

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-23090

(P2017-23090A)

(43) 公開日 平成29年2月2日(2017.2.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 Z N A A	4 B O 6 3
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 M	

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2015-147366 (P2015-147366)	(71) 出願人	504150450 国立大学法人神戸大学 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1
(22) 出願日	平成27年7月27日 (2015.7.27)	(74) 代理人	110000844 特許業務法人 クレイア特許事務所
		(72) 発明者	山本 和宏 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 国立大 学法人神戸大学内
		(72) 発明者	平井 みどり 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 国立大 学法人神戸大学内

最終頁に続く

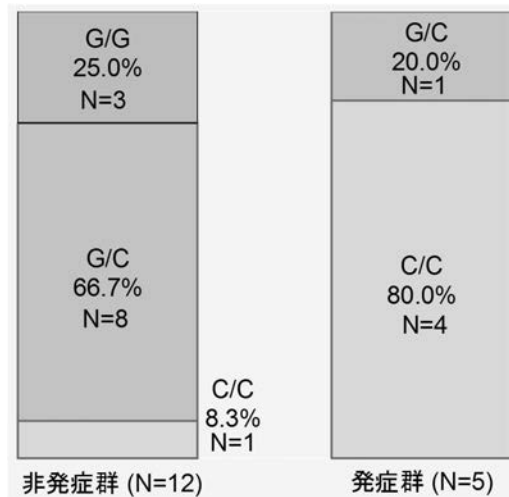
(54) 【発明の名称】 薬剤性間質性肺炎の易発症性判定用マーカーを用いた薬剤性間質性肺炎の易発症性を判定する方法およびキット

(57) 【要約】

【課題】 薬剤性間質性肺炎の発症リスクを判定する副作用マーカーを用いた薬剤性間質性肺炎の発症リスクを判定する方法およびキットを提供する。

【解決手段】 本発明は薬剤性間質性肺炎易発症性を判定する方法は、以下の(i)から(iii)の工程を含む。(i) 癌疾病に罹患した患者から取得された検体について、STAT3 遺伝子を含むDNA 試料を調製する工程；(ii) DNA 試料についてDNA 配列解析を行うことによって、STAT3 タンパク質に関連する機能的遺伝子多型が、STAT3 タンパク質の活性化抑制または発現量減少を誘発する遺伝子型であるか否かを決定する工程；および(iii) 当該遺伝子型が存在すると決定された場合に、前記癌疾病に対する抗癌剤によって薬剤性間質性肺炎を発症する可能性が高いと判定する工程。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (i) から (iii) の工程を含む、薬剤性間質性肺炎の易発症性を判定する方法；
 (i) 癌疾病に罹患した患者から取得された検体について、S T A T 3 遺伝子を含む D N A 試料を調製する工程、
 (ii) 前記 D N A 試料について D N A 配列解析を行うことによって、S T A T 3 タンパク質に関連する機能的遺伝子多型が、S T A T 3 タンパク質の活性化抑制または発現量減少を誘発する遺伝子型であるか否かを決定する工程、および
 (iii) 前記遺伝子型であると決定された場合に、前記癌疾病に対する抗癌剤によって薬物性間質性肺炎を発症する可能性が高いと判定する工程。

10

【請求項 2】

S T A T 3 タンパク質に関連する機能的遺伝子多型が、S T A T 3 遺伝子中に存在する配列番号 1 で示されるヌクレオチド配列の 2 6 番目の塩基 (リファレンス S N P I D 番号: r s 4 7 9 6 7 9 3 で示される機能的遺伝子多型の部位)、および前記塩基と連鎖不均衡の関係にある機能的遺伝子多型からなる群から選ばれる、請求項 1 に記載の薬物性間質性肺炎の易発症性を判定する方法。

【請求項 3】

前記遺伝子型が以下の (a) から (e) からなる群から選ばれる、請求項 1 または 2 に記載の薬剤性間質性肺炎の易発症性を判定する方法；

(a) S T A T 3 遺伝子中に存在する配列番号 1 で示されるヌクレオチド配列の 2 6 番目の塩基 (リファレンス S N P I D 番号: r s 4 7 9 6 7 9 3 で示される機能的遺伝子多型の部位) における C / C 遺伝子型、

20

(b) S T A T 3 遺伝子中に存在する配列番号 2 で示されるヌクレオチド配列の 2 6 番目の塩基 (リファレンス S N P I D 番号: r s 7 4 4 1 6 6 で示される機能的遺伝子多型の部位) における T / T 遺伝子型、

(c) S T A T 3 遺伝子中に存在する配列番号 3 で示されるヌクレオチド配列の 2 6 番目の塩基 (リファレンス S N P I D 番号: r s 9 8 9 1 1 1 9 で示される機能的遺伝子多型の部位) における A / A 遺伝子型、

(d) S T A T 3 遺伝子中に存在する配列番号 4 で示されるヌクレオチド配列の 2 6 番目の塩基 (リファレンス S N P I D 番号: r s 1 9 0 5 3 4 1 で示される機能的遺伝子多型の部位) における C / C 遺伝子型、および

30

(e) S T A T 3 遺伝子中に存在する配列番号 5 で示されるヌクレオチド配列の 2 6 番目の塩基 (リファレンス S N P I D 番号: r s 2 3 0 6 5 8 1 で示される機能的遺伝子多型の部位) における C / C 遺伝子型。

【請求項 4】

抗癌剤が、ラパマイシン標的タンパク質阻害剤、上皮成長因子受容体阻害剤、多標的キナーゼ阻害剤、からなる群から選ばれる分子標的治療薬、および / または、プログラム細胞死受容体 - 1 抗体、プログラム細胞死リガンド - 1 抗体、および細胞傷害性 T リンパ球抗原 - 4 抗体からなる群から選ばれる免疫チェックポイント阻害剤である、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の薬剤性間質性肺炎の易発症性を判定する方法。

40

【請求項 5】

前記機能的遺伝子多型の検出が、以下の (A) から (L) からなる群から選ばれるオリゴヌクレオチドを用いて行われる、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の薬剤性間質性肺炎の易発症性を判定する方法；

(A) S T A T 3 遺伝子中に存在する配列番号 1 で示されるヌクレオチド配列の 2 6 番目の塩基 (リファレンス S N P I D 番号: r s 4 7 9 6 7 9 3 で示される部位) における遺伝子型が C / C である機能的遺伝子多型を含む 1 5 m e r 以上の連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(B) S T A T 3 遺伝子中に存在する配列番号 2 で示されるヌクレオチド配列の 2 6 番目の塩基 (リファレンス S N P I D 番号: r s 7 4 4 1 6 6 で示される部位) における

50

遺伝子型が T / T である機能的遺伝子多型を含む 15 mer 以上の連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(C) STAT3 遺伝子中に存在する配列番号 3 で示されるヌクレオチド配列の 26 番目の塩基 (リファレンス SNP ID 番号: rs9891119 で示される部位) における遺伝子型が A / A である機能的遺伝子多型を含む 15 mer 以上の連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(D) STAT3 遺伝子中に存在する配列番号 4 で示されるヌクレオチド配列の 26 番目の塩基 (リファレンス SNP ID 番号: rs1905341 で示される部位) における遺伝子型が C / C である機能的遺伝子多型を含む 15 mer 以上の連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(E) STAT3 遺伝子中に存在する配列番号 5 で示されるヌクレオチド配列の 26 番目の塩基 (リファレンス SNP ID 番号: rs2306581 で示される部位) における遺伝子型が C / C である機能的遺伝子多型を含む 15 mer 以上の連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(F) STAT3 遺伝子中に存在する配列番号 1 で示されるヌクレオチド配列の 26 番目の塩基 (リファレンス SNP ID 番号: rs4796793 で示される部位) の一塩基上流の塩基から上流側へ 15 以上連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(G) STAT3 遺伝子中に存在する配列番号 2 で示されるヌクレオチド配列の 26 番目の塩基 (リファレンス SNP ID 番号: rs744166 で示される部位) の一塩基上流の塩基から上流側へ 15 以上連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(H) STAT3 遺伝子中に存在する配列番号 3 で示されるヌクレオチド配列の 26 番目の塩基 (リファレンス SNP ID 番号: rs9891119 で示される部位) の一塩基上流の塩基から上流側へ 15 以上連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(I) STAT3 遺伝子中に存在する配列番号 4 で示されるヌクレオチド配列の 26 番目の塩基 (リファレンス SNP ID 番号: rs1905341 で示される部位) の一塩基上流の塩基から上流側へ 15 以上連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(J) STAT3 遺伝子中に存在する配列番号 5 で示されるヌクレオチド配列の 26 番目の塩基 (リファレンス SNP ID 番号: rs2306581 で示される部位) 一塩基上流の塩基から上流側へ 15 以上連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(K) 前記 (A) から (J) のオリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチド、および

(L) 前記 (A) から (K) のオリゴヌクレオチドにおいて前記部位以外の 1 個以上の塩基が、欠失、置換および / または付加され、かつ前記 (A) から (K) のオリゴヌクレオチドの相補配列からなるオリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする活性を有するオリゴヌクレオチド。

【請求項 6】

前記機能的遺伝子多型の検出が、ダイレクトシーケンス法、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド (ASO) ハイブリダイゼーション法、PCR - 一本鎖 DNA 高次構造多型解析 (SSCP) 法、制限酵素切断断片長多型 (RFLP) 法、定量的リアルタイム PCR 検出法、インベータ法、TDI (Template-directed Dye-terminator Incorporation) 法、ARMS (Amplification Refracting Mutation System) 法、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法、RNA 分解酵素 (RNase A) 切断法、化学切断法、DOL (Dye-labeled Oligonucleotide Ligation) 法、および質量分析を用いた遺伝子多型検出法からなる群から選ばれる方法により行われる、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の薬剤性間質性肺炎の易発症性を判定する方法。

【請求項 7】

以下の (A) から (L) からなる群から選ばれるオリゴヌクレオチドを含む、薬剤性間質性肺炎の易発症性判定用キット；

(A) STAT3 遺伝子中に存在する配列番号 1 で示されるヌクレオチド配列の 26 番目の塩基 (リファレンス SNP ID 番号: rs4796793 で示される部位) にお

10

20

30

40

50

る遺伝子型が C / C である機能的遺伝子多型を含む 15 mer 以上の連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(B) S T A T 3 遺伝子中に存在する配列番号 2 で示されるヌクレオチド配列の 26 番目の塩基 (リファレンス S N P I D 番号 : r s 7 4 4 1 6 6 で示される部位) における遺伝子型が T / T である機能的遺伝子多型を含む 15 mer 以上の連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(C) S T A T 3 遺伝子中に存在する配列番号 3 で示されるヌクレオチド配列の 26 番目の塩基 (リファレンス S N P I D 番号 : r s 9 8 9 1 1 1 9 で示される部位) における遺伝子型が A / A である機能的遺伝子多型を含む 15 mer 以上の連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(D) S T A T 3 遺伝子中に存在する配列番号 4 で示されるヌクレオチド配列の 26 番目の塩基 (リファレンス S N P I D 番号 : r s 1 9 0 5 3 4 1 で示される部位) における遺伝子型が C / C である機能的遺伝子多型を含む 15 mer 以上の連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(E) S T A T 3 遺伝子中に存在する配列番号 5 で示されるヌクレオチド配列の 26 番目の塩基 (リファレンス S N P I D 番号 : r s 2 3 0 6 5 8 1 で示される部位) における遺伝子型が C / C である機能的遺伝子多型を含む 15 mer 以上の連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(F) S T A T 3 遺伝子中に存在する配列番号 1 で示されるヌクレオチド配列の 26 番目の塩基 (リファレンス S N P I D 番号 : r s 4 7 9 6 7 9 3 で示される部位) の一塩基上流の塩基から上流側へ 15 以上連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(G) S T A T 3 遺伝子中に存在する配列番号 2 で示されるヌクレオチド配列の 26 番目の塩基 (リファレンス S N P I D 番号 : r s 7 4 4 1 6 6 で示される部位) の一塩基上流の塩基から上流側へ 15 以上連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(H) S T A T 3 遺伝子中に存在する配列番号 3 で示されるヌクレオチド配列の 26 番目の塩基 (リファレンス S N P I D 番号 : r s 9 8 9 1 1 1 9 で示される部位) の一塩基上流の塩基から上流側へ 15 以上連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(I) S T A T 3 遺伝子中に存在する配列番号 4 で示されるヌクレオチド配列の 26 番目の塩基 (リファレンス S N P I D 番号 : r s 1 9 0 5 3 4 1 で示される部位) の一塩基上流の塩基から上流側へ 15 以上連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(J) S T A T 3 遺伝子中に存在する配列番号 5 で示されるヌクレオチド配列の 26 番目の塩基 (リファレンス S N P I D 番号 : r s 2 3 0 6 5 8 1 で示される部位) 一塩基上流の塩基から上流側へ 15 以上連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(K) 上記 (A) から (J) のオリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチド、および

(L) 前記 (A) から (K) のオリゴヌクレオチドにおいて前記部位以外の 1 個以上の塩基が、欠失、置換および / または付加され、かつ前記 (A) から (K) のオリゴヌクレオチドの相補配列からなるオリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする活性を有するオリゴヌクレオチド。

【請求項 8】

前記 (A) から (L) からなる群から選ばれるオリゴヌクレオチドが支持体に固定されている、請求項 7 に記載の薬剤性間質性肺炎の易発症性判定用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗癌剤によって副作用として発症する間質性肺炎のリスク管理に関する。より具体的には、本発明は、薬剤性間質性肺炎の易発症性判定用マーカーを用いた、薬剤性間質性肺炎の易発症性を判定する方法およびキットに関する。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0002】

癌化学療法は、分子標的治療薬の登場により飛躍的に進歩した。分子標的治療薬の適応疾患は、大腸癌、血液腫瘍、腎細胞癌、肝細胞癌などに広がり、今後も更なる発展が期待されている。しかしながら、当初副作用が少ないと考えられていた分子標的治療薬においても、臨床上、治療に影響を及ぼす重大な副作用が認められてきた。

【0003】

そのような副作用のうち特に肺障害については、ゲフィチニブによる薬剤性肺障害の報告により社会的にも問題視されて10年以上が経過している。未だに多くの分子標的治療薬において薬剤性肺障害が共通して発症し、治療の中断の要因となるのみならず、その症状が致命的となる場合もある。さらに近年では、あらたな分子標的治療薬の開発に伴い、薬剤性肺障害は経年的に増加している。特に日本人は薬剤性肺障害を発症しやすい人種として独自の安全性監視体制がとられている。薬剤性肺障害のうち最も多くみられる病変は、肺胞-間質領域の病変であり、薬剤性間質性肺炎と呼ばれている。

10

【0004】

一方、シグナル伝達兼転写活性化因子(S T A T 3)遺伝子は、たとえば、Wendt MK et al. JAKSTAT. 3(1):e28975(非特許文献1)のように、癌細胞において上皮間葉転換(EMT)を正に制御する遺伝子として多くの報告がされている。このため、S T A T 3タンパク質が癌の増殖を正に制御し、その活性化により転移性および線維化が亢進されることがin vitroで多数報告されている。

20

【0005】

S T A T 3遺伝子には複数の一塩基多型(SNP)が知られている。そのうち、リファレンスSNP ID番号:rs4796793で示される遺伝子多型については、Ito N, et al. J Clin Oncol. 25(19):2785-91, 2007(非特許文献2)に報告されているように、その遺伝子型によってS T A T 3のmRNAの発現量が異なり、中でも遺伝子型がC/Cであるものが最も発現量が少ない傾向にある。さらに、国際公開第2006/046505号(特許文献1)には、当該rs4796793で示される遺伝子多型のC/C遺伝子型を含め、S T A T 3の特定の遺伝子多型の特定の遺伝子型が、腎細胞癌のインターフェロン治療によって腫瘍が縮小する可能性が高いことを予測するマーカーとして利用されることが記載されている。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】国際公開第2006/046505号

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Wendt MK et al. JAKSTAT. 3(1):e28975

【非特許文献2】Ito N, et al. J Clin Oncol. 25(19):2785-91, 2007

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

40

【0008】

薬剤性間質性肺炎発症の詳細なメカニズムは知られていない。薬剤性間質性肺炎は、発症頻度が高く且つその発症が致命的ともなりうる臨床上重要な副作用として警戒されているにも関わらず、臨床所見および画像所見など症状に応じた事後的な処置がなされるにとどまっている。このように、分子標的治療薬による間質性肺炎はその発症リスクを予測することができないため、予防法の徹底および投与量の減量などの投与前に講じる手段を考慮すべき対象を、前もって判断することができない。

【0009】

また、S T A T 3遺伝子多型と薬剤性間質性肺炎の発症リスクとの関連について報告された例はない。

50

【 0 0 1 0 】

本発明の目的は、薬剤性間質性肺炎の発症リスクを判定する副作用マーカーを用いた、薬剤性間質性肺炎の発症リスクを判定する方法およびキットを提供することにある。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 1 】

S T A T 3 タンパク質がその活性化により転移性および線維化が亢進されることが *in vitro* で多数報告されているにも関わらず、本発明者は、肺組織においては S T A T 3 タンパク質の活性を阻害すると線維化が亢進されるという逆転現象を *in vitro* で発見した。さらに本発明者は、遺伝子多型解析による薬剤性間質性肺炎発症のレトロスペクティブ調査によっても、この現象を裏付ける知見を得た。具体的には、S T A T 3 タンパク質の活性抑制に関連する遺伝子多型の保有者群で薬剤性間質性肺炎発症率が有意に高くなることを確認した。これによって、本発明者は、当該遺伝子多型が薬剤性間質性肺炎のリスク予測を可能にすることを見出した。本発明は、このような知見に基づいて完成されたものである。

10

本発明は、以下の発明を包含する。

【 0 0 1 2 】

(1)

本発明は薬剤性間質性肺炎の易発症性を判定する方法であり、以下の (i) から (iii) の工程を含む。

(i) 癌疾病に罹患した患者から取得された検体について、S T A T 3 遺伝子を含む D N A 試料を調製する工程、

20

(ii) 前記 D N A 試料について D N A 配列解析を行うことによって、S T A T 3 タンパク質に関連する機能的遺伝子多型が、S T A T 3 タンパク質の活性化抑制または発現量減少を誘発する遺伝子型であるか否かを決定する工程、および

(iii) 前記遺伝子型であると決定された場合に、前記癌疾病に対する抗癌剤によって薬物性間質性肺炎を発症する可能性が高いと判定する工程。

【 0 0 1 3 】

(2)

本発明の方法においては、S T A T 3 タンパク質に関連する機能的遺伝子多型が、S T A T 3 遺伝子中に存在する配列番号 1 で示されるヌクレオチド配列の 2 6 番目の塩基 (リファレンス S N P I D 番号 : r s 4 7 9 6 7 9 3 で示される機能的遺伝子多型の部位) 、および前記塩基と連鎖不均衡の関係にある機能的遺伝子多型からなる群から選ばれてよい。

30

【 0 0 1 4 】

(3)

本発明の方法においては、S T A T 3 タンパク質の活性化抑制または発現量減少を誘発する遺伝子型が以下の (a) から (e) からなる群から選ばれてよい。

(a) S T A T 3 遺伝子中に存在する配列番号 1 で示されるヌクレオチド配列の 2 6 番目の塩基 (リファレンス S N P I D 番号 : r s 4 7 9 6 7 9 3 で示される機能的遺伝子多型の部位) における C / C 遺伝子型、

40

(b) S T A T 3 遺伝子中に存在する配列番号 2 で示されるヌクレオチド配列の 2 6 番目の塩基 (リファレンス S N P I D 番号 : r s 7 4 4 1 6 6 で示される機能的遺伝子多型の部位) における T / T 遺伝子型、

(c) S T A T 3 遺伝子中に存在する配列番号 3 で示されるヌクレオチド配列の 2 6 番目の塩基 (リファレンス S N P I D 番号 : r s 9 8 9 1 1 1 9 で示される機能的遺伝子多型の部位) における A / A 遺伝子型、

(d) S T A T 3 遺伝子中に存在する配列番号 4 で示されるヌクレオチド配列の 2 6 番目の塩基 (リファレンス S N P I D 番号 : r s 1 9 0 5 3 4 1 で示される機能的遺伝子多型の部位) における C / C 遺伝子型、および

(e) S T A T 3 遺伝子中に存在する配列番号 5 で示されるヌクレオチド配列の 2 6 番

50

目の塩基（リファレンスSNP ID番号：rs2306581で示される機能的遺伝子多型の部位）におけるC/C遺伝子型。

【0015】

(4)

本発明の方法においては、抗癌剤が、分子標的治療薬が、ラパマイシン標的タンパク質阻害剤（mTOR阻害剤）、上皮成長因子受容体阻害剤（EGFR阻害剤）、および多標的キナーゼ阻害剤（MK阻害剤）からなる群から選ばれる分子標的治療薬、および/または、プログラム細胞死受容体-1（PD-1）抗体、プログラム細胞死リガンド-1（PDL-1）抗体、および細胞傷害性Tリンパ球抗原-4（CTLA-4）抗体からなる群から選ばれる免疫チェックポイント阻害剤であってよい。

10

【0016】

(5)

本発明の方法においては、機能的遺伝子多型の検出が、以下の(A)から(L)からなる群から選ばれるオリゴヌクレオチドを用いて行われてよい。

(A) STAT3遺伝子中に存在する配列番号1で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基（リファレンスSNP ID番号：rs4796793で示される部位）における遺伝子型がC/Cである機能的遺伝子多型を含む15mer以上の連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(B) STAT3遺伝子中に存在する配列番号2で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基（リファレンスSNP ID番号：rs744166で示される部位）における遺伝子型がT/Tである機能的遺伝子多型を含む15mer以上の連続する配列のオリゴヌクレオチド、

20

(C) STAT3遺伝子中に存在する配列番号3で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基（リファレンスSNP ID番号：rs9891119で示される部位）における遺伝子型がA/Aである機能的遺伝子多型を含む15mer以上の連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(D) STAT3遺伝子中に存在する配列番号4で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基（リファレンスSNP ID番号：rs1905341で示される部位）における遺伝子型がC/Cである機能的遺伝子多型を含む15mer以上の連続する配列のオリゴヌクレオチド、

30

(E) STAT3遺伝子中に存在する配列番号5で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基（リファレンスSNP ID番号：rs2306581で示される部位）における遺伝子型がC/Cである機能的遺伝子多型を含む15mer以上の連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(F) STAT3遺伝子中に存在する配列番号1で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基（リファレンスSNP ID番号：rs4796793で示される部位）の一塩基上流の塩基から上流側へ15以上連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(G) STAT3遺伝子中に存在する配列番号2で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基（リファレンスSNP ID番号：rs744166で示される部位）の一塩基上流の塩基から上流側へ15以上連続する配列のオリゴヌクレオチド、

40

(H) STAT3遺伝子中に存在する配列番号3で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基（リファレンスSNP ID番号：rs9891119で示される部位）の一塩基上流の塩基から上流側へ15以上連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(I) STAT3遺伝子中に存在する配列番号4で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基（リファレンスSNP ID番号：rs1905341で示される部位）の一塩基上流の塩基から上流側へ15以上連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(J) STAT3遺伝子中に存在する配列番号5で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基（リファレンスSNP ID番号：rs2306581で示される部位）一塩基上流の塩基から上流側へ15以上連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(K) 前記(A)から(J)のオリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチド、お

50

よび

(L) 前記(A)から(K)のオリゴヌクレオチドにおいて前記部位以外の1個以上の塩基が、欠失、置換および/または付加され、かつ前記(A)から(K)のオリゴヌクレオチドの相補配列からなるオリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする活性を有するオリゴヌクレオチド。

【0017】

(6)

本発明の方法においては、機能的遺伝子多型の検出が、ダイレクトシーケンス法、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド(A SO)ハイブリダイゼーション法、PCR-一本鎖DNA高次構造多型解析(SSCP)法、制限酵素切断断片長多型(RFLP)法、定量的リアルタイムPCR検出法、インベータ法、TDI(Template-directed Dye-terminator Incorporation)法、ARMS(Amplification Refracting Mutation System)法、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)法、RNA分解酵素(RNase A)切断法、化学切断法、DOL(Dye-labeled Oligonucleotide Ligation)法、および質量分析を用いた遺伝子多型検出法からなる群から選ばれる方法により行われてよい。

10

【0018】

(7)

本発明の薬剤性間質性肺炎の易発症性判定用キットは、以下の(A)から(L)からなる群から選ばれるオリゴヌクレオチドを含む。

(A) STAT3 遺伝子中に存在する配列番号1で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基(リファレンスSNP ID番号: rs4796793で示される部位)における遺伝子型がC/Cである機能的遺伝子多型を含む15mer以上の連続する配列のオリゴヌクレオチド、

20

(B) STAT3 遺伝子中に存在する配列番号2で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基(リファレンスSNP ID番号: rs744166で示される部位)における遺伝子型がT/Tである機能的遺伝子多型を含む15mer以上の連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(C) STAT3 遺伝子中に存在する配列番号3で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基(リファレンスSNP ID番号: rs9891119で示される部位)における遺伝子型がA/Aである機能的遺伝子多型を含む15mer以上の連続する配列のオリゴヌクレオチド、

30

(D) STAT3 遺伝子中に存在する配列番号4で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基(リファレンスSNP ID番号: rs1905341で示される部位)における遺伝子型がC/Cである機能的遺伝子多型を含む15mer以上の連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(E) STAT3 遺伝子中に存在する配列番号5で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基(リファレンスSNP ID番号: rs2306581で示される部位)における遺伝子型がC/Cである機能的遺伝子多型を含む15mer以上の連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(F) STAT3 遺伝子中に存在する配列番号1で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基(リファレンスSNP ID番号: rs4796793で示される部位)の一塩基上流の塩基から上流側へ15以上連続する配列のオリゴヌクレオチド、

40

(G) STAT3 遺伝子中に存在する配列番号2で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基(リファレンスSNP ID番号: rs744166で示される部位)の一塩基上流の塩基から上流側へ15以上連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(H) STAT3 遺伝子中に存在する配列番号3で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基(リファレンスSNP ID番号: rs9891119で示される部位)の一塩基上流の塩基から上流側へ15以上連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(I) STAT3 遺伝子中に存在する配列番号4で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基(リファレンスSNP ID番号: rs1905341で示される部位)の一塩

50

基上流の塩基から上流側へ15以上連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(J) STAT3遺伝子中に存在する配列番号5で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基(リファレンスSNP ID番号: rs2306581で示される部位)ー塩基上流の塩基から上流側へ15以上連続する配列のオリゴヌクレオチド、

(K)上記(A)から(J)のオリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチド、および

(L)前記(A)から(K)のオリゴヌクレオチドにおいて前記部位以外の1個以上の塩基が、欠失、置換および/または付加され、かつ前記(A)から(K)のオリゴヌクレオチドの相補配列からなるオリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする活性を有するオリゴヌクレオチド。

【0019】

(8)

本発明のキットにおいては、(A)から(L)からなる群から選ばれるオリゴヌクレオチドが支持体に固定されていてよい。

【発明の効果】

【0020】

本発明によると、薬剤性間質性肺炎の発症リスクを判定する副作用マーカーを用いた、薬剤性間質性肺炎の発症リスクを判定する方法およびキットが提供される。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】テムシロリムスを使用した経験を有する患者の間質性肺炎発症についてのレトロスペクティブ統計解析結果を示す。

【図2】ヒト肺胞上皮基底細胞(A549細胞)におけるSTAT3阻害剤処置のシグナル因子の変動およびEMTマーカーの発現変動をWestern blot法により解析した結果を示す。

【図3】A549細胞のSTAT3過剰発現系におけるEMTマーカーの発現変動をWestern blot法により解析した結果を示す。

【図4】A549細胞およびエベロリムス継続曝露A549細胞(A549/EV細胞)を上皮系マーカー(E-cadherin)および間葉系マーカー(F-Actin)にて蛍光免疫染色した蛍光顕微鏡画像である。

【図5】エベロリムス継続曝露A549細胞(A549/EV細胞)におけるEMTマーカーをwestern blot法にて比較した結果である。

【図6】ラパマイシン継続曝露A549細胞(A549/Rap細胞)におけるEMTマーカーをwestern blot法にて比較した結果である。

【発明を実施するための形態】

【0022】

[1. 薬剤性間質性肺炎易発症性判定用マーカー]

本発明の薬剤性間質性肺炎易発症性判定用マーカーは、薬剤性間質性肺炎の易発症性に関する遺伝的素因の目印である。薬剤性間質性肺炎の発症とは、肺線維症(結合組織による肺組織の置換)による低酸素血症および画像所見で線維化を認めることの少なくともいずれかによって定義づけられる。

【0023】

本発明の薬剤性間質性肺炎易発症性判定用マーカーは、薬剤性間質性肺炎を有意に発症し易いか否かを判定するものである。本発明の薬剤性間質性肺炎易発症性判定用マーカーは、STAT3タンパク質に関連する機能的遺伝子多型であって、薬剤性間質性肺炎の発症性を高める特定の遺伝子型である。

【0024】

「STAT3タンパク質に関連する機能的遺伝子多型」とは、STAT3タンパク質を質的または量的に影響する遺伝子多型を意味する。この遺伝子多型は、STAT3遺伝子中に存在する一塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP)である。

【0025】

10

20

30

40

50

本明細書においては、「遺伝子」には2本鎖DNAおよびそれを構成する各1本鎖DNA（センス鎖およびアンチセンス鎖）も包含される。したがって、STAT3遺伝子は、ヒトゲノムDNAを含む2本鎖DNA、cDNAを含む1本鎖DNA（センス鎖）、当該センス鎖と相補的な配列を有する1本鎖DNA、およびそれらの断片を含む。またSTAT3遺伝子は、調節領域、コード領域、エクソンおよびイントロンを含むことができる。

【0026】

一塩基多型（single nucleotide polymorphism：SNP）とは、一般的には、遺伝子の塩基配列が1カ所だけ異なる状態およびその部位をいう。また、多型とは、一般的には、母集団中1%以上の頻度で存在する2以上の対立遺伝子（アレル）をいう。本発明において、SNPは、好ましくは、当業者が自由に利用可能な公開されたデータベースに登録されたSNPであって、そのリファレンス番号から特定できるSNPである。このようなデータベースとしては、例えば、米国国立生物工学情報センター（NCBI）のSNPデータベースが挙げられる。本発明におけるSNPは、上記NCBIのSNPデータベースのリファレンス番号であるrs番号により特定できる。以下、本明細書においては、特定のSNPを、このNCBIのSNPデータベースのrs番号で表示する。

10

【0027】

薬剤性間質性肺炎の発症性を高める特定の遺伝子型は、STAT3タンパク質の活性化抑制または発現量減少を誘発する遺伝子型である。「遺伝子型」とは、特定の遺伝子多型部位における遺伝子座の対立遺伝子の状態を示す。

このような特定の遺伝子型としては、たとえば、以下のホモ接合遺伝子型（a）が挙げられる。

20

【0028】

（a）STAT3遺伝子中に存在する配列番号1で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基（リファレンスSNP ID番号：rs4796793で示される遺伝子多型の部位）におけるC/C遺伝子型

【0029】

さらに、特定の遺伝子型の他の例としては、上記（a）における遺伝子多型と連鎖不均衡の関係にある他の任意の遺伝子多型の遺伝子型が挙げられる。「連鎖不均衡」とは、2つの対立遺伝子が同時に遺伝する頻度が、各対立遺伝子の個別の頻度の積により予測される頻度より高いことをいう。具体的には、連鎖不均衡の関係にある他の遺伝子多型としては、連鎖不平衡係数D'が0.9以上の連鎖不平衡状態にある遺伝子多型である。連鎖不平衡係数D'は、2つのSNPについて第一のSNPの各アレルを（A，a）、第二のSNPの各アレルを（B，b）とし、4つのハプロタイプ（AB，Ab，aB，ab）の各頻度をPAB，PAb，PaB，Pabとすると、下記式により得られる。

30

$$D' = (PABPab - PAbPaB) / \text{Min}[(PAB + PaB)(PaB + Pab), (PAB + PAb)(PAb + Pab)]$$

[式中、Min[(PAB + PaB)(PaB + Pab), (PAB + PAb)(PAb + Pab)]は、(PAB + PaB)(PaB + Pab)と(PAB + PAb)(PAb + Pab)とのうち、値の小さい方をとることを意味する。]

好ましくは、D'が0.95以上、より好ましくは0.99以上、最も好ましくは1.00である遺伝子多型が挙げられる。

40

【0030】

このような他の遺伝子多型の遺伝子型として、以下のホモ接合遺伝子型（b）、（c）（d）、および（e）などが挙げられる。

【0031】

（b）STAT3遺伝子中に存在する配列番号2で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基（リファレンスSNP ID番号：rs744166で示される遺伝子多型の部位）におけるT/T遺伝子型

（c）STAT3遺伝子中に存在する配列番号3で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基（リファレンスSNP ID番号：rs9891119で示される遺伝子多型の部

50

位)におけるA/A遺伝子型

(d)STAT3遺伝子中に存在する配列番号4で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基(リファレンスSNP ID番号:rs1905341で示される遺伝子多型の部位)におけるC/C遺伝子型

(e)STAT3遺伝子中に存在する配列番号5で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基(リファレンスSNP ID番号:rs2306581で示される遺伝子多型の部位)におけるC/C遺伝子型

【0032】

本発明の薬剤性間質性肺炎易発性判定用マーカーによってリスクが判断される間質性肺炎は、分子標的治療薬および/または免疫チェックポイント阻害剤に起因するものである。

10

分子標的治療薬は一般的にSTAT3の活性を変化させる。具体的には、STAT3シグナル経路においてSTAT3の上流に存在する因子を制御する。このような分子標的治療薬の例として、mTOR、EGFR、ならびに、ERKおよびJNKといった因子を制御するmTOR阻害剤、EGFR阻害剤、およびMK阻害剤が挙げられる。

免疫チェックポイント阻害剤は、癌細胞に過剰に発現している抗原またはそれを認識するT細胞側の抗原に対する抗体製剤であって、STAT3はこれら抗原の発現制御因子の1つである。このような免疫チェックポイント阻害剤の例として、PD-1抗体、PDL-1抗体、およびCTLA-4抗体が挙げられる。

【0033】

20

[2. 薬剤性間質性肺炎易発症性を判定する方法]

本発明の薬剤性間質性肺炎易発症性を判定する方法においては、STAT3タンパク質に関連する機能的遺伝子多型が、STAT3タンパク質の活性化抑制または発現量減少を誘発する遺伝子型であることを、薬剤性間質性肺炎の易発症性の指標とする。具体的には、(i)から(iii)の工程を含む。

【0034】

(i)STAT3遺伝子を含むDNA試料の調製工程

本工程では、癌疾病に罹患した患者から取得された検体について、STAT3遺伝子を含むDNA試料を調製する。

当該患者は、罹患している癌疾病に対する抗癌剤治療の実施を検討している者であってよい。抗癌剤治療の実施経験の有無は問わないが、好ましくは、当該患者は、罹患している癌疾病に対する抗癌剤治療を一度も実施されることがない者である。

30

【0035】

患者が罹患している癌疾病の種類は問わない。たとえば、腎細胞癌、乳癌、膵癌、肺癌、大腸癌、胃癌、肝臓癌などが挙げられる。

【0036】

STAT3遺伝子を含むDNA試料は、癌疾病に罹患した患者に由来する生体材料から調製される。生体材料としては、各種細胞(たとえば、血液、末梢血白血球、皮膚細胞、粘膜細胞など)、組織(肺、肝臓、腎臓、副腎、脳、子宮など)、およびこれらに由来する培養細胞が挙げられる。

40

【0037】

STAT3遺伝子を含むDNA試料は、STAT3タンパク質に関連する機能的遺伝子多型を含む。

STAT3遺伝子を含むDNA試料の具体的態様としては、ゲノムDNAであってよい。生体材料からのゲノムDNA抽出法および精製法は特に限定されず、当業者が適宜公知の方法から選択することができる。

【0038】

(ii)DNA配列解析工程

本工程では、STAT3遺伝子を含むDNA試料についてのDNA配列解析によって、STAT3タンパク質に関連する機能的遺伝子多型のSNPタイピングを行う。SNPタ

50

イピングにおいては、ゲノム上の位置が明らかとなっているSNPの部位がどの塩基であるかを同定して、STAT3タンパク質に関連する機能的遺伝子多型が、STAT3タンパク質の活性化抑制または発現量減少を誘発する遺伝子型であるか否かを決定する。

【0039】

本発明の薬剤性間質性肺炎易発症性判定用マーカーは、既にSNPの部位およびその周辺の配列が決定されているので、当業者であれば、例えば、データベースの配列に基づき、適宜、SNPのタイピングを行うことができる。

【0040】

本発明においては、SNPのタイピングは、目的のSNPに関するデータベースに記載の塩基配列、その部分配列、およびそれらの相補配列からなるオリゴヌクレオチド、なら
10
びに、当該オリゴヌクレオチドにおいて当該SNPの部位以外の1個以上の塩基が、欠失、置換および/または付加され、かつ当該オリゴヌクレオチドの相補配列からなるオリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする活性を有するオリゴヌクレオチドからなる群より選択されるオリゴヌクレオチドを、プローブやプライマーとして用いて行われる。

【0041】

本発明において、「オリゴヌクレオチド」とは、特に限定されず、DNA、RNA、または、従来公知のこれらの誘導体および類縁体などをいう。オリゴヌクレオチドは、一本鎖であってもよく、二本鎖であってもよい。このようなオリゴヌクレオチドにおいて、欠失、置換および/または付加が可能な塩基数としては、例えば、1個以上10個以下、好
20
ましくは、1個以上5個以下、より好ましくは、1個または2個である。「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする活性を有するオリゴヌクレオチド」とは、一般に当該分野において理解される意味であって、DNAプローブを用いて、サザンブロットハイブリダイゼーション法、コロニーハイブリダイゼーション法、ブランクハイブリダイゼーション法等のハイブリダイゼーション法を用いることにより得られるオリゴヌクレオチドを意味し、具体的には、フィルターに固定化したDNAを用いて、0.7M以上1.0M以下のNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1倍以上2倍以下の濃度のSSC(1×SSC; 150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウム)溶液を用い、65℃でフィルターを洗浄することにより同定できるオリゴヌクレオチドを意味する。ハイブリダイゼーション法は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989).)などに記載されている方法に準じて行うことができる。具体的には、目的のSNPに関するデータベースに記載の塩基配列、その部分配列、またはそれらの相補配列からなるオリゴヌクレオチドにおいて1から数個の塩基が欠失、置換及び/又は付加した塩基配列であって、少なくとも65%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の
30
相同性を有する塩基配列のオリゴヌクレオチドが挙げられる。

【0042】

オリゴヌクレオチドの製造方法は特に制限されず、例えば、天然の遺伝子から制限酵素などにより酵素的に直接切り出す方法、天然の遺伝子を鋳型としてPCRで増幅させる方法、遺伝子クローニングによる方法、化学合成による方法などが挙げられる。
40

【0043】

オリゴヌクレオチドは、SNPタイピングの具体的手法に応じて、適当な標識剤、例えば、ラジオアイソトープ素(たとえば、¹²⁵I、¹³¹I、³H、¹⁴Cなど)、酵素(たとえば、 α -ガラクトシダーゼ、 α -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素など)、蛍光物質(たとえば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなど)、発光物質(たとえば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなど)、クエンチャー、ピオチンなどで標識されていてもよい。

【0044】

このようなオリゴヌクレオチドの塩基配列は、SNPのタイピングにおけるプローブま
50

たはプライマーとしての使用を考慮し、当業者によって容易に設計できる。プローブは、検出すべき機能性遺伝子多型部位の含む領域でゲノムDNAとハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであり、標的部位に対して特異的である核酸であればよい。プライマーは、検出すべき機能性遺伝子多型部位を含むゲノムDNAの領域を特異的に増幅し得るように設計されたオリゴヌクレオチドであればよい。

【0045】

オリゴヌクレオチドの長さとしては、特に制限されず、例えば、15mer以上500mer以下、または15mer以上250mer以下、または15mer以上100mer以下、15mer以上50mer以下、または15mer以上39mer以下であってよい。また、オリゴヌクレオチドの長さの下限は20merであってよい。

10

【0046】

オリゴヌクレオチドの配列の設計には、配列表に記載の配列の他、各種データベースで特定されるSTAT3遺伝子の配列も利用できる。

オリゴヌクレオチドは、SNPタイピングの具体的手法に応じて、SNPの部位を含むものとして構成されてもよいし、SNPの部位を含まずその周辺配列を含むものとして構成されてもよい。また、オリゴヌクレオチドは、SNPタイピングの具体的手法に応じて、検出に適した付加的配列(ゲノムDNAと相補的でない配列)を含んでいてもよい。

【0047】

プライマーまたはプローブとして用いることができるオリゴヌクレオチドは、たとえば以下の(A)から(L)のものが挙げられる。

20

(A) STAT3遺伝子中に存在する配列番号1で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基(リファレンスSNP ID番号: rs4796793で示される遺伝子多型の部位)における遺伝子型がC/Cである遺伝子多型を含む15mer以上の連続する配列のオリゴヌクレオチド

(B) STAT3遺伝子中に存在する配列番号2で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基(リファレンスSNP ID番号: rs744166で示される遺伝子多型の部位)における遺伝子型がT/Tである遺伝子多型を含む15mer以上の連続する配列のオリゴヌクレオチド

(C) STAT3遺伝子中に存在する配列番号3で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基(リファレンスSNP ID番号: rs9891119で示される遺伝子多型の部位)における遺伝子型がA/Aである遺伝子多型を含む15mer以上の連続する配列のオリゴヌクレオチド

30

(D) STAT3遺伝子中に存在する配列番号4で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基(リファレンスSNP ID番号: rs1905341で示される遺伝子多型の部位)における遺伝子型がC/Cである遺伝子多型を含む15mer以上の連続する配列のオリゴヌクレオチド

(E) STAT3遺伝子中に存在する配列番号5で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基(リファレンスSNP ID番号: rs2306581で示される遺伝子多型の部位)における遺伝子型がC/Cである遺伝子多型を含む15mer以上の連続する配列のオリゴヌクレオチド、

40

(F) STAT3遺伝子中に存在する配列番号1で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基(リファレンスSNP ID番号: rs4796793で示される遺伝子多型の部位)の一塩基上流の塩基から上流側へ15以上連続する配列のオリゴヌクレオチド

(G) STAT3遺伝子中に存在する配列番号2で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基(リファレンスSNP ID番号: rs744166で示される遺伝子多型の部位)の一塩基上流の塩基から上流側へ15以上連続する配列のオリゴヌクレオチド

(H) STAT3遺伝子中に存在する配列番号3で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基(リファレンスSNP ID番号: rs9891119で示される遺伝子多型の部位)の一塩基上流の塩基から上流側へ15以上連続する配列のオリゴヌクレオチド

(I) STAT3遺伝子中に存在する配列番号4で示されるヌクレオチド配列の26番目

50

の塩基（リファレンスSNP ID番号：rs1905341で示される遺伝子多型の部位）の一塩基上流の塩基から上流側へ15以上連続する配列のオリゴヌクレオチド

（J）STAT3遺伝子中に存在する配列番号5で示されるヌクレオチド配列の26番目の塩基（リファレンスSNP ID番号：rs2306581で示される遺伝子多型の部位）一塩基上流の塩基から上流側へ15以上連続する配列のオリゴヌクレオチド、

（K）上記（A）から（J）のオリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチド

（L）上記（A）から（K）のオリゴヌクレオチドにおいて当該遺伝子多型の部位以外の1個以上の塩基が、欠失、置換および/または付加され、かつ上記（A）から（K）のオリゴヌクレオチドの相補配列からなるオリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする活性を有するオリゴヌクレオチド

【0048】

SNPタイピングの具体的手法としては特に限定されず、たとえば、ダイレクトシーケンス法、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド（ASO）ハイブリダイゼーション法、PCR-一本鎖DNA高次構造多型解析（SSCP）法、制限酵素切断断片長多型（RFLP）法、定量的リアルタイムPCR検出法、インベータ法、TDI（Template-directed Dye-terminator Incorporation）法、ARMS（Amplification Refracting Mutation System）法、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE）法、RNA分解酵素（RNase A）切断法、化学切断法、DOL（Dye-labeled Oligonucleotide Ligation）法、および質量分析を用いた遺伝子多型検出法などが挙げられる。

【0049】

・ダイレクトシーケンス法：

ダイレクトシーケンス法では、ダイデオキシ法(Sanger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 74, 5463-5467 (1977))、およびマキサム-ギルパート法[Methods in Enzymology, 65, 499 (1980)]などにより、DNA試料の塩基配列を決定することで、機能的遺伝子多型を検出する。

ダイレクトシーケンス法では、機能的遺伝子多型部位を含むDNA断片をPCR法により増幅後、増幅されたDNAに対してシーケンスを行ってよい。この方法で用いられるPCRプライマーは、機能的遺伝子多型部位を含む約0.05 kb以上4 kb以下のDNA断片を増幅するための、15 mer以上（たとえば15 mer以上39 mer以下）のオリゴヌクレオチドであってよい。また、シーケンスプライマーとしては、機能的遺伝子多型部位から50ヌクレオチド以上300ヌクレオチド以下程度5'末端側の位置に相当する15 mer以上（たとえば15 mer以上39 mer以下）のオリゴヌクレオチドを用いてよい。

【0050】

・対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド（ASO）ハイブリダイゼーション法：

ASOハイブリダイゼーション法では、機能的遺伝子多型部位を含むPCR産物をナイロンフィルターなどの支持体にドットプロットし、機能的遺伝子多型の野生型アレルと変異型アレル各々に対応したヌクレオチド配列を有する通常15 mer以上（たとえば15 mer以上25 mer以下程度）の合成オリゴヌクレオチドプローブ（シグナルを得るにはラジオアイソトープ、ビオチンまたは蛍光色素による標識が必要）とのハイブリダイゼーション後、当該プローブのTm値に準じた洗浄操作により、1ヌクレオチドのミスマッチの検出（ミスマッチがあればハイブリッドが外れる）を行う[Clin.Chim. Acta, 189, 153-157 (1990)]。この方法で用いられるPCRプライマーは、機能的遺伝子多型部位を含む約0.05 kb以上4 kb以下のDNA断片を増幅するための、15 mer以上（たとえば15 mer以上39 mer以下）のオリゴヌクレオチドであってよい。

【0051】

・PCR-（一本鎖DNA高次構造多型解析）SSCP法：

PCR-SSCP法では、機能的遺伝子多型部位を含むDNA断片をPCRで増幅後、熱変性し、電気泳動により、高次構造の異なる一本鎖DNAを分離する[Biotechniques, 16, 296-297 (1994); Biotechniques, 21, 510-514 (1996)]。機能的遺伝子多型の有

10

20

30

40

50

無により、1本鎖DNAの泳動距離が異なるため、そのパターンを解析することにより、多型のタイピングが可能である。この方法に用いられるPCR増幅用プライマーは、5'末端を蛍光色素で標識した機能的遺伝子多型部位を含む約50bp以上500bp以下のDNA断片を増幅するための15mer以上（たとえば15mer以上39mer以下）のオリゴヌクレオチドであってよい。

【0052】

・制限酵素切断断片長多型（RFLP）法：

機能的遺伝子多型部位を含む核酸配列が制限酵素認識部位を含む場合、その制限酵素で消化されることにより生じるDNA断片の長さの違いにより、当該機能的遺伝子多型の判定が可能である。制限酵素としては、機能的遺伝子多型の箇所の前後の配列を認識し得る制限酵素が用いられる。

RFLP法には、ゲノムDNAを制限酵素で分解後、サザンブロットを行なう方法と、多型部位を含むDNA断片をPCR増幅後、制限酵素で切断し、電気泳動により切断されたDNA断片の大きさを解析する方法とが挙げられる。前者の方法において用いられるプローブとしては、目的の機能的遺伝子多型部位を含んで、かつその多型部位から5'末端側および3'末端側それぞれの約0.05kb以上2kb以下までにわたる配列に相当するDNA断片（アイソトープ、ビオチンあるいは蛍光色素等で標識されたもの）であってよい。また、後者の方法に用いられるPCRプライマーは、多型部位を含む約0.05kb以上4kb以下のDNA断片を増幅するための、15mer以上（たとえば15mer以上39mer以下）のオリゴヌクレオチドであってよい。

【0053】

・定量的リアルタイムPCR検出法：

定量的リアルタイムPCR検出法では、蛍光標識したアレル特異的オリゴヌクレオチド（TaqMan^(R)プローブ）とTaqDNAポリメラーゼによるPCRを利用する[Genet. Anal., 14, 143-149 (1999); J. Clin. Microbiol., 34, 2933-2936 (1996)]。この方法で用いられるPCRプライマーは、機能的遺伝子多型部位を含む約0.05kb以上2kb以下のDNA断片を増幅するための、機能的遺伝子多型部位に対応する部位を含まない15mer以上（たとえば15mer以上39mer以下）のオリゴヌクレオチドであってよい。また、TaqManプローブは、機能的遺伝子多型に対応したヌクレオチド配列を含み、PCRプライマーのフォワード側がハイブリダイズする領域と重複する領域をハイブリダイズしないように構成された15mer以上（たとえば15mer以上50mer以下程度）の長さであってよく、5'末端は蛍光レポーター色素によって標識されているとともに3'末端がクエンチャー（消光物質）によって標識されている。このようなTaqManプローブは、野生型アレルと変異型アレルに各々特異的にアニーリングする2種類が設計され、それぞれ異なる波長を有する蛍光レポーター色素で標識されている。このようなプローブを用いて、検出すべき機能的遺伝子多型を含む領域をPCRによって増幅させて、PCR反応液からの蛍光をリアルタイムに測定することで、機能的遺伝子多型をタイピングすることができる。

【0054】

・インベーター法：

インベーター法では、定量的リアルタイムPCR検出法と同様にアレル特異的オリゴヌクレオチドと鋳型とをハイブリダイゼーションさせることによりタイピングする[Science, 5109, 778-783 (1993); J. Biol. Chem., 30, 21387-21394 (1999); Nat. Biotechnol., 17, 292-296 (1999)]。

インベーター法では、増幅処理しないゲノムDNAを鋳型とし、15mer以上（たとえば15mer以上50mer以下）の、鋳型にハイブリダイズしない5'フラップ部（付加的配列）と、当該5'フラップ部の3'端に配された、機能的遺伝子多型に対応したヌクレオチド配列とを含み、当該ヌクレオチド配列の3'側は鋳型にハイブリダイズするよう設計された30mer以上数百mer以下のオリゴヌクレオチド部からなる第一のプローブと；3'端に配された、機能的遺伝子多型に対応したヌクレオチド配列と、当該ヌク

10

20

30

40

50

レオチド配列の 5' 側に配された、鋳型にハイブリダイズするように設計された 15 mer 以上（たとえば、15 mer 以上数十 mer 以下）のオリゴヌクレオチド部とからなる第二のプローブとを用いる。これらのプローブと、ゲノム DNA とを、第一のプローブを切断する酵素（フラップエンドヌクレアーゼ）とともに反応液中で反応させる。

【0055】

フラップエンドヌクレアーゼは DNA の高次構造を認識するため、第一のプローブと鋳型のゲノム DNA と第二のプローブとがいずれも機能性遺伝子の部位に相補結合して三重鎖構造を形成した場合に第一のプローブを切断し、5' フラップ部と、当該 5' フラップ部の 3' 端に配された、機能的遺伝子多型に対応したヌクレオチド配列とからなるフラップ鎖を遊離する。遊離したフラップ鎖は、蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) プローブに相補的に結合する。FRET プローブは、遊離したフラップ鎖の 5' フラップ部と当該 5' フラップ部の 3' 端に配された、機能的遺伝子多型に対応したヌクレオチド配列と相補結合する 3' 領域と、レポーター蛍光色素とクエンチャー蛍光色素とを含む分子内ハイブリダイズした 5' 側のヘアピン領域とを有する。遊離したフラップ鎖の 3' 端つまり機能的遺伝子多型に対応したヌクレオチド配列が FRET プローブのヘアピン領域に侵入 (invasion) して相補結合することで DNA の高次構造を形成し、再びフラップエンドヌクレアーゼの認識によりクエンチングされていた蛍光色素が遊離する。

第 1 のプローブ、第 2 のプローブ、FRET プローブおよびレポーター蛍光色素は、野生型アレルと変異型アレルそれぞれに特異的に構成されるため、インベーター反応液からの蛍光を測定することで、機能的遺伝子多型をタイピングすることができる。

【0056】

・TDI (Template-directed Dye-terminator Incorporation) 法：

TDI 法では、目的の機能的遺伝子多型の直前の塩基または数塩基前の塩基に対応するように設定したプライマー（機能的多型部位の一塩基上流までの配列に相補的なオリゴヌクレオチドプローブ）を、DNA 鋳型にアニーリングさせ、プライマー伸張反応により、それぞれのアレルに対応する異なる蛍光色素で標識されたダイデオキシヌクレオチドを機能性多型部位に取りこませる [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 10756-10761 (1997)]。プライマー伸張産物は、DNA シークエンサー (ABI プリズム 377、アプライドバイオシステムズ社製) などを用いて解析する。このときに用いられる PCR プライマーは、多型部位を含む約 0.05 kb 以上 1 kb 以下の DNA 断片を増幅するための、15 mer 以上（たとえば 15 mer 以上 39 mer 以下）のオリゴヌクレオチドであってよい。

【0057】

・ARMS (Amplification Refracting Mutation System) 法：

PCR では、鋳型 DNA にプライマーがアニールした後、DNA ポリメラーゼにより 5' 末端側から 3' 末端側に相補鎖 DNA が合成される。プライマーの 3' 末端ヌクレオチドにミスマッチがあると、PCR の効率が低下し、電気泳動的に検出不可能になる。ARMS 法では、3' 末端ヌクレオチドが検出しようとする変異ヌクレオチドに相補的になるようなプライマーを用いて PCR を行い、増幅産物の有無を判定することにより遺伝子多型を検出する [Nuc. Acids. Res., 19, 3561-3567 (1991); Nuc. Acids. Res., 20, 4831-4837 (1992)]。ARMS 法における PCR に用いられるプライマーは、1 つは 3' 末端に多型部位が位置するように設計された、好ましくは 15 mer 以上（たとえば 15 mer 以上 39 mer 以下）のオリゴヌクレオチドであり、もう 1 つは、好ましくは、多型部位から 0.05 kb 以上 2 kb 以下程度離れた部分の 15 mer 以上（たとえば 15 mer 以上 39 mer 以下）のオリゴヌクレオチドであってよい。

【0058】

・変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法：

DGGE 法では、PCR 産物中の、ミスマッチを有するヘテロデュプレックスが、ホモデュプレックスよりも解離が容易であることを利用して遺伝子多型を検出する [Biotechniques, 27, 1016-1018 (1999)]。ヘテロデュプレックスは、解離が進むにつれ、ゲル電気

泳動における移動度が低下するので、使用するポリアクリルアミドゲル中に尿素およびホルムアミドの密度勾配を設定しておく、ホモデュプレックスとの移動度の差がさらに強調され、ミスマッチを含む2本鎖DNAの存在、すなわち変異の存在が検出される。この方法で用いられるPCRプライマーは、多型部位を含む約0.05 kb以上0.5 kb以下のDNA断片を増幅するための、15 mer以上（たとえば15 mer以上39 mer以下）のオリゴヌクレオチドであってよい。

【0059】

・RNA分解酵素（RNase A）切断法：

RNase A（RNA分解酵素）では、2本鎖のRNAもしくはRNA/DNAコンプレックスを分解せず、1本鎖のRNAのみを分解する。したがって、多型部位を含むDNA断片をPCRにより増幅後、アイソトープにより標識したRNAプローブを、変性し1本鎖にしたPCR産物とハイブリダイズさせ、RNase A処理後、電気泳動により分離すれば、変異型とハイブリダイズしたRNAプローブはミスマッチ部位で切断されるので、2本のバンドとして検出できる [DNA Cell. Biol., 14, 87-94 (1995)]。この方法で用いられるRNAプローブとしては、多型部位を含む通常15 mer以上（たとえば15 mer以上39 mer以下）のものであってよい。

10

【0060】

・化学切断法：

機能的多型部位を含むDNA断片をPCRにより増幅後、2本鎖DNAのミスマッチ部位の「C（シトシン）」に対してはヒドロキシルアミン、「T（チミン）」に対してはオスミウムテトラオキシドで別個に修飾し、ペペリジン処理により糖を切断する。標識プローブを用いて2本鎖を形成させ、上記処理を行った後、電気泳動し、プローブのサイズが短くなっていれば多型が検出されたことになる [Biotechniques, 21, 216-218 (1996)]。この方法で用いられるPCRプライマーは通常、機能的多型部位を含む約0.05 kb以上4 kb以下のDNA断片を増幅するための、15 mer以上（たとえば15 mer以上39 mer以下）のオリゴヌクレオチドであってよい。

20

【0061】

・DOL（Dye-labeled Oligonucleotide Ligation）法：

DOL法では、機能的遺伝子多型を含むDNA断片をPCRで増幅させた後、蛍光標識された機能的多型部位の直前の塩基まで含むダイプライマー（機能的多型部位の一塩基上流までの配列に相補的なオリゴヌクレオチドプローブ）と、それぞれのアレルに特異的な蛍光色素で標識されたダイターミネーターとを耐熱性DNAリガーゼで連結させる [Genome Res., 8, 549-556 (1998)]。このときに用いられるPCRプライマーは、機能的多型部位を含む約0.05 kb以上2 kb以下のDNA断片を増幅するための、15 mer以上（たとえば15 mer以上39 mer以下）のオリゴヌクレオチドであってよい。

30

【0062】

・質量分析法：

質量分析法では、機能的遺伝子多型のアレルに対応して異なるヌクレオチドを含む1本鎖オリゴヌクレオチドを合成してその質量を測定し、その差異をMALDI-TOF/MS（Matrix Assisted Laser Desorption-time of Flight/Mass Spectrometry）法により検出することによりタイピングする [Genome Res., 7, 378-388 (1997); Eur.J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 35, 545-548 (1997)]。MALDI-TOF/MS法では、はじめに機能的遺伝子多型部位を含むDNA断片をPCR法により増幅し、その後、機能的遺伝子多型部位に隣接するプライマーを用いた伸張反応により、それぞれのアレルに特異的なDNA伸張反応物をマススペクトルにより解析する。このときに用いられるPCRプライマーは、機能的遺伝子多型部位を含む約0.05 kb以上0.5 kb以下のDNA断片を増幅するための、15 mer以上（たとえば15 mer以上39 mer以下）のオリゴヌクレオチドであってよい。また、機能的遺伝子多型を検出するためのプライマーは、機能的遺伝子多型部位に隣接した15 mer以上（たとえば15 mer以上39 mer以下）のオリゴヌクレオチドであってよい。

40

50

【 0 0 6 3 】

(iii) 薬剤性間質性肺炎の易発症性の判定工程

上記 (ii) の DNA 配列解析工程によって、S T A T 3 タンパク質の活性化抑制または発現量減少を誘発する遺伝子型であると決定された場合、薬剤性間質性肺炎を発症する可能性が高い (易発症性) と判定することができる。反対に、S T A T 3 タンパク質の活性化抑制または発現量減少を誘発する遺伝子型でないと決定された場合、薬剤性間質性肺炎を発症する可能性は高くない (難発症性) と判定することができる。

【 0 0 6 4 】

上記 (ii) の DNA 配列解析工程によって得られた機能性遺伝子多型の情報は、DNA 配列解析結果を入力するための入力手段によって、コンピュータなどに手動または自動で入力されてよい。入力された結果は、薬剤性間質性肺炎の易発症性および難発症性に関する遺伝子型を設定する手段により予め設定された易発症性または難発症性のアレルと比較および / または照合する判定手段によって、易発症性か難発症性かを判定されてよい。これらの手段は、例えば、コンピュータ、またはコンピュータで作動するソフトウェアプログラムであってよい。

10

【 0 0 6 5 】

なお、機能的遺伝子多型の決定および遺伝子型からの易発症性の判定は、機能的遺伝子多型 1 箇所のみについて行ってもよいが、判定の精度の向上を考慮し、2 箇所以上の機能的遺伝子多型について行ってもよい。2 箇所以上の機能的遺伝子多型における遺伝子型で易発症性と判定されると、薬剤性間質性肺炎発症のリスクはより高いと推定することができる。

20

【 0 0 6 6 】

このように、薬剤性間質性肺炎発症リスクが高いと判定された患者に対しては、薬剤性間質性肺炎の予防法の徹底、抗癌剤の投与量の減量、抗癌剤以外の治療法の選択など、事前に対策を講じることができる。

【 0 0 6 7 】

[3 . 薬剤性間質性肺炎易発症性判定用キット]

上述の薬剤性間質性肺炎易発症性を判定する方法は、機能的遺伝子多型の検出のためのアイテムが含まれたキット (薬剤性間質性肺炎易発症性判定用キット) を利用することによって、より簡便に実施することができる。

30

【 0 0 6 8 】

本発明のキットは、本発明の薬剤性間質性肺炎易発症性判定用マーカーである機能的遺伝子多型を検出可能なプローブおよび / またはプライマーを含むことができる。プローブおよびプライマーとして用いることができるオリゴヌクレオチドは、上述の間質性肺炎易発症性を判定する方法で述べた通りである。したがって、本発明のキットは、目的の SNP に関するデータベースに記載の塩基配列、その部分配列、およびそれらの相補配列からなるオリゴヌクレオチド、ならびに、当該オリゴヌクレオチドにおいて当該 SNP の部位以外の 1 個以上の塩基が、欠失、置換および / または付加され、かつ当該オリゴヌクレオチドの相補配列からなるオリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする活性を有するオリゴヌクレオチドからなる群より選択されるオリゴヌクレオチドを、適宜、SNP タイピングの具体的手法に応じた態様で含んでよい。より具体的には、上述の (A) から (L) の少なくともいずれかのオリゴヌクレオチドを、適宜、SNP タイピングの具体的手法に応じた態様で含んでよい。

40

【 0 0 6 9 】

このオリゴヌクレオチドは、支持体上に固定されていてもよい。支持体上にオリゴヌクレオチドを固定する方法としては、支持体表面上で直接オリゴヌクレオチドを合成する方法と、予め調製したオリゴヌクレオチドを支持体表面上に固定する方法などが挙げられる。支持体上にオリゴヌクレオチドを固定する方法では、たとえば、光照射で選択的に除去される保護基の使用と、半導体製造に利用されるフォトリソグラフィ技術および固相合成技術とを組合せて、微小なマトリックスの所定の領域で選択的合成を行うことができる

50

。また、予め調製したオリゴヌクレオチドを支持体表面上に固定する方法においては、たとえば、オリゴヌクレオチド溶液をインクジェット法などの分注手段を用いて支持体上に微量滴下して、化学的または物理的に固定することができる。支持体の素材としては特に限定されず、たとえば、ガラス、金属、プラスチックなどが挙げられる。支持体の形状としても特に限定されず、板状（基板）、粒子状（担体）などが挙げられる。

【0070】

本発明のキットには、SNPタイピングの具体的手法に応じ、各種基質（たとえば、デオキシヌクレオチド、ダイデオキシヌクレオチドなど）、各種酵素（たとえば、制限酵素、TaqDNAポリメラーゼ、フラップエンドヌクレアーゼなど）などの試薬を含んでよい。さらに、反応希釈液、標準抗体、緩衝液、洗浄剤、反応停止液などが含まれていてもよい。

10

【実施例】

【0071】

以下に実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に制限されるものではない。

【0072】

<実施例1>

1. 研究方法

神戸大学医学部附属病院泌尿器科に入院中あるいは通院中の同意取得患者64名について、STAT3の遺伝子多型のタイピングを実施した。タイピングには、Taqman Probe法によるSNPタイピング（Taqman Genotyping Assay kit）を用い、機能的変異として報告されているrs4796793の部位を評価した。同意取得患者のうち、エベロリムスまたはテムシロリムスの治療経験を有する患者を対象とし、カルテ情報より間質性肺炎の発症の有無および患者の背景因子をレトロスペクティブに調査し、STAT3遺伝子多型と間質性肺炎との関連性について検討した。以下の研究は神戸大学医学倫理委員会において承認を得ており、実施時には患者に対する十分な説明および倫理的配慮のもと同意を取得した上で行った。

20

【0073】

2. 解析計画

間質性肺炎について、有害事象共通用語規準（CTCAE）ver4.0に基づき評価された症例を収集し、肺線維症がGrade 1以上となる場合を発症と定義した。観察期間は治療開始後4ヶ月とし、期間内に間質性肺炎を発症した患者を発症患者とした。治療開始後4ヶ月以内に間質性肺炎以外の理由で中断した症例は除外した。

30

【0074】

3. 結果

同意取得患者の内、テムシロリムスを使用した経験を有する患者18名のうち、血圧低下のため早期中断した1名を除く17名を解析対象とした。

解析対象の患者背景および間質性肺炎発症の有無を表1に示し、統計解析結果を表2および図1に示す。

【0075】

【表 1】

患者背景	間質性肺炎発症		
	なし N=12	あり N=5	P 値
年齢 中央値 (範囲)	67.3 (40.0-83.0)	66.9 (59.8-81.5)	0.844
性別 (男性) N (%)	10 (83.3)	4 (80.0)	0.966
体重 中央値 (範囲)	62.8 (40.6-79.0)	61.7 (53.1-68.6)	0.861
分子標的治療薬による 前治療歴あり N (%)	9 (75.0)	2 (40.0)	0.559
サイトカインによる 治療歴あり N (%)	6 (50.0)	0	0.144

10

【 0 0 7 6 】

20

【表 2】

遺伝子型	間質性肺炎発症			X ²	P 値	オッズ	95%信頼区間
	なし N (%)	あり N (%)					
G/G	3 (25.0)	0	G/G vs G/C vs C/C		0.012		
G/C	8 (66.7)	1 (20.0)	G/G vs G/C + C/C	1.52	0.218	-	-
C/C	1 (8.3)	4 (80.0)	G/G + G/C vs C/C	9.41	0.002	48.00	3.09-762.94

30

【 0 0 7 7 】

表 2 および図 1 に示すように、mTOR阻害薬に起因する間質性肺炎の発症患者において、STAT3遺伝子のSNP (rs4796793) の遺伝子型がC/Cである患者が有意に高い割合を占めた。したがって、STAT3遺伝子変異がmTOR阻害薬による間質性肺炎のリスク因子となる可能性が示された。STAT3遺伝子のSNP (rs4796793) は遺伝子型によりmRNAの発現量が異なることが報告されており、C/Cタイプは最もSTAT3のmRNA発現量が低い遺伝子型である。STAT3のmRNA発現量が低いことで、薬剤による活性阻害を受けやすいことがリスクとなる要因である可能性が考えられる。

一方、同意取得患者 (N=64) 全体においては、G/Gタイプは17.2% (N=11)、G/Cタイプは43.8% (N=28)、C/Cタイプは39.1% (N=25) であった。

40

【 0 0 7 8 】

なお、上記の患者群において、rs744166の部位におけるSNPの遺伝子型がT/Tであること (D' = 1.00)、rs9891119の部位におけるSNPの遺伝子型がA/Aであること (D' = 1.00)、rs1905341の部位におけるSNPの遺伝子型がC/Cであること (D' = 1.00)、およびrs2306581の部位におけるSNPの遺伝子型がC/Cであること (D' = 1.00) を確認した。

【 0 0 7 9 】

< 参考例 1 : A549細胞におけるSTAT3阻害剤処置の影響 >

ヒト肺胞上皮基底細胞 (A549細胞) におけるSTAT3阻害剤処置のシグナル因子の変動およびEMTマーカーの発現変動をWestern blot法により解析した。解析結果を図 2 に示す。

50

図2に示すように、A549細胞にSTAT3の選択的阻害剤であるStatticを20 μMで48時間処置することにより、対照系（Cont）に比べてEMTマーカーであるVimentin（Vim）の発現上昇およびE-cadherin（E-cad）の発現減少が認められた。EMTの補助因子については、SnailがStattic処置により発現上昇し、ZEB1はわずかな発現上昇を認めた。

【0080】

<参考例2：A549細胞のSTAT3過剰発現系におけるEMT補助因子への影響>

A549細胞にSTAT3の発現ベクターをリポフェクション法により遺伝子導入し、過剰発現系を作製した。この過剰発現系におけるEMTマーカーの発現変動をWestern blot法により解析した。解析結果を図3に示す。空ベクターの導入細胞（Emp）とSTAT3過剰発現系（STAT3）とを比較し、ZEB1の発現量は減少傾向を示した。

10

【0081】

<参考例3：エベロリムス継続曝露A549/EV細胞およびSTAT3阻害薬におけるEMT誘導作用>

A549細胞に10 nMのエベロリムスを1ヶ月間処置したA549/EV細胞を樹立した。A549細胞およびA549/EV細胞を上皮系マーカーであるE-cadherinおよび間葉系マーカーであるF-Actinにて蛍光免疫染色し、蛍光顕微鏡にて画像撮影した。得られた蛍光顕微鏡像を図4に示す。上皮系のコントロールとしてはA549細胞を、間葉系のコントロールとしてA549細胞に20 ng/mLのTGF- β を48時間処置したものをを用いた（A549 cells + TGF β ）。A549/EV細胞は、E-cadherinが消失しF-Actinが発現しているため、間葉系細胞の特性を示していることがわかる。また、STAT3阻害薬であるStattic 20 μMを48時間処置した細胞（A549 cells + Stattic）については、E-cadherinの消失は顕著ではないものの、F-Actinの発現が亢進していることから、間葉系細胞への移行が確認できた。

20

【0082】

なお、このような顕著なEMT誘導作用は、10nMのエベロリムスの曝露期間が2週間以上である場合から確認され、曝露期間が長くなるほど当該作用はより顕著となった。曝露期間を1ヶ月超えると、当該作用は頭打ちとなった。

【0083】

<参考例4：エベロリムス継続曝露A549/EV細胞でのEMT関連因子に及ぼす影響>

A549細胞、および1nMまたは10 nMのエベロリムスを継続曝露したA549/EV細胞におけるEMTマーカーを、western blot法にて比較した。その結果を図5に示す。図5に示すように、上皮系マーカーであるE-cadherinはA549/EV細胞において減少しており、間葉系の予備因子であるZEB1の発現は亢進していた。STAT3のリン酸化は顕著に減少した。

30

【0084】

<参考例5：ラパマイシン継続曝露A549細胞でのEMT関連因子に及ぼす影響>

mTOR阻害薬であるラパマイシンの継続曝露細胞において同様にEMTを評価した。その結果を図6に示す。A549/EV細胞と同様、ラパマイシンの継続曝露（A549/Rap）細胞においても、STAT3のリン酸化の減少、E-cadherinの発現低下およびVimentinの発現上昇を認めた。A549細胞へのEMT誘導作用がmTOR阻害薬に共通の作用である可能性を示している。

【0085】

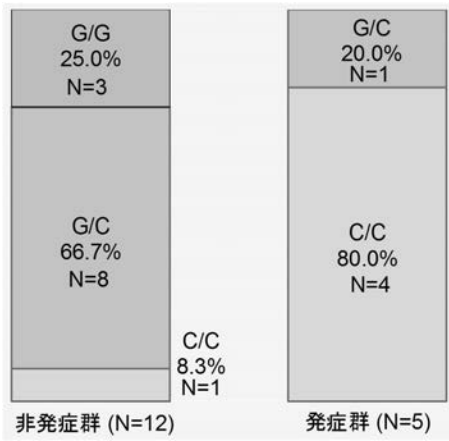
これらの結果を統合すると、A549細胞におけるSTAT3の阻害はEMTの誘導を惹起する可能性があり、mTOR阻害薬の継続曝露細胞においてもSTAT3の活性低下が認められたことから、エベロリムスによるA549細胞でのEMTの亢進はSTAT3の活性低下を介している可能性が高い。

40

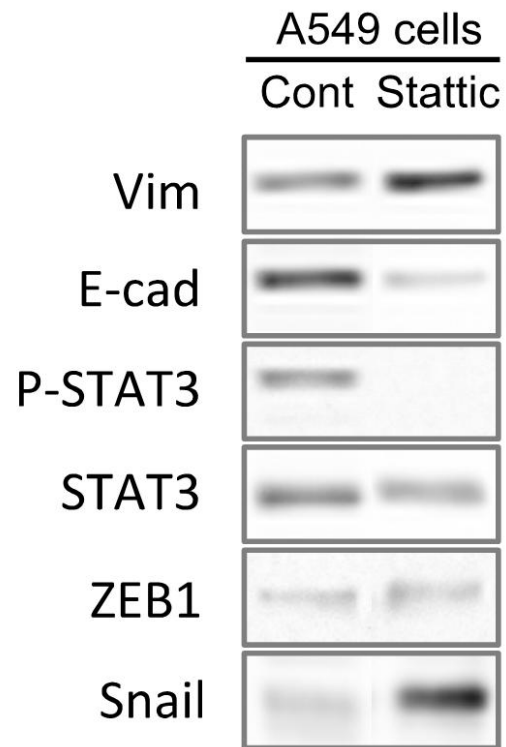
【0086】

本発明の好ましい実施形態は上記の通りであるが、本発明は、上述の実施形態に限定されるものではなく、本発明の趣旨から逸脱することのない様々な変形がなされる。

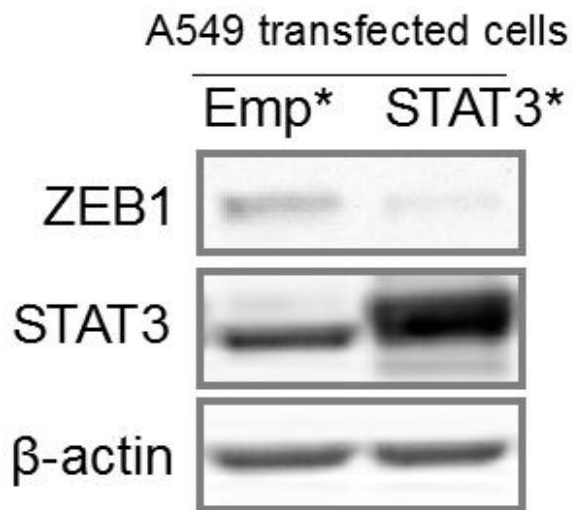
【 図 1 】



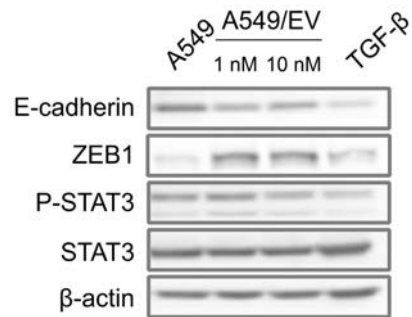
【 図 2 】



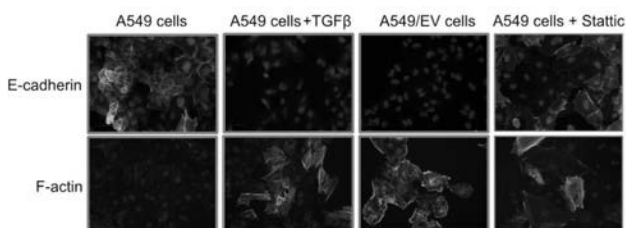
【 図 3 】



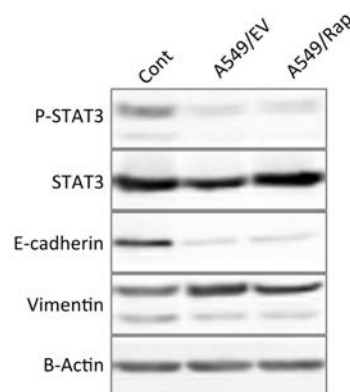
【 図 5 】



【 図 4 】



【 図 6 】



【配列表】

2017023090000001.app

フロントページの続き

特許法第30条第2項適用申請有り (I)日本薬学会第135年会(神戸)のウェブサイトで公開された講演予稿集 26PB-pm162「mTOR 阻害薬による肺線維症の長期曝露モデルを用いた基礎的検討とゲノム薬理学的解析」(平成27年2月2日公開、<http://nenkai.pharm.or.jp/135/pc/ipdfview.asp?i=1771>);および要旨検索公開日を示す日本薬学会第135年会(神戸)のウェブサイト(<http://nenkai.pharm.or.jp/135/web/>) (II)日本薬学会第135年会(神戸)ポスター 26PB-pm162「mTOR 阻害薬による肺線維症の長期曝露モデルを用いた基礎的検討とゲノム薬理学的解析」(平成27年3月26日、日本薬学会第135年会);および発表日を示す講演プログラム

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA17 QA19 QQ02 QQ42 QQ53 QR08 QR32 QR36 QR42
QR50 QR55 QR62 QR72 QR77 QS25 QS28 QS34 QS36 QS39
QX02 QX04 QX10

专利名称(译)	用标记物测定药物间质性肺炎的生物有效性的方法和试剂盒，用于测定药物颗粒体PML的种群		
公开(公告)号	JP2017023090A	公开(公告)日	2017-02-02
申请号	JP2015147366	申请日	2015-07-27
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人神戸大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人神戸大学		
[标]发明人	山本和宏 平井みどり		
发明人	山本 和宏 平井 みどり		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/53.M C12N15/09.Z C12Q1/68 C12Q1/68.AZN.A C12Q1/6827.Z C12Q1/683.Z C12Q1/6834.Z C12Q1/6851.Z C12Q1/6858.Z C12Q1/6869.Z C12Q1/6883.Z		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02 4B063/QX04 4B063/QX10		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种方法和试剂盒，用于确定药物引起的间质性肺炎的发病风险，使用副作用标记来判断药物间质性肺炎的发病风险。 解决方案：本发明包括以下步骤 (i) 至 (iii)，用于确定药物间质性肺炎易感性。(i) 制备含有STAT3基因的DNA样品，用于从患有癌症疾病的患者获得的样品；(ii) 对DNA样品进行DNA序列分析，从而获得与STAT3蛋白相关的功能基因确定该类型是否是诱导抑制STAT3蛋白激活或表达水平降低的基因型；和 (iii) 如果确定存在基因型，则确定该类型是否是由抗癌剂诱导的基因型确定发生药物间质性肺炎的可能性很高的步骤。 点域1

