

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 531580

(P2003 - 531580A)

(43)公表日 平成15年10月28日(2003.10.28)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ド* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/53	D 4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/53			M
		37/00	102
37/00	102	C 1 2 N 15/00	ZNA A
審査請求 未請求 予備審査請求 (全100数)			

(21)出願番号 特願2001 - 561767(P2001 - 561767)

(86)(22)出願日 平成13年2月26日(2001.2.26)

(85)翻訳文提出日 平成14年8月23日(2002.8.23)

(86)国際出願番号 PCT/CA01/00245

(87)国際公開番号 W001/062959

(87)国際公開日 平成13年8月30日(2001.8.30)

(31)優先権主張番号 60/185,063

(32)優先日 平成12年2月25日(2000.2.25)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/225,745

(32)優先日 平成12年8月17日(2000.8.17)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 メトリオジェ-ン・バイオサイ-ンシ-ズ
・インコーポレイテッド
カナダ国、エイチ4ピー・2ア-ル2、ケベック州、
モントリオ-ル、ロイヤルマ-ウント・アベニュー 6100

(72)発明者 ババン、ソーイ-ル
カナダ国、エイチ3エックス・2イ-6、ケベック州、
モントリオ-ル、リュ・グロベ-ル 5225

(72)発明者 ベルナ-ル、モニ-ック
カナダ国、ジェイ4ピー・5シ-9、ケベック州、
プッシュェ-ル、ディベ-ルピ-ル 813

(74)代理人 弁理士 鈴江 武彦 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 子宮内膜症関連マ-ーカー及びその使用

(57)【要約】

【課題】

【解決手段】本発明は、子宮内膜症に罹患していない女性に比べて、子宮内膜症を有する女性の子宮内膜細胞中で発現が異なる子宮内膜症のマ-ーカーに関する。本発明は、女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定する方法、子宮内膜症に罹患している女性の子宮内膜症に等級を付ける方法、及び該疾病を治療する方法にも関する。本発明は、腹腔鏡検査法に比べて、迅速で、非侵襲性であり、複雑さとコストが著しく低減された上記の方法を実施するのに有用な上記ポリヌクレオチド、プローブ、プライマー、及びキットにも関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定する方法であつて、

- 前記女性被験者から子宮内膜細胞の試料を得る工程と、
- 1) GENBANK(TM)の遺伝子名が与えられている表1に列記されている遺伝子からなる群から選択される遺伝子、

2) a) 1)に明記されている遺伝子に由来するcDNA、及び配列番号1~16から選択される配列を含むcDNAからなる群から選択されるcDNAを生じさせるリボ核酸、及び

b) a)に明記されたりボ核酸の断片からなる群から選択されるリボ核酸、並びに

3) 1)に明記された遺伝子によってコードされる、又は2)に明記されたりボ核酸によってコードされるペプチド又はタンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカの発現レベルに関して、前記子宮内膜細胞の試料をアッセイする工程とを備え、

前記少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカの発現レベルが、前記女性被験者における子宮内膜症の可能性の指標となる方法。

【請求項2】 請求項1の方法であつて、

1) NADH脱水素酵素、hUCC1、パラレンミン、クエン酸輸送タンパク質、HIF1、ARNT、Glut-1、MnSOD、GPx、ATPシンターゼ、c-jun、Cx43、HSP70、及びcox2からなる群から選択される遺伝子、

2) a) 1)に明記されている遺伝子に由来するcDNA、及び配列番号9、配列番号10、配列番号13~15から選択される配列を含むcDNAからなる群から選択されるcDNAを生じさせるリボ核酸、及び

b) a)に明記されたりボ核酸の断片からなる群から選択されるリボ核酸、並びに

3) 1)に明記された遺伝子によってコードされる、又は2)に明記されたりボ核酸によってコードされるペプチド又はタンパク質

からなる群から選択される少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの過剰発現レベルが、子宮内膜症に罹患していない女性被験者に比べて、前記女性被験者における子宮内膜症の可能性がより高いことの指標となる方法。

【請求項3】 請求項1又は2の方法であって、

前記女性被験者から得られる前記子宮内膜細胞が、前記女性被験者の性周期の増殖期に採取され、

1) NADH脱水素酵素、hUCC1、パラレンミン、クエン酸輸送タンパク質、HIF1、ARNT、Glut-1、MnSOD、GPx、ATPシンターゼ、c-jun、Cx43、HSP70、及びcox2からなる群から選択される遺伝子、

2) a) 1) に明記されている遺伝子に由来するcDNA、及び配列番号9、配列番号10、配列番号13～15から選択される配列を含むcDNAからなる群から選択されるcDNAを生じさせるリボ核酸、及び

b) a) に明記されたりボ核酸の断片からなる群から選択されるリボ核酸、並びに

3) 1) に明記された遺伝子によってコードされる、又は2) に明記されたりボ核酸によってコードされるペプチド又はタンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの過剰発現レベルが、子宮内膜症に罹患していない女性被験者に比べて、前記女性被験者における子宮内膜症の可能性がより高いことの指標となる方法。

【請求項4】 請求項1又は2の方法であって、

前記女性被験者から得られる子宮内膜細胞が、前記女性被験者の性周期の分泌期に採取され、

1) hUCC1、パラレンミン、クエン酸輸送タンパク質、HIF1、Glut-1、MnSOD、GPx、ATPシンターゼ、c-jun、Cx43、HSP70、及びcox2からなる群から選択される遺伝子、

2) a) 1) に明記されている遺伝子に由来するcDNA、及び配列番号13～15から選択される配列を含むcDNAからなる群から選択されるcDNAを生じさせるリボ核酸、及び

b) a) に明記されたりボ核酸の断片
からなる群から選択されるリボ核酸、並びに

3) 1) に明記された遺伝子によってコードされる、又は2) に明記されたり
ボ核酸によってコードされるペプチド又はタンパク質
からなる群から選択される少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの過剰発現
レベルが、子宮内膜症に罹患していない女性被験者に比べて、前記女性被験者に
おける子宮内膜症の可能性がより高いことの指標となる方法。

【請求項5】 請求項1の方法であって、

1) Cap43、RNAヘリカーゼ、CO3、FKHR、AK3、カタラーゼ
、GST、eNOS、12S rRNA、TI227H、CO2、アコニターゼ
、ANT-1、Bcl-2、COUP-TF、IL-1、HSP90、GPX
4、及びGRP78からなる群から選択される遺伝子、

2) a) 1) に明記されている遺伝子に由来するcDNA、及び配列番号1
~8、配列番号11、配列番号12、配列番号16から選択される配列を含むc
DNAからなる群から選択されるcDNAを生じさせるリボ核酸、及び

b) a) に明記されたりボ核酸の断片
からなる群から選択されるリボ核酸、並びに

3) 1) に明記された遺伝子によってコードされる、又は2) に明記されたり
ボ核酸によってコードされるペプチド又はタンパク質
からなる群から選択される少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの過少発現
レベルが、子宮内膜症に罹患していない女性被験者に比べて、前記女性被験者にお
ける子宮内膜症の可能性がより高いことの指標となる方法。

【請求項6】 請求項1又は5の方法であって、

前記女性被験者から得られる子宮内膜細胞が、前記女性被験者の性周期の増殖
期に採取され、

1) Cap43、RNAヘリカーゼ、FKHR、12S rRNA、AK3、
GST、eNOS、TI227H、CO2、ANT-1、Bcl-2、IL-1
、及びHSP90からなる群から選択される遺伝子、

2) a) 1) に明記されている遺伝子に由来するcDNA、及び配列番号2

、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号8、配列番号12、配列番号16から選択される配列を含むcDNAからなる群から選択されるcDNAを生じさせるリボ核酸、及び

b) a) に明記されたりボ核酸の断片からなる群から選択されるリボ核酸、並びに

3) 1) に明記された遺伝子によってコードされる、又は2) に明記されたりボ核酸によってコードされるペプチド又はタンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの過少発現レベルが、子宮内膜症に罹患していない女性被験者に比べて、前記女性被験者における子宮内膜症の可能性がより高いことの指標となる方法。

【請求項7】 請求項1又は5の方法であって、

前記女性被験者から得られる子宮内膜細胞が、前記女性被験者の性周期の分泌期に採取され、

1) RNAヘリカーゼ、CO3、FKHR、12S rRNA、AK3、カタラーゼ、GST、12S rRNA、TI227H、アコニターゼ、Bcl-2、COUP-TF、IL-1、HSP90、GPx4、及びGRP78からなる群から選択される遺伝子、

2) a) 1) に明記されている遺伝子に由来するcDNA、配列番号1~8、配列番号11、配列番号12、配列番号16から選択される配列を含むcDNAからなる群から選択されるcDNAを生じさせるリボ核酸、及び

b) a) に明記されたりボ核酸の断片からなる群から選択されるリボ核酸、並びに

3) 1) に明記された遺伝子によってコードされる、又は2) に明記されたりボ核酸によってコードされるペプチド又はタンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの子宮内膜関連マーカーの過少発現のレベルが、子宮内膜症に罹患していない女性被験者に比べて、前記女性被験者における子宮内膜症の可能性がより高いことの指標となる方法。

【請求項8】 前記子宮内膜細胞が正所子宮内膜細胞である請求項1~7の何れか1項の方法。

【請求項9】 前記子宮内膜細胞が上皮子宮内膜細胞である請求項1～8の何れか1項の方法。

【請求項10】 前記少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルを、確定されたベースライン発現レベルと比較する工程をさらに備える請求項1～9の何れか1項の方法。

【請求項11】 子宮内膜症に罹患していない女性の陰性参照群における前記少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルをアッセイすることによって、前記少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの前記ベースラインレベルが確定される請求項10の方法。

【請求項12】 バイオチップ、膜、及びガラスのcDNAアレイに基づく方法；RT-PCR；インシチュハイブリダイゼーション；細胞株又は初代培養でのインビトロプロモーター融合試験；転写速度研究法；膜プロットハイブリダイゼーション；標識；プロテオミクス；フローサイトメトリー；免疫細胞化学；免疫組織化学；及びELISAからなる群から選択される方法を用いて、前記少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルがアッセイされる請求項1～11の何れか1項の方法。

【請求項13】 少なくとも2つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルが組み合わせてアッセイされる請求項1～12の何れか1項の方法。

【請求項14】 GRP78、カタラーゼ、及びCOUP-TFの発現レベルが組み合わせてアッセイされる請求項13の方法。

【請求項15】 請求項1～14の何れか1項の方法であって、さらに、
1) 前記子宮内膜細胞が性周期の何れの期で得られたかを確定する工程と、
2) 1)で決定した期に従って、発現レベルをアッセイすべき前記少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーを選択する工程とを備えた方法。

【請求項16】 組織学的な検査、RNAの発現レベルを評価する方法、及び性ステロイドのレベルを評価する方法からなる群から選択される少なくとも1つの方法を用いることによって、前記子宮内膜細胞が得られた性周期の期を評価する請求項15の方法。

【請求項17】 女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定する方法で

あって、

- 前記女性被験者から正所子宮内膜細胞の試料を得る工程と、
- 前記子宮内膜細胞の酸化的リン酸化経路及び/又は内部酸化還元電位センサー経路(OXPHOS)に関わる、前記子宮内膜細胞試料の少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルをアッセイする工程と、
- 少なくとも1つのOXPHOS-子宮内膜症関連マーカーの発現レベルを、確定されたベースラインレベルと比較することによって、前記女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定する工程とを備えた方法。

【請求項18】 前記少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーが、NADH脱水素酵素、クエン酸輸送タンパク質、HIF1、ARNT、AK3、Glut-1、MnSOD、GPx、GRP78、カタラーゼ、GST、eNOS、CO2、アコニターゼ、ANT-1、ATPシンターゼ、Bcl-2、GPx4、及びcox2からなる群から選択される遺伝子である請求項17の方法。

【請求項19】 女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定する方法であって、

- 前記女性被験者から子宮内膜細胞の試料を得る工程と、
- 1) GENBANK(TM)の遺伝子名が与えられている表1に列記されている遺伝子からなる群から選択される遺伝子、
- 2) a) 1)に明記されている遺伝子に由来するcDNA、及び配列番号1~16から選択される配列を含むcDNAからなる群から選択されるcDNAを生じさせるリボ核酸、及び

b) a)に明記されたりボ核酸の断片からなる群から選択されるリボ核酸からなる群から選択される子宮内膜症関連マーカーの少なくとも1つの核酸産物の発現レベルについて、前記子宮内膜細胞の試料をアッセイする工程と、

- 前記少なくとも1つの核酸産物の発現レベルを、確立されたベースラインレベルと比較することによって、前記女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定する工程とを備えた方法。

【請求項20】 前記少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの前記ベー

スラインレベルが、子宮内膜症に罹患していない女性の陰性参照群における前記少なくとも1つの核酸産物の発現レベルをアッセイすることによって確定される請求項19の方法。

【請求項21】 請求項19又は20の方法であって、

- 1) 前記子宮内膜細胞が性周期の何れの期で得られたかを確定する工程と、
- 2) 1) で決定した期に従って、発現レベルをアッセイすべき前記少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーを選択する工程とをさらに備えた方法。

【請求項22】 前記少なくとも1つの核酸産物がメッセンジャーリボ核酸(mRNA)である請求項19~21の何れか1項の方法。

【請求項23】 前記メッセンジャーリボ核酸(mRNA)が、cDNAを合成するためのテンプレートとして機能する請求項22の方法。

【請求項24】 前記少なくとも1つの核酸産物の発現レベルが、バイオチップ、膜、膜、及びガラスのcDNAアレイに基づく方法；RT-PCR；インシチュハイブリダイゼーション；細胞株又は初代培養でのインビトロプロモーター融合試験；転写速度研究法；膜プロットハイブリダイゼーション；標識からなる群から選択される方法を用いてアッセイされる請求項19~23の何れか1項の方法。

【請求項25】 少なくとも2つの子宮内膜症関連マーカーの前記発現レベルが組み合わせてアッセイされる請求項19~24の何れか1項の方法。

【請求項26】 前記子宮内膜細胞が正所子宮内膜細胞である請求項19~25の何れか1項の方法。

【請求項27】 Cap43、RNAヘリカーゼ、NADH脱水素酵素、CO3、FKHR、hUCC1、パラレンミン、クエン酸輸送タンパク質、HIF1、ARNT、AK3、MnSOD、GPx、アコニターゼ、ATPシンターゼ、c-jun、COUP-TF、Cx43、HSP70、及びGRP78からなる群から選択される遺伝子の少なくとも1つの核酸産物の発現レベルをアッセイすることによって、前記女性被験者における子宮内膜症の可能性が決定される請求項19~26の何れか1項の方法。

【請求項28】 女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定する方法で

あって、

- 前記女性被験者から子宮内膜細胞の試料を得る工程と、
- 子宮内膜症関連マーカーの少なくとも1つのタンパク質産物、又は該タンパク質産物の少なくとも1つの断片の発現レベルについて、前記子宮内膜細胞の試料をアッセイする工程と（前記少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーは、

1) GENBANK(TM)の遺伝子名が与えられている表1に列記されている遺伝子からなる群から選択される遺伝子、

2) a) 1)に明記されている遺伝子に由来するcDNA、及び配列番号1~16から選択される配列を含むcDNAからなる群から選択されるcDNAを生じさせるリボ核酸、並びに

b) a)に明記されたりボ核酸の断片

からなる群から選択されるリボ核酸

からなる群から選択される)、

- 前記少なくとも1つのタンパク質産物の発現レベルを、確定されたベースラインレベルと比較することによって、前記女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定する工程とを備えた方法。

【請求項29】 前記子宮内膜細胞が正所子宮内膜細胞である請求項28の方法。

【請求項30】 前記少なくとも1つのタンパク質産物の発現レベルが、膜プロットハイブリダイゼーション；標識；プロテオミクス；フローサイトメトリー；免疫細胞化学；免疫組織化学；及びELISAからなる群から選択される方法を用いて決定される請求項28又は29の方法。

【請求項31】 少なくとも2つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルが組み合わせてアッセイされる請求項28~30の何れか1項の方法。

【請求項32】 CAP-43及び/又はその断片の発現レベルをアッセイすることによって、前記女性被験者における子宮内膜症の可能性が決定される請求項28~31の何れか1項の方法。

【請求項33】 子宮内膜症に等級を付ける方法であって、

- 子宮内膜症に罹患している女性被験者から子宮内膜細胞の試料を得る工程と、

- 1) RNAヘリカーゼ、NADH脱水素酵素、hUCC1、AK3、GST、12S rRNA、CO2、アコニターゼ、c-jun、Cx43、GPx4、cox2、hUCC1、Glut-1、TI227H、IL-1、HSP90からなる群から選択される遺伝子、

2) a) 1) に明記されている遺伝子に由来するcDNA、及び配列番号1、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号13から選択される配列を含むcDNAからなる群から選択されるcDNAを生じさせるリボ核酸、及び

b) a) に明記されたりボ核酸の断片からなる群から選択されるリボ核酸、並びに

3) 1) に明記された遺伝子によってコードされる、又は2) に明記されたりボ核酸によってコードされるペプチド又はタンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルについて、前記子宮内膜細胞の試料をアッセイする工程とを備え、

前記少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルが、前記女性被験者の子宮内膜症の段階の指標となる方法。

【請求項34】 前記少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの発現のレベルが、前記女性被験者が子宮内膜症の第I若しくは第II段階、又は第III若しくは第IV段階にあることの指標となる請求項33の方法。

【請求項35】 NADH脱水素酵素、c-jun、Cx43、及び/又はcox2の過剰発現が、前記女性被験者が実質的に子宮内膜症の第I又はII段階にあるかどうかの指標となり、hUCC1及び/又はGlut-1の過剰発現が、前記女性被験者が子宮内膜症の第III又は第IV段階にあるかどうかの指標となる請求項33又は34の方法。

【請求項36】 CO2、配列番号1、配列番号6、アコニターゼ、GPx4、RNAヘリカーゼ、AK3、GST、及び/又は12S rRNAの過少発現が、前記女性被験者が実質的に子宮内膜症の第I又はII段階にあるかどうかの指標となり、TI227H、IL-1、及び/又はHSP90の過少発現が、前記女性被験者が子宮内膜症の第III又は第IV段階にあるかどうかの指標となる請求項33又は34の方法。

【請求項37】 請求項33～36の何れか1項の方法であって、さらに、

- 1) 前記子宮内膜細胞が性周期の何れの期で得られたかを確定する工程と、
- 2) 1) で決定した期に従って、発現レベルをアッセイすべき前記少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーを選択する工程とを備えた方法。

【請求項38】 請求項33～36の何れか1項の方法であって、さらに、前記少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの前記発現レベルを、確定されたベースラインレベルと比較する工程を備えた方法。

【請求項39】 前記ベースラインレベルが、

- ある実質的に確定的な子宮内膜症の段階にあることが知られている女性被験者の第一の陽性参照群から得た子宮内膜症細胞の試料中に存在する前記少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルをアッセイすることと、
- 前記第一の陽性参照群の前記段階とは異なる別の実質的に確定的な子宮内膜症の段階にあることが知られている女性被験者の第二の陽性参照群から得た子宮内膜症細胞の試料中に存在する前記少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルをアッセイすることと、
- 前記少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルを、前記第一及び第二の陽性参照群から得られた発現レベルと比較すること

によって得られる請求項38の方法。

【請求項40】 女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定するための、又は子宮内膜症に罹患している女性被験者の子宮内膜症に等級を付けるためのキットであって、

- 子宮内膜症関連マーカーの核酸産物又はタンパク質産物に結合する少なくとも1つの結合分子

(前記子宮内膜症関連マーカーは、

- 1) GENBANK(TM)の遺伝子名が与えられている表1に列記されている遺伝子からなる群から選択される遺伝子、

- 2) a) 1) に明記されている遺伝子に由来するcDNA、及び配列番号1～16から選択される配列を含むcDNAからなる群から選択されるcDNAを生じさせるリボ核酸、

b) a) に明記されたりボ核酸の断片からなる群から選択されるリボ核酸、

3) 1) に明記された遺伝子によってコードされる、又は2) に明記されたりボ核酸によってコードされるペプチド又はタンパク質からなる群から選択される)、並びに

- 前記少なくとも1つの結合分子のための支持体、混合チューブ、緩衝液、酵素、及び前記少なくとも1つの結合分子を検出するための物質からなる群から選択される少なくとも1つの要素を備えたキット。

【請求項41】 前記結合分子が、

a) GENBANK(TM) 受付番号が表1に与えられているEST及びmRNA、

b) 標準的な条件下で、a) に明記されている核酸にハイブリダイズする一本鎖核酸、

c) a) 又はb) に明記されている核酸の逆転写によって得られる一本鎖核酸、

d) GENBANK(TM) 受付番号が表1に与えられているDNA及びcDNA、

e) 標準的な条件下で、d) に明記されている核酸にハイブリダイズする二本鎖及び一本鎖核酸、

f) d) 又はe) に明記されている核酸の逆転写によって得られる二本鎖及び一本鎖核酸、及び

g) a) ~ f) に明記されている核酸の断片からなる群から選択される核酸に、標準的な条件下でハイブリダイズする核酸である請求項40のキット。

【請求項42】 前記結合分子が、請求項40に記載の子宮内膜症関連マーカーの少なくとも1つのタンパク質産物に対して、又は該タンパク質産物の少なくとも1つの断片に対して誘導された単離された抗体である請求項40のキット。

【請求項43】 女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定するための、又は子宮内膜症に罹患している女性被験者の子宮内膜症に等級を付けるための方法であって、

- a) GENBANK(TM) 受付番号が表1に与えられているEST及びmRNA、
 - b) 標準的な条件下で、a)に明記されている核酸にハイブリダイズする一本鎖核酸、
 - c) a)又はb)に明記されている核酸の逆転写によって得られる一本鎖核酸、
 - d) GENBANK(TM) 受付番号が表1に与えられているDNA及びcDNA、
 - e) 標準的な条件下で、d)に明記されている核酸にハイブリダイズする二本鎖及び一本鎖核酸、
 - f) d)又はe)に明記されている核酸の逆転写によって得られる二本鎖及び一本鎖核酸、並びに
 - g) a)～f)に明記されている核酸の断片
- からなる群から選択される単離された核酸の使用を備えた方法。

【請求項44】 単離されたポリヌクレオチドであって、

- a) 配列番号1～10、配列番号12～16、及びそれらの一部からなる群から選択される核酸配列を含むポリヌクレオチド、
 - b) a)に明記されているポリヌクレオチドに相補的な核酸配列を含むポリヌクレオチド
- からなる群から選択される単離されたポリヌクレオチド。

【請求項45】 女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定するための、又は子宮内膜症に罹患している女性被験者の子宮内膜症に等級を付けるためのプライマー又はプローブであって、

- a) GENBANK(TM) 受付番号が表1に与えられているEST及びmRNA、
- b) 標準的な条件下で、a)に明記されている核酸にハイブリダイズする一本

鎖核酸、

c) a) 又は b) に明記されている核酸の逆転写によって得られる一本鎖核酸

、

d) GENBANK (TM) 受付番号が表 1 に与えられている DNA 及び cDNA、

e) 標準的な条件下で、d) に明記されている核酸にハイブリダイズする二本鎖及び一本鎖核酸、

f) d) 又は e) に明記されている核酸の逆転写によって得られる二本鎖及び一本鎖核酸、並びに

g) a) ~ f) に明記されている核酸の断片

からなる群から選択される単離された核酸を含むプライマー又はプローブ。

【請求項 46】 子宮内膜症を治療する方法であって、

1) GENBANK (TM) の遺伝子名が与えられている表 1 に列記されている遺伝子からなる群から選択される遺伝子、

2) a) 1) に明記されている遺伝子に由来する cDNA、及び配列番号 1 ~ 16 から選択される配列を含む cDNA からなる群から選択される cDNA を生じさせるリボ核酸、及び

b) a) に明記されたりボ核酸の断片

からなる群から選択されるリボ核酸、並びに

3) 1) に明記された遺伝子によってコードされる、又は 2) に明記されたりボ核酸によってコードされるペプチド又はタンパク質

からなる群から選択される子宮内膜症関連マーカーの発現レベルを調節することを備えた方法。

【請求項 47】 請求項 46 の方法であって、

1) Cap43、RNAヘリカーゼ、CO3、FKHR、12S rRNA、AK3、カタラーゼ、GST、eNOS、12S rRNA、TI227H、CO2、アコニターゼ、ANT-1、Bcl-2、COUP-TF、IL-1、HSP90、GPx4、及びGRP78 からなる群から選択される遺伝子、

2) a) 1) に明記されている遺伝子に由来する cDNA、及び配列番号 1

～ 8、配列番号 1 1、配列番号 1 2、配列番号 1 6 から選択される配列を含む c DNA からなる群から選択される c DNA を生じさせるリボ核酸、及び

b) a) に明記されたりボ核酸の断片からなる群から選択されるリボ核酸、並びに

3) 1) に明記された遺伝子によってコードされる、又は 2) に明記されたりボ核酸によってコードされるペプチド又はタンパク質からなる群から選択された少なくとも 1 つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルを増加させることを備えた方法。

【請求項 4 8】 請求項 4 6 の方法であって、

1) NADH 脱水素酵素、hUCC 1、パラレンミン、クエン酸輸送タンパク質、HIF 1、ARNT、Glut-1、MnSOD、GPx、ATP シンターゼ、c-jun、Cx43、HSP 70、及びcox 2 からなる群から選択される遺伝子、

2) a) 1) に明記されている遺伝子に由来する cDNA、及び配列番号 9、配列番号 10、配列番号 13～15 から選択される配列を含む cDNA からなる群から選択される cDNA を生じさせるリボ核酸、及び

b) a) に明記されたりボ核酸の断片からなる群から選択されるリボ核酸、並びに

3) 1) に明記された遺伝子によってコードされる、又は 2) に明記されたりボ核酸によってコードされるペプチド又はタンパク質からなる群から選択される子宮内膜症関連マーカーの発現レベルを低下させることを備えた方法。

【請求項 4 9】 女性被験者における子宮内膜症を検出するための診断方法であって、請求項 1～32 の何れか 1 項に記載の方法の使用、又は請求項 33～39 の何れか 1 項に記載の方法の使用を備えた方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の分野】**

本発明は、子宮内膜症のマーカー、より具体的には、女性被験者の子宮内膜症の可能性を決定する方法、子宮内膜症に罹患している女性の子宮内膜症の等級を決定する方法、及び該疾病を治療する方法に関する。本発明は、上述の方法を実施するのに有用なポリヌクレオチド、プローブ、プライマー、及びキットにも関する。

【0002】**【従来技術の簡単な説明】**

子宮内膜症は、生殖能力を有する年齢の女性の最大10～15%が罹患する最も一般的な婦人疾患の一つである。子宮内膜症には、主として、重い骨盤痛及び/又は不妊が伴うが、月経困難、性交疼痛、及び腹腔内出血、背痛、便秘、及び/又は下痢等の他の様々な症状も伴う。子宮内膜症は、子宮外の部位（腹腔内が最も多い）への子宮内膜細胞（通常は、子宮の内面を構成する）の定着と増殖を特徴とする。該疾病の重篤度には等級を付けることができる。米国生殖医学会議（ASRM）によれば、該疾病は、4つの段階、すなわち、最軽度（段階Ⅰ）、軽度（段階Ⅱ）、中度（段階Ⅲ）、及び重度（段階Ⅳ）に分類される。子宮内膜症の病因及び病原は未だ不明であるが、異所部位への子宮内膜細胞の存在を説明するものとして、逆行性月経理論が最も広く受けられている。しかしながら、逆行性月経は多くの女性で起こっている。従って、子宮内膜細胞に存在する何らかの遺伝的素因又は傾向が、該疾病の発症の原因となっている可能性がある。一次的には、該遺伝的素因はゲノムの突然変異に関わっている可能性があるが、さらに、その後の遺伝子発現の変化をもたらす可能性もある。

【0003】

現在のところ、外科的な手技（腹腔鏡検査法又は開腹）の下で、子宮内膜の病変を直接可視化することが、子宮内膜症を診断する唯一の信頼できる方法である。しかしながら、該方法は、侵襲性が大きく（すなわち、全身麻酔下での手術）、コストもかかる。症状の発生と疾病の診断の間隔は、8～12年にも及ぶこと

がある。理想的には、疾病の進行中に、より簡単、迅速に、できるだけ早く子宮内膜症を診断する見込みが立てば、患者が、痛みや不妊、又はその他の症状に耐える年数を確実に減らすことができるであろう。

【0004】

この見通しに基づいて、複数の研究者が、子宮内膜症の予想ツールとして効率的に使用し得る生物学的マーカー（タンパク質又は遺伝子）の同定を模索してきた。しかしながら、現在まで、これを為し得た者はいない。

【0005】

例えば、子宮内膜症では、幾つかのタンパク質の発現が異なることも示されている。これらには、メタロプロテイナーゼ-1の組織阻害因子（TIMP-1）、 α_3 インテグリン、MCP-1、アロマターゼP450、並びにプラスミノーゲン活性化因子受容体及び阻害因子が含まれる。残念なことに、これらの候補マーカーの診断パラメーター（有病正診率と無病正診率等）が未だあまり明らかになっていないので、これらのマーカーの臨床上の妥当性は不確実なものである。

【0006】

Bcl-2は、病気の女性の正所子宮内膜の中で、卵巣周期の増殖期の間にはアップレギュレートされるほか（Meresman et al. (2000) Fertil. Steril. 74(4):760-6）、前記サイクルの両期の子宮内膜病変部内で（Jones et al. (1998) Hum. Reprod. 13(12):3496-502）、及び子宮内膜症を有する女性の腹腔液由来のマクロファージ中で（McLaren et al. (1997) Hum. Reprod. 12(1):146-52）アップレギュレートされることが報告されている。しかしながら、これらの結果は、卵巣周期の期にかかわらず、疾病に罹患していない女性に比べて、子宮内膜症の女性の正所組織中でBcl-2のダウンレギュレーションが観察された本明細書に示されている本発明者らのデータとは異なっている。

【0007】

ギャップジャンクションに含まれるタンパク質であるコネクシン43（Cx4

3) は、子宮内膜症の女性の異所子宮内膜組織の腺性子宮上皮で異常発現されることが報告されている (Regidor et al. (1997) Mol. Hum. Reprod. 3: 375 - 381)。該研究の最終目標は、子宮内膜組織中でのコネクシンのホルモン制御を明らかにすることに尽き、従って、該報告は、子宮内膜症の女性と子宮内膜症に罹っていない女性の何れの正所組織についても分析していなかった。このため、該研究における知見は、臨床又は診断上の妥当性をほとんど有していない。

【0008】

ヒトシクロオキシゲナーゼ - 2 (COX - 2) は、プロスタグランジンの合成に関与しており、その結果、子宮内膜の間質細胞の増殖と分化、及び妊娠を確立するのに必要な着床期間に関わっていると考えられている (Marions and Danielsson (1999) Mol. Hum. Reprod. 5: 961 - 5)。妊娠中の着床におけるCOX - 2の役割故に、COX - 2は、異所部位への子宮内膜細胞の定着、子宮内膜症の発症に関わっている可能性があるかと推測されてきた。しかしながら、現在までのところ、子宮内膜症におけるCOX - 2の役割を実証し、COX - 2の発現の変化が該疾病をもたらすという決定的な報告は全く存在していない。

【0009】

対照群に比べて、子宮内膜症及び腺筋症を有する女性の子宮内膜腺性細胞の中で、熱ショックタンパク質70 (HSP70) の発現がタンパク質レベルで増加していることが記載されている (Ota et al. (1997) Fertil Steril 68: 23 - 28)。この結果は、免疫組織化学によって得られた。同じ技術を用いて同じ著者が、子宮内膜症又は腺筋症患者の子宮内膜中で、内皮性一酸化窒素合成酵素 (eNOS) とスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) もアップレギュレートされることを示した (Ota et al. (1998) Fertil Steril 69: 303 - 308; Ota et al. (1999) Fertil Steril 72: 129 - 134)。しかしながら、全ての実験が、正確な技術的アプローチで行われているわけではなく、少数の患者に対して該マーカーを調べているために統計的に有意な結果が

得られていないので、これらの研究の臨床的価値は限られている。さらに、Otaの研究では、遺伝子発現の変化は、正所子宮内膜ではなく、異所組織中で起きていることが明らかとなっており、そこに示されている結果は、従って、産業的に応用できない。

【0010】

遺伝子発現を研究しているその他のグループは、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)遺伝子が、対照群に比べて、子宮内膜症の群で多型の割合が高く、それ故、解毒系の総体的な能力が劣り、女性が該疾病に罹りやすくなることを報告している(Baranova et al., (1990) Mol. Hum. Reprod. 5: 636-641)。これらの結果は、内膜症の可能性より、該疾病を保有する遺伝的な素因を反映している。

【0011】

要約すれば、女性が子宮内膜症に罹る可能性を決定する方法、子宮内膜症に罹患している女性を効率的に同定する方法、及び該疾病に罹患している女性の子宮内膜症に等級を付ける方法を記載した者は、これまで全く存在していない。

【0012】

従って、腹腔鏡検査法又は開腹に代わる、子宮内膜症の段階を診断及び確定するためのアプローチが必要とされている。より具体的には、子宮内膜症に罹患していない女性(対照群)に比べて、子宮内膜症の女性(Endo群)の子宮内膜細胞で発現が異なることが知られている、子宮内膜細胞試料の特異的な子宮内膜症関連遺伝子(RNA若しくはcDNA転写物又はそれらの対応するタンパク質)の発現レベルをアッセイする方法を提供することが極めて望ましいであろう。

【0013】

本発明は、これらの要望を充足するものであって、以下の明細書を読めば当業者に明らかであると思われるその他の要望をも充足する。

【0014】

【発明の概要】

本発明の1つの目的は、女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定する方法を提供することである。

【0015】

本発明は、子宮内膜症に罹患している女性の該疾病に等級を付ける方法、及び該疾病を治療する方法を提供することも目的とする。

【0016】

本発明は、上記方法を実施するのに有用なプライマー、プローブ、及びキットにも関する。

【0017】

本発明のある側面によれば、選択した1以上の子宮内膜症関連マーカーの発現レベルをアッセイすることによって、女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定する方法であって、マーカーの発現レベルが前記被験者における子宮内膜症の可能性の指標となる方法が提供される。好ましい実施態様では、前記子宮内膜症関連マーカーは、

1) GENBANK(TM)の遺伝子名が与えられている表1に列記されている遺伝子からなる群から選択される遺伝子、

2) a) 1)に明記されている遺伝子に由来するcDNA、及び配列番号1~16から選択される配列を含むcDNAからなる群から選択されるcDNAを生じさせるリボ核酸、及び

b) a)に明記されたりボ核酸の断片からなる群から選択されるリボ核酸、並びに

3) 1)に明記された遺伝子によってコードされる、又は2)に明記されたりボ核酸によってコードされるペプチド又はタンパク質からなる群から選択される。

【0018】

別の側面では、本発明は、女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定する方法におけるOXPHOS-子宮内膜症関連マーカーの使用に関する。該方法は、
- 女性被験者から正所子宮内膜細胞、好ましくは、上皮子宮内膜細胞の試料を得る工程と、

- 子宮内膜細胞の酸化的リン酸化経路及び/又は内部酸化還元電位センサー経路(OXPHOS)に関わる、子宮内膜細胞試料の少なくとも1つの子宮内膜症関

連マーカーの発現レベルをアッセイする工程と、

- 少なくとも1つのOXPHOS - 子宮内膜症関連マーカーの発現レベルを、少なくともOXPHOS - 子宮内膜症関連マーカーについて確定されたベースラインレベルと比較することによって、前記女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定する工程とを備える。

【0019】

さらなる側面では、本発明は、女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定する方法における子宮内膜症関連マーカーの核酸産物のアッセイに関する。該方法は、

- 女性被験者から子宮内膜細胞、好ましくは、正所子宮内膜細胞の試料を得る工程と、

- 1) GENBANK(TM)の遺伝子名が与えられている表1に列記されている遺伝子からなる群から選択される遺伝子、

2) a) 1)に明記されている遺伝子に由来するcDNA、及び配列番号1~16から選択される配列を含むcDNAからなる群から選択されるcDNAを生じさせるリボ核酸、並びに

b) a)に明記されたりボ核酸の断片からなる群から選択されるリボ核酸

からなる群から選択される、前記子宮内膜細胞試料の少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの核酸産物の発現レベルをアッセイする工程と、

- 前記少なくとも1つの核酸産物の発現レベルを確定されたベースラインと比較することによって、前記女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定する工程とを備える。

【0020】

別の側面では、本発明は、女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定する方法における子宮内膜症関連マーカーのタンパク質産物のアッセイに関する。該方法は、

- 女性被験者から子宮内膜細胞、好ましくは、正所子宮内膜細胞の試料を得る工程と、

- 子宮内膜症関連マーカーの少なくとも1つのタンパク質産物、又は該タンパク質産物の少なくとも1つの断片の発現レベルについて、該子宮内膜細胞試料をアッセイする工程と（前記少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーは、

1) GENBANK(TM)の遺伝子名が与えられている表1に列記されている遺伝子からなる群から選択される遺伝子、

2) a) 1)に明記されている遺伝子に由来するcDNA、及び配列番号1~16から選択される配列を含むcDNAからなる群から選択されるcDNAを生じさせるリボ核酸、並びに

b) a)に明記されたりボ核酸の断片からなる群からなる群から選択されるリボ核酸

からなる群から選択される)、

- 前記少なくとも1つのタンパク質産物の発現レベルを確定されたベースラインレベルと比較することによって、前記女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定する工程とを備える。

【0021】

別の側面によれば、本発明は、子宮内膜症に等級を付ける方法に関する。該方法は、

- 子宮内膜症に罹患している女性被験者から子宮内膜細胞、好ましくは、正所子宮内膜細胞の試料を得る工程と、

- 1) RNAヘリカーゼ、NADH脱水素酵素、hUCC1、AK3、GST、12S rRNA、CO2、アコニターゼ、c-jun、Cx43、GPx4、cox2、hUCC1、Glut-1、TI227H、IL-1、HSP90からなる群から選択される遺伝子、

2) a) 1)に明記されている遺伝子に由来するcDNA、及び配列番号1、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号13から選択される配列を含むcDNAからなる群から選択されるcDNAを生じさせるリボ核酸、及び

b) a)に明記されたりボ核酸の断片からなる群から選択されるリボ核酸、並びに

3) 1)に明記された遺伝子によってコードされる、又は2)に明記されたり

ボ核酸によってコードされるペプチド又はタンパク質からなる群から選択される、前記子宮内膜細胞試料の少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルをアッセイする工程とを備え、

前記少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルが、前記女性被験者の子宮内膜症の段階の指標となる。

【0022】

別の側面によれば、本発明は、女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定するためのキット、又は子宮内膜症に罹患している女性被験者の子宮内膜症に等級を付けるためのキットに関する。該キットは、子宮内膜症関連マーカーの核酸産物又はタンパク質産物に結合する少なくとも1つの結合分子を備える。好ましい実施態様によれば、前記結合分子結合分子は核酸である。別の好ましい実施態様では、前記結合分子は単離された抗体である。

【0023】

さらなる側面によれば、本発明は、単離されたポリヌクレオチド、プライマー、及び/又はプローブ、及び女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定する方法、又は子宮内膜症に罹患している女性被験者の子宮内膜症に等級を付ける方法におけるそれらの使用に関する。

【0024】

本発明は、選択した少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルを調節する工程を備えた、子宮内膜症を治療する方法にも関する。

【0025】

本発明の利点は、腹腔鏡検査法又は開腹の実施に比べて、迅速で、非侵襲性であり、複雑さとコストが著しく低減されていることである。現在利用可能な方法に比べて、本発明によれば、子宮内膜症の存否に応じて、子宮内膜細胞中での発現が異なる子宮内膜症関連遺伝子の発現レベル、及び相対的に高いレベルの有病正診率と無病正診率で、該疾病の段階を直接測定することが可能である。

【0026】

本発明のその他の目的及び利点は、以下の非制限的な説明を読むことによって明らかとなるであろう。

【0027】

【発明の詳細な記述】

A) 定義

本明細書を通じて、一般的に、「塩基対」という用語は「bp」、「デオキシリボ核酸」という用語は「DNA」、「リボ核酸」という用語は「RNA」、「相補的DNA」という用語は「cDNA」、「ポリメラーゼ連鎖反応」という用語は「PCR」、「逆転写」という用語は「RT」と略記される。特に明記していなければ、ヌクレオチド配列は、5'から3'方向に書かれている。

【0028】

本明細書及び特許請求の範囲(このような用語に対して本明細書で与えられている範囲を含む)をより明確に、且つより一貫して理解できるように、以下の定義を与える。

【0029】

結合分子：ある標的分子に適切な態様で付着する任意の分子、例えば、基質に対する酵素、抗原に対する抗体、又は相補鎖に対するDNA鎖。

【0030】

に由来する：本明細書で使用する場合、遺伝子にコードされるメッセンジャーRNAからcDNAが合成されるときに、cDNAは遺伝子「に由来する」。典型的には、ウイルスの逆転写酵素によって触媒され、単離されたmRNAテンプレートからDNAの相補鎖が生成されるインビトロ反応で、cDNAが合成される。

【0031】

子宮内膜細胞：子宮の組織内面を形成する細胞(間質細胞と上皮細胞)を指す。通常、内皮細胞は、女性の月経期間中に剥離した後に、再び増殖し、次の期間までゆっくりと肥厚する。本明細書で使用する「子宮内膜細胞」には、異所子宮内膜細胞のみならず正所子宮内膜細胞も包含される。子宮腔の内面を普通に構成している子宮内膜細胞が正所であり、子宮の外にある子宮内膜細胞が異所であると考えられる。

【0032】

子宮内膜症関連マーカー：女性の子宮内膜における発現レベルが子宮内膜症と相関する任意のアミノ酸産物又は核酸産物を指す。

【0033】

発現レベル：ある細胞又は組織中に存在する一定のアミノ酸産物又は一定の核酸産物の量を指す。「発現」とは、より具体的には、遺伝子によってコードされる情報が細胞中に存在する構造物に転換され、細胞中で作用するプロセスを指す。本明細書で使用する、発現される遺伝子には、mRNAに転写された後、タンパク質に翻訳されるもの、及びRNAに転写されるがタンパク質には翻訳されないもの（例えば、転移及びリボソームRNA）が含まれる。同様に、「ベースライン発現レベル」という表現は、正常な条件下及び正常な機能レベルの下（例えば、子宮内膜症に罹っていない女性）で見られる発現のレベルを指す。「過剰発現」という用語、及び「過少発現」という用語は、それぞれ、ベースライン発現レベルに比べて、分析した発現のレベルが上昇する方向又は下降する方向に乖離していることを指す。

【0034】

女性被験者：生殖能力を有する年齢のヒトの女性を指す。本発明において、前記女性被験者は、不妊及び骨盤痛のような子宮内膜症の臨床症状を示すことが好ましい。

【0035】

断片：タンパク質又は核酸のような分子の切片を指し、アミノ酸又はヌクレオチド配列の任意の部分指す。

【0036】

遺伝子：単一のポリペプチド鎖又はタンパク質に関連するDNA配列を指し、本明細書で使用する場合、5'及び3'非翻訳領域も含む。

【0037】

生じさせる：本明細書で使用する場合、cDNAを合成するためのテンプレートとして、リボ核酸が機能するときに、リボ核酸はcDNAを「生じさせる」。典型的には、ウイルスの逆転写酵素によって触媒され、単離されたmRNAテンプレートからDNAの相補鎖が生成されるインビトロ反応で、cDNAが合成

される。

【0038】

可能性 (l i k e l i h o o d) : 本明細書において「子宮内膜症」という用語とともに使用する場合、より具体的には、現に子宮内膜症に罹患している女性被験者の現存する確率を指す。本用語は、将来、該疾病に罹患する素因を表すものではない。

【0039】

核酸産物：遺伝子の発現に由来する1以上のヌクレオチドを有する任意の分子。本明細書において「子宮内膜症関連マーカー」という表現とともに用いる場合、より具体的には、その発現が子宮内膜症関連マーカー（上記参照）の発現と相関するRNA及びその断片、cDNA及びその断片、発現遺伝子配列断片（EST）を指す。

【0040】

O X P H O S : 「酸化的リン酸化」の略称。本明細書で使用する場合、O X P H O S とは、A T P がリン酸化されるミトコンドリアの呼吸鎖に共役した連続する酵素反応、及びこれらの反応に含まれる核酸及びタンパク質産物を指す。

【0041】

性周期の期：月経周期又は卵巢周期の間に、ホルモンの影響の結果、生理的变化が女性に起こる発情期間を指す。簡潔に述べれば、ヒトの女性では、月経周期は、2つの期 (p h a s e)、すなわち、「増殖期」（卵胞期とも称され、本明細書ではP期と称する）と「分泌期」（黄体期とも称され、本明細書ではS期と称する）に分けられる。増殖期は、通常月経周期の0日から14日にまで及び、分泌期は、通常15日から28日にまで及び。排卵は、標準的な月経周期の14日目に起こる。

【0042】

タンパク質産物：メッセンジャーRNAのリボソームでの翻訳中に、ペプチド結合の形成によって組み立てられた2以上のアミノ酸を含有する有機分子を指す。本明細書において「子宮内膜症関連マーカー」という表現とともに使用される場合、より具体的には、その発現が子宮内膜症関連マーカー（上記参照）の発

現と相関するペプチド、タンパク質、糖タンパク質、及びタンパク質断片を指す。

【0043】

B) 発明の総括

本発明は、子宮内膜症の初期検出、診断、予後診断、等級付け、及び治療に関する。ヒトの子宮内膜細胞から単離された核酸配列、タンパク質、及びペプチドの形態の子宮内膜症のマーカが開示されている。これらの「子宮内膜症関連マーカ」の発現レベルは、女性被験者における子宮内膜症の可能性の指標となり、子宮内膜症を有すると診断された女性被験者の子宮内膜症の段階の指標となる。好ましくは、本発明の子宮内膜症関連マーカは、下表1に列記されているものである。表2には、これらの子宮内膜症関連マーカのうちの幾つかのヌクレオチド配列が列記されており、本発明者らによって、DD1～DD16（配列番号1～16）とも表記されている。

【0044】

C) 子宮内膜症の可能性を決定する方法

i) 子宮内膜症関連マーカ

本発明のある側面によれば、女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定する方法において、前記子宮内膜症関連マーカが使用される。該方法は、

- 女性被験者から子宮内膜細胞（好ましくは、正所子宮内膜細胞、さらに好ましくは上皮性正所子宮内膜細胞）の試料を得る工程と、

- 1) GENBANK(TM)の遺伝子名が与えられている表1に列記されている遺伝子からなる群から選択される遺伝子、

2) a) 1)に明記されている遺伝子に由来するcDNA、及び配列番号1～16から選択される配列を含むcDNAからなる群から選択されるcDNAを生じさせるリボ核酸、及び

b) a)に明記されたりボ核酸の断片からなる群から選択されるリボ核酸、並びに

3) 1)に明記された遺伝子によってコードされる、又は2)に明記されたりボ核酸によってコードされるペプチド又はタンパク質

からなる群から選択される少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルに関して、子宮内膜細胞の試料をアッセイする工程とを備える。

【0045】

該方法によれば、前記子宮内膜症関連マーカーの発現レベルは、前記女性被験者の子宮内膜症の可能性の指標となる。好ましくは、前記方法は、前記子宮内膜症関連マーカーの発現レベルを、確定されたベースライン発現レベルと比較する工程をさらに備える。前記子宮内膜症関連マーカーのベースラインレベルは、好ましくは、子宮内膜症に罹っていない女性の陰性参照群における同じマーカーの発現レベルをアッセイすることによって確定される。

【0046】

好ましい実施態様によれば、表4に列記されている少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカー、より具体的には、以下の子宮内膜症関連マーカー

1) NADH脱水素酵素、hUCC1、パラレンミン(Paralemmin)、クエン酸輸送タンパク質、HIF1、ARNT、Glut-1、MnSOD、GPx、ATPシンターゼ、c-jun、Cx43、HSP70、及びcox2からなる群から選択される遺伝子、

2) a) 1)に明記されている遺伝子に由来するcDNA、及び配列番号9、配列番号10、配列番号13~15から選択される配列を含むcDNAからなる群から選択されるcDNAを生じさせるリボ核酸、及び

b) a)に明記されたりボ核酸の断片からなる群から選択されるリボ核酸、並びに

3) 1)に明記された遺伝子によってコードされる、又は2)に明記されたりボ核酸によってコードされるペプチド又はタンパク質の過剰発現は、女性被験者における子宮内膜症の可能性がより高いことの指標となる。

【0047】

別の好ましい実施態様によれば、表5に列記された少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカー、より具体的には、以下の子宮内膜症関連マーカー

1) Cap43、RNAヘリカーゼ、CO3、FKHR、12S rRNA、

AK3、カタラーゼ、GST、eNOS、12S rRNA、TI227H、CO2、アコニターゼ、ANT-1、Bcl-2、COUP-TF、IL-1、HSP90、GPx4、及びGRP78からなる群から選択される遺伝子、

2) a) 1) に明記されている遺伝子に由来するcDNA、及び配列番号1~8、配列番号11、配列番号12、配列番号16から選択される配列を含むcDNAからなる群から選択されるcDNAを生じさせるリボ核酸、及び

b) a) に明記されたりボ核酸の断片からなる群から選択されるリボ核酸、並びに

3) 1) に明記された遺伝子によってコードされる、又は2) に明記されたりボ核酸によってコードされるペプチド又はタンパク質の過少発現は、女性被験者における子宮内膜症の可能性がより高いことの指標となる。

【0048】

本発明者らは、子宮内膜細胞が女子被験者の性周期の増殖期又は分泌期に於いて得られたかどうかに応じて調節される子宮内膜症関連マーカーが存在することも見出した。下表6と7は、その発現レベルが、それぞれ、増殖期と分泌期において調節されることが明らかとなった本発明の子宮内膜症関連マーカーのリストである。従って、好ましい実施態様では、本発明の方法は、さらに、1) 子宮内膜細胞が性周期のどの期で得られたかを確定する工程と、2) 1) で決定した期に従って、発現レベルをアッセイすべき子宮内膜症関連マーカーを選択する工程とを備える。性周期の期は、一例を挙げれば、(好ましくは、子宮内膜組織の) 組織学的な検査、RNAの発現レベルを評価する方法、及び性ステロイドのレベルを評価する方法などの本分野で周知な技術を用いることによって評価し得る。

【0049】

従って、好ましい実施態様では、性周期の増殖期に、女性被験者から子宮内膜細胞を採取し、

1) NADH脱水素酵素、hUCC1、パラレンミン、クエン酸輸送タンパク質、HIF1、ARNT、Glut-1、MnSOD、GPx、ATPシンターゼ、c-jun、Cx43、HSP70、及びcox2からなる群から選択さ

れる遺伝子、

2) a) 1) に明記されている遺伝子に由来するcDNA、及び配列番号9、配列番号10、配列番号13～15から選択される配列を含むcDNAからなる群から選択されるcDNAを生じさせるリボ核酸、及び

b) a) に明記されたりボ核酸の断片からなる群から選択されるリボ核酸、並びに

3) 1) に明記された遺伝子によってコードされる、又は2) に明記されたりボ核酸によってコードされるペプチド又はタンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの過剰発現レベルは、子宮内膜症に罹患していない女性被験者に比べて、女性被験者の子宮内膜症の可能性がより高いことの指標となる。

【0050】

別の好ましい実施態様では、性周期の分泌期に、女性被験者から子宮内膜細胞を採取し、

1) hUCC1、パラレンミン、クエン酸輸送タンパク質、HIF1、Glut-1、MnSOD、GPx、ATPシンターゼ、c-jun、Cx43、HSP70、及びcox2からなる群から選択される遺伝子、

2) a) 1) に明記されている遺伝子に由来するcDNA、及び配列番号13～15から選択される配列を含むcDNAからなる群から選択されるcDNAを生じさせるリボ核酸、及び

b) a) に明記されたりボ核酸の断片からなる群から選択されるリボ核酸、並びに

3) 1) に明記された遺伝子によってコードされる、又は2) に明記されたりボ核酸によってコードされるペプチド又はタンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの過剰発現レベルは、子宮内膜症に罹患していない女性被験者に比べて、女性被験者における子宮内膜症の可能性がより高いことの指標となる。

【0051】

また、さらに好ましい実施態様では、性周期の増殖期に、女性被験者から子宮

内膜細胞を採取し、

1) Cap43、RNAヘリカーゼ、FKHR、12S rRNA、AK3、GST、eNOS、TI227H、CO2、ANT-1、Bcl-2、IL-1、及びHSP90からなる群から選択される遺伝子、

2) a) 1) に明記されている遺伝子に由来するcDNA、及び配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号8、配列番号12、配列番号16から選択される配列を含むcDNAからなる群から選択されるcDNAを生じさせるリボ核酸、及び

b) a) に明記されたりボ核酸の断片からなる群から選択されるリボ核酸、並びに

3) 1) に明記された遺伝子によってコードされる、又は2) に明記されたりボ核酸によってコードされるペプチド又はタンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの過少発現レベルは、子宮内膜症に罹患していない女性被験者に比べて、女性被験者における子宮内膜症の可能性がより高いことの指標となる。

【0052】

別の好ましい実施態様では、性周期の分泌期に、女性被験者から子宮内膜細胞を採取し、

1) RNAヘリカーゼ、CO3、FKHR、12S rRNA、AK3、カタラーゼ、GST、12S rRNA、TI227H、アコニターゼ、Bcl-2、COUP-TF、IL-1、HSP90、GPx4、及びGRP78からなる群から選択される遺伝子、

2) a) 1) に明記されている遺伝子に由来するcDNA、配列番号1~8、配列番号11、配列番号12、配列番号16から選択される配列を含むcDNAからなる群から選択されるcDNAを生じさせるリボ核酸、及び

b) a) に明記されたりボ核酸の断片からなる群から選択されるリボ核酸、並びに

3) 1) に明記された遺伝子によってコードされる、又は2) に明記されたりボ核酸によってコードされるペプチド又はタンパク質

からなる群から選択される少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの過少発現レベルは、子宮内膜症に罹患していない女性被験者に比べて、女性被験者における子宮内膜症の可能性がより高いことの指標となる。

【0053】

本発明の別の好ましい実施態様では、少なくとも2つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルを組み合わせてアッセイする。一般に、マーカーを組み合わせることによって、本発明の方法の無病正診率と有病正診率を増加させることが可能である。表11には、子宮内膜症関連マーカーの組み合わせの例が幾つか記載されている。本発明の子宮内膜症関連マーカーのような遺伝子及びタンパク質マーカーの発現レベルをアッセイする方法は周知である。核酸をアッセイする方法及び材料には、BioChip、膜、及びガラスのcDNAアレイに基づく技術；RT-PCR；インシチュハイブリダイゼーション；細胞株又は初代培養モデル中でのインビトロプロモーター融合試験；核run-onのような転写速度研究技術；膜プロットハイブリダイゼーションアプローチ；核酸の直接標識が含まれる。タンパク質及びペプチドをアッセイする方法及び材料には、膜プロットハイブリダイゼーションアプローチ；タンパク質又はペプチドの直接標識；プロテオミクス；フローサイトメトリー；免疫細胞化学；免疫組織化学；ELISAに基づくアプローチが含まれる。分子生物学及び免疫学の当業者であれば、価値ある結果を得るために、具体的な要求に応じて、これらの方法をどのように選択し、適合し、使用するか理解できるであろう。例えば、女性、より具体的には、子宮内膜症に関連する症状を有する女性をスクリーニングするためには、cDNAハイブリダイゼーションアッセイの無病正診率と有病正診率の見地から最良と考えられる遺伝子マーカーを保持するバイオチップを開発することは比較的容易であり得る。

【0054】

ある場合には、ある種の遺伝子マーカーとタンパク質マーカーの過剰発現によって、患者の血液中に自己抗体の産生が誘導される。従って、間接的ではあるが、これらの自己抗体を測定して、本発明の遺伝子及びタンパク質マーカーの発現レベルをアッセイすることが別の代替法であり得る。

【0055】

i i) O X P H O S - 子宮内膜症関連マーカー

別の側面では、本発明は、女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定する方法におけるOXPHOS - 子宮内膜症関連マーカーの使用に関する。OXPHOSは、子宮内膜細胞の酸化的リン酸化経路及び/又は内部酸化還元電位センサー経路をあらわす。該方法は、

- 女性被験者から正所子宮内膜細胞、好ましくは、上皮子宮内膜細胞の試料を得る工程と、
- 前記子宮内膜細胞試料のOXPHOSに関わる少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルをアッセイする工程と、
- 少なくとも1つのOXPHOS - 子宮内膜症関連マーカーの発現レベルを、少なくともOXPHOS - 子宮内膜症関連マーカーの確立されたベースラインレベルと比較することによって、前記女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定する工程とを備える。

【0056】

好ましい実施態様によれば、子宮内膜細胞の酸化的リン酸化経路に関わるOXPHOS - 子宮内膜症関連マーカーは、NADH脱水素酵素、クエン酸輸送タンパク質、HIF1、ARNT、AK3、Glut-1、MnSOD、GPx、GRP78、カタラーゼ、GST、eNOS、CO2、アコニターゼ、ANT-1、ATPシンターゼ、Bcl-2、GPx4、及びcox2からなる群から選択される遺伝子である。子宮内膜細胞が属する性周期の期に従って、アッセイすべき前記OXPHOS - 子宮内膜症関連マーカーを選択することも好ましいかもしれない。

【0057】

i i i) 子宮内膜症関連マーカーの核酸産物

別の側面では、本発明は、女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定する方法に従って、子宮内膜症関連マーカーの核酸産物をアッセイすることに関する。該方法は、

- 女性被験者から子宮内膜細胞、好ましくは、正所子宮内膜細胞の試料を得る工

程と、

- 1) GENBANK(TM)の遺伝子名が与えられている表1に列記されている遺伝子からなる群から選択される遺伝子、

2) a) 1)に明記されている遺伝子に由来するcDNA、及び配列番号1~16から選択される配列を含むcDNAからなる群から選択されるcDNAを生じさせるリボ核酸、及び

b) a)に明記されたりボ核酸の断片からなる群から選択されるリボ核酸からなる群から選択される子宮内膜症関連マーカーの少なくとも1つの核酸産物の発現レベルについて、前記子宮内膜細胞の試料をアッセイする工程と、
- 前記少なくとも1つの核酸産物の発現レベルを、確立されたベースラインレベルと比較することによって、前記女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定する工程とを備える。

【0058】

好ましい実施態様によれば、前記女性被験者における子宮内膜症の可能性は、Cap43、RNAヘリカーゼ、NADH脱水素酵素、CO3、FKHR、hUCC1、パラレンミン、クエン酸輸送タンパク質、HIF1、ARNT、AK3、MnSOD、GPx、アコニターゼ、ATPシンターゼ、c-jun、COUP-TF、Cx43、HSP70、及びGRP78からなる群から選択される遺伝子の少なくとも1つの核酸産物の発現レベルをアッセイすることによって決定される。

【0059】

別の好ましい実施態様によれば、女性被験者における子宮内膜症の可能性は、配列番号8~16から選択される配列を含むcDNA及びそれらの断片を生じさせるリボ核酸からなる群から選択されるリボ核酸の発現レベルをアッセイすることによって決定される。

【0060】

より好ましくは、選択した子宮内膜症関連マーカーのベースラインレベルは、子宮内膜症に罹患していない女性の陰性参照群における子宮内膜症関連マーカー

の発現レベルをアッセイすることによって確定される。前記少なくとも1つの核酸産物がメッセンジャーリボ核酸(mRNA)であり、該mRNAはcDNAを合成するためのテンプレートとして機能することも好ましい。

【0061】

前記少なくとも1つの核酸産物の発現レベルは、バイオチップ、膜、及びガラスのcDNAアレイに基づく方法；RT-PCR；インシチュハイブリダイゼーション；細胞株又は初代培養モデル中でのインビトロプロモーター融合試験；転写速度研究法；膜プロットハイブリダイゼーション；標識などの周知の方法を用いてアッセイすることができる。さらに好ましくは、少なくとも2つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルをアッセイする。性周期の期と合致した、核酸産物をアッセイすべき子宮内膜症関連マーカーを適切に選択するために、前記子宮内膜細胞が得られた性周期の期を確定することも望ましいかもしれない。

【0062】

iv) 子宮内膜症関連マーカーのタンパク質産物

別の側面では、本発明は、女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定する方法に従って、子宮内膜症関連マーカーのアミノ酸産物をアッセイすることに関する。該方法は、

- 女性被験者から子宮内膜細胞、好ましくは、正所子宮内膜細胞の試料を得る工程と、

- 子宮内膜症関連マーカーの少なくとも1つのタンパク質産物、又は該タンパク質産物の少なくとも1つの断片の発現レベルについて、該子宮内膜症細胞の試料をアッセイする工程と（前記少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーは、

1) GENBANK(TM)の遺伝子名が与えられている表1に列記されている遺伝子からなる群から選択される遺伝子、

2) a) 1)に明記されている遺伝子に由来するcDNA、及び配列番号1~16から選択される配列を含むcDNAからなる群から選択されるcDNAを生じさせるリボ核酸、並びに

b) a)に明記されたりボ核酸の断片からなる群から選択されるリボ核酸

からなる群から選択される)、

- 前記少なくとも1つのタンパク質産物の発現レベルを確定されたベースラインレベルと比較することによって、前記女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定する工程とを備える。

【0063】

好ましい実施態様によれば、選択したタンパク質産物のベースラインレベルは、子宮内膜症に罹患していない女性の陰性参照群におけるタンパク質産物の発現レベルをアッセイすることによって確定される。前記少なくとも1つのタンパク質産物は、CAP-43タンパク質又はその断片であることも好ましい。

【0064】

前記少なくとも1つのタンパク質産物の発現レベルは、膜プロットハイブリダイゼーション；標識；プロテオミクス；フローサイトメトリー；免疫細胞化学；免疫組織化学；及びELISA等の周知の方法を用いてアッセイすることができる。さらに好ましくは、少なくとも2つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルを組み合わせてアッセイする。アッセイすべきタンパク質産物が性周期の期と合致するように、前記子宮内膜症関連マーカーを適切に選択するために、前記子宮内膜細胞が得られた性周期の期を確定することも望ましいかもしれない。

【0065】

D) 子宮内膜症の等級を付ける方法

本発明者らは、子宮内膜症の段階に応じて、特定の子宮内膜症関連マーカーの発現レベルが調節されることも見出した。下表8には、その発現レベルが子宮内膜症の段階に応じて調節されることが見出された子宮内膜症関連マーカーのリストが示されている。従って、別の側面によれば、本発明は、子宮内膜症の等級を付ける方法に関する。該方法は、

- 子宮内膜症に罹患している女性被験者から子宮内膜細胞、好ましくは、正所子宮内膜細胞の試料を得る工程と、

- 1) RNAヘリカーゼ、NADH脱水素酵素、hUCC1、AK3、GST、12S rRNA、CO2、アコニターゼ、c-jun、Cx43、GPx4、cox2、hUCC1、Glut-1、TI227H、IL-1、HSP90

からなる群から選択される遺伝子、

2) a) 1) に明記されている遺伝子に由来する cDNA、及び配列番号 1、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 13 から選択される配列を含む cDNA からなる群から選択される cDNA を生じさせるリボ核酸、及び

b) a) に明記されたりボ核酸の断片からなる群から選択されるリボ核酸

3) 1) に明記された遺伝子によってコードされる、又は 2) に明記されたりボ核酸によってコードされるペプチド又はタンパク質からなる群から選択される少なくとも 1 つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルについて、前記子宮内膜細胞の試料をアッセイする工程とを備え、

前記少なくとも 1 つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルが、前記女性被験者における子宮内膜症の段階の指標となる。

【0066】

好ましい実施態様では、少なくとも 1 つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルが、前記女性被験者が子宮内膜症の第 I 若しくは II、又は第 III 若しくは第 IV 段階にあるかどうかの指標となるように、該方法が使用される。

【0067】

より具体的には、NADH 脱水素酵素、c-jun、Cx43、及び/又は Cox2 の過剰発現は、前記女性被験者が実質的に子宮内膜症の第 I 又は II 段階にあるかどうかの指標となり、hUCC1 及び/又は Glut-1 の過剰発現は、子宮内膜症の第 III 又は第 IV 段階にあるかどうかの指標となることを見出された。CO2、配列番号 1、配列番号 6、アコニターゼ、GPx4、RNA ヘリカーゼ、AK3、GST、及び/又は 12S rRNA の過少発現は、前記女性被験者が実質的に子宮内膜症の第 I 又は II 段階にあるかどうかの指標となり、TI227H、IL-1、及び/又は HSP90 の過少発現は、前記女性被験者が子宮内膜症の第 III 又は第 IV 段階にあるかどうかの指標となることも見出された。このため、これらのマーカーが過少発現又は過剰発現されているかどうかは、子宮内膜症の段階の強固な指標となる。

【0068】

より好ましくは、前記方法は、前記少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルを、確定されたベースラインレベルと比較する工程をさらに備える。ベースラインレベルは、

- ある実質的に確定的な子宮内膜症の段階にあることが知られている第一の女性被験者の陽性参照群から得た子宮内膜症細胞の試料中に存在する少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルをアッセイすること、
- 前記第一の陽性参照群の前記段階とは異なる別の実質的に確定的な子宮内膜症の段階にあることが知られている第二の女性被験者の陽性参照群から得た子宮内膜細胞の試料中に存在する少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルをアッセイすること、
- 前記少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルを、前記第一及び第二の陽性参照群から得られた発現レベルと比較すること

によって得ることができる。

【0069】

本発明の子宮内膜症関連マーカー（遺伝子又はタンパク質）の発現レベルの測定は、本明細書に記載されているように実施することができる。アッセイすべきタンパク質産物が性周期の期と合致するように、前記子宮内膜症関連マーカーを適切に選択するために、前記子宮内膜細胞が得られた性周期の期を確定することも望ましいかもしれない。

【0070】

E) キット

別の側面によれば、本発明は、女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定するためのキット、又は子宮内膜症に罹患している女性被験者における子宮内膜症の等級を付けるためのキットに関する。本発明のキットは、

- 子宮内膜症関連マーカーの核酸産物又はタンパク質産物に結合させるための少なくとも1つの結合分子

（前記子宮内膜症関連マーカーは、

- 1) GENBANK (TM) の遺伝子名が与えられている表1に列記されている遺伝子からなる群から選択される遺伝子、

2) a) 1) に明記されている遺伝子に由来する cDNA、及び配列番号 1 ~ 16 から選択される配列を含む cDNA からなる群から選択される cDNA を生じさせるリボ核酸、

b) a) に明記されたりボ核酸の断片からなる群から選択されるリボ核酸、

3) 1) に明記された遺伝子によってコードされる、又は 2) に明記されたりボ核酸によってコードされるペプチド又はタンパク質からなる群から選択される)、並びに

- 前記結合分子のための支持体、混合チューブ、緩衝液、酵素、及び前記結合分子を検出するための物質からなる群から選択される少なくとも 1 つの要素を備える。

【0071】

好ましい実施態様によれば、前記結合分子は、

a) GENBANK (TM) 受付番号が表 1 に与えられている EST 及び mRNA、

b) 標準的な条件下で、a) に明記されている核酸にハイブリダイズする一本鎖核酸、

c) a) 又は b) に明記されている核酸の逆転写によって得られる一本鎖核酸、

d) GENBANK (TM) 受付番号が表 1 に与えられている DNA 及び cDNA、

e) 標準的な条件下で、d) に明記されている核酸にハイブリダイズする二本鎖及び一本鎖核酸、

f) d) 又は e) に明記されている核酸の逆転写によって得られる二本鎖及び一本鎖核酸、及び

g) a) ~ f) に明記されている核酸の断片からなる群から選択される核酸に、標準的な条件下でハイブリダイズする核酸である。

【0072】

本明細書で使用する場合、核酸のハイブリダイゼーションとは、相補的な塩基配列を有する2つの一本鎖核酸分子が、適切な条件下で混合されたときに、熱力学的に好ましい二本鎖構造を再編するという原理を指す。例えば、約0.1~0.25MのNaCl、約37~55の温度によって中程度のストリンジェンシー条件を与えることができ、約0.15~0.9MのNaCl、約20~55の範囲の温度によって低ストリンジェンシー条件を与えることができる。このように、「標準的なハイブリダイゼーション条件」は、所望の結果に応じて変動する。

【0073】

別の好ましい実施態様によれば、前記結合分子は、前述されているような子宮内膜症関連マーカーの少なくとも1つのタンパク質産物に対して誘導された単離された抗体、又は該タンパク質産物の断片に対して誘導された単離された抗体である。

【0074】

他のタイプの結合分子には、糖及び糖タンパク質のような小分子が含まれる。

【0075】

F) ポリヌクレオチド、プライマー、プローブ、及びそれらの使用

別の側面によれば、本発明は、単離されたポリヌクレオチドに関する。本発明のポリヌクレオチドは、

a) 配列番号1~10、配列番号12~16、及びそれらの一部からなる群から選択される核酸配列を含むポリヌクレオチド、

b) a) に明記されているポリヌクレオチドに相補的な核酸配列を含むポリヌクレオチド

からなる群から選択される。

【0076】

これらのポリヌクレオチドは、特に本発明の方法の生物学的マーカーとして、プライマーとして、及び/又は子宮内膜症用のプローブとして、多くの用途を有している。該ポリヌクレオチドは、遺伝子治療法で有用な一本鎖又は二本鎖核酸（アンチセンス、遺伝子サイレンシング、二本鎖RNA等）を調製するためのテ

ンプレートとして使用することもできる。

【0077】

本発明は、女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定するためのプライマー及び/又はプローブ、又は子宮内膜症に罹患している女性被験者の子宮内膜症の等級を付けるためのプライマー及び/又はプローブにも関する。本発明によれば、該プライマー又はプローブは、

- a) GENBANK (TM) 受付番号が表1に与えられているEST及びmRNA、
 - b) 標準的な条件下で、a)に明記されている核酸にハイブリダイズする一本鎖核酸、
 - c) a)又はb)に明記されている核酸の逆転写によって得られる一本鎖核酸、
 - d) GENBANK (TM) 受付番号が表1に与えられているDNA及びcDNA、
 - e) 標準的な条件下で、d)に明記されている核酸にハイブリダイズする二本鎖及び一本鎖核酸、
 - f) d)又はe)に明記されている核酸の逆転写によって得られる二本鎖及び一本鎖核酸、及び
 - g) a)～f)に明記されている核酸の断片
- からなる群から選択される単離された核酸を含む。

【0078】

本発明には、女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定するための方法における上述の単離されたポリヌクレオチド及び核酸の使用、又は子宮内膜症に罹患している女性被験者の子宮内膜症に等級を付けるための方法における上述の単離されたポリヌクレオチド及び核酸の使用も包含される。これらの方法には、バイオチップ、膜、ガラスのcDNAアレイに基づく技術；RT-PCR；インシチュハイブリダイゼーション；細胞株又は初代培養モデル中でのインビトロプロモーター融合試験；転写速度研究法；膜プロットハイブリダイゼーション；標識が含まれ得る。例えば、女性のスクリーニングにおける無病正診率と有病正診率

に関して「最良である」と考えられる上述の単離された核酸を幾つか、子宮内膜症について女性をスクリーニングするためのバイオチップ及び/又は女性の子宮内膜症の段階を評価するためのバイオチップに結合することができるであろう。

【0079】

本発明には、女性被験者中の子宮内膜症を検出するための診断法も含まれる。本発明の診断法には、前記可能性を決定するための上記方法の何れか、及び/又は上述のキット、単離されたポリヌクレオチド、核酸プローブ及びプライマーの使用が含まれる。実際に、選択した子宮内膜症関連マーカーに応じて、特に組み合わせで使用する場合には、本発明によれば、極めて高い有病正診率と極めて高い無病正診率で、子宮内膜症を有する女性を診断することが可能である。

【0080】

G) 子宮内膜症を治療する方法

さらなる側面によれば、本発明は、子宮内膜症を治療する方法に関する。該方法は、

1) GENBANK(TM)の遺伝子名が与えられている表1に列記されている遺伝子からなる群から選択される遺伝子、

2) a) 1)に明記されている遺伝子に由来するcDNA、及び配列番号1~16から選択される配列を含むcDNAからなる群から選択されるcDNAを生じさせるリボ核酸、及び

b) a)に明記されたりボ核酸の断片からなる群から選択されるリボ核酸、並びに

3) 1)に明記された遺伝子によってコードされる、又は2)に明記されたりボ核酸によってコードされるペプチド又はタンパク質からなる群から選択される子宮内膜症関連マーカーの発現レベルを調節する工程を備える。

【0081】

好ましい実施態様では、表5に列記されている少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルが増加される。別の好ましい実施態様では、表4に列記されている少なくとも1つの以下の子宮内膜症関連マーカーの発現レベルが減少

される。

【0082】

本発明の子宮内膜症関連マーカー等の遺伝子及びタンパク質マーカーの発現レベルを増加又は減少させる方法及び材料は周知であり、当業者の知識の範囲に属する。公知の方法及び材料のリストには、食物、ビタミン、栄養補助食品(dietary supplement)、遺伝子療法、アンチセンスオリゴヌクレオチド、薬物、及びホルモン性薬物(hormonal medications)が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0083】

本発明の治療法によれば、例えば、実際には子宮内膜症の治療に使用されていない、METAPHORE PHARMACEUTICALS(TM) (www.metaphore.com) から市販されているROSスカベンジャー分子等の細胞中のROSレベルを減少させる化合物を使用できる可能性があるとして仮定される。従って、上述の子宮内膜症関連マーカーの発現レベルを調節する分子を含む子宮内膜症を治療するための薬学的組成物も、本発明の範囲に属する。

【0084】

【実施例】

以下の実施例は、本発明の可能な広範な応用範囲を例示するものであって、本発明の範囲を制限するものではない。本発明の精神及び範囲を逸脱しなければ、変更及び変化を加えることが可能である。本発明の試験の実施において、本明細書の説明と同様または同等の方法及び材料を使用することが可能であるが、好ましい方法及び物質について説明する。

【0085】

実施例1：遺伝子マーカー

1) 課題

信頼できる非侵襲性の子宮内膜症検出用診断ツールがないため、子宮内膜症に罹患していない被験者(対照群)と比較して、子宮内膜症に罹患した女性被験者(Endo群)の子宮内膜で発現が異なっている遺伝子を同定することに研究の焦点を当てた。同定を実現するために、3種類の定量的なアプローチ、すなわち

、ディファレンシャルディスプレイ法、cDNAアレイハイブリダイゼーション法、及び特異的RT-PCR法を使用した。特に記載がなければ、実験は全て子宮内膜の濃縮した腺画分から得られたRNAを使用して実施した。さらに、分析によっては、未分画子宮内膜生検から単離されたRNAからも結果を得た。

【0086】

2) 材料及び方法

後述した例で使用した実験方法と材料を以下に示す。

【0087】

採用患者

本実施例のために実施された研究に登録した患者の一般的な必要条件は、子宮内膜症に罹患していない対照群と子宮内膜症に罹患した群の両群について、以下の通りである。

【0088】

- 閉経前の年齢である。

【0089】

- 現在、月経中ではない。

【0090】

- 月経周期が21日から35日の間である。

【0091】

- 急性卵管炎に罹っていない。

【0092】

- HIV、B型肝炎またはC型肝炎陽性の診断を受けていない。

【0093】

- 現在、また過去3ヶ月間妊娠していない。

【0094】

- 現在、授乳中ではない。

【0095】

- GnRH作用薬、プロゲスチン、ダナゾール、及び経口避妊薬から成る群から選択された化合物を過去3ヶ月間使用していない。及び、

- 子宮内避妊具 (I . U . D) を過去 3 ヶ月間使用していない。

【 0 0 9 6 】

子宮内膜の生検を提供する子宮内膜症陽性群に採用した女性は、腹腔鏡検査を行い、外科的検査時に子宮内膜症の存在が確認された女性から選択した。該疾病の段階は、米生殖医学会議 (A S R M) に従って、以下の通りの分類、段階 I (最軽度)、段階 I I (軽度)、段階 I I I (中等度)、及び段階 I V (重度) に定義した。

【 0 0 9 7 】

対照群に適格であるためには、生検を提供する女性は以下の状態を満たさなければならないものとした。

【 0 0 9 8 】

- 卵管結紮または卵管再吻合のために腹腔鏡検査を受けている。

【 0 0 9 9 】

- 手術時に、腹腔内に子宮内膜症病変は検出されなかった。

【 0 1 0 0 】

- 一親等の近親者に子宮内膜症の病歴がない。及び、

- 不妊症の徴候がない。

【 0 1 0 1 】

子宮内膜症 (E n d o) の女性をさらに、2種類の実験群、すなわち、E X P 1 (段階 I 及び I I) 及び E X P 2 (段階 I I I 及び I V) に分けた。最終月経によって示され、組織学的検査によって確認された月経周期の期に基づいて、実験群をさらに、増殖 (P) 期と分泌 (S) 期の群に分けた。

【 0 1 0 2 】

組織試料

子宮内膜の生検は、腹腔鏡法の前に麻酔して、通常のキューレットを使用して患者から採取した。採取した組織は氷上に維持し、4時間以内に実験に使用した。実験は、濃縮した腺画分または未分画生検のいずれかで実施した。

【 0 1 0 3 】

濃縮腺画分からの R N A の単離と調製

酵素消化によって、子宮内膜から得られた腺画分を濃縮した。まず、HBSS培地(LIFE TECHNOLOGIES(TM))の存在下で、小片に切断した。次に、この小片を、パンクレアチン3.4mg/ml、ヒアルロニダーゼ0.1mg/ml及びコラゲナーゼ1.6mg/ml(SIGMA(TM))を含む酵素混合物で37℃、5%CO₂の下で50分間、該小片を消化した。酵素消化後、サイズ排除によって間質画分から腺細胞を分離した。すなわち、消化した細胞懸濁物を41µm及び11µmのフィルタで相次いで濾過した。腺画分は、フィルタ上に保持された細胞から成る。

【0104】

全RNAは、子宮内膜腺性細胞から単離した。腺性細胞画分の重量を量り、2.7M グアニジンチオシアネート、1.3M チオシアン酸アンモニウム、及び0.1M 酢酸ナトリウム、pH4.0を含有する変性溶液で、細胞を最終濃度100mg/mlになるように再懸濁した。次に、イソプロパノール1容量で沈殿させる前にフェノール/クロロホルムで、懸濁液を2回抽出した。RNAペレットを80%エタノールで洗浄して、H₂Oで最終濃度1µg/µlに再懸濁した。

【0105】

未分画生検からのRNAの単離と調製

全細胞RNAは、子宮内膜生検組織から直接単離した。簡単に述べると、TRIZOL(TM)(LIFE TECHNOLOGIES(TM))3mlの存在下で、電気ホモゲナイザを使用して、生検組織200~300mgをホモゲナイズした。RNAは、TRIZOL(TM)製造者のプロトコールに従って調製した。明瞭な界面を得るためには、通常フェノール/クロロホルムでさらに2または3回抽出することが必要であった。次に、前述の通りにRNAを沈殿させ、再懸濁した。

【0106】

ディファレンシャルディスプレイ

ディファレンシャルディスプレイ(DD)は、Liang及びPardee(Differential Display: Methods and Pro

tocols、1997、Humana Press、Totowa、N.J. p. 1-11)に従って、腺性細胞または未分画生検から単離した全RNAを使用して実施した。STRATAGENE ROBOCYCLER(TM)(STRATAGENE(TM))で、94(1分)、40(2分)、72(1分)を40回及び最終伸長727分を行って増幅を実施した。以下の試薬を使用した。M-MLV逆転写酵素(LIFE TECHNOLOGIES(TM))、³³P-dATP(AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH(TM)、2500 Ci/mmol)、及びrTaq DNAポリメラーゼ(AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH(TM))。

【0107】

PCR産物のクローニング

TAクローニングキット(TM)(INVITROGEN(TM))を使用し、製造元の取扱説明書に従って、ディファレンシャルディスプレイによって同定した断片をクローニングした。所望の断片を含有するクローンは、Maniatis他(Maniatis他、1992、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.)で記載された通りにコロニー-PCRによって、lacZ-20及びリバースプライマーを使用して同定した。

【0108】

リバース-ノザンプロット

正に荷電したナイロン膜(BOEHRINGER MANNHEIM(TM))にコロニー-PCR産物を沈着させ、³²P-標識ディファレンシャルディスプレイプローブとハイブリダイズさせた。シーケンシングのために、異なるパターンが予想されるいくつかのクローンを選択した。同一の配列を表すクローンを候補として認めた。

【0109】

シーケンシング

ABI PRISM RHODAMINE CYCLE SEQUENSIN

G KIT (TM) (PE APPLIED BIOSYSTEMS (TM)) を使用してシーケンシングを実施し、自動化ABI PRISM 310 (TM) シーケンサー (PE APPLIED BIOSYSTEMS (TM)) で操作した。

【0110】

cDNAマイクロアレイ

遺伝子の発現は、HUMAN and CANCER ATLAS cDNA ARRAYS (TM) (CLONTECH LABORATORIES (TM)) の2重膜を使用して調べた。月経周期の同じ期にある対照個体及び患者の腺RNA (3 µg) を ³²P - dATP (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH (TM)、3000 Ci / mmol) の存在下で逆転写させた。ハイブリダイゼーション及び分析は、製造者によって提供された使用者の説明書に従って実施した。

【0111】

RT - PCR

前述のように既に腺性細胞または未分画生検から単離した全細胞RNAを、cDNA生成用の鋳型として使用した。簡単に述べると、製造者の取扱説明書に従って、RNA 1 µgをDNA分解酵素1 (LIFE TECHNOLOGIES (TM)) 1Uで消化した。次に、ランダムプライマー (LIFE TECHNOLOGIES (TM)) 0.4 µM、dGTP、dATP、dTTP、及びdCTPそれぞれ2 mM、及び添付の反応緩衝液の存在下において、M - MLV逆転写酵素200Uを使用して、消化したRNAをcDNAに逆転写した。37で1時間インキュベートした後、5分間沸騰させて反応を停止した。cDNAのPCR増幅は、Maniatis他 (Maniatis他、前述) が記載した標準的プロトコールに従って実施した。内部対照遺伝子、グリセルアルデヒドリン酸脱水素酵素 (GAPDH) の一連のPCR増幅によって、cDNAをまず標準化した。

【0112】

PCR反応液には、DNA (GAPDHによって標準化してある) 5 µl、2

種類の特異的オリゴヌクレオチドプライマー各0.5 μM、dGTP、dATP、dTTP、及びdCTP各0.2 mM、rTaq DNAポリメラーゼ 1 U、添付の反応緩衝液を含めた。BIOMETRA UNO II (TM) または THERMO CYCLER (TM) (BIOMETRA (TM) 中で、94 (45秒)、特異的アニーリング温度(45秒)、72 (1分)を25~40回、最終伸長72 で7分によって増幅を実施した。アニーリング温度は、使用した特異的オリゴヌクレオチドプライマーによって変化させた一方、サイクル数は問題のcDNAテンプレートの量によって変化させた。

【0113】

サザンブロット

サザンブロットは、Maniatis他(Maniatis他、前述)が記載した標準的プロトコールに従って実施した。簡単に述べると、前述のcDNA特異的なPCR増幅の後、試料を1.5%アガロースゲルで分離し、製造者の取扱説明書に従ってBIODYNE (TM) 0.45 μm膜(PALL CORPORATION (TM))に転写した。紫外線照射によってこの膜を固定し、ランダムプライマー標識キット(MEGAPRIME (TM) DNA標識システム、AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH (TM))を使用して³²P標識した特異的プラスミドプローブと65 で一晩ハイブリダイズさせた。産物をオートラジオグラフィで視覚化し、スキャンして、MOLECULAR ANALYST (TM) ソフトウェア(BIO-RAD (TM))によって分析した。バンドの強度は内部対照(GAPDH)の強度をベースにして標準化した。

【0114】

配列の分析

GENBANK (TM) とのヌクレオチド配列アラインメントは、生物学情報センター(National Center for Biotechnology Information (NCBI))のウェブサイト(www.ncbi.nih.gov)から入手できるBLASTソフトウェアによって実施した。本発明者らのデータとGENBANK (TM) との配列読み違いの割合が少

ないと仮定して、90%あるいはそれ以上の相同性を同一と見なした。

【0115】

統計解析

データはMICROSOFT EXCEL (TM) を使用して解析した。統計解析のために、スチューデントの t 検定を実施し、p 値が 0.05 以下の結果を有意と見なした。

【0116】

本明細書では、無病正診率は対照群に疾患マーカーが存在しない確率として定義され、有病正診率は子宮内膜症群に疾患マーカーが存在する確率と定義される。無病正診率及び有病正診率の算出は、以下の通りに実施する。まず、問題の試料 (RNA、cDNA、タンパク質その他) のグラフ上に、任意に選んだカットオフ値を確定する。疾患群でアップレギュレートされている試料については、無病正診率はカットオフ値を下回る対照群の患者の数を計数し、対照群の患者の総数で除することによって算出し、パーセントで表す。有病正診率は同じカットオフ値を上回る内膜症群の患者の数を計数し内膜症群の患者の総数で除することによって算出し、パーセントで表す。疾患群でダウンレギュレートされた試料については、無病正診率はカットオフ値を上回る対照群の患者の数を計数して対照群の患者の総数で除することによって算出し、パーセントで表す。有病正診率は同じカットオフ値を下回る内膜症群の患者の数を計数し内膜症群の患者の総数で除して算出し、パーセントで表す。

【0117】

3) 結果

1 - ディファレンシャルディスプレイ (DD)

濃縮した腺細胞を子宮内膜生検から単離し、全RNAを抽出した。対照群及びEndo群両者のRNA抽出物を、月経周期の期、すなわち、増殖期 (P) または分泌期 (S) によってさらに2群に分けた。最初に、他方の群と比較して一方の群の50%を上回る試料に出現するシグナルを異なるシグナルとして選択した。選択したシグナルをゲルから精製して、E. coli にクローニングした。各シグナルについて数個の組換えプラスミドに対して、本出願で説明したように、

リバース - ノザンプロットングによって確認工程を行った。各シリーズの異なるプラスミドについてヌクレオチド配列を決定し、分析して、特異的プライマーを次段階のために合成した。

【0118】

RNAの異なる群に対する半定量的RT - PCRによって、候補の発現レベルをさらに分析した。サイクル数とcDNA量に基づいた実験を実施して、PCR反応の直線性を確認した。GAPDHの発現レベルを、測定値を標準化するための内部対照として使用した。Endo群をさらに2種類の実験群に分けた。EXP1には、この疾患の最軽度及び軽度の段階（I及びII）を含め、EXP2は、子宮内膜症の中等度及び重度の段階（III及びIV）から構成された。表3は、分析した全ての子宮内膜症関連マーカーの平均値を群毎にまとめた表である。

【0119】

カットオフ値（図示せず）を選択して、各マーカーの臨床値、すなわち、無病正診率及び有病正診率を推定した。したがって、各マーカーについて、カットオフ値を測定して、最大無病正診率及び有病正診率の値を見込んだ。無病正診率は、対照群においてマーカーが存在しない確率に相当し、有病正診率は患者群において同マーカーが存在する確率を表している。

【0120】

ディファレンシャルディスプレイによるアプローチによって同定された全cDNAのリストが本明細書に掲載されている。各候補について、相同な遺伝子のGENBANK（TM）登録番号を表1に掲載する。ヌクレオチド配列データ及び対応する配列番号を表2に掲載する。

【0121】

DD1マーカー（配列番号1）は、GENBANK（TM）の胎児腎組織からクローニングされたcDNAと94%の相同性を示している。このcDNA配列はまた、22q11染色体（AC007064）の領域に対して100%の相同性を表している。発現分析によって、対照群の分泌期と比較してEXP1群の分泌期の減少が有意であることが示された（ $p = 0.01$ ）（表3）。カットオフ

値を0.4に設定すると、無病正診率75%及び有病正診率90%が得られた(表5)。

【0122】

DD2マーカー(配列番号2)は、ヒト神経膠腫細胞からもディファレンシャルディスプレイによって単離されたリンタンパク質をコードする発現遺伝子配列断片(EST)に対応する。この相同性には、上流領域の40bp(97%)及び下流領域の89bp(96%)が包含される。40bpのギャップが2種類の配列間のアラインメント中央に存在する。同じアラインメントが、1-my c相同cDNA(HSLMYCH)で得られた。これは、異なる組織に存在する共通の遺伝子、または所与のファミリーの2種類の別個の遺伝子における選択的スプライシングによるものである。このcDNAが子宮内膜で報告されたことはなかった。表3に示されているように、この遺伝子転写は、Endo群においてダウンレギュレートされていた($p = 0.04$)。カットオフ値0.13によって、無病正診率65%及び有病正診率77%が得られた(表5)。

【0123】

DD3マーカー(配列番号3)はミトコンドリアの複製起点(ori)と100%の相同性を示した。現在のところ、mRNAをコードする遺伝子はミトコンドリアDNAの領域にマップされていない。表3に示した本発明の実施例で得られた結果によれば、Endo群において発現は著しく減少している($p = 0.01$)。カットオフ値0.7でのマーカーパラメーターは、無病正診率63%及び有病正診率69%である(表5)。

【0124】

DD4マーカー(配列番号4)は、ヒト結腸腫瘍から単離したcDNAと98%の相同性を示した。現在のところ、この遺伝子に公知の機能は関連づけられていない。表3に示したように、発現はEndo群の分泌期において著しく減少している($p = 0.04$)。閾値1.3では、候補遺伝子の無病正診率は83%、有病正診率は85%である(表5)。

【0125】

DD5マーカー(配列番号5)は様々な名称、たとえばCap43、Dr g1

、TDD-5、rit42、Ndr1、Proxy-1またはRTPを有する遺伝子に対応し、最も一般的な名称であり、本明細書で使用したのはCap43である。Cap43 mRNAは1759bpの3'非翻訳領域を有し、その予想されるオープンリーディングフレームは394アミノ酸残基のポリペプチドをコードする。今までの実験で、様々な種類の細胞においてCap43 mRNAの発現が調節されていることが示されたが、子宮内膜細胞においても子宮内膜症においてもその調節は示されていない。表3で示したように、子宮内膜症の患者全において増殖期で一般的に減少が観察された ($p = 0.03$)。カットオフ値1.2によって、無病正診率78%及び有病正診率79%の結果が得られた (表5)。

【0126】

DD6マーカーの配列 (配列番号6) は、ゲノム配列のファイルと97%の相同性が示された。さらに、DD6のcDNA断片は、3'末端にalu配列を含有している。表3に示したように、分泌期において対照とEXP1の間に有意な減少が認められた ($p = 0.018$)。EXP1ではカットオフ値0.4によって、以下のパラメーター、無病正診率89%、有病正診率100%が得られる (表5)。

【0127】

いくつかのESTは配列DD7 (配列番号7) と同一であった。公知の配列は全て、膵臓腺癌、前立腺上皮異常増殖、または中等度に分化した子宮内膜癌などの形質転換した組織からクローニングされた。DD7 cDNAもalu配列を含有している。表3に示したように、このマーカーの遺伝子発現の著しい減少がEndo群の増殖期において観察された ($p = 0.019$)。カットオフ値0.5では無病正診率80%及び有病正診率70%が認められた (表5)。

【0128】

配列の相同性によって、DD8マーカー (配列番号8) の配列がJurkat細胞、脳及びその他の組織からクローニングされた遺伝子と同一であることが示された。表3では、EXP1群においてわずかではあるが有意なDD8発現の減少 ($p = 0.02$) (カットオフ値0.6で、それぞれ有病正診率の値67%及

び有病正診率の値60%)が認められた(表5)。

【0129】

DD9マーカー(配列番号9)は、細胞の酸素代謝に関与するミトコンドリア酵素、NADH脱水素酵素のサブユニットIIIに対応している。この遺伝子は、電子伝達鎖及びエネルギー産生において重要な役割を果たしている。表3から分かるように、Endo群(EXP1及びEXP2)の増殖期に、かなりの増加が検出されている($p = 0.008$)。カットオフ値0.2では、無病正診率70%、有病正診率59%である(表4)。

【0130】

DD10マーカー(配列番号10)は、NADH脱水素酵素サブユニットIIに対応する。DD9の場合のように、この遺伝子産物はミトコンドリア内に局在する呼吸酵素複合体の一部である。この完全な酵素は、12の異なるポリペプチドから構成される。表3では、このマーカーをEXP1群の増殖期に検証したところ、発現が高レベルであることが示された($p = 0.04$)。この遺伝子の診断値をカットオフ値0.2で評価し、無病正診率71%、有病正診率71%を得た(表4)。

【0131】

DD11マーカー(配列番号11)は、チトクロームオキシダーゼ(CO3)に対応している(以下に説明する)。

【0132】

DD12マーカー(配列番号12)は、フォークヘッドドメインタンパク質(FKHR)の転写因子に対応している。子宮内膜における存在は、文献で報告されたことはなかった。表3では、未分画子宮内膜組織のRNAにおけるこのマーカーの発現を分析することによって、Endo群において発現が減少していることが示された($p = 0.015$)。このマーカーをカットオフ値23で評価すると、両期を考慮すると、無病正診率81%及び有病正診率56%であった(表5)。DD12の発現を未画分生検RNA試料についてノザンプロットによって分析したところ、対照と比較して、Endo群で有意な減少が検出された($p = 0.05$)(表5)。カットオフ値0.4を用いると、無病正診率55%及び有病

正診率68%であった。この結果は、RT-PCRを使用した本発明者の最初の観察結果と一致している。

【0133】

DD13マーカー(配列番号13)は、hUCC1遺伝子メッセンジャーRNAに対応している。同cDNAは、以前に結腸癌からクローニングされている。表3では、未分画組織のRNAにおけるこのマーカーの発現を分析することによって、EXP2群において発現が高レベルであることが示された($p = 0.04$)。この遺伝子の診断値をカットオフ値0.5で評価すると、EXP2群において、無病正診率62%、有病正診率64%が得られた(表4)。

【0134】

DD14マーカー(配列番号14)の配列は、パラレンミン、膜結合形態調節タンパク質との相同性を示す膜結合型の形態調節タンパク質と思われるタンパク質をコードする、最近クローニングされたヒトcDNAと98%同一である。表3に示したように、未分画生検RNAではEndo群(EXP1及びEXP2)において増加が検出されている($p = 0.04$)。S期のみを考慮すると、カットオフ値1.2では、無病正診率78%及び有病正診率58%である(表4)。

【0135】

DD15マーカー(配列番号15)は、22q11領域のディジョージ症候群マーカーの1種であるクエン酸輸送タンパク質に対応する。表3に示したように、このマーカーは、未分画生検RNAのEndo群において実質的な発現の増加が示す($p = 6.10^{-4}$)。カットオフ値0.18で、無病正診率85%及び有病正診率79%が得られた(表4)。

【0136】

DD16マーカー(配列番号16)の配列は、いくつかのヒトESTと90%相同性を示し、ヒトミトコンドリア12SrRNA遺伝子と82%相同性を示している。表3に示したように、このマーカーの発現は、未分画生検RNAのEndo群においてダウンレギュレートされていた($p = 3 \times 10^{-5}$)。カットオフ値2では、このマーカーは無病正診率70%及び有病正診率78%を示した(表5)。

【0137】

II - その他のアプローチ

本発明の実施例では、別の半定量的技法、すなわちcDNAアレイを用いたりバース - ノザンプロットィングを使用して、子宮内膜症で発現が異なるその他の遺伝子を同定した。最終的な確認分析は、ディファレンシャルディスプレイ法と同様の標準化RT - PCRによって行った。

【0138】

表1に、本発明によって子宮内膜症関連マーカーと同一と同定された各遺伝子に対する公知のGENMANK(TM)登録番号を挙げる。

【0139】

低酸素症誘導因子1 (HIF - 1) は、酸化ストレスに関連した転写因子の2個のサブユニットのうちの1つである。表3に示したように、統計解析によって、Endo群においてHIF - 1 mRNAの有意な増加が示された ($p = 0.028$)。カットオフ値1.1では、無病正診率65%及び有病正診率72%が得られた。未分画生検RNA試料に対するノザンプロットィングによってHIF - 1 の発現を分析すると、Endo群のP期に、対照のP期と比較して有意な増加が検出された ($p = 0.019$) (表4)。カットオフ値0.95を使用すると、無病正診率は83%、有病正診率は80%であった。この結果は、上皮細胞RNAに関する発明者の最初の観察と一致している。

【0140】

アリール炭化水素受容体核トランスロケータ (ARNT) (またはHIF - 1) は、低酸素症誘導転写複合体の第2サブユニットである。実際に、ARNTは2つの役割を持っている。低酸素症の場合のように、HIF - 1 と結合することが可能であるが、芳香族 (アリール) 炭化水素受容体 (AhR) とヘテロダイマーを形成して、毒性状態をうち消すことも可能である。子宮内膜症では、ARNT遺伝子は、その相手であるHIF - 1 で認められたよりも高率で転写される。表3にも示されているように、Endo群の増殖期患者において有意な増加が記録された ($p = 0.02$)。カットオフ値0.6で、このマーカーの無病正診率は67%、有病正診率は83%であった (表4)。これらのパラメーター

は、増殖期におけるHIF-1のパラメーターに匹敵する。HIF-1とARNTの発現パターンが同等であることは、子宮内膜症に酸化ストレス経路(OXPHOS)が関与していることを証明する強力な証拠である。

【0141】

アデニレートキナーゼは、細胞性アデニン及びグアニン組成のホメオスタシスに関与する遍在性酵素である。アデニレートキナーゼアイソザイム3(AK3)のアイソフォームは専らミトコンドリアの内膜に局在し、その活性はエネルギー伝達に関与している。これが変化すると、低酸素症、より詳細には、HIF1活性に関与する。表3では、EXP1群においてAK3発現の強いダウンレギュレートが認められた($p = 0.005$)。カットオフ値0.75では、無病正診率68%及び有病正診率82%が生じた(表5)。

【0142】

グルコーストランスポーターアイソフォーム1(Glut-1)は、細胞のエネルギー代謝において重要な役割を果たす。上述のように、Glut-1の発現は、HIF-1/ARNT転写因子複合体によって制御される。加えて、酸化ストレス又は細胞の形質転換といった様々な環境で、Glut-1の発現が誘導される。表3では、対照群に比べて、Exp2群でGlut-1発現の有意なアップレギュレーション($p = 0.037$)を観察した。さらに、カットオフ値1を用いると、Glut-1の無病正診率と有病正診率は各々、71%及び67%である(表4)。

【0143】

ミトコンドリアで行う細胞呼吸により、活性酸素種(ROS)が産生される。慢性的にROSに暴露されると、細胞及びミトコンドリアのタンパク質、脂質、核酸に永続的な酸化的損傷がもたらされ得る。これらの毒性産物に起因する酸化的損傷に対して防御するため、哺乳類細胞は防御メカニズムを進化させた。解毒酵素には、マンガンスーパーオキシドジスムターゼ(MnSOD)、グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)、カタラーゼ(CAT)及び、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)が含まれる。MnSODの転写がミトコンドリアでアップレギュレートされると、スーパーオキシドアニオン(O_2^-)を過酸

化水素 (H_2O_2) に変換して、解毒を行う。

【0144】

表3におけるMnSOD発現の分析によって、対照群に比べて、全てのEndo群で、一般的且つ有意なアップレギュレーションが生じる ($p = 0.017$) ことが実証される。0.9のカットオフ値を用いると、MnSODの無病正診率は76%、その有病正診率は58%であった。未分画生検由来のRNAを用いても同様の結果が得られ、Endo群全体で、有意な上昇が検出された ($p = 0.003$)。カットオフ値0.9を用いると、前記マーカーは81%の無病正診率と53%の有病正診率を呈示した (表4)。

【0145】

上述のように、GPxはミトコンドリアのROS解毒経路に関連する。より具体的には、GPxは、MnSODによって産生された過酸化水素を H_2O に変換する。表3に示すように、統計解析により、対照群に比べてEndo群では、GPxmRNAの発現に有意な増加を示した ($p = 1.7 \times 10^{-11}$)。1.2のカットオフ値を用いると、無病正診率が100%となり、有病正診率が87.5%の結果となった (表4)。

【0146】

ペルオキシソームのようなミトコンドリア外の部位では、MnSODによって産生された過酸化水素は、カタラーゼ (CAT) により H_2O に変換される。このため、CATは、細胞内で生じた過酸化水素から細胞を防御することによって、ROSの解毒で機能する。表3に示されているように、本例では、未分画生検のRNA中のCAT mRNAの発現が、対照群に比べて、Endo群の分泌期で有意に減少することを観察した ($p = 0.001$)。0.2のカットオフ値を用いると、CATの無病正診率と有病正診率は、各々83%及び78%であった (表5)。

【0147】

グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) 遺伝子スーパーファミリーは、哺乳類細胞の主要な解毒システム及びフリーラジカル除去システムの一つである。本例では、表5に図示されているように、対照群に比べて、EXP1群では、

GSTの発現が有意に減少することが観察された ($p = 0.0026$)。また、表3の直接分析によって、EXP2群でGST発現が増加していることが示されている。0.21のカットオフ値では、EXP1群のパラメーターは、54%の無病正診率と74%の有病正診率となろう (表5)。

【0148】

内皮性一酸化炭素合成酵素 (eNOS) は、L-アルギニンの酸化を触媒して、一酸化窒素とシトルリンにする。これまでに、前記周期の分泌期に、子宮内膜症患者の子宮内膜中で、タンパク質レベルでのアップレギュレーションが起こることを記載した報告がある (Ota et al., *Fertility and Sterility* (1998) 69:303-308)。本例において、対照群の増殖期及びEndo群の増殖期を全体として比較すると、eNOSの発現が有意に減少すること ($p = 0.027$) が観察される (表3参照)。0.1のカットオフ値を用いて、各々77%の無病正診率と65%の有病正診率を決定することができた (表5)。

【0149】

過酸化水素及び/又はホモシステインによって、肝細胞の中で、所謂チトクロームオキシダーゼ3 (CO3) 遺伝子がアップレギュレートされることが公表された。本例で増幅した配列は、実際にはヒトのミトコンドリアゲノムの16S rRNA領域にある低酸素症誘導遺伝子14のようなGENBANK™に登録されたいくつかのcDNAに相当し、転移性マーカーであるTI-227HのcDNAに相当した。最終的に、前記CO3遺伝子の配列は (ディファレンシャルディスプレイ法により単離された) DD11配列と全く相同である。CO3遺伝子発現 (及びDD11) の分析により、対照群とEndo群とを比較すると、表3に見られるように、分泌期特異的な減少が明らかとなった ($p = 0.002$)。0.58のカットオフ値を用いると、該マーカーの無病正診率及び有病正診率は、各々83%及び79%であった (表5)。

【0150】

12S rRNAは、ミトコンドリアゲノムによってコードされる二つのrRNA遺伝子のうちの一つである。本例では、表3に図示されているように、対照

に比べて、EXP 1群で、未分画生検RNA中の12S rRNAが有意に減少することが観察された ($p = 0.02$)。カットオフ値1を用いると、12S rRNAの無病正診率と有病正診率は、各々77%及び67%であった (表5)。

【0151】

TI - 227Hは、既述のようにCO3と相同性を有する核遺伝子である。これらの配列が類似しているため、二つの配列が実際には同一の遺伝子であるのか、又は恐らく偽遺伝子であるかどうかを決定することに、本発明者は興味を抱いた。興味深いことに、未分画生検RNA中のTI - 227H mRNAの発現を解析すると、本例に記載されているように、CO3で得られた結果とは異なる結果を示し、両配列は異なる遺伝子に由来することが示唆された。全Endo群で減少したCO3の発現とは異なり、表3に示されているように、対照に比べて、EXP 2群では、TI - 227Hの発現は有意に減少した ($p = 2 \times 10^{-8}$)。カットオフ値0.15を用いると、TI - 227Hの無病正診率と有病正診率は、各々81%と100%となる。

【0152】

チトクロームオキシダーゼ2 (CO2) はミトコンドリアの電子伝達鎖 (ETC) に関与し、それ故、細胞に必須のエネルギーを提供する酸化的リン酸化 (OXPHOS) の過程に関与するミトコンドリア内にコードされる酵素である。表3に示されているように、未分画生検RNA中のCO2 mRNAの発現は、対照に比べて、EXP 1群の増殖期で減少することが見出された ($p = 0.02$)。0.2のカットオフ値を用いると、CO2の無病正診率と有病正診率は、各々64%及び69%である (表5)。酸化的ストレスに応答して鉄代謝の変化を示す実験的な証拠が文献で報告されている。この経路で中心となる酵素の一つは、ミトコンドリアに局在するアコニターゼである。

【0153】

アコニターゼの遺伝子発現の分析 (表3) によれば、EXP 1群のS期 ($p = 0.005$) 及びEXP 2のP期 ($p = 0.04$) においても、発現の減少を示した。P期のサンプルの平均値を分析すると、両群 (EXP 1及びEXP 2) の

P期の減少が示されるが、対照群よりも有意に低下するのは後者のみである。最も顕著な減少はEXP1のS期で観察されるので、本発明者らは、これに基づいて、アコニターゼでの診断能を評価した。0.11のカットオフ値を用いて、80%の無病正診率と86%の有病正診率を計測した(表5)。

【0154】

アデニンヌクレオチドトランスロケータ1(ANT-1)は、核遺伝子にコードされ、ミトコンドリア内膜に局在する。ANT-1は、新規に合成されたATPと消費したADPを交換することによって、OXPHOSにおいて重要な役割を果たしている。現在までに、子宮内膜の生検中でのANT-1発現の調節は報告されていない。本例では、表3に示されているように、未分画生検RNAで、RT-PCRによって分析すると、ANT-1 mRNAの発現は、対照群に比べてEndo群の増殖期に減少する($p = 0.007$)ことが明らかとなった。カットオフ値1を用いると、ANT-1は、86%の無病正診率と74%の有病正診率を有する(表5)。この結果は、ノーザンブロットイング($p = 0.016$)によって確認され、カットオフ値0.042を用いると、無病正診率と有病正診率の値は各々75%及び73%であった(表5)。

【0155】

ETCの第V複合体としても知られるATPシンターゼは、2つのミトコンドリア遺伝子(ATP分解酵素6とATP分解酵素8)及び12の核遺伝子によってコードされる。OXPHOSでの決定的な役割と一致して、ATPシンターゼの変異はミトコンドリア病と関連してきた。表3に示されているように、対照群と比べて、Endo群では、未分画生検RNAにおいてATPシンターゼのサブユニットの発現が増加した($p = 1 \times 10^{-3}$)。興味深いことに、Endo群の増殖期のみを考慮すると、統計解析は $p = 8 \times 10^{-4}$ となる。対照群とEndo群を比較し、カットオフ値4を用いると、ATPシンターゼの(サブユニット)の無病正診率と有病正診率は、各々77%と75%である。Endo群のP期を分析すると、無病正診率は93%、有病正診率は64%である(表4)。

【0156】

B細胞白血病/リンパ腫 2 (Bcl-2) は核にコードされ、ミトコンドリア外膜に局在する抗アポトーシスタンパク質である。興味深いことに、Bcl-2の発現は卵巣周期を通じて、子宮内膜の中でエストラジオールによって駆動されるようであり、増殖期の子宮内膜では、高いBcl-2の発現が観察され、分泌期には発現が減少する (Vaskivuo et al (2000) Mol Cell Endocrinol 165:75-83)。これまでの研究によって、腺性細胞と間質細胞でのBcl-2の発現、及び正所と異所子宮内膜画分でのBcl-2の発現が分析されている (Meresman et al., (2000) Fertil. Steril. 74(4):760-6; Jones et al., (1998) Hum. Reprod. 13(12):3496-502)。本研究では、表3に示されているように、対照群に比べて、Endo群で子宮内膜の未分画生検RNAにおいて、Bcl-2の発現が減少した ($p = 0.01$)。カットオフ値4を用いると、Bcl-2の発現の無病正診率と有病正診率は、各々54%、82%である (表5)。

【0157】

ヒトc-jun原癌遺伝子(c-jun)は、c-fosと共にAP1複合体を形成する主要な遍在性転写因子の一つである。本例では、c-junの発現を分析して、EXP1群の分泌期に有意なアップレギュレーション ($p = 0.05$) が観察された (表3を参照)。カットオフ値0.7を用いて、EXP1のS期の群に対して以下のパラメーターを得た。無病正診率75%、有病正診率67% (表4)である。未分画生検RNAに対して検査を行うと、c-jun発現のアップレギュレーションは、対照群と比べて、Endo群で有意となった ($p = 0.005$)。カットオフ値1を用いて、76%の無病正診率と65%の有病正診率を決定した (表4)。

【0158】

ニワトリオボアルブミンの上流プロモーター転写因子(COUP-TF)は、アロマターゼP450 (P450arom)の重要な制御因子であり、エストロゲンの生合成に関与する。正所子宮内膜の間質細胞では、アロマターゼプロモーターの上流領域へのCOUP-TFの結合がアロマターゼの転写抑制を媒介して

、異常なエストロゲン産生を阻害する。表3に示されているように、未分画RNA生検では、対照群に比べて、Endoサンプルの分泌期においてCOUP-TF mRNAの発現が減少した ($p = 0.01$)。0.075のカットオフ値を用いると、COUP-TFの無病正診率と有病正診率は、各々83%と78%である(表5)。

【0159】

インターロイキンは炎症の過程に関与しており、子宮内膜のような疾病で顕在化する。本例でのIL-1の転写分析によって、対照群ではレベルがかなり一定であるのに対し、Endo群ではパターンが全体的に異変を受けることが明らかとなった(表3参照)。特に、EXP2群では、IL-1発現の有意な減少が観察された ($p = 0.0002$)。散布図に基づいて(図示せず)、2つのカットオフ値を決定した。一方は対照群の平均に対する値であり、もう一方はその標準偏差に相当する値である。この範囲外の値では、子宮内膜症に罹患した可能性が高い患者に該当すると認めた。対照群の平均値である 0.98 ± 0.28 に対して、78%の無病正診率と93%の有病正診率を決定した(表5)。

【0160】

コネキシンは細胞間の相互作用、より具体的には、ギャップジャンクションといった構造に関与する。それらの発現は、一般にステロイドによって制御される。コネキシン43(Cx43)はエストラジオールにより制御されると思われる。一般に子宮内膜では、コネキシン43(Cx43)は、他の数種のコネキシンと同様に、月経周期の約11~15日目において免疫組織化学によって、より高い発現を示す。例えば、コネキシン類は、妊娠中には、特異的に着床に関与すると考えられる。ある論文では、子宮内膜の病変部中の全ての異所上皮組織サンプル中に、コネキシン43の異常発現を報告した。正所子宮内膜細胞中のコネキシン43の発現レベルを計測した研究はない。本例では、対照群に比べて、EXP1群で、Cx43 mRNAのアップレギュレーションが観察され ($p = 0.048$) (表3)、EXP1群の増殖期のみを考慮すると、差はさらに有意となった ($p = 0.02$)。EXP1群に対し、カットオフ値1.3を用いて、74%の無病正診率と48%の有病正診率を得た(表4)。EXP1群の増殖期を考慮

することによって、無病正診率と有病正診率は各々77%と64%となるので(表4)、マーカーはより強力となる(表4)。多くの場合、様々なストレスから細胞を防御するため、熱ショックタンパク質(HSPs)が誘導される。より具体的には、タンパク質の誤フォールディング、DNA損傷、代謝上の酸化的ストレス、低酸素症に反応して熱ショックタンパク質70(HSP70)が誘導される。本例では、子宮内膜症に罹患した女性において、HSP70 mRNAの調節が、対照群に比べて、Endo群で鋭敏に上昇することが報告されている($p = 0.01$)(表3参照)。0.6のカットオフ値を用いると、子宮内膜症に対するマーカーとして、HSP70の無病正診率と有病正診率は各々73%及び61%であった(表4)。未分画生検RNAでは、増殖期にも有意な増加が検出され($p = 0.014$)これ故、該マーカーは0.25のカットオフを用いると、71%の無病正診率と78%の有病正診率を有した(表4)。

【0161】

熱ショックタンパク質90(HSP90)は、ステロイド誘導性及び外来毒素誘導性のシグナリングに関与するタンパク質のシャペロン系の一部である。本例では、EXP2群の女性を対照群と比較すると、子宮内膜症に関するHSP90の分析によって、遺伝子発現の顕著な減少が明白となった($p = 4.3 \times 10^{-5}$)(表3を参照)。対照群と比較したEXP2群の分析で0.17のカットオフ値を用いると、無病正診率と有病正診率は、各々75%と100%であった(表5)。

【0162】

リン脂質ヒドロペルオキシド グルタチオン ペルオキシダーゼ4(GPx4又はPHGPx)は、過酸化された膜及び酸化されたリポタンパク質において産生されるヒドロペルオキシドの還元が必要とされる。表3に示すように、未分画生検RNAでは、GPx4 mRNAの発現は対照群と比べて、EXP1群の分泌期に減少した($p = 5 \times 10^{-3}$)。0.1のカットオフ値を用いて、GPx4の無病正診率は83%、有病正診率は75%である(表5)。

【0163】

グルコース制御性タンパク質78(GRP78)は、ホモシステインなどの小

胞体の機能低下に影響する物質または条件によって誘導されるHSP70に関連するストレス応答タンパク質である。本例では、表3に示されているように、未分画生検RNAにおけるGRP78の発現は対照群と比べて、Endo群の分泌期で減少した ($p = 6 \times 10^{-3}$)。カットオフ値3を用いると、GRP78の無病正診率と有病正診率は、各々92%と78%である。

【0164】

シクロオキシゲナーゼ-2 (cox2) は、プロスタグランジンシンターゼ (PG-2) とも呼称され、プロスタグランジン合成に関与する。子宮内膜症における関与の可能性は、異所的病変におけるアロマターゼ活性の増加と関連して議論されてきたが、これまでのところ、正所子宮内膜細胞では、cox2の調節不全に関する証拠はない。表3に示すように、未分画生検RNAでは、cox2 mRNAの発現は、対照群に比べて、EXP1群で有意に増加した ($p = 0.01$)。カットオフ値6を用いると、COX2の無病正診率は69%であり、有病正診率は62%である (表4)。

【0165】

III - マーカーの組み合わせ

対照群及びEndo群で発現が異なる多くの遺伝的マーカーを見出したので、発現が異なる遺伝子を組み合わせることで、単一の遺伝子評価よりも強力な診断ツールを提供し得るかもしれないという仮説を本発明者は検討した。個人間の遺伝的な不均一性が高いレベルにある場合、このことは特に当てはまる。

【0166】

表11に遺伝子マーカーの組み合わせの例を示す。無病正診率と有病正診率は上述のように計算した (統計解析を参照)。簡潔に述べれば、無病正診率は対照群にマーカーが存在しないことを示し、有病正診率はENDO群にマーカーが存在することを示す。3つの対象遺伝子マーカーを全て同一個体の患者サンプルで検査するように、組み合わせを行った。あるマーカーが存在する場合には、患者の各サンプルに対してスコア1を割り当て、同マーカーが存在していなければ、スコア0を割り当てた (マーカーの存在及び非存在は、割り当てたカットオフ値

を超えるか否かに従って決定する)。3つの対象遺伝子全てにかかるアルゴリズムを適用した後、該マーカーのスコアを合わせ、以下に従って百分率に変換した。すなわち、2種のマーカーを組み合わせた場合、0%とは両マーカーのスコアが0であることを意味し、50%とは一方のマーカーのスコアが0で、もう一方のマーカーのスコアが1であることを意味し、100%とは両マーカーのスコアが1であることを意味する。3つのマーカーを組み合わせた場合、0%とは3つの全てのマーカーのスコアが0であることを意味し、33%とは1/3のマーカーのスコアが1であることを意味し、67%とは2/3のマーカーのスコアが1であることを意味し、100%とは3つの全てのマーカーのスコアが1であることを意味する。次に、これらのパーセンテージをグラフ化して、無病正診率と有病正診率の値を新たに計算した。これらの値を表11に示す。

【0167】

マーカーを組み合わせた場合の威力が例として表11に示されているが、該表では2つのマーカーを組み合わせることによって、診断の有病正診率が最大100%まで増加した。3つのマーカーを組み合わせると、無病正診率と有病正診率が何れも増加した。多数のマーカーのこれ以外の組み合わせによっても、無病正診率と有病正診率の改善が得られ、それによって本発明の方法とキットが改良されるであろう。

【0168】

4) 結論

本明細書に示した結果は、表1に列記されている遺伝子マーカーが全て優れた子宮内膜症のマーカーであることを示している。それ故、発現が異なる遺伝子を使用することは、疾病を有する個体を同定し、子宮内膜症に等級を付ける代替手段となる。これらのマーカーを2、3及びそれ以上組み合わせることによって、診断の無病正診率と有病正診率が増加することも可能である。

【0169】

本発明のマーカーに属する遺伝子の多くはミトコンドリアに付随する。16のDDマーカーのうち、5つがこの範疇に包含される。この観察により、本発明者は本分野での研究をさらに進めるに至った。実際に、生理学的には、酸化的リ

ン酸化 (OXPHOS) のような多くの中心的代謝反応がミトコンドリアに関係する。このため、表3に示されているように、HIF-1、ARNT、又はNADH脱水素酵素などのOXPHOS関連遺伝子及び/又はミトコンドリア関連遺伝子の調節が、子宮内膜症患者の子宮内膜組織中で観察した。このことは、OXPHOS経路が子宮内膜症に関与しており、子宮内膜細胞の酸化的リン酸化経路及び/又は内部酸化還元電位センサー経路 (OXPHOS) に関与する少なくとも1つの子宮内膜症関連マーカーの発現レベルを前記子宮内膜細胞の試料でアッセイすることによって、女性被験者における子宮内膜症の可能性を決定し得ることを強く示唆する。

【0170】

興味深いことに、発現が異なる3つのalu配列含有cDNAが単離され、子宮内膜症関連マーカーと同定された。同様に、子宮内膜症関連マーカーの別の異なる群は細胞ストレスマーカーであった (熱ショックタンパク質、CAP43、コネキシン43、RNAヘリカーゼ)。それ故、alu配列を含有する大部分の遺伝子及び/又は細胞ストレスマーカーは、本発明の子宮内膜症関連マーカーとして使用し得ると推測される。

【0171】

実施例2：タンパク質のマーカー

1) 課題

女性の対照群とEndo群で発現が異なる多くの遺伝子マーカーを発見したので、本研究者らは、これらの遺伝子マーカーに由来するタンパク質産物のタンパク測定も、子宮内膜症の診断に適切なアプローチであり得るという仮説を検証した。

【0172】

マーカーDD5 (所謂Cap43) は、子宮内膜症に罹患した女性の子宮内膜で、mRNAレベルでの調節を受けなかったため、本発明者らは同遺伝子によりコードされるタンパク質の発現の特徴を決定した。ウエスタンブロッティングによってこれを実行した。

【0173】

Cap43のmRNAは、1759塩基対の3'非翻訳領域を有しており、その予測されるオープンリーディングフレームは、推定分子量43,400ダルトン、等電点5.3を有する394アミノ酸残基のポリタンパク質をコードする。これまでの研究によって、様々な種類の細胞の中で、Cap43遺伝子のmRNAの発現が調節されることが示された。しかしながら、Cap43タンパク質は、子宮内膜症を含むいかなる疾病のマーカーとしても使用されたことはない。本例では、対照群及び疾病群から得た子宮内膜組織の生検から単離されたタンパク質抽出物を、Cap43のタンパク質の発現についてスクリーニングし、本明細書に記載の結果によって、該タンパク質が子宮内膜症の適切なマーカーであることを示す。

【0174】

2) 材料と方法

患者の募集と組織サンプル

対照群と子宮内膜症陽性群由来の組織生検は、本明細書の例1で前述したようにして取得した。

【0175】

未分画生検からのタンパク質の単離と調製

細胞の全タンパク質抽出物を組織生検から直接単離した。簡潔に述べれば、3 mLの溶解用バッファー(0.1M NaCl、2% SDS、5mM EDTA、0.5 µg/mL ロイペプチン、2 µg/mL アプロチニン、及び200 µg/mL PMSFを含有する20mM Tris-HCl pH7.5)の存在下、室温で電気ホモジナイザーを使用して、200~300mgの生検組織をホモジナイズし、10分間1000 rpmで溶解させ、14,000gで20分間遠心分離した。上清のタンパク質の定量は業者の指示に従って、DCタンパク質アッセイ(BIO-RAD™)を用いて行った。20mM Tris-HCl、pH7.5でサンプルを希釈し、96ウェルのGIBCO-BRL™滴下装置を用いて、ニトロセルロース膜(2.5及び5 µg)上に滴下した(2.5及び5 µg)。TST緩衝液(100mM NaCl、0.1% TWEEN-20™を含有する10mM Tris-HCl、pH7.5)に溶かした2.5%乾

乾燥ミルクパウダー中で一晩、前記膜のブロッキングを行い、抗CAP43 (SKULDTECH™, Université Montpellier II, France) 一次抗血清又は抗アクチン (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY™) 一次抗血清のいずれかで1:2000に希釈して1時間インキュベートし、TSTで5分間二度洗浄してから、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 抱合抗ウサギ免疫グロブリン特異的ポリクローナルヤギ抗体でさらに1時間インキュベートし (5%ミルク-TST中で1:2000に希釈)、TSTで10分間3度洗浄して、業者 (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH™) のプロトコールに従って、ECL試薬で可視化した。オートラジオグラムを走査して、アクチンに対するCap43のレベルを計測し、プログラムMOLECULAR ANALYST™を使用して、ドットの濃度測定を行った。

【0176】

3) 結果

抗CAP43ポリクローナル抗体を使用して、本発明者らは対照群と疾病群由来の子宮内膜組織生検から単離したタンパク質抽出物をスクリーニングした。表3に示されているように、2種類の実験を行った。第一の実験では、増殖期及び分泌期の対照群及び実験群の全てを含めて、卵巢周期の双方の時期でのCap43の存在を比較した。第二の実験では、分泌期の群のみを検査し、このようにして、分析したサンプルの数を増加させることができた。

【0177】

第一の実験から得られた結果は、卵巢周期の分泌期にはCap43タンパク質がより高いレベルで発現され、対照群における平均アップレギュレーションが、増殖期に比べて、分泌期では2倍を超えることを示している (1.92 ± 0.21 対照群分泌期 対 0.55 ± 0.06 対照群増殖期) ことを示した。さらに、対照群とEndo群とを比較することによって、Endo群の分泌期においてCap43が有意に減少し ($p = 0.05$)、カットオフ1.35を使用すると、無病正診率及び有病正診率の値が各々71%及び57%となることが明らかである (表5)。

【0178】

分泌期のサンプルのみを分析した第二の実験でも、Cap43はEndo群の分泌期に有意に減少する ($p = 0.001$)。1.1のカットオフを用いると、無病正診率が77%、有病正診率が61%である (表5)。

【0179】

4) 結論

これらの結果により、Cap43 mRNAのように、Cap43タンパク質は、子宮内膜症を有する女性に比べて、子宮内膜症に罹患していない女性の子宮内膜の細胞で発現が異なることが確認された。それ故、表1に列記されている全子宮内膜症関連マーカーが同様であると考えてもよい。

【0180】

従って、異なって発現する遺伝子又は (翻訳されたタンパク質又はペプチドなどの) 該遺伝子由来のタンパク質産物を使用すれば、女性における子宮内膜症の可能性を決定し、該疾病に罹患した女性の該疾病に等級を付けるための代替手段となる。

【0181】

【表1】

表1:子宮内膜症関連マーカー

出願人の参照項目		GENBANK(TM)の参照項目				
配列番号	任意名	GENBANK(TM)の遺伝子名	受付番号	種類	塩基数	日付
1	DD1	-	AL050039; AC007064	EST; EST	6241	18-Feb-00
2	DD2	-	AF084555	EST	5171	27-May-00
3	DD3	-	J01415	DNA	16569	1-Sep-99
4	DD4	-	AA829538	EST	1329	18-Apr-00
5	DD5	ニッケル特異的誘導タンパク質(CAP43)	AF004162	mRNA	2972	29-Apr-98
6	DD6	-	AL034374	EST	101270	24-Jan-00
7	DD7	-	A1567884; AA558871; A1890794	EST; EST; EST	500 487 2501	29-Apr-00 14-May-99 9-Sep-97 7-Mar-00
8	DD8	RNAヘリカーゼ	AB028449	mRNA	7037	18-Feb-00
9	DD9	NADH脱水素酵素	AF004342	DNA	320	19-Jul-97
10	DD10	NADH脱水素酵素	J01415	DNA	16569	18-Apr-00
11	DD11	チトクロムオキシダーゼ3(CO3)	AF014897	DNA	1041	6-May-99
12	DD12	転写因子フォークヘッドドメインタンパク質(FKHR)	J01415	DNA	16569	18-Apr-00
13	DD13	rUCC1	AB017708	DNA	346	26-Sep-98
			AF032885	mRNA	5723	19-Feb-98
			AJ250475	mRNA	2073	1-Jul-00

表1:子宮内膜症関連マーカー

出願人の参照項目		GENBANK(TM)の参照項目				
配列番号	任意名	GENBANK(TM)の遺伝子名	受付番号	種類	塩基数	日付
14	DD14	パラレンミン	AK000278	mRNA	2197	22-Feb-00
15	DD15	クエン酸輸送タンパク質	X96924	DNA	2270	9-Oct-97
16	DD16		AC022148	DNA	198751	26-Aug-00
		12SミトコンドリアRNA(12S rRNA)	J01415	DNA	16569	18-Apr-00
		低酸素症誘導因子1 α (HIF1 α)	NM_001530	mRNA	3933	31-Oct-00
		アリール炭化水素受容体核トランスロケータ(ARNT)	NM_001668	mRNA	2616	31-Oct-00
		アデニレートキナーゼアイソザイム3(AK3)	X60673	mRNA	1707	18-Jan-95
		グルコーストランスポーターアイソフォーム1(Glut-1)	aa368897	mRNA	288	21-Apr-97
		マンガンスーパーオキシドアイソタマーゼ(MnSOD)	X14322	mRNA	977	12-Nov-90
		グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)	X13709	mRNA	819	6-Apr-95
		カタラーゼ(CAT)	NM_001752	mRNA	2279	31-Oct-00
		グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)	X15480	mRNA	725	12-Sep-93
		内皮性一酸化窒素シンターゼ(eNOS)	M93718	mRNA	4077	27-Apr-93
		T1227H	DD50525	mRNA	3911	10-Feb-99
		チトクロムオキシダーゼ2(CO2)	J01415	DNA	16569	18-Apr-00
		アコニターゼ	NM_001098	mRNA	2467	31-Oct-00
		アデニンスクレオチドトランスロケータ1(ANT-1)	NM_001151	mRNA	1320	31-Oct-00
		ATPシンターゼ	X03559	mRNA	1807	30-Dec-97

表1:子宮内膜症関連マーカー

出願人の参照項目		GENBANK(TM)の参照項目				
配列番号	任意名	GENBANK(TM)の遺伝子名	受付番号	種類	塩基数	日付
		B細胞白血病/リンパ腫-2(Bcl-2)	NM_000633	mRNA	6030	3-Feb-01
		ヒトc-jun前癌遺伝子(c-jun)	J04111	DNA	3622	6-Jan-95
		ニフトリオボアルブミン上流プロモーター転写因子 (COUP-TF)	X16155	mRNA	1513	19-Jul-95
		インターロイキン1β(IL-1β)	m15330	mRNA	1497	6-Jan-95
		コネクシン43(Cx43)	m65188	mRNA	1314	1-Nov-94
		熱ショックタンパク質70(HSP70)	m11717	DNA	2691	8-Nov-94
		熱ショックタンパク質90(HSP90)	x15183	mRNA	2912	30-Jan-95
		リン脂質過ヒドロキシル化グルタリオンペルオキシターゼ4 (GPx4)	NM_002085	mRNA	896	31-Oct-00
		グルコース調節性タンパク質78(GRP78)	m19645	DNA	5470	8-Nov-94
		シクロオキシゲナーゼ-2(cox2)	m90100	mRNA	3387	31-Dec-94

表2: ディファレンシャルディスプレイによって同定された
子宮内膜症関連マーカーのヌクレオチド配列

配列番号	任意名	ヌクレオチド配列
1	DD1	ggtagtaaltctgcagatcgctagctcgacgattcattggctgaatagccagtggtgcaggacatatgc acagtgctgacctcagtaactcactctcatacatatgtattaggacaccaacacatgtgtcatataa gatgtatgatagatattgcaacaagtaataattactgtcctatttataggatttaacttaactacttca ccctatttccaaaaaaa
2	DD2	gactgactgaaagggccaagaglaaalgccttcgtttgttttttcgtttntttgttttagctttttgtaaac gtctatagattggcagttaatgctgaattgtcaaatacccttccaaaattatactttgtatttaaaaaata aatgggatctacctaatttcaa
3	DD3	cgactglatntgaacgtaggtgcgataaataataggatcgaggcaggaatcaagacagatactg cgacataggggtgctccggctccagcgtctcgcaatgctatcgcggtgcatacccccaa
4	DD4	cgactgtggacgagaggggaacctgggtggggaccatggaggcaggggtgcagagggtgcacaata aaattgattatcatcglttttgagaatgttgttgglttccccca
5	DD5	aagctttggtcagagtgaattgaatattglaagtcagccactgggacccgaggattcgggaccccg agttgggaggaggaalnagtcagccttccagggtggcgtgagaggcaatgactcgttacctgcccgc calcaccttgaggccttccctggccttgagtagaaaagtcggggatcggggcaagagaggctgagt acggatgggaaactattgtcacaagcttccanaggagticttaatgagagttgtatttattccaga ccaataaattglaacttgcga
6	DD6	aagctttggtcagggatagagaatgaaagtgagatcatttagatcttagaaaggnagatgltnggctn gggacaggtggctcacacctgtaatcccagcacttgggaagccatggtgggcagatcatttgagctca ggagttgcaaccagcctgggcaatalggcaagaccccatctgtacaa
7	DD7	ttgtatttttagtaaacggggttccactatgtggccaggctggctcgaacccctgacctggtatcca cccacctggcctcccaatcttattgctttacaagctctgcttcagggttaccttccctgaccaaagctt
8	DD8	tctaatgcataataaaatgaaaggaatcglaaacagtttcgttccaaaagtcagagataaagacta tccatgaagggtcacttttgaggcaagaacctttttatgcaagactatgtggcatcagaaaactaaaat gtgattcaccaacatgccagccaatgttcatlaaaaatctgtcccttactaacagggtcaacagcgacc gggaacatcaccttacacagtataacgtggaagaaaagacaacattggngcacttctntctcca aaaccttatcttctnattcagcttanatntactgcaggactg
9	DD9	ttgattcgggtcagctaatccctttgtatcactcatagggcagactlnagggctaggatgatgattaataa gagggatgacataactattagtgccaggtagttgtttagggctcatggtaggggtlaaaaggagggc aatttctagatcaataataagaagglaatagctactaagaagaatttatggagaaagggacgagg gagggggataggggtcgaagccgcactcgtaaggggtggattttctatgtagccgtgaagaagctt

配列番号	任意名	ヌクレオチド配列
10	DD10	gtaggcagltgaggtggattaaaccaaaccagclacgcaaaatcctnagcatactcctcaattacc acataggatgaataatagcagttctaccgtacaaccctaacataacctgcttaatttaactttatattat cctaactactaccgcatctctactcaacttaaacctccagcaccacgaccctactactatctcgcacc tgaacaagctaacaatgactaacacccttaattccalccaccctcctccttaggaggcctgaccccg ctaancngcttttggccaattgggcattancgagattca
11	DD11	gtaggcctaaaagcagccaccaattaagaaagcgtlcaagclcaacacccactacctnaaaaaatc ccaaacatataactgaactcctcacaccaatlngaccaatctatcacctatagaagaactaatgtt agtataaglaacatgaaaacattctcctccgcataagccttgcgtcagattaaacactgaactgaca atfaacagcccaatactacaatcaaccaacaagtattaccctcactgcaaccaacacagggc atgctcataaggaaaggttaaaaaaglaaaaggaactcggcaaatcttaccncgc
12	DD12	gactgtgacatggaatccatcattcgggaatgaccicatggatggagatacatlggatttaactttgaca atgtgtgccaaccaaaagcttcccacacagtgcaagacaacgacacatagctgggtgtagggctg agggttagtgagcaggttacactlaaaagfacttcagattgctcagcaggaactgagagaagca gtccaagatgtcttccaactcccttttagtttcttggtaaaaaa
13	DD13	ggltgagttgtccatlgctagggagagactccagtaataaaaatfactatctagatgcttctactgttatg ttttatctaccatttacttcttagttaccaggagaaatgtgtgacacctatattataatgaaaacaatctta ttacttatagttatctatattaacaaaatlaattgcattiaaagcattcttgataattgttcttgaataaat atggataatcttgggtataaggagttaaacaatgclgtaataataaagtttcatgtgatcaaa
14	DD14	ttcatcatcttcttctcatnnaatctccttcaacctagaaggatgtaggactttggaaggcagggga tattagcatagatgctcctaattgactctctcctctctctctctctctctctccacttccacagatcttataatgcttctgt tgtccgctcaattgacttttagtttcttlaaaatggcctctcctcgttgagaagcttaagccga
15	DD15	ggcctggcttaccgcatccaggctgcagccccctgcttctcccgcattgccttaactgccctcgggc cctctctccgcccggacagggggcaccaccactctcaggaccaccctgccaaggcagaataaa ccgatcctgttc
16	DD16	aagctgcacatgacctaacgtttatgtaataactgtgttagtaccttttaaggtttgcagaagatgg cgggtataggctgaattagcaagagatagtgaggttactggggttattgatcaaa

【表3】

表3:グループ毎の子宮内膜症関連マーカーの平均値(±SEM)のまとめ

名前	CTL P ₀₀₀	CTL ₀	CTL	EXP I P	EXP I S	EXP I	EXP II P	EXP II S	EXP II	ENDO P	ENDOS	ENDO
DD1 (上皮)	0.24 ±0.04	0.81* ±0.20	0.55 ±0.12	0.60 ±0.21	0.15* ±0.03	0.38 ±0.12	2.77 ±1.96	1.39 ±1.02	1.94 ±0.97	1.36 ±0.72	0.74 ±0.49	1.03 ±0.42
DD2 (上皮)	1.21 ±0.62	0.42 ±0.14	0.76* ±0.29	0.10 ±0.04	0.09 ±0.03	0.10 ±0.02	0.09 ±0.02	0.28 ±0.13	0.21 ±0.08	0.10 ±0.03	0.18 ±0.06	0.14* ±0.03
DD3 (上皮)	0.98 ±0.09	0.64 ±0.03	0.88* ±0.07	0.79 ±0.09	0.57 ±0.04	0.68 ±0.05	0.41 ±0.10	0.60 n.a.	0.45 ±0.08	0.71 ±0.08	0.58 ±0.04	0.65* ±0.05
DD4 (上皮)	0.87 ±0.18	1.29* ±0.23	1.00 ±0.15	0.77 ±0.12	0.79 ±0.14	0.78 ±0.09	0.80 ±0.36	0.36 n.a.	0.69 ±0.28	0.78 ±0.11	0.75* ±0.13	0.77 ±0.08
DD5 (上皮)	1.92* ±0.38	3.65 ±1.85	2.86 ±1.02	0.85 ±0.25	1.61 ±0.50	1.19 ±0.27	1.11 ±0.62	28.06 ±23.75	17.70 ±14.73	0.92* ±0.24	13.37 ±10.65	7.32 ±5.51
DD5 (生検PROT*) (2つの実験)	n.a.	1.81* ±0.17	n.a.	n.a.	1.08 ±0.11	n.a.	n.a.	1.34 ±0.29	n.a.	n.a.	1.12* ±0.10	n.a. 1.04
DD6 (上皮)	2.18 ±1.32	0.83* ±0.23	1.42 ±0.59	0.49 ±0.12	0.15* ±0.03	0.32 ±0.08	1.06 ±0.72	0.54 ±0.20	0.74 ±0.29	0.73 ±0.30	0.36 ±0.12	0.52 ±0.15
DD7 (上皮)	1.49* ±0.39	2.47 ±1.37	2.02 ±0.76	0.38 ±0.12	0.35 ±0.09	0.37 ±0.08	0.27 ±0.21	0.99 ±0.34	0.73 ±0.24	0.35* ±0.10	0.65 ±0.18	0.51 ±0.11
DD8 (上皮)	0.81 ±0.14	1.01 ±0.20	0.88* ±0.11	0.59 ±0.10	0.52 ±0.12	0.56* ±0.08	0.70 ±0.22	0.73 ±n.a.	0.70 ±0.17	0.62 ±0.09	0.54 ±0.11	0.58 ±0.07
DD9 (上皮)	0.14* ±0.03	0.41 ±0.14	0.29 ±0.08	0.29 ±0.06	0.44 ±0.22	0.36 ±0.10	0.76 ±0.23	0.35 ±0.06	0.52 ±0.11	0.43* ±0.09	0.40 ±0.13	0.42 ±0.08
DD10 (上皮)	0.17* ±0.03	0.23 ±0.02	0.19 ±0.02	0.27* ±0.04	0.13 ±0.02	0.20 ±0.03	0.21 ±0.06	0.08 n.a.	0.18 ±0.05	0.26 ±0.03	0.13 ±0.02	0.20 ±0.02

名前	CTL P ₀₀	CTL ₀	CTL	EXPI P	EXPI S	EXPI	EXPI P	EXPI S	EXPI I	EXPI P	EXPI S	EXPI II	ENDO P	ENDO S	ENDO
DD11(生検)		See:CO3													
DD12(生検)	27.82 ±5.01	40.20 ±5.46	34.73* ±3.97	14.48 ±2.29	35.42 ±3.85	26.11 ±3.42	17.10 ±1.91	42.96 ±5.10	20.79 ±3.04	16.05 ±1.46	36.67 ±3.35				23.78* ±2.35
DD12(生検NB)	0.47 ±0.14	1.15 ±0.26	0.78* ±0.15	0.46 ±0.15	0.52 ±0.15	0.49 ±0.10	0.27 ±0.13	0.53 ±0.33	0.31 ±0.12	0.37 ±0.10	0.52 ±0.13				0.42* ±0.09
DD13(生検)	0.72 ±0.13	0.24 ±0.08	0.45* ±0.09	0.83 ±0.17	0.24 ±0.06	0.48 ±0.10	0.87 ±0.17	0.47 ±0.11	0.82* ±0.15	0.86 ±0.12	0.28 ±0.06				0.63 ±0.09
DD14(生検)	1.36 ±0.25	0.77 ±0.12	1.03* ±0.15	2.65 ±0.83	1.23 ±0.18	1.86 ±0.41	1.18 ±0.15	2.06 ±0.13	1.31 ±0.15	1.77 ±0.37	1.37 ±0.18				1.62* ±0.24
DD15(生検)	0.12 ±0.07	0.10 ±0.06	0.11* ±0.05	0.49 ±0.12	0.32 ±0.08	0.43 ±0.08	0.48 ±0.15	0.12 ±0.12	0.39 ±0.13	0.49 ±0.09	0.28 ±0.07				0.42* ±0.07
DD16(生検)	2.54 ±0.35	2.46 ±0.32	2.50* ±0.23	0.63 ±0.16	1.49 ±0.11	0.98 ±0.15	1.63 ±0.33	1.90 ±0.19	1.70 ±0.24	0.96 ±0.19	1.58 ±0.11				1.19* ±0.14
HIF1α(上皮)	0.84 ±0.10	1.34 ±0.15	0.99* ±0.10	1.29 ±0.13	1.23 ±0.16	1.26 ±0.10	1.47 ±0.33	2.27 n.a.	1.62 ±0.30	1.33 ±0.12	1.31 ±0.17				1.32* ±0.10
HIF1α(生検NB)	0.78* ±0.08	1.82 ±0.35	1.20 ±0.18	1.06 ±0.14	1.82 ±0.32	1.35 ±0.18	1.16 ±0.14	1.27 ±0.71	1.19 ±0.21	1.11* ±0.10	1.61 ±0.32				1.28 ±0.13
ARNT(上皮)	0.53* ±0.11	1.38 ±0.65	1.00 ±0.37	1.04 ±0.19	1.76 ±0.61	1.37 ±0.30	1.03 ±0.17	10.13 ±7.93	6.49 ±4.80	1.04* ±0.14	5.72 ±3.78				3.44 ±1.96
AK3(上皮)	0.60 ±0.17	1.62 ±0.32	1.14* ±0.22	0.22 ±0.07	0.62 ±0.18	0.41* ±0.10	3.16 ±2.12	13.83 ±10.70	8.91 ±5.83	1.40 ±0.89	6.78 ±5.10				4.10 ±2.59
Glut-1(上皮)	0.51 ±0.12	0.86 ±0.18	0.69* ±0.11	0.63 ±0.21	1.28 ±0.65	0.81 ±0.29	1.23 ±0.39	2.33 ±0.77	1.87* ±0.49	0.81 ±0.19	1.77 ±0.50				1.26 ±0.27
MnSOD(上皮)	0.62 ±0.04	0.96 ±0.23	0.84* ±0.15	0.10 ±0.23	3.89 ±2.32	2.62 ±1.32	5.35 ±4.12	6.29 ±2.85	5.90 ±2.27	2.81 ±1.73	4.94 ±1.77				4.03* ±1.25
MnSOD(生検)	0.68	0.89	0.76*	0.92	2.20	1.56	0.89	1.36	0.98	0.90	2.00				1.30*

名前	CTL P ₀₀	CTL ₀	CTL	EXPI P	EXPI S	EXPI	EXPI I P	EXPI I S	EXPI I I	EXPI I I S	EXPI I I S	ENDO P	ENDO S	ENDO S
	±0.06	±0.16	±0.08	±0.18	±0.41	±0.26	±0.07	±0.30	±0.29	±0.09	±0.33	±0.16		
GPx(上皮)	0.34 ±0.08	0.80 ±0.11	0.49* ±0.08	1.50 ±0.18	2.01 ±0.19	1.75 ±0.14	1.83 ±0.35	2.80 n.a.	2.02 0.33	1.57 ±0.16	2.08 ±0.18	1.80* ±0.13		
カタラーゼ (生検)	0.60 ±0.08	0.49* ±0.08	0.55 ±0.06	0.88 ±0.25	0.13 ±0.04	0.59 ±0.17	0.46 ±0.18	0.14 n.a.	0.41 ±0.16	0.74 ±0.18	0.13* ±0.03	0.55 ±0.14		
GST(上皮)	0.40 ±0.09	0.38 ±0.12	0.39* ±0.07	0.21 ±0.08	0.15 ±0.03	0.19* ±0.05	0.80 ±0.48	0.67 ±0.21	0.71 ±0.20	0.35 ±0.13	0.42 ±0.13	0.39 ±0.09		
eNOS(上皮)	0.35* ±0.08	0.39 ±0.20	0.36 ±0.08	0.17 ±0.05	0.40 ±0.09	0.27 ±0.05	0.07 ±0.03	0.04 n.a.	0.06 ±0.02	0.15* ±0.04	0.37 ±0.09	0.24 ±0.05		
CO3IDD11 (上皮)	0.44 ±0.09	0.77* ±0.11	0.55 ±0.08	0.51 ±0.08	0.31 ±0.07	0.41 ±0.06	0.35 ±0.19	0.03 n.a.	0.29 ±0.16	0.47 ±0.07	0.29* ±0.07	0.39 ±0.05		
12S rRNA(生検)	4.12 ±1.02	3.02 ±0.70	3.61* ±0.63	0.78 ±0.42	2.82 ±1.19	1.56* ±0.55	4.57 ±1.83	1.68 n.a.	4.16 ±1.60	1.98 ±0.74	2.69 ±1.06	2.21 ±0.60		
T1227H(生検)	0.33 ±0.04	0.30 ±0.06	0.32* ±0.04	0.43 ±0.12	0.45 ±0.18	0.44 ±0.10	0.02 ±0.01	0.05 ±0.05	0.03* ±0.01	0.30 ±0.09	0.37 ±0.15	0.33 ±0.08		
CO2(生検)	0.58* ±0.16	0.37 ±0.15	0.48 ±0.11	0.16* ±0.04	0.40 ±0.05	0.25 ±0.04	0.83 ±0.20	2.42 n.a.	1.06 ±0.28	0.37 ±0.10	0.62 ±0.23	0.45 ±1.10		
アコタラーゼ (生検)	0.43 ±0.10	0.18* ±0.02	0.31 ±0.06	0.30 ±0.07	0.07* ±0.02	0.21 ±0.05	0.20 ±0.03	0.30 ±0.04	0.22 ±0.03	0.25 ±0.04	0.12 ±0.04	0.21 ±0.03		
ANT-1(生検)	0.02* ±0.003	0.03 ±0.01	0.03 ±0.004	0.01 ±0.001	0.08 ±0.02	0.03 ±0.01	0.02 ±0.01	0.00 n.a.	0.01 ±0.005	0.01* ±0.002	0.07 ±0.02	0.03 ±0.01		
ANT-1(生検NB)	0.09* ±0.02	0.02 ±0.01	0.06 ±0.01	0.05 ±0.02	0.02 ±0.01	0.04 ±0.01	0.02 ±0.01	0.10 ±0.06	0.05 ±0.02	0.04* ±0.01	0.05 ±0.03	0.04 ±0.01		
ATPシタラーゼ (生検)	2.28 ±0.32	5.28 ±1.53	3.67* ±0.77	5.06 ±1.05	9.43 ±1.43	6.72 ±0.95	11.26 ±2.19	13.14 n.a.	11.53 ±1.87	7.02 ±1.18	9.85 ±1.33	7.93* ±0.93		
Bcl-2(生検)	4.61 ±1.13	6.11 ±1.64	5.30* ±0.97	3.96 ±0.90	0.82 ±0.31	2.76 ±0.65	0.99 ±0.38	2.81 n.a.	1.25 ±0.41	3.02 ±0.70	1.04 ±0.35	2.38* ±0.51		

【表4】

名前	CTL P ₀₀₀	CTL ₀	CTL	EXPIP	EXPI S	EXPI	EXPI P	EXPI S	EXPI I	EXPI I I	EXPI I I	EXPI I I	ENDO P	ENDO S	ENDO
c-jun(上皮)	0.51 ±0.09	0.51* ±0.08	0.51 ±0.07	0.53 ±0.10	0.85* ±0.11	0.66 ±0.08	0.63 ±0.31	0.10 n.a.	0.50 ±0.26	0.55 ±0.09	0.77 ±0.12	0.64 ±0.08			
c-jun(生検)	0.68 ±0.11	1.02 ±0.18	0.82* ±0.11	0.98 ±0.26	1.84 ±0.40	1.38 ±0.25	1.35 ±0.21	1.55 ±0.45	1.38 ±0.18	1.19 ±0.16	1.78 ±0.32	1.38* ±0.16			
COUP-TF(生検)	0.05 ±0.01	0.22* ±0.05	0.13 ±0.03	0.08 ±0.04	0.06 ±0.03	0.07 ±0.02	0.10 ±0.06	0.12 n.a.	0.10 ±0.05	0.09 ±0.03	0.07* ±0.02	0.08 ±0.02			
IL-1β(上皮)	1.02 ±0.09	0.86 ±0.10	0.98* ±0.07	1.31 ±0.36	1.14 ±0.28	1.23 ±0.23	0.31 ±0.15	0.06 n.a.	0.25* ±0.12	1.13 ±0.31	1.05 ±0.27	1.10 ±0.21			
Cx43(上皮)	1.06 ±0.15	0.72 ±0.32	0.95* ±0.14	1.69 ±0.21	1.06 ±0.19	1.39* ±0.16	1.30 ±0.27	0.26 n.a.	1.04 ±0.32	1.61 ±0.18	0.98 ±0.18	1.33 ±0.14			
HSP 70(上皮)	0.56 ±0.09	0.30 ±0.07	0.42* ±0.06	1.04 ±0.28	0.91 ±0.26	0.98 ±0.19	2.61 ±1.01	2.75 ±1.67	2.70 ±1.10	1.50 ±0.38	1.78 ±0.81	1.65* ±0.46			
HSP 70(生検)	0.26* ±0.13	1.38 ±0.44	0.86 ±0.28	0.80 ±0.20	0.80 ±0.31	0.80 ±0.18	1.06 ±0.33	0.10 n.a.	0.99 ±0.31	0.96* ±0.22	0.71 ±0.28	0.89 ±0.18			
HSP 90(上皮)	0.38 ±0.08	0.32 ±0.06	0.36* ±0.06	0.37 ±0.06	0.19 ±0.03	0.28 ±0.04	0.05 ±0.02	n.a. n.a.	0.05* ±0.02	0.30 ±0.06	0.19 ±0.03	0.25 ±0.04			
GPx4(生検)	0.07 ±0.01	0.21* ±0.04	0.13 ±0.02	0.06 ±0.02	0.07* ±0.02	0.07 ±0.01	0.09 ±0.02	0.81 n.a.	0.19 ±0.10	0.07 ±0.01	0.15 ±0.08	0.10 ±0.03			
GRP78(生検)	4.76 ±0.57	7.97* ±1.75	6.24 ±0.90	6.49 ±1.38	1.63 ±0.71	4.64 ±1.03	1.66 ±0.41	4.60 n.a.	2.08 ±0.54	4.97 ±1.08	1.96* ±0.71	3.10 ±0.80			
cox2(生検)	3.04 ±0.98	5.88 ±2.10	4.35* ±1.12	9.28 ±1.97	9.73 ±2.91	9.46* ±1.60	2.67 ±0.79	3.75 n.a.	2.83 ±0.68	7.20 ±1.53	9.07 ±2.65	7.80 ±1.33			

表4: 過剰発現される子宮内膜症関連マーカー

名前	無病正診率	有病正診率	調節された 期	調節された 実験群	有意差 (p値)*
DD9 (上皮)	70%	70%	↑ P□□	1&2	0.008
DD10 (上皮)	71%	71%	↑ P	1	0.04
DD13 (生検)	62%	64%	↑ P&S□	2	0.04
DD14 (生検)	78%	58%	↑ P&S	1&2	0.04
DD15 (生検)	85%	79%	↑ P&S	1&2	0.0006
HIF1α (上皮)	65%	72%	↑ P&S	1&2	0.028
HIF1α (生検NB)	83%	80%	↑ P	1&2	0.019
ARNT (上皮)	67%	83%	↑ P	1&2	0.02
Glut-1 (上皮)	71%	67%	↑ P&S	2	0.037
MnSOD (上皮)	76%	58%	↑ P&S	1&2	0.017
MnSOD (生検)	81%	53%	↑ P&S	1&2	0.003
GPx (上皮)	100%	87.5%	↑ P&S	1&2	1.7×10^{-11}
ATPシンターゼ (生検)	77% 93%	75% 64%	↑ P&S ↑ P	1&2 1&2	10^{-3} 8×10^{-4}
c-jun (上皮)	75%	67%	↑ S	1	0.05
c-jun (生検)	76%	65%	↑ P&S	1&2	0.005
Cx43 (上皮)	74%	48%	↑ P&S	1	0.048
	77%	64%	↑ P	1	0.02
HSP 70 (上皮)	73%	61%	↑ P&S	1&2	0.01
HSP 70 (生検)	71%	78%	↑ P	1&2	0.014
cox2 (生検)	69%	62%	↑ P&S	1	0.01

【表5】

表5: 過少発現される子宮内膜症関連マーカー

名前	無病正診率	有病正診率	調節された 期	調節された 実験群	有意差 (p値)*
DD1(上皮)	75%	90%	↓ S \square	1	0.01
DD2(上皮)	65%	77%	↓ P \square \square &S	1&2	0.04
DD3(上皮)	63%	69%	↓ P&S	1&2	0.01
DD4(上皮)	83%	85%	↓ S	1&2	0.04
DD5(上皮)	78%	79%	↓ P	1&2	0.03
DD5 (生検PROT)+	77%	61%	↓ S	1&2	0.001
	71%	57%	↓ S	1&2	0.05
DD6(上皮)	89%	100%	↓ S	1	0.018
DD7(上皮)	80%	70%	↓ P	1&2	0.019
DD8(上皮)	67%	60%	↓ P&S	1	0.02
DD12(生検)	81%	56%	↓ P&S	1&2	0.015
DD12 (生検NB)	55%	68%	↓ P&S	1&2	0.05
DD16(生検)	70%	78%	↓ P&S	1&2	3.5x10 ⁻⁵
AK3(上皮)	68%	82%	↓ P&S	1	0.005
カタラーゼ(生検)	83%	78%	↓ S	1&2	0.001
GST(上皮)	54%	74%	↓ P&S	1	0.026
eNOS(上皮)	77%	65%	↓ P	1&2	0.027
CO3/DD11(上皮)	83%	79%	↓ S	1&2	0.002
12S rRNA(生検)	77%	67%	↓ P&S	1	0.02
TI227H(生検)	81%	100%	↓ P&S	2	2x10 ⁻⁸
CO2 (生検)	64%	69%	↓ P	1	0.02
アコニターゼ(生検)	80%	86%	↓ S	1	0.005
ANT-1(生検)	86%	74%	↓ P	1&2	0.007
ANT-1 (生検 NB)	75%	73%	↓ P	1&2	0.016
Bcl-2(生検)	54%	82%	↓ P&S	1&2	0.01
COUP-TF(生検)	83%	78%	↓ S	1&2	0.01
IL-1 β (上皮)	78%	100%	↓ P&S	2	0.0002
HSP 90(上皮)	75%	100%	↓ P&S	2	4.3 x10 ⁻⁵
GPx4(生検)	83%	75%	↓ S	1	5x10 ⁻³
GRP78(生検)	92%	78%	↓ S	1&2	6x10 ⁻³

【表6】

表6:増殖期で調節される子宮内膜症関連マーカー

名前	無病正診率	有病正診率	調節された 期	調節された 実験群	有意差 (p値)*
DD5(上皮)	78%	79%	↓ P ₀₀	1&2	0.03
DD7(上皮)	80%	70%	↓ P	1&2	0.019
DD9(上皮)	70%	70%	↑ P	1&2	0.008
DD10(上皮)	71%	71%	↑ P	1	0.04
HIF1 α (生検NB)	83%	80%	↑ P	1&2	0.019
ARNT(上皮)	67%	83%	↑ P	1&2	0.02
eNOS(上皮)	77%	65%	↓ P	1&2	0.027
CO2(生検)	64%	69%	↓ P	1	0.02
ANT-1(生検)	86%	74%	↓ P	1&2	0.007
ATPシンターゼ (生検)	93%	64%	↑ P	1&2	8x10 ⁻⁴
Cx43(上皮)	77%	64%	↑ P	1	0.02
HSP 70(生検)	71%	78%	↑ P	1&2	0.014
DD2(上皮)	65%	77%	↓ P&S _D	1&2	0.04
DD3(上皮)	63%	69%	↓ P&S	1&2	0.01
DD8(上皮)	67%	60%	↓ P&S	1	0.02
DD12(生検)	81%	56%	↓ P&S	1&2	0.015
DD12(生検NB)	55%	68%	↓ P&S	1&2	0.05
DD13(生検)	62%	64%	↑ P&S	2	0.04
DD14(生検)	78%	58%	↑ P&S	1&2	0.04
DD15(生検)	85%	79%	↑ P&S	1&2	0.0006
DD16(生検)	70%	78%	↓ P&S	1&2	3.5x10 ⁻⁵
HIF1 α (上皮)	65%	72%	↑ P&S	1&2	0.028
AK3(上皮)	68%	82%	↓ P&S	1	0.005
Glut-1(上皮)	71%	67%	↑ P&S	2	0.037
MnSOD(上皮)	76%	58%	↑ P&S	1&2	0.017
MnSOD(生検)	81%	53%	↑ P&S	1&2	0.003
GPx(上皮)	100%	87.5%	↑ P&S	1&2	1.7x10 ⁻¹¹
GST(上皮)	54%	74%	↓ P&S	1	0.026
12S rRNA(生検)	77%	67%	↓ P&S	1	0.02
TI227H(生検)	81%	100%	↓ P&S	2	2x10 ⁻⁶
ANT-1(生検NB)	85%	75%	↓ P&S	1&2	0.016
ATPシンターゼ (生検)	77%	75%	↑ P&S	1&2	10 ⁻³
Bcl-2(生検)	54%	82%	↓ P&S	1&2	0.01
c-jun(生検)	76%	65%	↑ P&S	1&2	0.005
IL-1 β (上皮)	78%	100%	↓ P&S	2	0.0002
Cx43(上皮)	74%	48%	↑ P&S	1	0.048
HSP 70(上皮)	73%	61%	↑ P&S	1&2	0.01
HSP 90(上皮)	75%	100%	↓ P&S	2	4.3 x10 ⁻⁵
cox2(生検)	69%	62%	↑ P&S	1	0.01

【表7】

表7: 分泌期で調節される子宮内膜症関連マーカー

名前	無病正診率	有病正診率	調節された 期	調節された 実験群	有意差 (p値)*
DD1(上皮)	75%	90%	↓ S α	1	0.01
DD4(上皮)	83%	85%	↓ S	1&2	0.04
DD6(上皮)	89%	100%	↓ S	1	0.018
カタラーゼ(生検)	83%	78%	↓ S	1&2	0.001
CO3/DD11(上皮)	83%	79%	↓ S	1&2	0.002
アコニターゼ(生検)	80%	86%	↓ S	1	0.005
c-jun(上皮)	75%	67%	↑ S	1	0.05
COUP-TF(生検)	83%	78%	↓ S	1&2	0.01
GPx4(生検)	83%	75%	↓ S	1	5x10 ⁻³
GRP78(生検)	92%	78%	↓ S	1&2	6x10 ⁻³
DD2(上皮)	65%	77%	↓ P α &S	1&2	0.04
DD3(上皮)	63%	69%	↓ P&S	1&2	0.01
DD8(上皮)	67%	60%	↓ P&S	1	0.02
DD12(生検)	81%	56%	↓ P&S	1&2	0.015
DD12(生検 NB)	55%	68%	↓ P&S	1&2	0.05
DD13(生検)	62%	64%	↑ P&S	2	0.04
DD14(生検)	78%	58%	↑ P&S	1&2	0.04
DD15(生検)	85%	79%	↑ P&S	1&2	0.0006
DD16(生検)	70%	78%	↓ P&S	1&2	3.5x10 ⁻⁵
HIF1 α (上皮)	65%	72%	↑ P&S	1&2	0.028
AK3(上皮)	68%	82%	↓ P&S	1	0.005
Glut-1(上皮)	71%	67%	↑ P&S	2	0.037
MnSOD(上皮)	76%	58%	↑ P&S	1&2	0.017
MnSOD(生検)	81%	53%	↑ P&S	1&2	0.003
GPx(上皮)	100%	87.5%	↑ P&S	1&2	1.7x10 ⁻¹¹
GST(上皮)	54%	74%	↓ P&S	1	0.026
12S rRNA(生検)	77%	67%	↓ P&S	1	0.02
TI227H(生検)	81%	100%	↓ P&S	2	2x10 ⁻⁵
ANT-1(生検 NB)	85%	75%	↓ P&S	1&2	0.016
ATPシンターゼ (生検)	77%	75%	↑ P&S	1&2	10 ⁻³
Bcl-2(生検)	54%	82%	↓ P&S	1&2	0.01
c-jun(生検)	76%	65%	↑ P&S	1&2	0.005
IL-1 β (上皮)	78%	100%	↓ P&S	2	0.0002
Cx43(上皮)	74%	48%	↑ P&S	1	0.048
HSP 70(上皮)	73%	61%	↑ P&S	1&2	0.01
HSP 90(上皮)	75%	100%	↓ P&S	2	4.3 x10 ⁻⁵
cox2(生検)	69%	62%	↑ P&S	1	0.01

【表8】

表8: 疾病の段階に応じて調節される子宮内膜症関連マーカー

名前	無病正診率	有病正診率	調節された期	調節された実験群	有意差(p値)*
DD1(上皮)	75%	90%	↓ S α	1	0.01
DD6(上皮)	89%	100%	↓ S	1	0.018
DD8(上皮)	67%	60%	↓ P α &S	1	0.02
DD10(上皮)	71%	71%	↑ P	1	0.04
AK3(上皮)	68%	82%	↓ P&S	1	0.005
GST(上皮)	54%	74%	↓ P&S	1	0.026
12S rRNA(生検)	77%	67%	↓ P&S	1	0.02
CO2(生検)	64%	69%	↓ P	1	0.02
アコニターゼ(生検)	80%	86%	↓ S	1	0.005
c-jun(上皮)	75%	67%	↑ S	1	0.05
Cx43(上皮)	74%	48%	↑ P&S	1	0.048
	77%	64%	↑ P	1	0.02
GPx4(生検)	83%	75%	↓ S	1	5x10 ⁻³
cox2(生検)	69%	62%	↑ P&S	1	0.01
DD13(生検)	62%	64%	↑ P&S	2	0.04
Glut-1(上皮)	71%	67%	↑ P&S	2	0.037
TI227H(生検)	81%	100%	↓ P&S	2	2x10 ⁻⁸
IL-1 β (上皮)	78%	100%	↓ P&S	2	0.0002
HSP 90(上皮)	75%	100%	↓ P&S	2	4.3 x10 ⁻⁵

【表9】

表9: 疾病の段階I若しくはII(EXP1)、又は段階III若しくはIV(EXP2)で過剰発現される子宮内膜症関連マーカー

名前	無病正診率	有病正診率	調節された期	調節された実験群	有意差(p値)*
DD10(上皮)	71%	71%	↑ P	1	0.04
c-jun(上皮)	75%	67%	↑ S	1	0.05
Cx43(上皮)	74%	48%	↑ P&S	1	0.048
	77%	64%	↑ P	1	0.02
cox2(生検)	69%	62%	↑ P&S	1	0.01
DD13(生検)	62%	64%	↑ P&S	2	0.04
Glut-1(上皮)	71%	67%	↑ P&S	2	0.037

【表10】

表10: 疾病の段階I若しくはII(EXP1)、又は段階III若しくはIV(EXP2)で過少発現される子宮内膜症関連マーカー

名前	無病正診率	有病正診率	調節された期	調節された実験群	有意差(p値)*
CO2(生検)	64%	69%	↓ P	1	0.02
DD1(上皮)	75%	90%	↓ S□	1	0.01
DD6(上皮)	89%	100%	↓ S	1	0.018
アコニターゼ(生検)	80%	86%	↓ S	1	0.005
GPx4(生検)	83%	75%	↓ S	1	5x10 ⁻³
DD8(上皮)	67%	60%	↓ P□□&S	1	0.02
AK3(上皮)	68%	82%	↓ P&S	1	0.005
GST(上皮)	54%	74%	↓ P&S	1	0.026
12S rRNA(生検)	77%	67%	↓ P&S	1	0.02
TI227H(生検)	81%	100%	↓ P&S	2	2x10 ⁻⁵
IL-1β(上皮)	78%	100%	↓ P&S	2	0.0002
HSP 90(上皮)	75%	100%	↓ P&S	2	4.3 x10 ⁻⁵

表3~10の脚注:

TL: 対照群(子宮内膜症に罹患していない女性)

ENDO: Endo 群(子宮内膜症を有する女性)

EXP: Endo 群を表す: **EXP1**: 疾病の段階I及びIIIにある女性

EXP2: 疾病の段階III及びIVにある女性

epith: 上皮細胞RNAに由来するマーカー

biop: 分画されていない生検 RNA に由来するマーカー

biop PROT⁺: 分画されていない生検タンパク質に由来するマーカー

*: 記載の比較群に対するスチューデントのt検定による有意差を示す

□S: 分泌期

□□P: 増殖期

NB: ノーザンブロット分析によって得られた、分画されていない生検 RNA に由来するマーカーを示す

n.a.: 取得不能

【表11】

表11:子宮内膜症関連遺伝子マーカーの組み合わせ

		無病正診率	有病正診率
各マーカー単独	GRP 78	92%	78%
	カタラーゼ	83%	78%
	COUP-TF	83%	78%
2つのマーカーの 組み合わせ	GRP 78 & カタラーゼ	75%	100%
	GRP 78 & COUP-TF	75%	89%
	カタラーゼ & COUP-TF	75%	100%
3つのマーカーの 組み合わせ	GRP 78 & カタラーゼ & COUP-TF	92%	89%

本発明の実施態様を幾つか説明したが、本発明はさらに改変することが可能であり、本出願は本発明の任意の変法、用途、又は修正に及ぶことを意図したものであって、本発明の一般原理に倣って、本発明が属する分野の知識又は慣行の範囲に納まり、且つ本明細書に上記されている本質的特徴に該当し、本発明の範囲内又は添付の特許請求の範囲の境界の中に属し得るように本発明の開示内容から逸脱することが含まれることが理解できるであろう。

【0182】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> PROCREA INC.
 <120> ENDOMETRIOSIS-RELATED MARKERS AND USES THEREOF
 <130> 029318-0013
 <150> US 60/185,063
 <151> 2000-02-25
 <150> US 60/225,745
 <151> 2000-08-17
 <160> 16
 <170> PatentIn version 3.0

<210> 1
 <211> 231
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc feature
 <222> (1)..(231)
 <223> cDNA

<400> 1
 ggtttagtaat tctgcagatc gctagctcga cgattcattg gctgaatagc cagtgggtgca 60
 ggacatatgc acagtgtctg acctcagtaa cttcactctc atacatatgt attaggacac 120
 caacacatgt gtgcataata gatgtatgat agatattgca acaagtaata atttactgtc 180
 ctatttatag gatttttaaac ttaaactact ttcacctat ttccaaaaa a 231

<210> 2
 <211> 174
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(174)
 <223> cDNA

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (53)..(53)
 <223> n = undetermined nucleotide

<400> 2
 gactgtactg aaagggccaa gagtaaatgc cttcgttttg tttttttcgt ttnttttggt 60
 ttagcttttt gttaaaaagt ctatagattg gcagttaatg ctgaatttgc caaatacccc 120
 ttccaaaatt atactttgta tttaaaaaat aaatgggatc tacctaattt ccaa 174

<210> 3

```

<211> 123
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(123)
<223> cDNA

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> n = undetermined nucleotide

<400> 3
cgactgtatg ntgaacgtag gtgcgataaa taataggatc gaggcaggaa tcaaagacag      60
atactgcgac atagggtgct ccggctccag cgtctcgcaa tgctatcgcg tgcatacccc      120
caa                                                                    123

<210> 4
<211> 108
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(108)
<223> cDNA

<400> 4
cgactgtgga cgagagggaa cctggtggtg ggaccatgga ggcagggtgc agaggtgcac      60
aataaaattg attatcatcg tttttgagaa tgttgttggg ttccccca                  108

<210> 5
<211> 297
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(297)
<223> cDNA

<220>
<221> misc_feature
<222> (85)..(85)
<223> n = undetermined nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (237)..(237)
<223> n = undetermined nucleotide

<400> 5
aagctttggt cagagtgaat tgaatattgt aagtcagcca ctgggacccg aggattctgg      60
gaccocgcag tfgggaggag gaatnagtcc agccttcag gtggcgtgag aggcaatgac      120

```



```

tcgttacctg ccgccatca ccttgaggc cttccctggc cttgagtaga aaagtcgggg      180
atcggggcaa gagaggctga gtacggatgg gaaactattg tgcacaagtc ttccanagg      240
agtttotta taagagtttg tatttatttc cagaccaata aatttgtaac ttgcaa        297

```

```

<210> 6
<211> 184
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(184)
<223> cDNA

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(55)
<223> n = undetermined nucleotide

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (63)..(63)
<223> n = undetermined nucleotide

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (68)..(68)
<223> n = undetermined nucleotide

```

```

<400> 6
aagctttggt cagggataga gaatgaaagt gagatcattt agatcttaga aaggnagatg      60
ttnggctngg gcacgggtggc tcacacctgt aatcccagca cttgggaage catggtgggc      120
agatcatttg agctcaggag ttgcaacca gcctgggcaa tatggcaaga ccccatctgt      180
acaa                                              184

```

```

<210> 7
<211> 143
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(143)
<223> cDNA

```

```

<400> 7
ttgtattttt agtaaagaag gggtttcaact atgttggcca ggctggtctc gaactcctga      60
cctcgtgac caccacactt ggctcccaa tottatttgc ttacaagtc ctgcttcagg      120
gttaccttcc ctgaccaaag ctt                                              143

```

```

<210> 8
<211> 319
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(319)
<223> cDNA

<220>
<221> misc_feature
<222> (259)..(259)
<223> n = undetermined nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (269)..(269)
<223> n = undetermined nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (290)..(290)
<223> n = undetermined nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (302)..(302)
<223> n = undetermined nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (306)..(306)
<223> n = undetermined nucleotide

<400> 8
tctaattgat aataaaatga aaggaatcgt aaaacagttt cgttccaaaa agtcagagat      60
aaagactatc catgaagggt cacttttgag gcaagaacco ttttttatgc aagactatgt      120
ggcatcagaa aactaaaatg tgattcacca acatgccagc caatgttcat taaaaatctg      180
tccottacta acaggtgcaa cagcgaccgg gaacatcacc ttacacagta taacgtggaa      240
agaaaagaca acattgggng catttctent ctccaasaacc ttatcttten attcagcttt      300
ancatntact gcaggactg                                     319

<210> 9
<211> 277
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(277)
<223> cDNA

<220>
<221> misc_feature
<222> (50)..(50)
<223> n = undetermined nucleotide

<400> 9
ttgattcggg tcagttotaat cctttttgta tcaactcatag gccagacttn agggctagga      60
tgatgattaa taagagggat gacataacta ttagtggcag gtagtgtgtt gtagggetca      120

```

```

tggtaggggt aaaaggagg caatttctag atcaaataat aagaaggtaa tagctactaa 180
gaagaatttt atggagaaaag ggacgcgggc ggggatata gggtcgaagc cgcactcgtc 240
aggggtggat ttttctatgt agccgttgaa gaagctt 277

```

```

<210> 10
<211> 320
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(320)
<223> cDNA

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (48)..(48)
<223> n = undetermined nucleotide

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (284)..(284)
<223> n = undetermined nucleotide

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (287)..(287)
<223> n = undetermined nucleotide

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (311)..(311)
<223> n = undetermined nucleotide

```

```

<400> 10
gtaggcagtt gaggtggatt aaaccasacc cagctacgca aaatcctnag catactctc 60
aattaccac ataggatgaa taatagcagt tctaccgtac aaccctaaca taacctgctt 120
aatttaacta tttatattat cctaactact accgcattcc tactactcaa cttaaactcc 180
agcaccacga cctactact atctgcacc tgaacaagc taacatgact aacaccctta 240
attccatcca cctcctctc cctaggagge ctgaccocgc taanogngct tttgcccac 300
ttgggcatta ncgagattca 320

```

```

<210> 11
<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(327)
<223> cDNA

```

```

<220>
<221> misc_feature

```

```

<222> (58)..(58)
<223> n = undetermined nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (101)..(101)
<223> n = undetermined nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (324)..(324)
<223> n = undetermined nucleotide

<400> 11
gtaggcctaa aagcagccac caattaagaa agcgttcaag ctcaacaccc actacctnaa      60
aaaatcccaa acatataact gaactcctca caccacaattg ngaccaatct atcaccctat      120
agaagaacta atgttagtat aagtaacatg aaaacattct cctccgcata agccttgctg      180
cagattaaaa cactgaactg acaattaaca gcccaatata tacaatcaac caacaagtca      240
ttattaccct cactgtcaac ccaacacagg catgctcata aggaaagggt aaaaaaagta      300
aaaggaactc ggcaaatctt accncgc                                           327

<210> 12
<211> 254
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(254)
<223> cDNA

<400> 12
gactgtgaca tggaaatccat cattcggaat gacctcatgg atggagatac attggatttt      60
aactttgaca atgtgttgcc caaccaaaagc ttcccacaca gtgtcaagac aacgacacat      120
agctgggtgt caggctgagg gttagtgagc aggttacact taaaagtact tcagattgtc      180
tgacagcagg aactgagaga agcagtccaa agatgtcttt caccaactcc cttttagttt      240
tcttggttaa aaaa                                                         254

<210> 13
<211> 295
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(295)
<223> cDNA

<400> 13
ggttgagttt gtccattgct agggagagac ttccagtaat aaaatttact attctagatg      60
cttctactgt tatgttttat ctaccoatct atctttctta gttaccagga gaaatgtgtg      120

```

```

acacctatat tataatgaaa acaatcttat tactttatagt ttatctatat taaacaaatt      180
taattgcatt taaagcattc ttgatattg ttgcttttgc aataaatatg gataatcttg      240
gttataaggg agttaaaca atgctgtaat aaataaagtg tttcatgtga tcaaa          295

```

```

<210> 14
<211> 218
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(218)
<223> cDNA

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(25)
<223> n = undetermined nucleotide

```

```

<400> 14
ttcatcatct tcttttctct catnncctc cttccttaac ctagaaggta tgtaggactt      60
tggaaggcca gggatattag catagatgtc ctcaattgac tttctctctc tttcttctct      120
ttccactttc acagatctta taatgtcttc tgttgtccgc tcaattgact ttagtttctt      180
taaaatggcc tcttccttcg ttgagaagct taagccga          218

```

```

<210> 15
<211> 150
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(150)
<223> cDNA

```

```

<400> 15
ggcctgggct caccgcattc caggctgcag ccccttgctt ctcccgcgat tgccttaact      60
gccctcgggc cctctctccg ccccgacag ggtggcacc accactctca ggaccaccct      120
gccaaggcag aataaacggg atcctgttgc          150

```

```

<210> 16
<211> 132
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(132)
<223> cDNA

```

```

<400> 16
aagcttgcac catgacctaa cgttttatgt aaatacttgt gtttagtacc ttttaaggtt      60
ttgcagaaga tggcgggtga taggctgaat tagcaagaga tagtgaggtt tactgggggt      120

```

```

tattgattca aa          132

```

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/CA 01/00245
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 G01N33/68		
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 G01N C07K C12N		
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) EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Biosis:AN=PREV199598004176: Huang J-C et al: "Quantitative analysis of epidermal growth factor receptor gene expression in endometriosis. XP002176156 see abstract	1-49
A	BERGQVIST A ET AL: "A COMPARISON OF CATHEPSIN D LEVELS IN ENDOMETRIOTIC TISSUE AND IN UTERINE ENDOMETRIUM" FERTILITY AND STERILITY, ELSEVIER SCIENCE INC, NEW YORK, NY, US, vol. 65, no. 6, June 1996 (1996-06), pages 1130-1134, XP000978984 ISSN: 0015-0282 the whole document	1-49
--- -/--		
<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 "E" earlier document but published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"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 "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 "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. "Z" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 19 June 2002		Date of mailing of the international search report 19 09 2002
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. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer OSBORNE, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/CA 01/00245

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Biosis: AN=PREV199598288484; Misao R et al: "Levels of sex hormone-binding globulin (SHBG) and corticosteriod-binding globulin (CBG) messenger ribonucleic acid (mRNAs) in ovarian endometriosis. XP002176157 see abstract ---	1-49
A	Biosis: AN= PREV199799745062: Kitawaki J et al: "Expression of aromatase cytochrome P450 protein and messenger ribonucleic acid in human endometriotic and adenomyotic tissues but not in normal endometrium. XP002176158 see abstract ---	1-49
A	WO 99 63116 A (SCHNEIDER PATRICK A ;REPROGEN INC (US); FRENCH CYNTHIA K (US); YAM) 9 December 1999 (1999-12-09) the whole document ---	1-49
A	WO 99 63115 A (SCHNEIDER PATRICK ;REPROGEN INC (US); FRENCH CYNTHIA K (US); YAMAM) 9 December 1999 (1999-12-09) the whole document ---	1-49
A	DE 198 24 230 A (STARZINSKI POWITZ ANNA) 2 December 1999 (1999-12-02) the whole document ---	1-49
A	WO 95 13821 A (UNIV PENNSYLVANIA) 26 May 1995 (1995-05-26) page 23 -page 27; claim 1 -----	1-49

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA 01/00245**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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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.:
1-49, 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.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: 1-49, all partially

Methods for the diagnosis/monitoring endometriosis by analysis of marker genes, probes and primers therefore, wherein the marker gene is given by SEQ ID NO 1, its arbitrary name DD1.

2. Claims: 1-49 all partially

Methods for the diagnosis/monitoring endometriosis by analysis of marker genes, probes and primers therefore, wherein the marker gene is given by SEQ ID NO 2, its arbitrary name DD2.

3. Claims: 1-49 all partially

Methods for the diagnosis/monitoring endometriosis by analysis of marker genes, probes and primers therefore, wherein the marker gene is given by SEQ ID NO 3, its arbitrary name DD3.

4. Claims: 1-49 all partially

Idem for the 38 distinct genes listed in table 1.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/CA 01/00245

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9963116	A	09-12-1999	AU 4230599	A 20-12-1999
			EP 1002136	A2 24-05-2000
			JP 2002517209	T 18-06-2002
			WO 9963116	A2 09-12-1999
WO 9963115	A	09-12-1999	AU 4230499	A 20-12-1999
			EP 1076723	A2 21-02-2001
			JP 2002517208	T 18-06-2002
			WO 9963115	A2 09-12-1999
			US 6387629	BI 14-05-2002
DE 19824230	A	02-12-1999	DE 19824230	A1 02-12-1999
			AU 4502499	A 20-12-1999
			CA 2329527	A1 09-12-1999
			CN 1307636	T 08-08-2001
			WO 9963079	A1 09-12-1999
			EP 1080195	A1 07-03-2001
			JP 2002517193	T 18-06-2002
WO 9513821	A	26-05-1995	US 5478725	A 26-12-1995
			AU 684582	B2 18-12-1997
			AU 1180995	A 06-06-1995
			CA 2176926	A1 26-05-1995
			EP 0734263	A1 02-10-1996
			JP 9505569	T 03-06-1997
			WO 9513821	A1 26-05-1995

フロントページの続き

(81)指定国 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, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ベルナール、モニック
カナダ国、ジェイ4ビー・5シー9、ケベック州、ブッシュビル、ディベールビル
813

(72)発明者 シェリー、エラーナ
カナダ国、エイチ4アール・2エー6、ケベック州、モントリオール、アレクシ・ニエロン 1225、アパルトマン 310

(72)発明者 ゴセリン、ディアース
カナダ国、ジェイ0エヌ・1ジー2、ケベック州、ポワント・カルメ、リュ・ドゥ・ラ・プラージュ 100

(72)発明者 ユーゴー、パトリス
カナダ国、エイチ7ダブリュ・3エス6、ケベック州、ラバル、サン・ドロテー、リュ・ピエール 820

(72)発明者 マレット、ブリジtte
カナダ国、エイチ2アール・2シー8、ケベック州、モントリオール、ドロール
7793

(72)発明者 ミロン、ピエール
カナダ国、エイチ7エル・4ダブリュ7、ケベック州、ラバル、ブルバール・デオワゾー 2474

(72)発明者 プリベ、シャルル
カナダ国、エイチ3エス・2エム6、ケベック州、モントリオール、ワイルダートン・クレセント 6190、アパートメント
8

(72)発明者 シャザン、カムラン
カナダ国、エイチ3イー・1ケー6、ケベック州、ベルダン、イレ・デ・ソワー、リュ・フェルラン 131

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA01 HA12
4B063 QA19 QQ08 QQ53 QQ79 QR08
QR32 QR42 QR55 QR62 QS25
QS34 QX01

专利名称(译)	子宫内膜异位症相关标志物及其用途		
公开(公告)号	JP2003531580A	公开(公告)日	2003-10-28
申请号	JP2001561767	申请日	2001-02-26
[标]申请(专利权)人(译)	主要三人组简Biosciences的纸张尺寸公司		
申请(专利权)人(译)	主要三人组简仕生物科学公司的IS		
[标]发明人	ババンソーイール ベルナールモニック シェリーエラーナ ゴセリンディアース ユーゴーパトリス マレットブリジtte ミロンピエール プリベシャルル シャザンカムラン		
发明人	ババン、ソーイール ベルナール、モニック シェリー、エラーナ ゴセリン、ディアース ユーゴー、パトリス マレット、ブリジtte ミロン、ピエール プリベ、シャルル シャザン、カムラン		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C12Q1/68 G01N37/00		
CPC分类号	A61P15/00 C12Q1/6883 C12Q2600/158		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N15/00.ZNA.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/HA12 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX01		
优先权	60/185063 2000-02-25 US 60/225745 2000-08-17 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

[问题] 本发明涉及子宫内膜异位症的标志物，与未患有子宫内膜异位症的妇女相比，其在子宫内膜异位症的妇女的子宫内膜细胞中的表达不同。本发明还涉及在女性受试者中确定子宫内膜异位的可能性的方法，在患有子宫内膜异位的女性中对子宫内膜异位进行分级的方法以及该疾病的治疗方法。本发明提供了用于进行上述方法的上述多核苷酸，探针，引物和试剂盒，它们与腹腔镜检查相比是快速的，非侵入性的并且具有显著降低的复杂性和成本。这也令人担忧。

出展者の所属項目		GERBANKINの所属項目				
序列番号	氏名	GERBANKINの遺伝子名	受付番号	種類	塩基数	日付
1	DD1		AL050039, AC001064	EST, EST	624	18-Feb-00
2	DD2				12423	27-May-00
3	DD3		AF04655	EST	5171	1-Sep-99
4	DD4		J01415	DNA	16559	18-Apr-00
5	DD5		AK82538	EST	109	29-Apr-99
6	DD6	ニッケル体異変誘導剤5ハロアミン(HAF5)	AF04162	mRNA	2072	24-Jan-00
7	DD7		AL04374	EST	107270	29-Apr-00
8	DD8		A657384	EST	600	14-May-99
9	DD9		AK53811	EST	467	9-Sep-97
10	DD10		AB00794	EST	2501	7-Mar-00
11	DD11	RNAヘリナーゼ	AB22849	mRNA	7037	18-Feb-00
12	DD12	MAPK阻害薬	AF04342	DNA	320	19-Jul-97
13	DD13	MAPK阻害薬	J01415	DNA	16559	18-Apr-00
14	DD14	MAPK阻害薬	AF04487	DNA	1041	6-May-99
15	DD15	MAPK阻害薬	J01415	DNA	16559	18-Apr-00
16	DD16	チロシリンキナーゼ(CCK)	AB01706	DNA	545	26-Sep-98
17	DD17	転写因子フォークホロシチン/シリン/チリン(FKHL)	AF03466	mRNA	5123	19-Feb-98
18	DD18		U1CC1	mRNA	2072	1-Jul-00