

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-518812

(P2005-518812A)

(43) 公表日 平成17年6月30日(2005.6.30)

(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 Z N A A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B 0 2 9
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 27/06	A 6 1 P 27/06	4 C 0 8 4
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00 A	4 C 0 8 6
	審査請求 有 予備審査請求 未請求	(全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-573180 (P2003-573180)
 (86) (22) 出願日 平成14年3月1日(2002.3.1)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年8月31日(2004.8.31)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2002/000648
 (87) 国際公開番号 W02003/074735
 (87) 国際公開日 平成15年9月12日(2003.9.12)
 (81) 指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, C H, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, P L, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

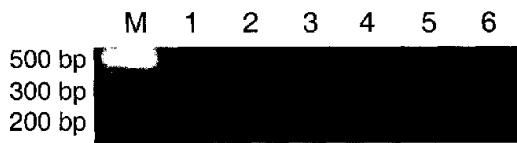
(71) 出願人 504330672
 フラマー、ヨセフ
 スイス、ツェーハー 4 1 0 2 ビニンゲン、オブ デム ヒューグリアッカー 7 6
 (74) 代理人 100071054
 弁理士 木村 高久
 (72) 発明者 ゴルブニッシャーヤ、オルガ
 ドイツ、5 3 1 2 5 ボン、チャールズー
 ヴィマー シュトラーセ 4 4
 Fターム(参考) 4B024 AA11 CA09 HA12 HA17
 4B029 AA07 AA23 BB20 FA15
 4B063 QA19 QQ02 QQ03 QQ43 QQ44
 QR55 QR82 QS32
 4C084 AA13 NA14 ZA332
 4C086 AA01 EA16 NA14 ZA33

(54) 【発明の名称】 緑内障の診断方法

(57) 【要約】

本発明は、緑内障を診断および/または予測するためのエクスピボ方法に関する。前記方法は、ヒト個体の組織および/または血液サンプルにおいて、少なくとも組織リモデリングに関連する遺伝子の群から選択される遺伝子の改変された遺伝子発現パターンを検出することを含んでなる。さらに、本発明は、指定された遺伝子群の遺伝子の核酸プローブを含んでなるDNAマイクロアレイに関する。

MMP9_K



MMP9_N



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

緑内障を診断および/または予測するためのエクスピボ方法であって、
ヒト個体の組織および/または血液サンプルにおいて、少なくとも組織リモデリングに関連する遺伝子の群から選択される遺伝子の改変された遺伝子発現パターンを検出すること、
を含んでなる方法。

【請求項 2】

前記遺伝子発現パターンは、DNA修復に関連する遺伝子および/または細胞付着に関連する遺伝子および/または虚血/再灌流障害に関連する遺伝子もしくは緑内障障害の影響を受けた遺伝子の群から選択される遺伝子をさらに含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記遺伝子発現パターンは、少なくとも 1 つの遺伝子が 4 つの遺伝子群のそれぞれに由来する、合計で少なくとも 4 つの遺伝子、好ましくは合計で少なくとも 8 つの遺伝子を含んでなる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記改変された遺伝子発現パターンは転写レベルで決定される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

組織リモデリングに関連する前記遺伝子の群は、以下の遺伝子：
メタロプロテイナーゼ、メタロプロテイナーゼ阻害因子およびプロテイナーゼ 3、
を含んでなる、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

DNA修復に関連する前記遺伝子の群は、以下の遺伝子：
XPGC、14-3-3、p53、MDR-X、サービピン、DEADボックスXアイソフォームタンパク質(DBX)、X連鎖網膜症タンパク質、STM2遺伝子家族性アルツハイマー病、MRCCK(筋強直性ジストロフィーキナーゼ関連cdc42結合キナーゼ)、チオレドキシン、NF-B、アポトーシスタンパク質1の阻害因子(HIAP1、API1)、IAP相同体C、TNFR2-TRAFシグナリング複合体タンパク質、MHC、サイクリンA1、グアニンヌクレオチド結合タンパク質G(I)/G(S)/G(T)サブユニット1(GNB1)、トランスデュシン-1サブユニット、
を含んでなる、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

細胞付着に関連する前記遺伝子の群は、以下の遺伝子：
E-カドヘリン、チトロムP450、シクロオキシゲナーゼ2、rhoGDP解離因子1、rhoGDI、ARHGDI A、チモシン、VEGFR1、チロシントタンパク質キナーゼ受容体SFLT、ホスホリパーゼC-1、1-ホスファチジル-イノシトール-4,5-ビスホスフェート-ホスホジエステラーゼ-1、PLC-II、PLC-148、68kDa I型ホスファチジル-イノシトール-4-ホスフェート-5-キナーゼキナーゼ、1-ホスファチジルイノシトール-4-ホスフェートキナーゼ、ジホスホ-イノシチドキナーゼ、Gタンパク質活性型内向き整流性カリウムチャンネル3、KIR3.3、グアニンヌクレオチド結合タンパク質G(I)/G(S)/G(T)サブユニット1、トランスデュシン-1サブユニット、Racセリン/スレオニンキナーゼ、タンパク質キナーゼB、c-akt、akt1、
を含んでなる、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

虚血/再灌流障害に関連するかもしくは緑内障障害の影響を受けた前記遺伝子の群は、以下の遺伝子：

20Sプロテオソーム、NTP、Jun-D、c-jun N末端キナーゼ(JNKK

10

20

30

40

50

)、JNK活性化キナーゼ1 (JNK K1)、MAPキナーゼ4 (MKK4)、SRp20スプライシング因子、リンパ球IgE受容体、トロンボキサンA2受容体、Na⁺/K⁺-ATPase、ITK、アルカリホスファターゼ、を含んでなる、請求項1~7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

前記改変された遺伝子発現は、白血球、好ましくは、末梢リンパ球、単球および幹細胞において決定される、請求項1~8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

固相支持体に固定化された核酸プローブのアレイであって、ここで、前記アレイは、組織リモデリングに関連する前記遺伝子の群から選択される遺伝子の少なくとも核酸プローブを含んでなるアレイ。

10

【請求項11】

前記アレイは、DNA修復に関連する遺伝子および/または細胞付着に関連する遺伝子および/または虚血/再灌流障害に関連する遺伝子もしくは緑内障の影響を受けた遺伝子の前記群から選択される遺伝子の核酸プローブをさらに含んでなる、請求項9に記載のアレイ。

【請求項12】

前記核酸プローブは請求項5~8のいずれか1項に記載の遺伝子から選択される、請求項9または10に記載のアレイ。

【請求項13】

前記アレイは上記に記載の4種の遺伝子群から選択される遺伝子の核酸プローブのみを含んでなる、請求項10~12のいずれか1項に記載のアレイ。

20

【請求項14】

緑内障を診断および/または予測するためのエクスピボ方法における請求項10~13のいずれか1項に記載のアレイの使用。

【請求項15】

緑内障を診断および/または予測するための前記エクスピボ方法は請求項1~9のいずれか1項に記載の方法である、請求項14に記載の使用。

【請求項16】

緑内障の体細胞遺伝子療法のための請求項1~15のいずれか1項に記載の4種の遺伝子群から選択される遺伝子の使用。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、緑内障を診断および/または予測するための方法ならびに核酸プローブのアレイに関する。

【背景技術】

【0002】

緑内障は、アポトーシスプロセスによっていくつかの網膜神経節細胞(RGC)が死滅する視神経障害である。

40

【0003】

原発開放隅角緑内障(POAG)は、緑内障の最も一般的な形態である。該疾患は、小柱網の改変を特徴とし、空所を閉止せずに眼球を放置するための水分の正常な能力が妨害される。本疾患のそのような妨害の特徴は眼内圧(IOP)の上昇であり、適切かつ適時に処置されなければ進行性の視力の消失および失明を生じる。

【0004】

緑内障のもう1つの形態は、統計的に正常な眼内圧(IOP 21 mmHg)を伴う進行性視神経障害および視野の消失を特徴とする。この形態の緑内障は正常眼圧緑内障(NTG)に分類される。

50

【0005】

過去に、緑内障を診断するための異なるインビボおよびエクスピボ診断方法が記載されている。

【0006】

国際公開第98/44108号パンフレットは、緑内障を診断するためのインビボおよびインビトロ方法を開示しており、ここで、前記方法は、小柱網誘導性グルココルチコイド応答タンパク質(TIGR)の発現の決定に基づく。

【0007】

国際公開第98/36098号パンフレットは、遺伝子チトクロムP450B1の変異の検出に基づく緑内障を診断するためのインビトロ方法について記載している。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

上記で同定された先行技術は緑内障の診断方法について記載しているが、緑内障発達または該疾患の進行のための素因を有する患者の正確な同定を可能にする利用可能な方法は現在のところない。

【0009】

従って、緑内障を診断および/または予測するための信頼できる方法ならびに前記方法の使用に適切な手段が緊急に必要とされている。

【課題を解決するための手段】

20

【0010】

従って、本発明の一般的目的は、緑内障を診断および/または予測するためのエクスピボ方法を提供することである。前記方法は、ヒト個体の組織および/または血液サンプルにおいて、少なくとも組織リモデリングに関連する遺伝子の群から選択される遺伝子の改変された遺伝子発現パターンを検出することを含んでなる。

【0011】

用語「改変された遺伝子発現」は、健常被験体において観察される平均的な遺伝子発現レベルと比較して目的の遺伝子の遺伝子発現の増加および遺伝子発現の減少を包含する。ヒトの健康状態の決定は、通常、患者の健康に関する自覚症状の説明、医師による問診および患者の身体的検査に基づく。

30

【0012】

本明細書において使用される用語である緑内障は、臨床上観察される全ての形態の緑内障を含んでなる。

【0013】

本方法の好適な実施態様では、前記遺伝子発現パターンは、以下の群：DNA修復に関連する遺伝子、細胞付着に関連する遺伝子、虚血/再灌流障害に関連する遺伝子もしくは緑内障障害の影響を受けた遺伝子の群から選択される遺伝子から選択される遺伝子をさらに含んでなる。

【0014】

本方法のさらに好適な実施態様では、前記遺伝子発現パターンは、少なくとも1つの遺伝子が前記4つの遺伝子群のそれぞれに由来する、合計で少なくとも4つの遺伝子を含んでなる。より好適な実施態様では、前記遺伝子発現パターンは、少なくとも2つの遺伝子が前記4つの遺伝子群のそれぞれに由来する、合計で少なくとも8つの遺伝子を含んでなる。

40

【0015】

前記4つの遺伝子群の遺伝子の任意の組み合わせは、本発明の方法の使用に適切であると理解されなければならない。例えば、第1の群の2つの遺伝子、第2の群の1つの遺伝子、第3の群の4つの遺伝子および第4の群の3つの遺伝子を使用することが可能である。

【0016】

50

本発明の遺伝子の前記改変された遺伝子発現は、転写レベルで好適に決定される。

【0017】

組織リモデリングに関連する遺伝子群の好適な遺伝子は、以下の遺伝子：

メタロプロテイナーゼ、メタロプロテイナーゼ阻害因子およびプロテイナーゼ3、
である。

【0018】

DNA修復に関連する遺伝子の群の好適な遺伝子は、以下の遺伝子：

XPGC、14-3-3（ストラティフィン（*stratifin*））、p53、MDR-X（ABC（ATP-結合カセット）-輸送体、サービピン、DEADボックスX
アイソフォームタンパク質（DBX）、X連鎖網膜症タンパク質、STM2遺伝子家族性
アルツハイマー病、MRCK（筋強直性ジストロフィーキナーゼ関連cdc42結合キナ
ーゼ）、チオレドキシン、NF- κ B、アポトーシスタンパク質1の阻害因子（HIAP1
、API1）、IAP相同体C、TNFR2-TRAFシグナリング複合体タンパク質、
MHC、サイクリンA1、グアニンヌクレオチド結合タンパク質G（I）/G（S）/
G（T）サブユニット1（GNB1）、トランスデュシン-1サブユニット、
である。

【0019】

細胞付着に関連する遺伝子群の好適な遺伝子は、以下の遺伝子：

E-カドヘリン、チトクロムP450、シクロオキシゲナーゼ2、rhoGDP解離因
子1、rhoGDI、ARHGDI A、チモシン、VEGFR1、チロシントンパ
ク質キナーゼ受容体SFLT、ホスホリパーゼC-1、1-ホスファチジルイノシトール
-4,5-ビスホスフェート-ホスホジエステラーゼ-1、PLC-II、PLC-14
8、68kDa I型ホスファチジル-イノシトール-4-ホスフェート-5-キナーゼ
キナーゼ、1-ホスファチジルイノシトール-4-ホスフェートキナーゼ、ジホスホ
イノシチドキナーゼ、Gタンパク質活性型内向き整流性カリウムチャンネル3、KIR3
.3、グアニンヌクレオチド結合タンパク質G（I）/G（S）/G（T）サブユニッ
ト1、トランスデュシン-1サブユニット、Racセリン/スレオニンキナーゼ、
タンパク質キナーゼB、c-akt、akt1、
である。

【0020】

虚血/再灌流障害に関連するもしくは緑内障障害の影響を受けた遺伝子の群の好適な
遺伝子は、以下の遺伝子：

20Sプロテオソーム、NTP、Jun-D、c-jun N末端キナーゼ（JNKK
）、JNK活性化キナーゼ1（JNKK1）、MAPキナーゼ4（MKK4）、SRp2
0スプライシング因子、リンパ球IgE受容体、トロンボキサンA2受容体、Na⁺/K⁺
-ATPase、ITK、アルカリホスファターゼ、
である。

【0021】

本発明の特に好適な実施態様では、前記改変された発現は、白血球、好ましくは、末梢
リンパ球、単球および幹細胞において決定される。

【0022】

本発明のもう1つの目的は、固相支持体に固定化された核酸プローブのアレイであって
、ここで、前記アレイは、組織リモデリングに関連する遺伝子の群から選択される遺伝子
の核酸プローブを含んでなる。

【0023】

本発明の前記アレイは、以下の遺伝子群：DNA修復に関連する遺伝子、細胞付着に関
連する遺伝子、虚血/再灌流障害に関連する遺伝子もしくは緑内障障害の影響を受けた遺
伝子から選択される遺伝子の核酸プローブをさらに含んでなる。

【0024】

好適な実施態様では、前記アレイは、上記で同定された4種の遺伝子群のそれぞれから

10

20

30

40

50

選択される遺伝子の核酸プローブを含んでなる。

【0025】

もう1つの好適な好適な実施態様は、上記で規定された4種の遺伝子群から選択される遺伝子の核酸プローブのみを含んでなるアレイに関する。

【0026】

本発明のアレイは、緑内障を診断および/または予測するためのエクスピボ方法、好ましくは、本発明の緑内障を診断および/または予測するための方法において使用することができる。

【0027】

本発明のさらなる目的は、緑内障の体細胞遺伝子療法のための上記で規定された3種の遺伝子群の遺伝子の使用である。

【0028】

本発明は、以下に記載の本発明の詳細な説明を考慮すれば、本発明がさらに理解され、上記以外の目的についても明らかとなるであろう。該説明は、添付の図面を参考にする。

【発明を実施するための最良の形態】

【0029】

本発明の方法によって特定の遺伝子の発現パターンを決定することにより、緑内障患者の正確な診断および慢性緑内障の発達または該疾患の進行の素因を伴う患者の正確な同定が可能である。本発明の方法は、多くの診断上の利点を提供する。例えば、前記方法は高感度であり、患者から小組織サンプルおよび/または少量の体液、特に血液を採取/回収することによって侵襲が最小限である。

【0030】

当業者であれば、本発明の方法において用いることができる適切な遺伝子発現検出方法を知っている。前記方法は、例えば、ノーザンブロット分析、RT-PCR、リアルタイム定量PCR、免疫組織化学法、ELISA、ドットブロット分析を含んでなる。

【0031】

好適な実施態様では、遺伝子発現レベルが転写レベルで決定され、即ち、RNA転写物の量が決定される。患者の生物学的サンプル、例えば、組織サンプル、好ましくは、血液サンプルは、mRNA単離および精製のために確立された方法の1つを使用して処理され、mRNAが単離される。好ましくは、RNAは末梢血白血球から単離される。次いで、単離されたRNAは、逆転写酵素による反応でDNAに転写される。次いで、得られるcDNAは、本発明の方法によって分析することができる。本発明における使用に特に適切な方法は、遺伝子の発現レベルの迅速な決定を可能にするRT-PCRである。RT-PCRのためのプライマーは、遺伝子の非保存領域が増幅されるように好適に選択される。

【0032】

前記RNA転写物を検出するための好適な手段はDNAマイクロアッセイである。DNAマイクロアッセイの構築およびそれらの使用は、当該分野において周知である。例えば、DNA Microarrays: A practical approach、M. シェーナ (M. Schena) 編、オックスフォード大学出版 (Oxford University Press)、英国オックスフォード (Oxford, UK)、1999; レミュックス (Lemieux) ら、Overview of DNA Chip Technology, Molecular Breeding 1998, 4, p. 277-289; およびインターネットサイト <http://www.gene-chip.com> ならびに本明細書において引用した参考文献を参照のこと。

【0033】

アレイは、固相支持体に固定化された核酸プローブを含んでなる。本明細書において使用される用語「核酸プローブ」は、例えば、オリゴヌクレオチド、部分的または完全なcDNAを対形成させることによって、相補配列の標的核酸に結合することが可能な一本鎖核酸を包含する。核酸プローブは、天然または修飾された塩基を含むことができる。核酸プローブは、10~500、10~250、10~150、10~75、10~50およ

10

20

30

40

50

び10～25塩基長の間であり得る。使用されるプローブの特定の長さは特定の遺伝子に依存し、前記長さはそれぞれの遺伝子について当業者によって決定されなければならない。

【0034】

好適な実施態様では、前記核酸プローブは、目的のタンパク質の非保存ドメイン、より好ましくは、目的のタンパク質の非保存N末端ドメインまたは非保存C末端ドメインに由来する。

【0035】

DNAアレイを使用する本発明の方法の例示的实施態様は、以下の工程：核酸のサンプルの調製、核酸のサンプルのアレイへのハイブリダイゼーション、ハイブリダイズした核酸の検出およびハイブリダイゼーションパターンの分析を含んでなる。

10

【0036】

核酸サンプルの調製は、典型的に、以下の工程：組織ならびに/あるいは体液サンプルからのmRNAの単離および精製、cDNAへの逆転写および必要に応じて第2鎖の合成を含む。合成されたcDNAは、典型的に標識される。標識は、例えば、組み入れられるヌクレオチドの1つによって導入することができる。仕様に適切な検出可能な標識は、例えば、分光的、光化学的、生化学的または免疫化学的手段を含む。

【0037】

1つの検出方法では、サンプルのmRNAから誘導される変性され標識された核酸は、アレイに適用される。前記核酸は、アレイに固定化された相補的プローブにハイブリダイズし、標識を検出することによってハイブリダイゼーションが同定される。標識の位置は、アレイにおけるそれぞれのプローブについて検出され、あれ以上のプローブに相補的であるそれぞれの配列の濃度は、例えば、読み取り器を使用して蛍光強度を測定することによって決定される。患者サンプルのハイブリダイゼーションパターンをコントロールサンプルと比較すると、どのプローブが2つのサンプル間での発現に差異が認められるmRNAから誘導される核酸鎖にハイブリダイズするかが示される。コントロールの発現パターンとは異なる患者サンプルの発現パターンは、緑内障または緑内障の素因を示す。

20

【0038】

緑内障に関連する遺伝子またはそのアンチセンスオリゴヌクレオチドの上記で規定された群の遺伝子は、緑内障の遺伝子治療に使用することができる。

30

【0039】

遺伝子治療のために、上記で同定された群のタンパク質をコードする核酸は、適切なベクター、好ましくは、アデノウイルスベクターに導入され、対象となる標的細胞、好ましくは視神経の神経節細胞における前記タンパク質の発現を可能にする。遺伝子治療に適切であり、特定の遺伝子の発現を可能にする上記ベクターは、標的細胞特異的プロモーターの制御下でコードする核酸を含んでなる。遺伝子治療方法およびベクターシステムについては、例えば、Gene Therapy, T. Blankenshtein)、1998およびGene Therapy - from laboratory to the clinic、カムM.フイ(Kam M. Hui)編に記載されている。

40

【実施例】

【0040】

実施例によって、本発明をさらに例示する。

【0041】

目的

血管攣縮症候群の患者間の分子レベルに対する特異的差異について調べるために、正常眼圧緑内障(NTG)患者および高眼圧緑内障(HTG)患者を健常コントロールと比較した。

【0042】

結果

50

1. コメットアッセイ

初期DNA損傷の評価。生細胞の解凍直後、健常コントロールの大部分(55%)は、僅かな程度のDNA損傷を示した(クラス2)が、重度のDNA損傷を示したのはこのグループの僅か5%に過ぎない(クラス4)。25%ではDNA損傷を観察することができなかった(クラス1)が、健常コントロールの15%はクラス3に分類することができた。NTG患者では、より高い程度のDNA損傷への移行を観察することができた。NTG患者から誘導される細胞は、41%の百分率でクラス3の状態(中等度のDNA損傷)で主に検出することができた。また、コントロールと比較すると、重度のDNA損傷の状態(クラス4)の細胞の百分率は、26%にまで増加した。DNA損傷を伴わない細胞の量はむしろ安定に保持された(29)が、クラス2の状態の細胞の量は4%に減少した。HTG患者の分布パターンは、NTG患者のグループにむしろ類似した。細胞の大部分(47%)は、中等度の状態(クラス3)のDNA損傷を示し、細胞の21%はDNA損傷を示さず、10%は軽度(クラス2)を示し、22%は重度のDNA損傷(クラス4)を示した。図1に、NTG患者および健常コントロールの分布パターンを示す。毛細血管拡張性運動失調の患者はDNA損傷に対する陽性コントロールとしての役割を果たした。

10

【0043】

インビトロインキュベーション後のDNA損傷の評価。解凍後、細胞は、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)中、37℃で、3時間の再生期間を経た。その後、DNAの状態を決定した。解凍直後の評価を比較すると、健常コントロールから誘導される細胞の大部分は、それぞれDNA損傷なし(31%;クラス1)および、軽度(26%;クラス2)に移行した。さらに、27%の細胞は、中等度のDNA損傷(クラス3)を示し、16%は重度のDNA損傷(クラス4)を示した。対照的に、NTG患者のグループ内では、DNAが損傷を受けていない細胞の量の増加を観察することはできなかった。平均で、以下のような分布が認められた: DNA損傷なし(クラス1)が13%、軽度のDNA損傷(クラス2)が29%、中等度のDNA損傷(クラス3)が32%および重度のDNA損傷(クラス4)が26%。HTG患者のグループ内では、細胞の大部分は、54%で中等度のDNA損傷(クラス3)および36%で重度のDNA損傷(クラス4)を示すことができた。平均で、10%の細胞をクラス1(DNA損傷なし)および5%をクラス2(軽度のDNA損傷)に分類することができた。

20

【0044】

2. サブトラクティブ・ハイブリダイゼーションおよびドットプロット

サブトラクトされたcDNAは、全てのNTG患者について極めて類似のパターンを示した。サブトラクトされたcDNAをクローニングし、配列決定した。それらの配列をデータバンク(Genbank)と比較すると、表1および2に列挙される以下の公知のタンパク質をコードする遺伝子との相同性が示された。健常コントロールと比較したNTG患者の異なる発現パターンをより良好に可視化するために、6例のNTG患者および6例の健常コントロールによるドットプロットを実施した。結果を図2に示す: コントロールと比較して、NTG患者は、mRNA発現のレベル上でp53および20S-プロテアソームサブユニットの若干の増加、ならびに神経系タンパク質(NTF)の発現のより強力な増加を示した。対照的に、mRNA発現は、XPGC(色素性乾皮症相補性群因子)、サービピンおよび新規に同定された遺伝子MDR-Xについては減少した。

30

40

【0045】

【表 1】

NTG患者のリンパ球においてアップレギュレートされた遺伝子の相同性 (hs - ホモサピエンス)

遺伝子の名称	EMBL 受託番号	生物	cDNAの長さ (bp)	アミノ酸配列 の類似製%
p53 細胞性腫瘍抗原	X02469	hs	796	100
20S-プロテアソームサブユニット XAPC7	AF022815	hs	168	99
アルツハイマー病に関連する神経系 タンパク質AD7c-NTP (Alu反復含有ドメイン)	AF010144	hs	213	87

10

【0046】

【表 2】

NTG患者のリンパ球においてダウンレギュレートされた遺伝子の相同性 (hs - ホモサピエンス)

遺伝子の名称	EMBL 受託番号	生物	cDNAの長さ (bp)	アミノ酸配列 の類似製%
アポトーシス阻害因子 サーベピン遺伝子	U75285	hs	312	100
XPGC遺伝子	X71347	hs	174	100(cDNA)
仮想ABC輸送体ATP結 合タンパク質 HI0354;MDR-X	P44656	ヘモフィルス・ インフルエンザ	327	83

20

【0047】

XPGC転写物の増幅。ドットプロット実験に加えて、RT-PCRを実施して、XPGC遺伝子発現を評価した。図3に示される通り、すべてのNTG患者は、XPGC遺伝子発現の欠損を示した。対照的に、1例のボランティア(n.5)を除く全ての健常コントロールにおいて、XPGCが検出可能であった。ボランティアn.5の再調査では、視神経乳頭の緑内障性陥凹が認められたが、視野は正常であった。このことは、該個体はa) 緑内障を発達する危険性があり、b) 既に視野測定以前の緑内障(perimetrimetry glaucoma)を患っていることを示す。

30

【0048】

3. アトラス(Atlas)cDNA発現アレイ

緑内障患者対健常コントロールのスクリーニングされた遺伝子のスペクトルを、イメージシステム(Imagine System)と組み合わせたcDNA発現アレイを使用することによって拡張した。結果は、コントロールと比較して、緑内障患者の92遺伝子の改変された遺伝子発現を示した。遺伝子のうち33遺伝子はダウンレギュレーションを示し、59遺伝子はアップレギュレートされた。組織リモデリングに必要なタンパク質の一群であるメタロプロテイナーゼに注目すると、以下の遺伝子の発現パターンが、緑内障患者の白血球において改変されたことが見出された：マトリックスメタロプロテイナーゼ9(MMP-9)および膜型マトリックスメタロプロテイナーゼ1(MT1-MMP)のアップレギュレーション、ならびにメタロプロテイナーゼ阻害因子1前駆体1(TIMP-1)のレギュレーション不全。MMP-9およびMT1-MMPについての結果はサブトラクティブ・ハイブリダイゼーションによって確認することができ、リアルタイムQPCR(定量PCR)を確認することができた。上記のスクリーニングされた遺伝子のデータを表3に列挙する。

40

50

【 0 0 4 9 】

【 表 3 】

遺伝子の名称	ジェンバンク 受託番号	生物	cDNAの長さ (bp)	アミノ酸配列 の類似製%
マトリックスメタロプロテイナーゼ9 (MMP-9;ゼラチナーゼB; 92-kDa IV型コラゲナーゼ 前駆体)	BC006093	hs	683	100
膜型マトリックスメタロプロテ イナーゼ1(MT1-MMP、 MMP-14前駆体)	X83535	hs	239	100
メタロプロテイナーゼ阻害因子1 前駆体1(TIMP-1)	X03124	hs	発現アレイに よってのみ 実施される	発現アレイに よってのみ 実施される

10

【 0 0 5 0 】

4. 特異的 RT - PCR を使用する標的遺伝子発現の確認

RT - PCR によって MMP - 9 および MT 1 - MMP の c DNA フラグメントを増幅して、健常コントロールとは対照的に緑内障患者の循環白血球におけるそれらのフラグメントの導入を確認した(図 4 C ~ F)。c DNA 合成の内部コントロールとして、ハウスキーピング遺伝子 アクチンを増幅した(図 4 A および B)。

20

【 0 0 5 1 】

5. 制限分析

標的 PCR 産物の増幅を、制限分析によって確認した。3%「広範囲」アガロースゲルにおける標的 RT - PCR 産物の制限分析。図 5 において、レーン 1 は、非消化増幅産物に属し;レーン 2 および 3、ならびにさらに 4 および 5 は選択されたエンドヌクレアーゼによる消化によって得られた増幅産物に属する。A l u I を使用して、制限分析を実施し、58 および 151 塩基対 (bp); 図 5 A) のフラグメントを得、45 および 164 bp のフラグメントについては A v a I、フラグメント 15、44 および 159 bp につ

いては H a e I I I、フラグメント 77 および 132 bp については R s a I を使用し、全て 209 bp の アクチン増幅産物に由来した。289 bp の MMP - 9 増幅産物由来のフラグメントを得るために、A l u I を使用して制限分析を実施し、40、123 および 125 bp フラグメントのフラグメントを得、46 および 243 bp のフラグメントを得るために H p a I I、123 および 166 のフラグメントを得るために P v u I I、ならびに 142 および 147 bp のフラグメントを得るために R s a I を使用した(図 5 B)。

295 bp の MT 1 - MMP 増幅産物からフラグメントを得るために、6、54、58、69 および 108 bp のフラグメントには H a e I I I、ならびに 125 および 170 bp のフラグメントには R s a I を使用して、制限分析を実施した(図 5 C)。

393 bp の T I M P - 1 増幅産物からフラグメントを得るために、2、30、96 および 265 bp のフラグメントには H a e I I I、154 および 239 bp のフラグメントには H i n d I I、152 および 241 bp のフラグメントには H p a I I ならびに 28、29 および 336 のフラグメントには P s t I を使用して、制限分析を実施した(図 5 D)。

30

40

【 0 0 5 2 】

5. リアルタイム PCR を使用する遺伝子発現の定量分析

目的の遺伝子およびハウスキーピング遺伝子 アクチンの個々の C_t 値に基づいて、相対的遺伝子発現を算出した。健常ボランティアとは対照的に、全ての緑内障患者の白血球は MMP - 9 の発現を示したが、転写レベルでは両極端の症例間で 5 倍までの差異を示した。また、T I M P - 1 の転写レベルはこれらの患者では極めて異質であり、サンプルによって 25 x までの差異が認められる。さらに、MMP - 9、および M I M P - 1 間の転

50

写の増加には相関関係が存在しない。MT1 - MMPは5例の緑内障患者では高度に発現され、1例の患者では弱く発現される。

【0053】

結論

1. フラグメント化されたDNAの程度に依存して、正常眼圧緑内障(NTG)患者は、正常と比較して、それほど十分なDNA修復能力を示さない。

【0054】

2. また、これらの患者は、様々な遺伝子の発現パターンが正常とは異なる。遺伝子は、a) 組織リモデリング、b) DNA修復、c) 虚血-再灌流およびd) 付着に關与する遺伝子ファミリーに属する。

10

【0055】

材料および方法

1. 血液サンプル

NTGおよびHTG患者ならびに健常コントロールから血液サンプルを回収した。全ての緑内障患者は、両側の典型的緑内障性視神経乳頭陥凹および視野欠損を有した。NTG患者では、眼内圧(IOP)は決して21mmHgを超えなかったが、指の局所冷却後、これらの全てのNTG患者は20秒間を超える血流の停止を示し、これは、爪縁部の毛細管顕微鏡によって検出した(血管攣縮を示す)。対照的に、HTG患者は、21mmHgを超えるIOPを示したが、血管攣縮性応答は示さなかった。健常コントロールの眼科学的検査では、目立った結果は得られず、また攣縮性応答も得られなかった。採血の少なくとも4週間前に全身的または局所的な眼の治療を受けた患者はいなかった。

20

【0056】

2. 白血球の単離

先に記載(カルマー(Kalmar)ら、1988)のように、密度勾配遠心によって、ヘパリン化血液から白血球を単離した。単離後、PBS洗浄した白血球を乾燥ペレットとして-70℃で保存するかまたは生細胞としてDMSO含有培養培地中で凍結した。

【0057】

3. コメットアッセイ

サンプルの調製。フラグメント化DNAを含有する細胞の割合は、コメットアッセイを使用することによって評価した。コメットアッセイ(トレビゲン社(Trevigen INC.)、米国(USA))または単一細胞電気泳動の原理は、電場の影響下で変性、切断したDNAフラグメントが細胞外(out of)へ泳動する能力に基づく。損傷を受けていないDNAは、電流が適用される場合、ゆっくりと泳動し、核の範囲内に留まる。DNA「コメット」テイル形状および泳動パターンを評価することによって、DNA損傷を評価することが可能である(図1)。詳細については、方法がオストリング(Ostling)およびジョンソン(Johanson)(1984)によって説明された。簡単に説明すると、サンプルあたり200~300細胞の密度で単離された白血球を、低融点アガロースのベット中に固定化した。細胞溶解後、サンプルをアルカリで処置し、DNAを巻き戻して変性させ、損傷部位を加水分解した。電気泳動後、サンプルを、SYBRグリーン(SYBR Green)、蛍光DNA挿入染料で染色した。

30

40

【0058】

サンプルの分析。コメットは、倍率200×で蛍光顕微鏡(オリンパス(Olympus))下で可視化した。515~560nmの励起波長および590nmに対するバリアフィルターを使用した。少なくとも100コメットを各データポイントについて分析した。DNA損傷の定量では、コメットの全長(ヘッドおよびテイル)を測定し、マケルビー-マーチンら(1993)の基準に従って、損傷の程度を算出した。DNAの泳動の程度を考慮し、コメットの視覚的局面上に基づいて、損傷の程度を4つのクラス(1~4)に割り当てた(ビスバーディス(Visvardis)ら、1997)。図1に示される通り、鮮明なヘッドを有し、テイルを有さないコメットをクラス1(無傷な(intact)DNA)に分類し、小さなヘッドおよび長い散乱したテイルを有するコメットをクラス4

50

(重度のDNA損傷)に分類した。中間的な特徴はクラス2および3に割り当てた。次いで、健常ドナーについて算出された平均よりも大きな細胞消失はクラス5に分類した。初期のDNA損傷(DD)およびBPS中、37で3時間のインキュベーション後のDNA損傷(DD3)は、ジャロスジンスキー(Jaloszynski)ら(1997)が記載し、変更を加えた以下の式(1)を使用して、定量的に評価した:

$$DD = (n_2 + 2n_3 + 3n_4 + 4n_5) / (S / 100)$$

式中、DD:DNA損傷、 $n_2 \sim n_4$:それぞれクラス2、3および4において算出されたコメットの量; S:クラス1を含むスコア化したコメットの総数。

【0059】

統計解析。初期のDNA損傷および3時間のインキュベーション後の修復能を、ノンパラメトリックな二元ANOVA分析によって3つのグループ間で比較した。全ての統計解析は、グラフパッド・プリズム(Graphpad Prism)ソフトウェア(バージョン2.01)を使用して行った。統計的有意差は、両側、対応のない学生t検定によって算出した。

10

【0060】

4. サブトラクティブ・ハイブリダイゼーションによる「遺伝子ハンティング」

mRNAの単離。mRNAの単離は、製造者のプロトコルに従って、クイック・プレップ・マイクロmRNA精製キット(ファルマシア・バイオテック(Pharmacia Biotech)、ウプサラ、スウェーデン(Uppsala, Sweden))を使用して、実施した。品質チェックは、[$-^{32}P$]dATP(アマシャム(Amersham)、英国バッキンガムシャー(Buckinghamshire, UK))の組み入れ、続く1%アガロースゲル上での電気泳動、その後のオートラジオグラフィ(サンブロック(Sambrock)ら、1981)を使用して、ファーストストランド(First-strand)cDNA合成キット(ファルマシア・バイオテック(Pharmacia Biotech)、ウプサラ、スウェーデン(Uppsala, Sweden))によって実施した。反射フィルム(NENライフ・サイエンス・プロダクツ(NEN Life Science Products))を2時間、室温でゲルに暴露した。

20

【0061】

サブトラクティブ・ライブラリーの構築。原則として、サブトラクティブ・ライブラリーの構築は、活性化/抑制されて、病理学的条件下でアップレギュレートまたはダウンレギュレートされるそれらの遺伝子の転写物(cDNAの形態)のクローニングに基づく。これらの遺伝子を同定するために、転写物の2つのプール:患者由来のmRNAの完全なプールおよび健常コントロール由来のmRNAの完全なプールを使用する。両プールの転写物は誘導性および非誘導性プールのmRNAと呼ばれ、分子生物学的比較を経て、その後、2つのプール間の差異のサブトラクションが行われ、疾患によって活性化または抑制される転写物が示される。サブトラクティブ・ライブラリーの構築は、次のようにして行われる:白血球サンプルおよびコントロール由来のmRNAを、サブトラクター・キット(Subtractor Kit)(インビトロゲン(Invitrogen)、リーク、オランダ(Leek, NL))の取扱説明書に従って、UV照射によってビオチン化した。擬陽性の結果を回避するために、非誘導性プールのmRNAを過剰に添加した。等量の各mRNAプールを逆転写に供し、続いて、mRNA-テンプレートを変性した。それぞれ新たに合成したcDNAプール(誘導性プール)を、68で48時間、対応する非誘導性ビオチン化mRNA-プールにハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション混合物をストレプトアビジンと共にインキュベートし、従って、全てのビオチン化分子(非誘導性ならびにRNA/DNAハイブリッド)をストレプトアビジンと複合させた。ストレプトアビジン核酸複合体を、フェノール-クロロホルム抽出によって取り出し、サブトラクトしたcDNAをエタノールによって沈殿させた(シブ(Sive)およびジョン(John)、1988)。NTG患者/コントロールのそれぞれの対について、両プール:誘導性「NTG遺伝子」および誘導性「正常遺伝子」をサブトラクトした。第2の鎖のcDNA合成を、cDNA合成キット(ベーリンガー・マンハイム(Boehringer

30

40

50

r Mannheim)、ドイツ連邦共和国(FRG))により実施した。構築されたライブラリーの目的は、個々に、およびNTG患者のグループと健常コントロールとで遺伝子発現を比較することである。個々の対および対応するグループの両方からサブトラクトされているそれらの遺伝子のみが、関連性があるとみなされている。

【0062】

サブトラクトされたcDNAのクローニング。サンプブック(Sambrook)ら(1989)によって記載されたクローニング方法に従って、pSPORT1クローニングベクター(ギブコ・ライフ・テクノロジーズ(GIBCO Life Technologies)、エーゲンシュタイン、ドイツ連邦共和国(Eggenstein, FRG))を使用して、サブトラクトされたcDNAをクローニングした。サブトラクトされたcDNAの可視化を可能にするために、pSPORT1ベクターの複数のクローニング部位を制限するユニバーサルプライマーI-5'GTAACAACGACGGCCAGT3'(配列番号1)およびII-5'ACAGCTATGACCCATG3'(配列番号2)を使用して、クローニングしたcDNAを増幅した。増幅物を1%アガロースゲル中で分析した。対応するcDNAを、DNAクリーンキット(AGS、ハイデルベルク、ドイツ連邦共和国(Heidelberg, FRG))で浄化したゲルから切り出し、pUC18ベクターのSmaI部位に再クローニングした。組換え分子を、INVaF大腸菌(Escherichia coli)細胞(インビトロゲン(Invitrogen)、リーク、オランダ(Leek, NL))での形質転換に使用した。制限分析を使用して、挿入されたフラグメントの長さについて、組換えプラスミドDNAを分析した。キアフィルター・プラスミド・ミディ・システム(QiaFilter Plasmid Midi System)(キアゲン(Quiagen)、ヒルデン、ドイツ連邦共和国(Hilden, FRG))を使用して、プラスミドDNAを精製した。MWG-バイオテック(MWG-Biotech)(エベルスベルク、ドイツ連邦共和国(Ebersberg, FRG))により、プラスミドDNAを配列決定した。

【0063】

遺伝子の同定。データとDNAおよびタンパク質遺伝子バンク(EMBL and SWISS-PROT(EMBL and SWISS-PROT)、ハイデルベルク、ドイツ連邦共和国(Heidelberg, FRG))とのコンピュータ支援による比較によって、相同性を決定した。MWG-バイオテック(MWG-Biotech)(エベルスベルク、ドイツ連邦共和国(Ebersberg, FRG))製「DNASIS」プログラムを使用して、アラインメントを調製した。

【0064】

ドットプロット分析。特定の転写物を定量するために、個々のクローニングおよび配列決定されたcDNAを、ドットプロットハイブリダイゼーションのための特定の標識されたプローブとして使用した。クローニングおよび精製後、標識の前に95℃で5分間それぞれのプローブを変性し、続いて、ルネサンス・ランダム・プライマー・フルオレセイン-12-UTPラベリング・キット(Renaissance Random Primer Fluorescein-12-UTP Labeling Kit)(NEN・ライフ・サイエンス・プロダクツ(NEN Life Science Products))を使用して、フルオレセイン-12-dUTPで標識した。ホワイト(White)およびバンクcroft(Bancroft)のプロトコル(1982)に従って、ドットプロット技術を使用し、単離したmRNA-プールのアリコートの特異的プローブとのハイブリダイゼーションに適用した。簡単に説明すると、mRNA-プールのサンプルを、正に帯電させたナイロンメンブラン上に配置した。固定化後、ナイロンメンブランを、ブロック試薬(NEN・ライフ・サイエンス・プロダクツ(NEN Life Science Products))を含有するプレハイブリダイゼーション溶液中、3時間、65℃、ハイブリダイゼーションオープン中でインキュベートした。メンブランを、各標識されたプローブで、段階的に、1晩、65℃でハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、プレハイブリダイゼーション緩衝液で2回メンブランを洗浄することによって

、非特異的結合材料を除去した。次いで、メンブランをブロッキング試薬でブロックし、抗フルオレセインHRP抗体(1:1000; NEN・ライフ・サイエンス・プロダクツ(NEN Life Science Products))と共に1時間、37°Cでインキュベートした。洗浄後、メンブランを、核酸化学ルミネセンス試薬(Nucleic Acid Chemiluminescence Reagent)(NEN・ライフ・サイエンス・プロダクツ(NEN Life Science Products))中で1時間インキュベートし、その後、オートラジオグラフィ反射フィルム(NEN・ライフ・サイエンス・プロダクツ(NEN Life Science Products))室温で、1時間暴露した。同じ様式で、それぞれのハイブリダイゼーションを実施した。製造者のプロトコルに従い、個々のハイブリダイゼーションの間で、メンブランをはがした。デンシトメーター(densitometer)を使用して、フィルムのデンシトメトリー(densitometry)およびMWG - バイオテック(MWG - Biotech)(ドイツ連邦共和国(FRG))製定量ソフトウェアプログラムを実施した。

10

【0065】

統計解析。以後のクルスカール - ウォリスの検定によるANVAおよびスチューデントのt検定を適用し、回帰直線分析を実施した。有意性のレベルは $p < 0.05$ においてであった。

【0066】

5. cDNAプローブの発現アレイへのハイブリダイゼーションによる「遺伝子ハンティング」

20

異なる分子発現パターンの評価のために設計されたアトラス(ATLAS)TMヒト1.2アレイ(クローンテック(Clontech)、パロアルト、米国(Palo Alto, USA))を使用した。アトラス(ATLAS)TMヒト1.2アレイは、全てナイロンメンブラン上に固定化された1176ヒトcDNA、9ハウスキーピングコントロールcDNA、およびネガティブコントロールを含む。ファルマシア(Pharmacia)(ウプサラ、スウェーデン(Uppsala, S))製ファーストストランド(First-strand)cDNA合成キットを使用して、緑内障患者および健常コントロールから誘導される単離されたmRNAからのcDNAの合成を実施した。合成およびフルオレセイン-12-dUTPによる標識後(上記を参照のこと)、アトラス(ATLAS)TMヒト1.2アレイを、それぞれ個々の標識されたcDNAプローブにハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、いくらかの洗浄工程により非特異的結合材料を除去し、次いで、ブロッキング試薬によって、メンブランをブロックした。その後、メンブランを、抗フルオレセインHRP抗体(NEN・ライフ・サイエンス・プロダクツ(NEN Life Science Products))と共に1時間、37°Cでインキュベートし、続いて、洗浄手順および核酸ルミネセンス試薬(NEN・ライフ・サイエンス・プロダクツ(NEN Life Science Products))と共にインキュベートを行った。次いで、メンブランをオートラジオグラフィ反射フィルム(NEN・ライフ・サイエンス・プロダクツ(NEN Life Science Products))室温で、1時間暴露した。アトラス(ATLAS)cDNA発現アッセイの分析のために特別に開発されたアトラス・イメージ(ATLAS Image)2.0ソフトウェア(クローンテック(Clontech)、パロアルト、米国(Palo Alto, USA))を使用して、評価を実施した。

30

40

【0067】

6. ポリメラーゼ連鎖反応

逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)。標的遺伝子の発現を定量的に検出し、リアルタイム定量PCR(以下を参照のこと)の個々の反応条件を最適化するために、MMP-2、MMP-9、MT1-MMPおよびTIMP1遺伝子のために設計された特異的プライマーで、RT-PCRを実施した。ファルマシア(Pharmacia)(ウプサラ、スウェーデン(Uppsala, S))製ファーストストランド(First-strand)cDNA合成キットを使用して、緑内障患者および健常コントロールが

50

ら誘導される単離された mRNA からの cDNA の合成を実施した。ホットスタート (hot-start) Taq ポリメラーゼ (アベジーン (Abgene)、ハンブルグ、ドイツ連邦共和国 (Hamburg, FRG)) を使用して PCR を実施し、35 サイクル稼働させた。DNA を伴わない PCR はネガティブコントロールとしての役割を果たし、配列テンプレートを伴う PCR はポジティブコントロールとしての役割を果たした。分析のために、アガロースゲルで分別された臭化エチジウム染色された PCR 産物を、UV 証明下で可視化した。

【0068】

リアルタイム定量 PCR (RT-QPCR)。目的の遺伝子の発現の変化について記述するために、挿入染料および蛍光レポーター分子として SYBER グリーン (SYBER Green) I を使用して RT-QPCR を実施し、iCycler iQTM 検出システム (バイオラッド・ラボラトリーズ (Bio-Rad Laboratories)、米国 (USA)) において増幅された二本鎖産物の蓄積を検出した。RT-PCR は、上記の通りに実施したが、ただ唯一の例外は：ホットレッド Taq ポリメラーゼ (アベジーン (Abgene)、ハンブルグ、ドイツ連邦共和国 (Hamburg, FRG)) を Taq DNA ポリメラーゼ (ロッシュ (Roche)、スイス (CH)) に置き換えて、発色シグナルの攪乱を回避したことであった。iCycler iQTM 検出システムのアルゴリズムは、内部リファレンス (passive reference) に対してレポーターシグナル (非挿入 SYBER グリーン (SYBER Green)) を標準化し、10 の脱落因数 (defaulter) により最初の数サイクルにおけるバックグランドシグナルの SD を増加して、閾値を決定する。ベースラインレベルを超えるサイクルは閾値サイクル (C_T) として規定される。C_T は初期のテンプレートコピー数に依存し、核酸の開始量に比例する (ヘイド (Heid) ら)。目的の遺伝子とハウスキーピング遺伝子 (アクチン) との間の C_T 値の差異をサブトラクトすることによって、データが標準化される。C_T 値の差異に基づき、NTG サンプルからコントロールサンプルにおける遺伝子発現について、相対レベルを算出した (ヘイド (Heid) ら、1996)。

【0069】

統計解析。全ての値を平均値 ± SEM で表す。パラメティックデータについて、スチューデントの t 検定を使用して、値を比較した。0.05 未満の p 値を有意とみなした。

【0070】

制限分析。標的 PCR 産物を、特異的制限分析を使用して同定した。標的増幅産物は、消化の前に、DNA 単離キット (DNA-クリーン (Clean)TM、ハイバイド-AGS (Hybaid-AGS)、ドイツ連邦共和国 (FRG)) を使用するアガロースゲルからの抽出を経た。それらは、製造者 (ロッシュ (Roche)、スイス (CH)) のプロトコルに従って、20 単位の各制限エンドヌクレアーゼを有する 50 μl の最終容積中で、4 時間、消化した。消化し DNA フラグメントを、アガロースゲル中で分別し、臭化エチジウムによる染色後、UV 光によって可視化した (図 5)。

【0071】

ここまで、本発明の好適な実施態様を示し、説明してきたが、本発明がそれらに制限されることはなく、添付の特許請求の範囲内で多様に具体化し、実施することができることはいうまでもない。

【0072】

参考文献

ヘイド CA (Heid CA)、スティーブンス J (Stevens J)、リバック KJ (Livak KJ)、ウィリアムス PM (Williams PM)、Real time quantitative PCR. Genome Res 1996年 10月; 6(10): 986頁 - 94頁

ジャロスジンスキー P (Jaloszynski P)、クジャースキー M (Kujawski M)、クズブ-スウィールクゼック M (Czub-Swierczek M)、マルコースカ J (Markowska J)、スジフター K (Szyfter K)、

10

20

30

40

50

Bleomycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studied by comet assay. *Mutat Res* 1997年 12月; 385 (3): 223頁 - 33頁

カルマーJR (Kalmar JR)、アーノルドRP (Arnold RR)、ワーピングトンML (Warbington ML)、ガードナーMK (Gardner MK)、Superior leukocyte separation with a discontinuous one-step Ficoll-Hypaque gradient for the isolation of human neutrophils. *J Immunol Methods* 1988年 6月 13; 110 (2): 275頁 - 81頁 10

マッケルビー-マーチンVJ (McKelvey - Martin VJ)、グリーンMH (Green MH)、シュメザーP (Schmezer P)、プール-ゾベルBL (Pool - Zobel BL)、デ・メオMP (De Meo MP)、コリンズA (Collins A)、The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat Res* 1993年 7月; 288/1): 47頁 - 63頁

オストリングO (Ostling O)、ジョハンソンKJ (Johanson KJ)、Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984年 8月 30; 123 (1): 291頁 - 8頁 20

サンブロクJ (Sambrook J)、フリッシュEF (Fritsch EF)、マニアティスT (Maniatis T)、Molecular cloning: A laboratory manual. In: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. 1989年; 第2版: 1.53 - 1.73

シベHL (Sive HL) および StジョンT (St John T)、A simple subtractive hybridization technique employing photoactivatable biotin and phenol extraction. *Nucleic Acids Res* 1988年 11月 25; 15 (22): 10937頁 30

ホワイトBA (White BA) およびバンクcroft FC (Bancroft FC)、Cytoplasmic dot hybridization. Simple analysis of relative mRNA levels in multiple small cell or tissue samples. *J Biol Chem* 1982年 8月 10; 257 (15): 8569頁 - 72頁

ビスバルディスEE (Visvardis EE)、タッシオウAM (Tassiou AM)、ピペライスSM (Piperakis SM). Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to H₂O₂ and gamma-irradiation with the alkaline comet assay. *Mutat Res* 1997年 1月 31; 383 (1): 71頁 - 80頁 40

【図面の簡単な説明】

【0073】

【図1】コメットアッセイの結果を示す。

【図2】ドットプロットアッセイの結果を示す(1: 緑内障患者、2: 健常コントロール)。

【図3】XPGC転写物のRT-PCR増幅の結果を示す。

【図4 a】コントロール個体における アクチン転写物のRT-PCR増幅の結果を示す。

【図4 b】緑内障患者における アクチン転写物のRT-PCR増幅の結果を示す。

【図4 c】コントロール個体におけるマトリックスメタロプロテイナーゼ9 (MMP-9) 転写物のRT-PCR増幅の結果を示す。

【図4 d】緑内障患者におけるマトリックスメタロプロテイナーゼ9 (MMP-9) 転写物のRT-PCR増幅の結果を示す。

【図4 e】コントロール個体における膜型マトリックスメタロプロテイナーゼ1 (MT1-MMP) 転写物のRT-PCR増幅の結果を示す。

【図4 f】は緑内障患者における膜型マトリックスメタロプロテイナーゼ1 (MT1-MMP) 転写物のRT-PCR増幅の結果を示す。 10

【図4 g】コントロール個体におけるメタロプロテイナーゼ阻害因子1前駆体1 (TIMP-1) 転写物のRT-PCR増幅の結果を示す。

【図4 h】緑内障患者におけるメタロプロテイナーゼ阻害因子1前駆体1 (TIMP-1) 転写物のRT-PCR増幅の結果を示す。

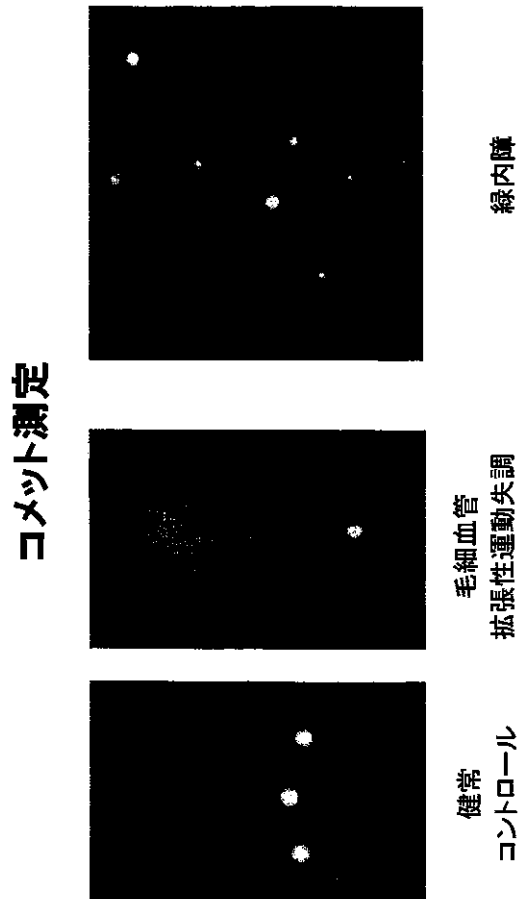
【図5 a】 アクチンの209bp PCRフラグメントの制限分析を示す。

【図5 b】 289bp MMP-9 PCRフラグメントの制限分析を示す。

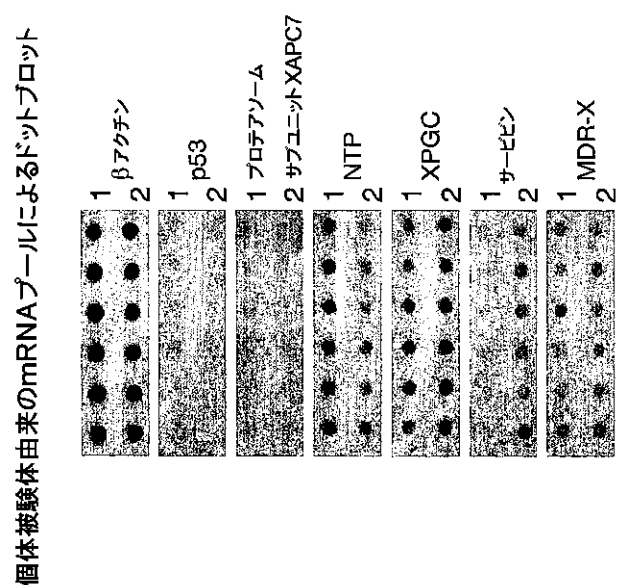
【図5 c】 295bp MT1-MMP PCRフラグメントの制限分析を示す。

【図5 d】 393bp TIMP-1 PCRフラグメントの制限分析を示す。

【図1】



【図2】



コメット測定

【 図 3 】

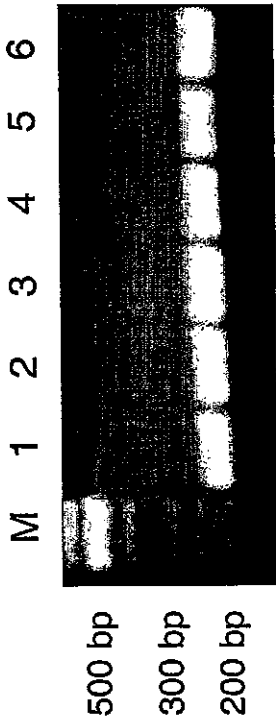
XPGC転写物の増幅



1-7 = コントロール 8-13 = 緑内障患者
 ボランティア5:緑内障の疑いが認められる

【 図 4 b 】

βアクチン_N



【 図 4 a 】

βアクチン_K



【 図 4 c 】

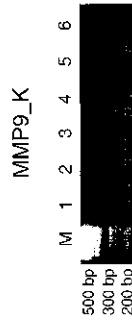


Fig. 4c

【 4 d 】

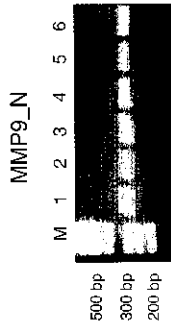


Fig. 4d

【 4 e 】

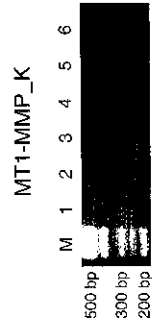


Fig. 4e

【 4 f 】

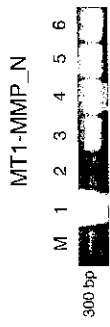


Fig. 4f

【 4 g 】

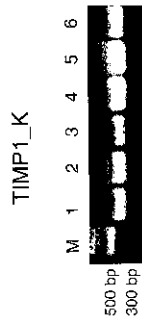


Fig. 4g

【 図 4 h 】

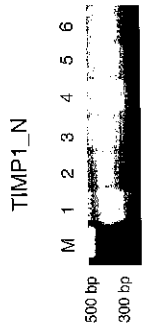
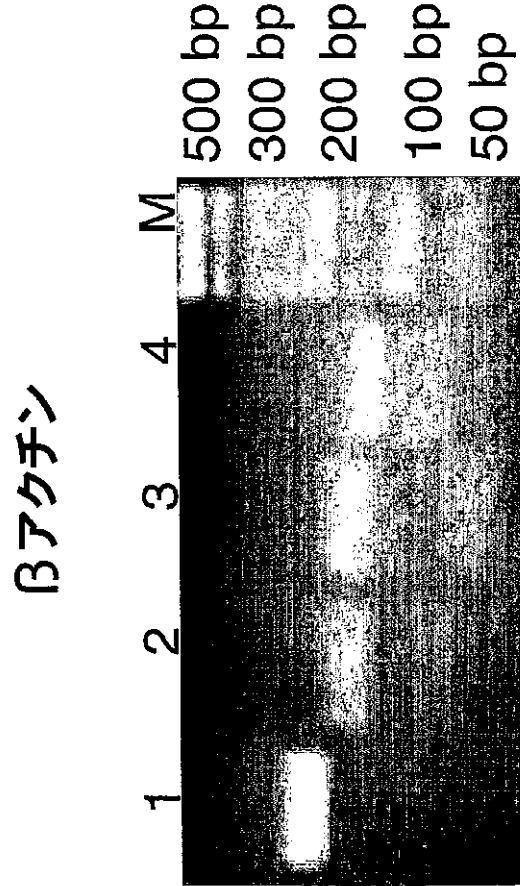


Fig. 4h

【 図 5 a ）



【 図 5 b ）

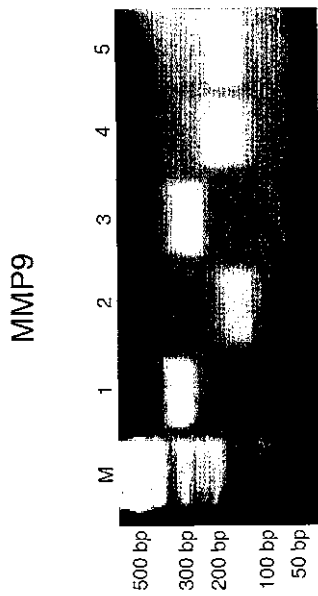


Fig. 5b

【 図 5 c ）

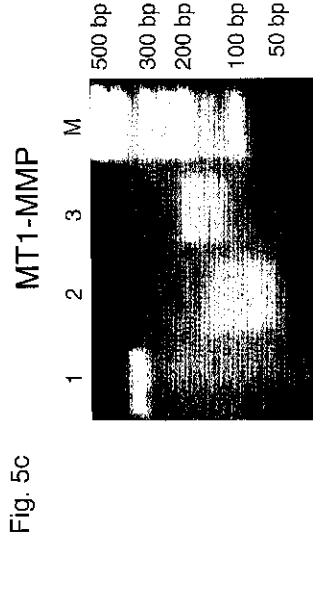
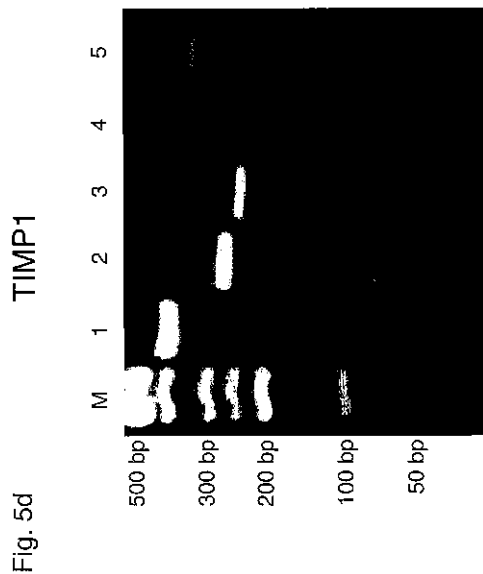


Fig. 5c

【 図 5 d 】



【 配列表 】

[2005518812000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/IB 02/00648

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 025 194 A (FUNK WALTER) 15 February 2000 (2000-02-15) column 54, line 50 - line 56 column 57, line 9 ---	10-13
X	WO 99 57315 A (HENNEY ADRIANO ;ISIS INNOVATION (GB); YE SHU (GB); ZHANG BAI PING) 11 November 1999 (1999-11-11) abstract page 9, paragraph 2 ---	10-13
X	US 6 077 673 A (CHENCHIK ALEX ET AL) 20 June 2000 (2000-06-20) column 20, line 44; table 1 ---	10-13
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 10 December 2002	Date of mailing of the international search report 27.02.2003	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818, Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Aguilera, M	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/IB 02/00648

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 98 44108 A (HUANG WEIDONG ;NGUYEN THAI D (US); POLANSKY JON R (US); UNIV CALIF) 8 October 1998 (1998-10-08) cited in the application page 3, line 18 -page 5, line 5 ---	1-16
Y	WO 98 24932 A (CLARK ABBOT F ;WORDINGER ROBERT J (US)) 11 June 1998 (1998-06-11) abstract page 2 ---	1-16
Y	WO 01 64949 A (ALCON LAB INC) 7 September 2001 (2001-09-07) page 5, line 22 -page 6, line 7 ---	1-16
Y	SAMPLES J R ET AL: "REGULATION OF THE LEVELS OF HUMAN TRABECULAR MATRIX METALLOPROTEINASES AND INHIBITOR BY INTERLEUKIN-1 AND DEXAMETHASONE" INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE, ASSOCIATION FOR RESEARCH IN VISION AND, US, vol. 34, no. 12, 1993, pages 3386-3395, XP000907323 ISSN: 0146-0404 Introduction and citations therein ---	1-16
Y	SAWAGUCHI S ET AL: "Matrix metalloproteinase were over-expressed in the optic nerve heads of experimental primate glaucoma." IOVS, vol. 39, no. 4, 15 March 1998 (1998-03-15), page S512 XP008011322 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology;Fort Lauderdale, Florida, USA; May 10-15, 1998 abstract ---	1-16
Y	AGAPOVA O A ET AL: "Matrix metalloproteinase (MMP) expression in monkey eyes with experimental glaucoma and with optic nerve transection." IOVS, vol. 42, no. 4, 15 March 2001 (2001-03-15), page S830 XP008011324 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology;Fort Lauderdale, Florida, USA; April 29-May 04, 2001 abstract --- -/-	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/IB 02/00648

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 90 12590 A (OREGON STATE) 1 November 1990 (1990-11-01) page 5, paragraph 1 -page 6, paragraph 2 ---	1-16
Y	WO 01 80862 A (NEW ENGLAND MEDICAL CT HOSPITA) 1 November 2001 (2001-11-01) page 1 -page 12 ---	1-16
A	GOLUBNITSCHAJA-LABUDOVA O-ET AL: "Altered gene expression in lymphocytes of patients with normal-tension glaucoma." CURRENT EYE RESEARCH. ENGLAND NOV 2000, vol. 21, no. 5, November 2000 (2000-11), pages 867-876, XP008011287 ISSN: 0271-3683 the whole document -----	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB 02/00648

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 16
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claim 16 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the metalloproteinase gene used in said method.

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

see additional sheet

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

1-16 (all partially)

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/IB 02/00648

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-16 (all partially)

Methods for ex vivo diagnosis or prediction of glaucoma comprising ~~detecting an altered gene expression pattern of metalloproteinases~~. Array comprising a nucleic acid probe for metalloproteinases and its use in said methods.

2. Claims: 1-16 (all partially)

Methods for ex vivo diagnosis or prediction of glaucoma comprising detecting an altered gene expression pattern of metalloproteinase inhibitors. Array comprising a nucleic acid probe for metalloproteinase inhibitors and its use in said methods.

[idem for genes or gene families 3-57 as listed in claims 5-8]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/IB 02/00648

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6025194	A	15-02-2000	AU 1701599 A WO 9925878 A2	07-06-1999 27-05-1999
WO 9957315	A	11-11-1999	AU 3938599 A CA 2327538 A1 EP 1075547 A2 WO 9957315 A2	23-11-1999 11-11-1999 14-02-2001 11-11-1999
US 6077673	A	20-06-2000	AU 742342 B2 AU 7593398 A EP 0988398 A1 JP 2002504812 T WO 9853103 A1	20-12-2001 11-12-1998 29-03-2000 12-02-2002 26-11-1998
WO 9844108	A	08-10-1998	WO 9844107 A1 WO 9844108 A1 AU 2447197 A AU 2432897 A US 5789169 A	08-10-1998 08-10-1998 22-10-1998 22-10-1998 04-08-1998
WO 9824932	A	11-06-1998	AU 728438 B2 AU 5261798 A EP 0943014 A1 JP 2001505434 T WO 9824932 A1	11-01-2001 29-06-1998 22-09-1999 24-04-2001 11-06-1998
WO 0164949	A	07-09-2001	AU 4176801 A EP 1259648 A2 WO 0164949 A2 US 2002049177 A1	12-09-2001 27-11-2002 07-09-2001 25-04-2002
WO 9012590	A	01-11-1990	US 5260059 A AU 5551090 A WO 9012590 A1	09-11-1993 16-11-1990 01-11-1990
WO 0180862	A	01-11-2001	US 2002042402 A1 AU 5727201 A WO 0180862 A1	11-04-2002 07-11-2001 01-11-2001

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 N 15/09	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 37/00	1 0 2
G 0 1 N 37/00	C 1 2 N 15/00	A
	C 1 2 N 15/00	F

专利名称(译)	如何诊断青光眼		
公开(公告)号	JP2005518812A	公开(公告)日	2005-06-30
申请号	JP2003573180	申请日	2002-03-01
[标]申请(专利权)人(译)	Furamayosefu		
申请(专利权)人(译)	富丽华, 约瑟夫		
[标]发明人	ゴלבニツシャーヤオルガ		
发明人	ゴלבニツシャーヤ、オルガ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7088 A61K48/00 A61P27/06 C12M1/00 C12N15/09 C12Q1/68 G01N37/00		
CPC分类号	A61P27/06 C12Q1/6883 C12Q2600/158		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A A61K31/7088 A61K48/00 A61P27/06 C12M1/00.A G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N15/00.A C12N15/00.F		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA09 4B024/HA12 4B024/HA17 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/FA15 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ43 4B063/QQ44 4B063/QR55 4B063/QR82 4B063/QS32 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZA332 4C086/AA01 4C086/EA16 4C086/NA14 4C086/ZA33		
代理人(译)	高久木村		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于诊断和/或预测青光眼的离体方法。所述方法包括在个人体的组织和/或血液样品中检测至少基因的变化的基因表达模式，所述基因选自与组织重塑相关的基因组。此外，本发明涉及DNA微阵列，其包含特定基因组的基因的核酸探针。

MMP9_K

