、これがきっかけとなって、酸化ストレスが増加することが考えられる。すなわち、NOは、血管拡張作用を有するため、それまでの高血糖状態による組織内の低酸素状態あるいは虚血状態などが改善されるが、NOは、スーパーオキシドと容易に反応し、ペルオキシナイトライト(ONOO⁻)という反応性の高い物質に変わる。ペルオキシナイトライトは、ミトコンドリアを損傷させたり、ラジカルを発生させ脂質過酸化を促進させる。また、虚血再灌流説(Reperfusion Injury Hypothesis)によれば、低酸素あるいは虚血状態が急激に改善した場合には、フリーラジカルの産生も高まることが示唆されている。長期間の高血糖を放置した症例において、急激な血糖調節を行うと、時に、下肢のしびれ、下腿の浮腫、眼底出血などが起こる患者の群がいることが知られている。例えば、ミトコンドリア性糖尿病というミトコンドリア遺伝子異常(例えば塩基番号3243部位の変異)を有する糖尿病患者において、血糖調節後に下肢に疼痛が起こる例が多い(これについては、本発明者等は、米国糖尿病学会会誌に報告している。文献名:Suzuki, Yet al. (1994) Posttreatment neuropathy in dia 30 40 50

betics with mitochondrial tRNA^(Leu) mutation. Diabetes Care 17: 777-778)。これらの症状は、高血糖時のホメオスターシスから正常血糖時のホメオスターシスへ(図4から図5)急激に変化することによって起こると推察される。このような場合、細胞質内およびミトコンドリアにおいて、アルデヒド量も急激に変化し、それに伴いNADH/NAD⁺比も変化すると推察される。この調節には、ALDH2およびADH2が関与しているため、それらの遺伝子多型は、前記の治療後神経障害の発症や状態を予測する上で重要な意義を持つ。

【0032】

(ミトコンドリア遺伝子の異常)

ミトコンドリア遺伝子異常(例えば塩基番号3243部位の変異)は、通常、末梢血の白血球や、筋肉で検出することができる。ALDH2およびADH2は、末梢血内の白血球内に検出されるミトコンドリア遺伝子の変異量を制御するため、それらの多型が、ミトコンドリア遺伝子異常に関与していると推察できる。したがって、ALDH2遺伝子およびADH2遺伝子の多型を基礎にした本発明の分類およびマーカーは、ミトコンドリア遺伝子異常を診断する上で有用である。

【0033】

【実施例】

つぎに、本発明の実施例について説明する。

【0034】

2型糖尿病患者158名について、以下の方法により、ALDH2遺伝子とADH2遺伝子の多型を調べ、前記表1の4つのグループに分類した。そして、前記患者158名につき、性別、遺伝的特性、糖尿病発症年齢、身体的データ(身長、体重等)、神経障害および網膜障害の各項目について、前記4つのグループで比較した。その結果を、下記の表3に示す。

【0035】

(分析手法)

研究内容を説明した後、糖尿病患者から血液を研究に使用することに同意を得て、抹消血を採取した。血液の白血球より常法によって全DNAを抽出した。

【0036】

ADH2遺伝子多型はエクソン3部分をPCR法によって遺伝子断片を増幅し、制限酵素MaeIIIで切断後、2%アガロース電気泳動によって塩基配列の違いを判定した。MaeIIIで切断されたDNA断片は、ADH2β2遺伝子配列を含み、切断されないDNA断片はADH2β1遺伝子配列を含む。

【0037】

(PCRの具体的条件)

溶液: 50μL

DNA: 100ngから200ng程度

プライマー: 各5pmole

(5'-AATCTTTTCTGAATCTGAACAG-3'、5'-GAAGGGG
GGTCACCAAGGTTG-3')

dNTP: 50μMのdATP, dGTP, TTP, dCTP

MgCl₂: 1.5mM

TaqDNA polymerase: 1unit

反応条件: 94 30秒、58 2分、72 30秒のサイクルを35回くり返した。

【0038】

ALDH2遺伝子多型は、エクソン12部分をミスマッチPCR法によって遺伝子断片を増幅し、制限酵素EarIで切断後、2.5%アガロース電気泳動によって塩基配列の違いを判定した。切断されたDNA断片はALDH2¹遺伝子配列を含み、切断されないDNA断片はALDH2²遺伝子配列を含む。

10

20

30

40

50

【0039】

(PCRの具体的条件)

溶液: 50 μ L

DNA: 100 ng から 200 ng 程度

プライマー: 5 pmol e

(5' - TTACAGGGTCAACTGCTATG - 3'、5' - CCACACTCA
CAGTTTTTCTCTT - 3')dNTP: 50 μ M の dATP, dGTP, TTP, dCTPMgCl₂: 1.5 mM

TaqDNA polymerase: 1 unit

反応条件: 94 15秒、58 1分30秒、72 30秒のサイクルを35回くり返した。

【0040】

【表3】

	高活性型 ALDH2 (n=85)		低活性型 ALDH2 (n=73)	
	高活性型 ADH2 (n=41)	低活性型 ADH2 (n=44)	高活性型 ADH2 (n=41)	低活性型 ADH2 (n=32)
Group 番号	1	2	3	4
男性/女性	28/13	33/11	32/9	21/11
両親における糖尿病				
母親	6 (14.6%)	12 (27.3%)	16 (39.0%)	13 (40.6%)
その他	35 (85.4%)	32 (72.7%)	25 (61.0%)	19 (59.4%)
詳細				
母が糖尿病	5 (12.2%)	9 (20.5%)	15 (36.6%)	13 (40.6%)
父が糖尿病	4 (9.8%)	6 (13.6%)	5 (12.2%)	3 (9.4%)
母も父も糖尿	1 (2.4%)	3 (6.8%)	1 (2.4%)	0 (0.0%)
いずれも糖尿	31 (75.6%)	26 (59.1%)	20 (48.8%)	16 (50.0%)
母が糖尿病である 場合のオズ比	1	2.19 (0.74-6.51)	3.73 (1.28-10.88)	4.0 (1.31-12.20)
臨床的指標				
年齢 (歳)	59.1 $\pm$ 9.6	58.6 $\pm$ 10.6	58.7 $\pm$ 10.3	55.2 $\pm$ 12.9
糖尿病の発病年齢 (歳)	47.6 $\pm$ 10.4	48.1 $\pm$ 11.1	48.1 $\pm$ 12.1	42.3 $\pm$ 13.6
(>35 歳以下)	4 (9.8%)	6 (13.6%)	5 (12.2%)	9 (28.1%)
35 歳以下で発病する 患者のオズ比		1.46 (0.38-5.60)	1.29 (0.32-5.17)	3.62 (1.00-13.12)
糖尿病罹病期間 (年)	11.7 $\pm$ 7.3	10.3 $\pm$ 7.4	10.7 $\pm$ 8.1	13.2 $\pm$ 9.5
身長 (cm)	161 $\pm$ 10	162 $\pm$ 8	166 $\pm$ 8	160 $\pm$ 7
体重 (kg)	60.14 $\pm$ 11.3	61.7 $\pm$ 10.6	61.9 $\pm$ 11.0	57.8 $\pm$ 9.7
Body mass index	23.2 $\pm$ 3.9	23.4 $\pm$ 3.5	22.5 $\pm$ 3.5	22.5 $\pm$ 2.9
空腹時血糖値 (mmol/l)	8.3 $\pm$ 2.2	8.2 $\pm$ 1.8	8.3 $\pm$ 2.4	8.0 $\pm$ 3.0
HbA1c (%)	7.9 $\pm$ 1.4	7.7 $\pm$ 1.1	7.8 $\pm$ 1.3	8.0 $\pm$ 1.5
治療				
食事	10 (24.4%)	23 (52.3%)	16 (39.0%)	11 (34.4%)
経口糖尿病薬	13 (31.7%)	9 (20.5%)	14 (34.1%)	10 (31.3%)
インスリン	18 (44.0%)	12 (27.3%)	11 (26.8%)	11 (34.4%)
神経障害				
足の知覚障害がある患者	14 (34.1%)	8 (18.2%)	10 (24.4%)	16 (50.0%)
オズ比	1	0.43 (0.16-1.17)	0.62 (0.24-1.63)	1.93 (0.75-4.98)
重度の疼痛性神経障害 を有する患者数	0	0	1	2
網膜症				
所見ありの患者数	13 (31.7%)	13 (29.5%)	12 (29.3%)	13 (40.6%)
オズ比	1	0.90 (0.36-2.27)	0.89 (0.35-2.28)	1.47 (0.56-3.87)

() の中に示したのは、各群における群内での割合と、オズ比の confidence interval である。

10

20

30

40

50

【0041】

前記表3に示すように、各グループ(1~4)間で、さまざまな特徴が確認できた。まず、末梢神経障害の知覚異常の頻度が、グループ4とそれ以外のグループとで有意な差があり、グループ4が顕著に高かった。また、糖尿病の母親をもつ患者の頻度や、35歳未満で糖尿病を発病する患者の頻度が、グループ4では、他のグループと比較すると高値であった。これらの結果から、グループ4に分類された人は、母系遺伝により、ミトコンドリア遺伝子異常に関係した糖尿病の疾患表現形が遺伝しやすく、発症年齢も低いことが予測でき、また末梢神経障害がおこりやすと予測できる。一方、グループ1の場合は、糖尿病の血管障害に関係した合併症において特徴があった。すなわち、グループ1は、それ以外のグループよりも、タンパク尿や増殖性網膜症の頻度が高かった。

10

【0042】

(実施例2)

糖尿病患者14名について、ミトコンドリア遺伝子異常(3243変異)を、以下に示すPCR-REFP法およびAllele-Specific PCR法で検出すると共に、前述の方法により、前記表1の4つのグループに分類した。その結果を、下記の表4に示す。なお、前記ミトコンドリア遺伝子以上は、TaqMan PCR法によっても検出した。

【0043】

(PCR-REFLP法を用いたミトコンドリアDNA 3243変異の検出法)

100から200 ngのgenomic DNAを、5 pmolの各プライマーとミックスさせた。各プライマーは、(5'-CAAAATTACAGGGTCAAGGGCT-3' sense)および(5'-CCACACTTCACAGTTTTCTCTT-3' antisense)であり、50 μMのdNTP、1.5 mMのMgCl₂、1 UのTag DNA polymerase (Promega, Madison, WI)をミックスさせ増幅させた。PCR条件は、商品名GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer, Oak Brook, IL)を用い、94 15秒、58 1分30秒、72 30秒のサイクルを35回繰り返した(J Japan Diab Soc 38:401-404, 1995)。

20

【0044】

(Allele-Specific PCR増幅法を用いたミトコンドリアDNA 3243変異の検出および定量法)

末梢白血球から全DNAを抽出し、H鎖側に変異特異的プライマー3243G3'(5'-TTTTATGCGATTACCGGGCC-3')を用い、対となるプライマーcommon 5'(5'-AGGACAAAGAGAAATAAGGCC-3')とでPCRで増幅した。この方法はプライマー3'末端塩基にマッチした変異DNAは増幅されるが、ミスマッチの正常DNAは増幅されないという原理を利用した方法である。あらかじめPCR条件を検討し、94 1分、57 2分、72 30秒のサイクルを35回繰り返した。反応系は、合計50 μlで行い、プライマー各25 pmol, genomic DNA 100 ng, recombinant Taq DNA Polymerase (宝酒造) 1.25 Uを用いた(J Japan Diab Soc 38:401-404, 1995)。

30

40

【0045】

(TaqMan PCRを用いたミトコンドリアDNA 3243変異の検出および定量法)

ミトコンドリア遺伝子3243変異の検出において、プライマーは、ATTAAAGTCTACGTGATC (3,048-3,066)とATGCGATTACCGGGCC (3,258-3,243)を用いた。ミトコンドリアDNAの定量については、GCCCTTCCCCCGTAATAATGATAT (3,163-3,183)とGAAGAGGAATTGAACCTCTGACTG (3,298-3,275)を

50

用いた。TagMan プローブの塩基配列は、TGCCATCTTAACAACCC TGTTCCTTGGGTT (3, 241-3, 213) である。オリゴヌクレオチドは、HPLCで純化し、コンタミネーションを防いだ。PCR条件は、95 15秒、51 10秒、57 1分の40サイクルである。反応液には、ABI TaqMan buffer A, 0.05% glycerol, 2.5 mM MgCl₂, dATP, dGTP, dCTP, dTTPを各 0.16 mM, Ampli Taq Gold (ABI)を0.6 units, 100 nM TaqMan プローブ、200 nM の forward と reverse プライマーを、あるいは、300 nM の forward プライマーと 100 nM の reverse プライマーを含ませ、ミトコンドリアDNAの定量のために用いた。(野見山、他。D 10
iabetologia, in press, 2002)。

【0046】

【表4】

		ADH2 高活性	ADH2 低活性
Heteroplasmy		ALDS 分類 (1, 3)	ALDS 分類 (2, 4)
高値 (>約1%)	RFLP+, ASP+	8 名	0 名
低下 (<約1%)	RFLP-, ASP+	3 名	3 名

20

RFLP: PCR-RFLP 法の略、ASP: Allele Specific PCR amplification 法の略

【0047】

前記表4に示すように、糖尿病患者14名において、ミトコンドリア遺伝子異常(3243変異)をPCR-RFLP法およびAllele-Specific PCR増幅法の両方で検出できる患者8名中(ヘテロプラスミーは約1%以上と考えられる)、グループ1および3に属する患者は8名であった。また、PCR-RFLP法では検出しにくいが 30
Allele-Specific PCR増幅法では検出できた患者6名中、グループ1および3に属する患者は、3名であった。これらの結果は、ADH2遺伝子の多型が、末梢血白血球内のミトコンドリア遺伝子異常のヘテロプラスミーと関係する事を示す。したがって、本発明の分類方法およびマーカーにより、ミトコンドリア性糖尿病か否かを判断できるといえる。

【0048】

【発明の効果】

以上のように、本発明のマーカーおよび分類方法は、糖尿病および糖尿病合併症の診断並びに治療薬の評価等に有用である。したがって、本発明のマーカーおよび分類方法を用いれば、例えば、糖尿病の発症リスク、発症年齢、合併症の予測、体質にあわせた治療薬の 40
投与(テーラーメイド医療)等が可能となる。

【0049】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

Yoshihiko Suzuki

Shigeo Ohta

Marker for predicting diabetes and diabetic complication

10

1

21

DNA

Artificial sequence

1

caaattacag ggtcaagggc t 21

20

2

21

DNA

Artificial sequence

2

ccacactcac agttttctct t 21

30

3

22

DNA

Artificial sequence

40

3

aatcttttct gaatctgaac ag 22

4

20

DNA

Artificial sequence

10

4

gaaggggggt caccagggtg 20

5

22

DNA

Artificial sequence

20

5

aatcttttct gaatctgaac ag 22

6

20

DNA

Artificial sequence

30

6

gaaggggggt caccagggtg 20

7

20

DNA

40

Artificial sequence

7

ttacaggc aactgctatg 20

8

21

10

DNA

Artificial sequence

8

ccacactcac agttttctct t 21

9

21

DNA

Artificial sequence

9

caaattacag ggtaagggc t 21

10

10

21

DNA

Artificial sequence

10

ccacactcac agttttctct t 21

20

11

20

DNA

Artificial sequence

30

11

ttttatgcga ttaccgggcc 20

12

20

DNA

Artificial sequence

40

12		
aggacaagag aaataaggcc	20	
13		
19		
DNA		
Artificial sequence		10
13		
attaaagtcc tacgtgatc	19	
14		
16		
DNA		20
Artificial sequence		
14		
atgccattac cgggcc	16	
15		
21		30
DNA		
Artificial sequence		
15		
gccttcccc gttaatgata t	21	
16		40
24		

DNA

Artificial sequence

16

gaagaggaat igaacctctg actg 24

17

30

DNA

Artificial sequence

17

tgccatctta acaaaccctg ttcttgggtt 30

10

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】高血糖状態のアルデヒドの代謝を示す図である。

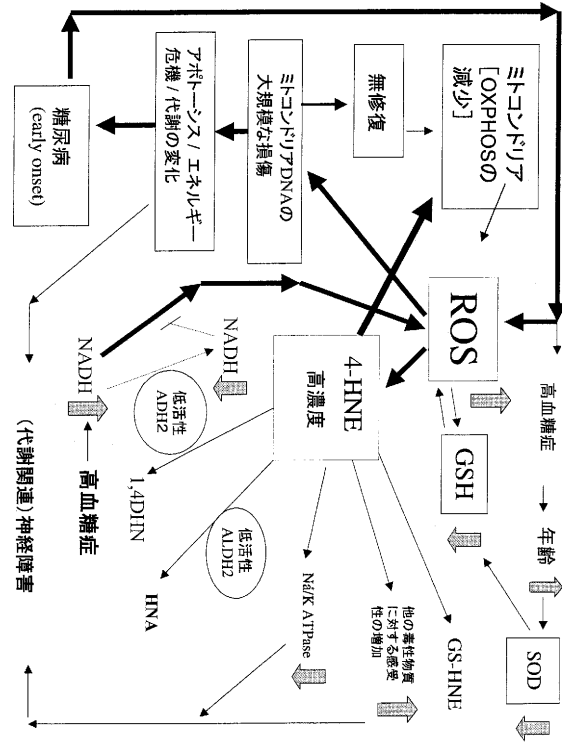
【図 2】アルデヒドが高濃度の場合の代謝を示す図である。

【図 3】アルデヒドが低濃度の場合の代謝を示す図である。

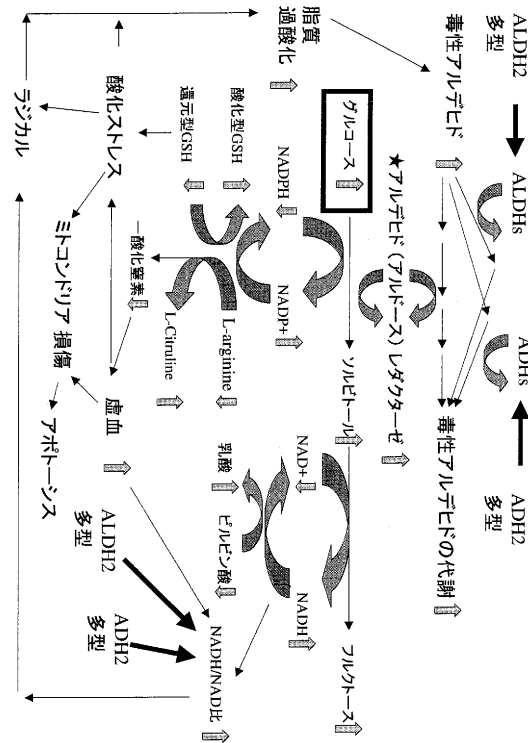
【図 4】高血糖状態のポリオール代謝を示す図である。

【図 5】高血糖を長く続けていた糖尿病患者が、インスリン療法や経口血糖降下薬他、糖尿病治療薬などによって、短期間に、急激に血糖コントロールが改善した場合の、ポリオール代謝を上流として考えた影響を示す図である。

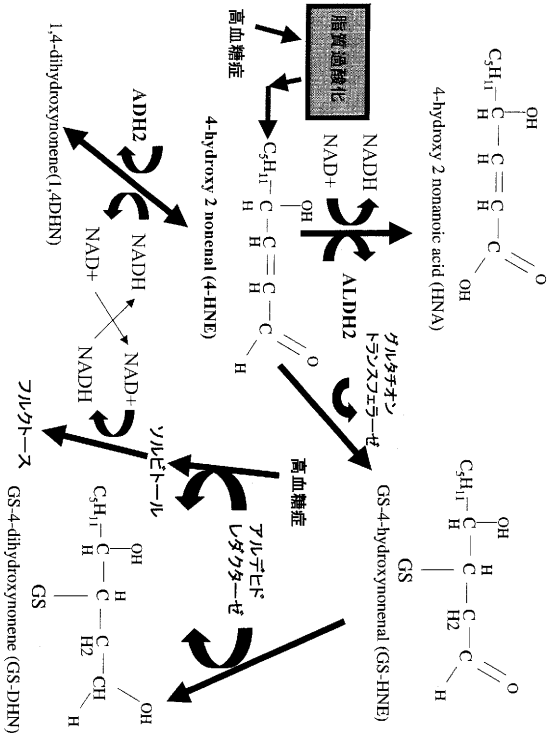
【図 2】



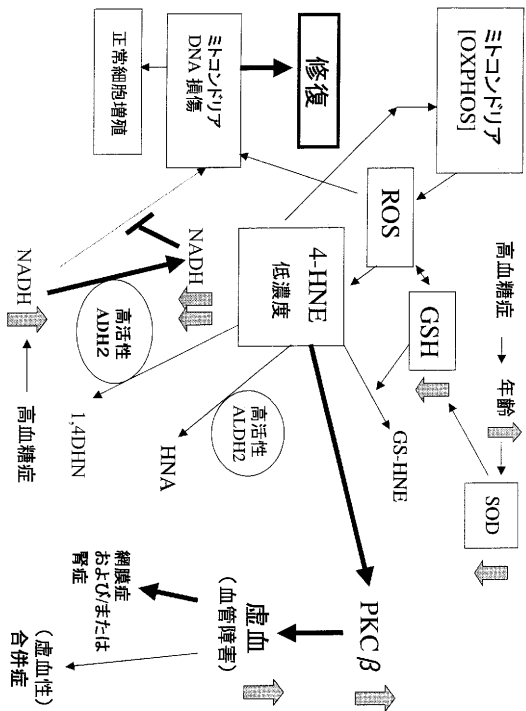
【図 4】



【図 1】



【図 3】



[illegible]

 フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 37/00	1 0 2
// C 0 7 K 16/40	C 0 7 K 16/40	

F ターム(参考) 4B050 CC08 LL03

4B063	QA19	QQ03	QQ24	QQ44	QQ79	QQ96	QR08	QR32	QR42	QR48
	QR55	QR82	QS25	QS26	QS33	QS34	QX01			
4H045	AA11	BA10	CA40	DA76	EA50	FA71				

专利名称(译)	用于预测糖尿病和糖尿病相关疾病的标记物和个体分类方法		
公开(公告)号	JP2004081156A	公开(公告)日	2004-03-18
申请号	JP2002249326	申请日	2002-08-28
[标]申请(专利权)人(译)	大田茂雄		
申请(专利权)人(译)	大田茂雄 铃木吉彦		
[标]发明人	太田成男 鈴木吉彦		
发明人	太田 成男 鈴木 吉彦		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/40 C12M1/00 C12M1/34 C12N9/04 C12N15/09 C12Q1/32 C12Q1/68 G01N37/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12M1/00.A C12M1/34 C12N9/04.E C12Q1/32 C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N37/00.102 C07K16/40 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/HA12 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB16 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA13 4B050/CC08 4B050/LL03 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ24 4B063/QQ44 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS26 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA71		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种人类分类方法，可用于诊断糖尿病和糖尿病相关疾病，以及评估疾病的治疗剂。ŽSOLUTION：人类个体分为由高活性型ALDH2和高活性型ADH2组成的组1，由高活性型ALDH2和低活性型ADH2组成的组2，由低活性型ALDH2和高活性型组成的组3ADH2和基于ALDH2和ADH2的活性水平的由低活性型ALDH2和低活性型ADH2组成的组4。通过分类可以预测细胞质和线粒体中醛的量，以预测糖尿病和糖尿病并发症的发病风险。Ž

