

(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 - 527865

(P2003 - 527865A)

(43)公表日 平成15年9月24日 (2003.9.24)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/7088	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088		45/00	4 B 0 2 4
45/00		48/00	4 B 0 6 3
48/00		A 6 1 P 25/32	4 C 0 8 4
A 6 1 P 25/32		C 1 2 Q 1/68	A 4 C 0 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 35数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 569409(P2001 - 569409)

(86) (22)出願日 平成13年2月6日 (2001.2.6)

(85)翻訳文提出日 平成14年9月4日 (2002.9.4)

(86)国際出願番号 PCT/F101/00103

(87)国際公開番号 W001/071029

(87)国際公開日 平成13年9月27日 (2001.9.27)

(31)優先権主張番号 60/219,324

(32)優先日 平成12年3月21日 (2000.3.21)

(33)優先権主張国 米国 (US)

(71)出願人 ホルモス メディカル コーポレーション
フィンランド共和国、フィン - 20520 ツルク、イテイネン ピトケカツ 4ペー、ファーマシティ (番地なし)

(71)出願人 ユッシ カウハネン
フィンランド共和国、フィン - 70620 クオピオ、レハチクーシコンチエ 3 ペー 6

(72)発明者 カウハネン、ユッシ
フィンランド共和国、フィン - 70620 クオピオ、レハチクーシコンチエ 3 ペー 6

(74)代理人 弁理士 朝日奈 宗太 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒトのアルコール依存症の発症に関するリスクの診断

(57)【要約】

本発明はアルコール依存症の発症に関するリスクを有することに対するヒトの感受性を診断するための方法に関する。本発明はさらに、該症状の発症を予防するため、アルコール依存症の発症に関するリスクを有すると診断されたヒトへの治療方法に関する。本発明はまた、トランスジェニック動物などの動物モデルを用いた、アルコール依存症の予防または治療において有用な医薬または遺伝的な標的の研究またはスクリーニング方法に関する。

。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アルコール依存症の発症に関するリスクを有することに対するヒトの感受性の診断方法であって、該被験者がヒトプレプロNPYのシグナルペプチド部分に多型を有するかどうかを測定することからなり、該多型が該プレプロNPYのシグナルペプチド内における7位のロイシンのプロリンによる置換からなり、該多型がアルコール依存症の発症に関するリスクを示すものである該方法。

【請求項2】 請求項1記載の方法であって、前記被験者におけるヒトプレプロNPYのシグナルペプチド部分の前記多型が、該被験者由来の試料へ7位の対立遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドプロ-ブを用いることによって検出され、該試料は該プレプロNPYの標的ポリヌクレオチドからなる方法。

【請求項3】 請求項1記載の方法であって、前記被験者におけるヒトプレプロNPYのシグナルペプチド部分の前記多型が、いかなるプレプロNPY分解産物にも結合するシグナルペプチドまたは該NPYペプチドに結合できる抗体に接触する該被験者由来の試料を用いた免疫アッセイによって検出される方法。

【請求項4】 請求項1、2または3記載のアルコール依存症の発症に関するリスクを有すると診断されたヒトの治療、アルコール依存者の進行の予防またはアルコール依存症を軽減もしくは治療するための方法であって、変異NPY遺伝子の影響を中和する薬剤を有効量、該ヒトに投与することからなる方法。

【請求項5】 請求項4記載の方法であって、前記薬剤が、NPYと特異的NPY受容体タンパク質との効果の調節することによって、内因性のNPYの合成、分泌または代謝の調節を目的とする薬剤、またはNPY標的部位での特異的な方法での相互作用を目的とする薬剤である方法。

【請求項6】 請求項4記載の方法であって、該薬剤が正常または変異NPY遺伝子の遺伝子発現を調節することを目的とする薬剤である方法。

【請求項7】 請求項1、2または3記載のアルコール依存症の発症に関するリスクを有すると診断されたヒトの治療、アルコール依存者の進行の予防またはアルコール依存症を軽減もしくは治療するための方法であって、該ヒトへ変異NPY配列を修復することを目的とした特異的な遺伝子治療を行なうことからな

る方法。

【請求項8】 プレプロ神経ペプチドY (プレプロNPY) をコードするヌクレオチド配列、または成熟ヒトNPYペプチドをコードするその部分からなるヒトのDNA配列であって、該プレプロNPYのシグナルペプチド部分の7位のロイシンアミノ酸がi) 変換されていない、またはii) プロリンによって置換されているDNA配列を有するトランスジェニック動物からなる動物モデルを用いることにより、アルコール依存症の予防または治療において有用な、医薬または遺伝的な標的の研究またはスクリーニング方法。

【請求項9】 マウスのシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列が正常または変異ヒトシグナルペプチドのどちらかをコードするシグナルペプチド配列によって置換されている以外は、正常なマウスのNPY配列をコードするヌクレオチド配列、または成熟マウスNPYペプチドをコードするその部分からなるDNA配列を有するトランスジェニック動物からなる動物モデルを用いた、アルコール依存症の予防または治療において有用な、医薬的または遺伝的な標的の研究またはスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****[技術分野]**

本発明は、アルコール依存症の発症に関するリスクを有することに対するヒトの感受性の診断方法に関する。本発明はさらにアルコール依存症の発症のリスクを有すると診断されたヒトの症状の進行を妨ぐために、該ヒトのアルコール依存症の発症を予防または治療する方法に関する。本発明はまた、トランスジェニック動物を含む動物モデルを用いることによって、アルコール依存症の予防または治療において有用な医薬または遺伝的な標的の研究またはスクリーニング方法に関する。

【0002】**[発明の背景]**

本発明の背景を説明するため、およびとくに、その実施に関わる付加的な詳説を提供するための場合、本明細書中に使用される刊行物およびほかのものは、参考文献として包含される。

【0003】

神経ペプチドY (NPY) は、中枢神経系内の神経モジュレーター (neuromodulator) としてよく特徴づけられるヘキサトリオコンタペプチド (hexatriocontapeptide) アミドである (Gray and Morley, 1986; Lundberg et al., 1982)。NPYの最も周知の効果は、摂食の刺激 (Clark et al., 1985; Levine and Morley, 1985; Stanley and Leibowitz 1985) および、白色脂肪細胞組織におけるリポタンパク質リパーゼの活性化によるエネルギー貯蔵の増加である (Billington et al., 1991; Billington et al., 1994)。最近のげっ歯類での調査結果は、NPYはエタノール消費の潜在的調節因子でもあり得るということを示唆する (Ehlers et al., 1998a; Ehlers et al., 1998b; Thiele et al., 1998; Cokerill, 1998; Tecott and Heberlein, 1998)。アルコールに対する好みは脳内のNPYレベルと反比例で関連しているように思われる (Thiele et al., 1998)。NPY欠失マウスは、エタノール消費が増加するのに対し、NPY遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウスはエタノールをあまり好まず、その鎮静剤/催

眠剤効果に対してより敏感である (Thiele et al., 1998)。NPYおよびエタノールは、同様の電気生理学的な側面を有し (Ehlers et al., 1998b)、両方とも抗不安特性を有することが知られている (Thiele et al., 1998; Heiling et al., 1992; Palmiter et al., 1998; Stewart et al., 1993)。さらに、NPYは補償効果により消費挙動に影響し得る (Ehlers et al., 1998a; Tecott and Heberlein, 1998)。NPYは、扁桃腺および側坐核、食物、アルコールおよびある種の薬物の有益な状況を仲介すると考えられる中脳辺縁 (mesolimbic) ドーパミン系の構造体で発現する (Tecott and Heberlein, 1998; Ault et al., 1993; Jewett et al., 1992)。動物モデルからの間接的証拠にもかかわらず、ヒトのアルコール消費の調節におけるNPYの役割に関する研究はまだ公表されていない。

【0004】

NPYのシグナルペプチドにおける共通の多型の新しい発見が、最近報告された (Karvonen et al., 1998)。配列変異体に対するNPY遺伝子の全コード領域のスクリーニングののち、チミジン (1128) からシトシン (1128) への多型 (T1128C) が同定され、結果、プレプロNPYのシグナルペプチド内にロイシン (7) からプロリン (7) への置換となる。NPY内のそのプロリン (7) は血清コレステロールレベルの上昇に強い関連を示した (Karvonen et al., 1998)。

【0005】

本研究において、我々は、クオピオ虚血性心臓疾患危険因子研究 (KIH D) からの不特定の男性群試料において、NPYにおけるロイシン (7) からプロリン (7) への多型がアルコール消費レベルに関連していることを見出した (Salonen, 1988; Lakka et al., 1994)。

【0006】

[発明の要約]

第1の側面によると、本発明は、アルコール依存症の発症に関するリスクを有することに対するヒトの感受性の診断方法であって、該被験者がヒトプレプロNPYのシグナルペプチド部分に多型を有するかどうかを測定することからなり、

該多型が該プレプロNPYのシグナルペプチド内における7位のロイシンのプロリンによる置換からなり、該多型がアルコール依存症の発症に関するリスクを示すものである方法に関する。

【0007】

第2の側面によると、本発明は、アルコール依存症の発症に関するリスクを有すると診断されたヒトの治療、アルコール依存症の進行の予防、またはアルコール依存症の緩和もしくは治療するための方法であって、変異NPY遺伝子の影響を中和する薬剤を有効量該ヒトに投与することからなる方法に関する。

【0008】

第3の側面によると、本発明は、アルコール依存症の発症に関するリスクを有すると診断されたヒトの治療、アルコール依存症の進行の予防、またはアルコール依存症の緩和もしくは治療するための方法であって、該ヒトへ変異NPYシグナルペプチド配列の修復を目的とする特異的な遺伝子治療を行なうことからなる方法に関する。

【0009】

第4の側面によると、本発明は、プレプロ-神経ペプチドY(プレプロNPY)をコードするヌクレオチド配列、またはヒト成熟NPYペプチドをコードするその領域を含むヒトのDNA配列であって、該プレプロNPYのシグナルペプチド領域の7位のロイシンアミノ酸がi)置換されていない、またはii)プロリンによって置換されたヒトのDNA配列を有するトランスジェニック動物などの動物モデルを用いることによって、アルコール依存症の予防または治療において有用な医薬的または遺伝的な標的の研究またはスクリーニング方法に関する。

【0010】

第5の側面によると、本発明は、別の正常なマウスNPY配列をコードするヌクレオチド配列、またはマウスの成熟NPYペプチドをコードするその領域からばるDNA配列であって、マウスのシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列が正常または変異したヒトのシグナルペプチドのどちらかをコードするヒトのシグナルペプチド配列によって置き換えられたDNA配列を持つトランスジェニック動物を有する動物モデルを用いることによって、アルコール依存症の予防

または治療において有用な医薬的または遺伝的な標的の研究またはスクリーニング方法に関する。

【0011】

[詳細な説明]

神経ペプチドY (NPY) は、中枢および末梢神経系に広く存在する36アミノ酸神経伝達物質である。NPYは、体のエネルギーバランスおよび心臓血管の機能の制御といった多様な作用を有する。我々は最近、NPYのシグナルペプチドにPro7を有する被験者が、野生型(Leu7/Leu7)のシグナルペプチド配列を有する個々人と比較して、より高い血清コレステロールレベルおよびアポリタンパク質Bレベルを有することを証明した。神経ペプチドY (NPY) は、食物摂取の視床下部調節およびエネルギーバランスに重要な役割を果たす。最近の動物における発見によると、NPYはアルコール消費の強力な調節因子であるとも考えられる。我々は最近、ヒトにおいてNPY系がアルコール消費に関連しているのかどうか研究するために、同定されたNPYのシグナルペプチド部分内のロイシン(7)からプロリン(7)への多型を用いた。被験者(N=889)は民族的に同種であり、フィンランド東部の中年男性の不特定な群の試料である。Pro(7)置換を産生する遺伝子変異体は、多数の共変量に関する調整後でさえ34%以上も高い平均アルコール消費に対応している($p=0.03$)。重度のドリンカー(エタノール230グラム以上/週)の割合もまた、この群においてある程度高い(13.1%対8.2%、 $p=0.10$)。我々の研究は、ヒトのアルコールに対する嗜好がNPY系によって調節されやすいという最初の証拠を提供するものである。

【0012】

そのDNA配列またはその変異シグナルペプチドもしくはプレプロNPYのほかの切断産物と関連する該ペプチドは、被験者が変異NPY遺伝子の保因者であるかどうか測定するために該被験者をスクリーニングするために使用できる。

【0013】

その測定は、正常および変異NPY遺伝子の直接DNAシーケンス法、正常NPY配列または変異NPY配列のどちらかを検出することができるポリメラー

ゼ連鎖反応（PCR法）を用いた対立遺伝子特異的増幅法などの周知の方法によるDNA解析として、またはたとえばPCR一本鎖配置多型（SSCP）法または変性勾配ゲル電気泳動法（DGGE）などのさまざまな分子生物学的方法による正常または変異NPY遺伝子の間接的な検出法のいずれかによって実施され得る。正常または変異NPY遺伝子の測定は、とくに多くの試料の遺伝子型を特定するために適している制限断片長多型（RFLP）法によってもなされ得る。

【0014】

その測定は、さまざまな方法を用いて組織レベルで発現するRNAを分析することによって、RNAレベルで行なうこともできる。対立遺伝子特異的プローブは、ハイブリダイゼーション用に設計され得る。ハイブリダイゼーションは、たとえばノーザンブロット、RNase保護アッセイまたはインサイチュハイブリダイゼーション法を用いてなされ得る。正常または変異NPY遺伝子由来のRNAは、組織RNAをまずcDNAに変換し、ついで対立遺伝子特異的PCR法によってcDNAを増幅し、前述したゲノムDNAに関して解析を行なうことによっても解析されることができる。

【0015】

あるいはまた、その測定は、試料を、そのシグナルペプチドまたはプレプロNPYのほかの切断産物と関連する該ペプチドに結合できる抗体と接触させる免疫解析としても行なうことができる。

【0016】

抗体は正常または変異プレプロNPYに対して、またはよりとくには正常またはNPYの変異シグナルペプチド領域に対して起こすことができる。その抗体の産生は、ポリクローナル抗体を得るために実験動物においてインビボでなされることができ、またモノクローナル抗体を得るためにインビトロで細胞株を用いてなされることができる。

【0017】

アルコール依存症の発症に関するリスクを有すると診断されたヒトは、該症状の進行を予防するために、その変異NPY遺伝子の影響を中和する薬剤を有効量該ヒトに投与することによって治療されることができる。これは、変異NPY配

列の修復を目的とした特異的な遺伝子治療によって、または内因性NPYの合成、放出または代謝を調節すること、またはNPYの効果を調節することによって、NPY標的部位で、特定な方法で特異的NPY受容体タンパク質と相互作用することを目的とした薬物治療を行なうことによってなされることができる。現在は、NPY受容体の5つの異なるサブタイプがクローニングされ、特徴付けられ（Y1～Y5受容体）、これらNPY受容体と特異的に相互作用する薬剤分子が合成されている。前記薬物治療は、これらの命名された受容体または機序のみに限定されるものではなく、NPYの分泌物を含む今後発見される他のNPY受容体および関連した機序も対象とするものである。

【0018】

患者におけるその変異NPYの影響は、病気に関連した変異を標的とする訂正または相同組換えによる変異対立遺伝子の位置指定不活性化を含む、アンチセンス治療または遺伝子スイッチングもしくは遺伝子置換を用いることによって妨げることができる。

【0019】

そのアンチセンス治療は、標的メッセンジャーRNA（mRNA）との直接的な相互作用によって翻訳を妨げるように設計された方法である。これは、その機能が破壊されるべきメッセンジャーRNAとワトソン・クリック型塩基対を形成する標的オリゴヌクレオチドを用いることによって遂行される。アンチセンスオリゴヌクレオチドによる遺伝子発現阻害は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの相補的なmRNA配列と結合する能力およびmRNAの翻訳を阻害する能力に依存している。遺伝子内の単一の変異塩基はオリゴヌクレオチドに基づいた戦略を用いることによって修復することが可能である（Giles et al., 1995; Schwab et al., 1994; Yoon et al., 1996）。短い7または8塩基のオリゴヌクレオチドは、充分、標的RNAのフランキング配列に大きく依存するアンチセンス活性および特異性を保持する。結合は、安定な結合およびRNase H媒介切断を促進するのに充分であるべきである。

【0020】

変異NPY遺伝子の影響は、好ましくは、変異領域：...c g a c t / c g g

g g...の配列からなる短い対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドを用いることによって妨げられる。これは、さまざまな長さのオリゴヌクレオチドを用いることによって遂行され得るが、全てがその変異塩基配列を認識するものではない。プレプロNPY mRNAの推定2次構造(スキーム1および2)によると、最も良い標的配列は、変異の周辺の-9と+2塩基間、すなわち3' a c a a g c g a c t g g -5' を標的とする配列である。この配列は標的mRNAへのオリゴヌクレオチドの結合を増強することで知られる「バルブ」を含む。

【0021】

非修飾のオリゴヌクレオチドを使用することは可能であるが、それらの安定性、ヌクレアーゼ耐性、および核への浸透を増加させるために、オリゴヌクレオチドのいくつかの修飾が使用され得る。主にC-2、C-4、C-5、およびC-6部位の、比較的多くの修飾ピリミジンが合成され、ヌクレオチドへ組み込まれる。またプリンアナログも合成することができ、オリゴヌクレオチドへ組み込まれる。糖部分、ペントフラノ-ス環の2'位がメトキシ、プロポキシ、O-アルコキシまたはメトキシエトキシ基で置換される。リン酸または糖リン酸単位を交換するオリゴヌクレオチドの新しい骨格は、C-5プロピニルピリミジン修飾ホスホチオエートオリゴヌクレオチドのように作られる。5'末端および3'末端がメチルホスホチオエート、ホスホジエステル、またはメチルホスホネートのようなヌクレオチド間結合によって修飾されたキメラオリゴヌクレオチドも、使用できる。比較的新しい技術は、立体構造的に制限されたLNA(固定された核酸)オリゴヌクレオチドおよびペプチド核酸である。生物学リボザイムは構造的に様々であるが、それらの特異性はまた標的mRNA配列の認識に基づいている。

【0022】

遺伝子置換または遺伝子スイッチング技術は、その変異遺伝子配列を不活性化し、正しい配列を導入する。これは、正常なコーディング配列を有する外来遺伝子をトランスフェクトし、アンチセンスオリゴヌクレオチドで変異コーディング配列を遮断することによって遂行され得る。また、変異配列を妨害せず、正しい正常配列を導入するだけの技術も使用できる。これは、ヘテロ接合性細胞、すな

わち1つの正常対立遺伝子と1つの変異対立遺伝子を保持する細胞において使用することができ、それにより正常対立遺伝子を過剰発現する結果となる。ホモ接合性変異細胞もまた治療することができ、それによりドミナントポジティブ効果、すなわち正常対立遺伝子の変異対立遺伝子より高度に発現される結果となる。

【0023】

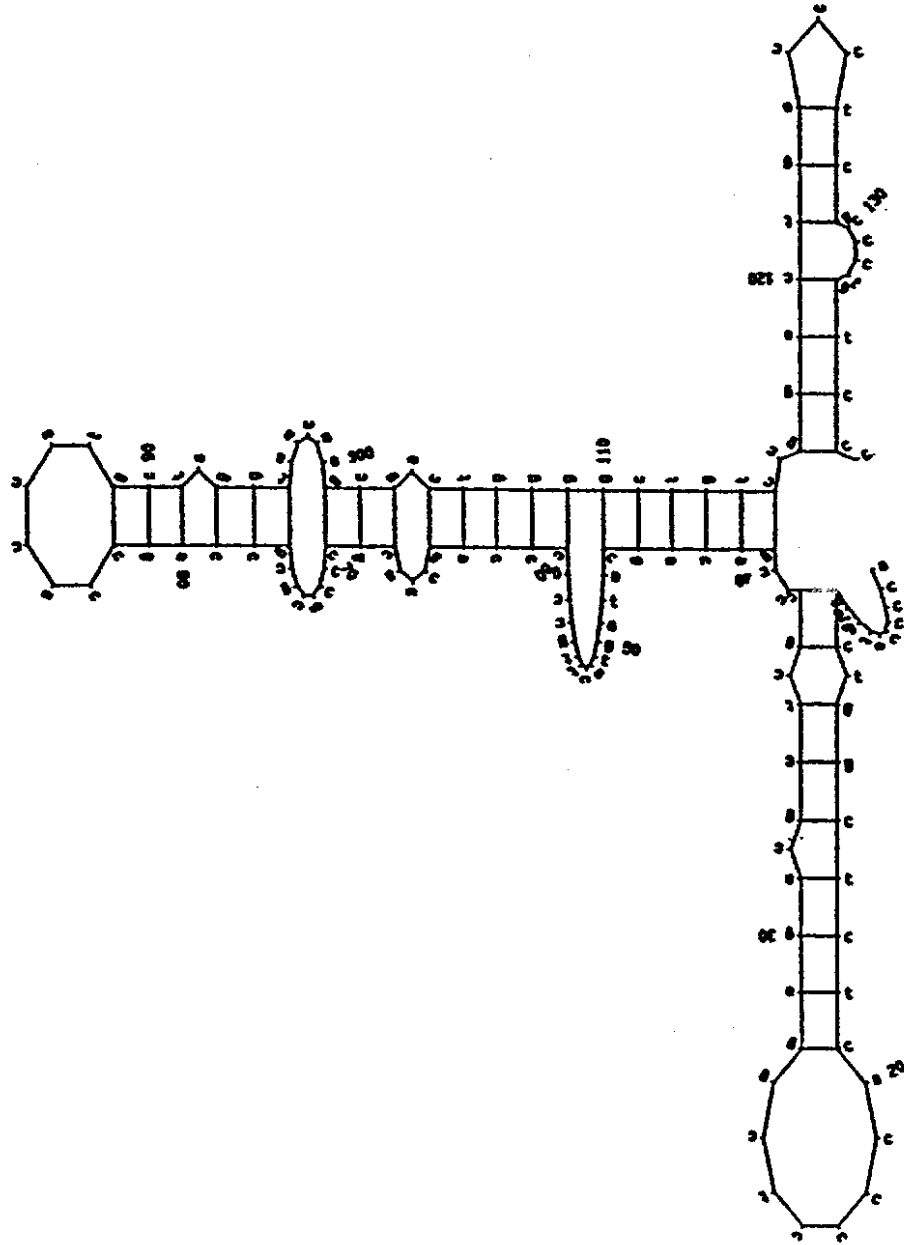
スキーム1

プレプロNPYmRNAの推定二次構造。このスキームは、ジーンバンク (GenBank) 登録番号K01911に公表された全プレプロNPYmRNA配列の5末端(1~138塩基)の推定構造を示す。その二次構造は、ウィスコンシン大学の遺伝学コンピューターグループのMFOLDプログラムを用いることによって推定された。

【0024】

【外1】

曲折図: *ossl.mfold* 2月 7. 19100 12:46
 (リニア) *MFOLD* of: *ossl.seq* T: 37.0 調査: 5173 from: 1 to: 138 2月 7. 19100 12:43
 長さ: 138 エネルギー: -28.4



【0025】

スキーム2

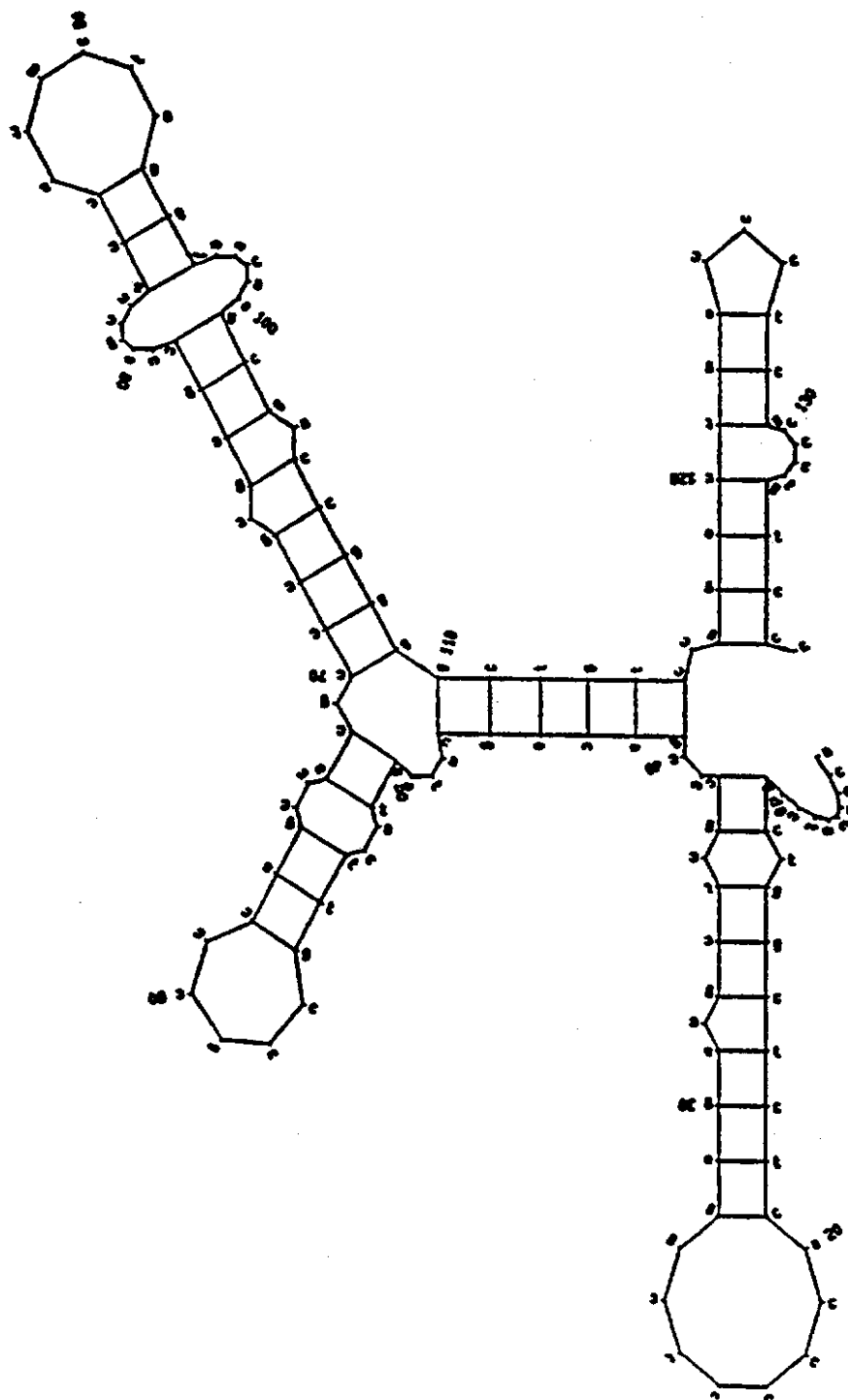
プレプロNPYmRNAの推定二次構造。このスキームは、ジーンバンク登録番号K01911に公表された全プレプロNPYmRNA配列の5'末端(1~138塩基)の推定構造を示す。その二次構造は、ウィスコンシン大学の遺伝学コ

ンピューターグループのMFOLDプログラムを用いることによって推定された。
。TからCへの変異塩基は塩基番号106である。

【0026】

【外2】

曲折図: *osa2.mfold* 2月 7. 19100 14.11
 (リニア) MFOLD of: *osa2.seq* r: 37.0 調査: 4310 from: 1 to: 138 2月 7. 19100 14:07
 長さ: 138 エネルギー: -26.4



【0027】

N P Y 遺伝子の機能における変異 N P Y 配列の影響は、トランスジェニック動物において研究され得る。トランスジェニック動物は標的相同組換え方法を用いることで作製し得る。ヒト N P Y シグナルペプチドの正常および変異配列の双方（またはプレプロ神経ペプチド Y（プレプロ N P Y）をコードするヌクレオチド配列からなるあらゆる DNA 配列、または成体マウスまたはヒトの成熟 N P Y ペプチドのアミノ酸をコードする領域であって、i）該プレプロ N P Y のシグナルペプチド部分の 7 位のロイシンアミノ酸がプロリンによって置換されたもの、または ii）該プレプロ N P Y のシグナルペプチド部分の 7 位のロイシンアミノ酸が置換されていないもののどちらかである領域）は、内因性シグナルペプチド配列を置換するために、N P Y 遺伝子の配列に導入されるだろう。これらの条件下で、プレプロ N P Y の合成が正常または変異したヒト N P Y シグナルペプチド配列のどちらかによって調節される以外は、内因性 N P Y 遺伝子は一方で正常に機能する。このトランスジェニックモデルは、非常に特異的な方法でその変異 N P Y 遺伝子の生理学的重要性を研究するために用いることができる。それはまた、変異 N P Y 遺伝子の影響を緩和するように設計される、新しい薬剤分子を研究およびスクリーニングするための理想的な前臨床モデルを提供することにもなるだろう。

【0028】

本発明は以下の実験においてより詳細に記載される。

【0029】

実験

材料と方法

研究被験者

本研究群は、クオピオ虚血性心臓疾患危険因子研究（K I H D）の協力者、すなわち心筋梗塞、アテローム性動脈硬化の進行、および中年男性におけるほかの多くの健康結果に対してそれまで未確定だった危険因子を研究するために 1980 年代に着手された疫学的研究に基づく群からなる（Salonen, 1988; Lakka et al., 1994）。本研究プロトコールはクオピオ大学の倫理調査委員会によって是認され、全協力者は K I H D に参加するために書面のインフォームドコンセント

を提出した。

【0030】

K I H D研究の全試料は、2つの集団に集められた2,682人の男性からなる。本研究は、1986年から1989年の間の研究で登録された42歳~、48歳、54歳~、および60歳男性の年齢層に分けられた試料(N=1,516、参加率82.6%)である第2集団に基づいている。DNA試料は、基準として冠状動脈性心臓病ではない1,137人の男性から得られた。

【0031】

アルコール消費量の評価

自己申告の量 - 頻度アンケート (Kauhanen et al., 1997a; Kauhanen et al., 1997b) は、アルコール服用レベルの記録のために使用した。純エタノールでのアルコールの週平均消費量(グラム/週)は、各飲料のタイプの既知のアルコール量ならびに報告された用量および飲む機会の頻度に基づいて計算された。我々はさらに、一日の平均消費量が標準用量の3倍(3 standard doses)を越える(>230グラム エタノール/週)服用者からなる重度の服用者の割合を計算した。1用量は、12 fl ozのビールのボトル、12 clのワイン、または4 cl量のハードリカーである。血清ガンマ - グルタミルトランスペプチダーゼ(GGT)および平均血球容量(MCV)が、過剰なアルコール服用のバイオマーカーとして基準血液試料から測定された。これらの生化学的な測定値は、いずれかの遺伝子型の群が事実上アルコール乱用の生化学的徴候を示すのかどうかを知るために調べられた。

【0032】

少なくとも12ヵ月間は全く飲んでいないと話す男性を節制家(N=123、全体の12.1%)として測定した。節制家は健康上の問題でお酒を止めていた男性からなる混成の群であるため、彼らについては最終的な解析から除外した。

【0033】

共変量

多くの社会人口学、行動および医学的性質は、以前に記載されたようにK I H Dプロトコールにより評価された(Salonen, 1988; Lakka et al., 1994; Kauha

unen et al., 1997a)。年齢、居住地域(都市/田舎)、婚姻状態、教育レベル、現所得、喫煙時代における喫煙歴、および診断された慢性病ならびに体調(虚血性心臓病、糖尿病、脳卒中、ガン、肝臓病、精神障害)歴およびトラウマ歴は、アンケートにより記録され、また臨床面談により再確認された。そのデータは、観察された関連性において混同する可能性のある効果を検討するために用いられた。

【0034】

遺伝子型分析

プレプロNPY遺伝子型は、表現型を知らない調査員によって被験者の抹消血液から抽出されたDNA由来の制限断片長多型(RFLP)分析により決定された。つまり、その多型は、BsiEI制限部位を生じるチミジン(1128)からシトシン(1128)への置換として現れ、以前に記載されたように(Karvonen et al., 1998)、Leu7Pro多型に関して被験者の遺伝子型を特定するのに用いられた。PCR産物はBsiEI(ニューイングランドバイオラプス社(New England Biolabs, Inc.)、ベバリー(Beverly)、MA、USA)によって消化され、消化物は2%アガロースゲルで電気泳動によって分析された。

【0035】

統計学的解析

対立遺伝子型の頻度分布は、 χ^2 検定によってハーディー-ワインベルグ平衡に対して検定された。遺伝子型群のあいだの平均週アルコール消費における統計学的な違いは、分散解析において検討された。年齢および他の共変量は、共分散解析に対して調整された。遺伝子型群における重度のドリンカーの割合は、カイ二乗検定を用いることで比較された。統計学的検定から得られた0.05以下のP値は、統計学的に有意であると考えられた。統計学的計算はIBP RS/6000のためのSPSSソフトウェアを用いて行った(SPSS for Unix(登録商標)、SPSS社製、シカゴ、米国)。

【0036】

結果

プレプロNPYのシグナルペプチド部分におけるLeu(7)からPro(7)

)への多型およびアルコール服用についての完全なる情報は、889人のアルコールを服用する男性において利用された。彼らのうち790人(88.9%)はLeu(7)/Leu(7)ホモ接合の遺伝子型であり、全体の95人(10.7%)はLeu(7)/Pro(7)ヘテロ接合の遺伝子型であり、4人(0.4%)はPro(7)/Pro(7)ホモ接合体であった。対立遺伝子型頻度は、94.2%(Leu)および5.8%(Pro)であった。1つまたは2つのPro(7)対立遺伝子を有する全ての男性はさらに解析するために集められた。本研究群は、ハーディー-ワインベルグ平衡におけるものである(カイ²=0.585、1d.f.、p=0.44)。

【0037】

表Iは社会人口学および行動的な背景である特徴、および2つのNPY遺伝子型群において病気と診断された男性の割合を示す。遺伝子型間でガンマグルトミルトランスペプチダーゼ(GGT)の血清レベルまたは平均血球容量(MCV)において違いはなかった。GGTの平均および標準偏差はLeu(7)/Leu(7)ホモ接合体では29.0U/l(SD29.4)であり、Pro(7)を有する群では29.7U/l(26.0)であった(p=0.83)。MCVの平均および標準偏差は、それぞれ92.0fl(SD4.52)および92.0fl(SD4.0)であった(p=0.93)。

【0038】

1週間の純エタノールグラムでのアルコール消費量を、表IIに表す。調整されていない平均消費量および共変量で調整された消費量は両方ともに、Pro(7)を有する男性群が有意により高かった(33パーセント)。重度のドリンカー(1週間にエタノールで平均230グラム以上または1日に標準量の3倍以上飲むと報告した男性)の割合についても、Pro(7)置換を有する男性群が高かった(13.1%対8.2%)(P=0.10)。

【0039】

【表1】

表1. NPY 遺伝子型による背景変量の平均(標準偏差)および割合

	Leu(7) ホモ接合 (N=790)	Pro(7) 保因者 (N=99)
年齢 (年)	56.1 (SD 6.7)	56.1 (SD 6.9)
田舎での居住	21.8 %	27.0 %
年収 (US \$)	24,130 (SD 15,198)	26,862 (SD 14,771)
教育レベル (1=低、7=高)	2.05 (SD 1.75)	2.13 (SD 1.92)
既婚	87.1 %	86.9 %
喫煙 (箱/年)	141.3 (SD 292.1)	147.4 (SD 311.7)
虚血性心臓病	21.1 %	13.1 %
糖尿病	5.6 %	5.1 %
ガン歴	2.4 %	5.1 %
脳卒中歴	2.6 %	1.0 %
肝臓病	0.4 %	1.0 %
精神障害歴	4.6 %	6.1 %
トラウマ歴	10.4 %	10.2 %

【0040】

【表2】

表 II. NPY 遺伝子型に基づく純エタノールでの平均週アルコール消費量

			P 値
	Leu (7) ホモ接合 (N=790)	Pro(7) 保因者 (N=99)	
未調整の平均アルコール消費量 (g/wk)	86.3 (SD 127.6)	115.0 (SD 173.9)	0.030
全ての共変量で調整された平均アルコール消費量 (g/wk) *	86.4	114.7	0.035

* 年齢、居住地域、教育、収入、婚姻状態、喫煙時代の喫煙歴、虚血性心臓病歴、糖尿病歴、ガン歴、脳卒中歴、肝臓病歴、精神障害歴、およびトラウマ歴に対して調整された。

【0041】

考察

我々は、神経ペプチドY (NPY) のシグナルペプチド部分のPro(7)によってLeu(7)が置換されている共通の多型において、変異体対立遺伝子に対するホモ接合またはヘテロ接合である中年男性の試料群において、アルコール消費の増加を観察した。Pro(7)の存在は、Leu(7)/Leu(7)遺伝子型を有するホモ接合体の被験者と比較すると、およそ3分の1(33%)より高いエタノールの平均消費量と関連していた。週にエタノールを230g以上服用すると報告する重度の消費者の割合もまた、Pro(7)変異を有する男性においてより高かったが、この違いについては被験者が少数であるため統計的有意性については調べなかった。

【0042】

我々の研究は、ヒトにおける共通のNPY多型とアルコール服用との間の関連性を示す最初のものである。その結果は、中枢神経系におけるNPYのレベルとアルコール嗜好との間の反比例の関係を示している多くの最近の動物での研究結

果 (Ehlers et al., 1998a; Ehlers et al., 1998b; Thiele et al., 1998; Cockerill, 1998; Tecott and Heberlien, 1998) と一致している。神経ペプチドが欠如したマウスは、正常あるいはより多い神経ペプチド Y レベルを有するマウスと比較すると、とくにアルコールを好み、エタノール効果に対して感受性が低く (Thiele et al., 1998)、アルコールを好むラットは、扁桃腺、海馬および前頭皮質における N P Y レベルがより低い (Ehlers et al., 1998a)。

【0043】

我々の研究における対立遺伝子の頻度は、以前にフィンランド人の2つの群で観察された頻度とよく似ている (Karvonen et al., 1998)。フィンランド人は遺伝的にむしろホモ接合体群であることが知られているため、観察された関連性はサンプリング時、または群の混合における階層化の誤りによるものでは到底ありえない。

【0044】

多くの社会人口学的因子は、既知のアルコール服用の決定因子である。我々の研究における P r o (7) を有する男性群および有さない男性群での社会的背景は類似していた。その2つの群は、同年齢で同じような教育的背景を有した。P r o (7) を有する男性には田舎の地域社会在住の者がわずかに多く、この群はまたわずかにより高い所得を有した。喫煙歴は両群において類似していた。以前の研究結果では、この遺伝子型はより低い総コレステロールおよび L D L コレステロール血清レベルと関連していることが示されているため、L e u (7) ホモ接合体の群で虚血性心臓病歴のより高い罹患率を観察することはあまり予測されなかった (Karvonen et al., 1998)。多重変数モデルにおけるそれらの多くの変数すべての調整は、N P Y 多型とアルコール消費量との間で観察された関連性に影響を及ぼさなかったため、それらの変数は結果を混乱させないということを示唆する。

【0045】

アルコール服用における N P Y の影響を説明することができる生理学的にもっともらしい機序がいくつかある。N P Y は脳内で広く作用する抑制神経モジュレーターである。N P Y 受容体は、サイクリック A M P の産生を抑制するヘテロ三

量体Gタンパクと結合するので(Thiele et al., 1998; Lamme, 1995)、NPYはアルコールに反応してcAMP産生を抑制し、その結果アルコール摂取量を制限する可能性がある。NPYの中樞神経投与は不安を減少させ、NPYが不足したマウスは不安を測定すると高値であった(Heilig et al., 1992; Palmiter et al., 1998)。アルコール嗜好の進展は、不安を減少させるNPYが比較的欠損していることに一部依存し得る。

【0046】

ラットにおける慢性的なエタノール投与は、食物制限と一応同様に視床下部におけるNPYレベルに影響を及ぼす(Ehlers et al., 1998a)。NPYは、短期の食物摂取を強く刺激することによって、エネルギーバランスの視床下部調節において重要な役割を担う(Clark et al., 1985; Levine and Morley, 1985; Stanley and Leibowitz, 1985)。中樞神経投与されたNPYはまた、リポタンパク質リパーゼのmRNAの発現を増加させ、脂質貯蔵を支持する白色脂肪細胞における酵素活性を高める(Billington et al., 1991; Billington et al., 1994)。したがって、NPYは、食物摂取およびアルコール飲用の両方の点で完了行動に非特異的に影響し得る。しかしながら、食物摂取を調節と思われる領域である視床下部の弓状核において、NPY導入遺伝子発現は欠如している(Thiele et al., 1998; Palmiter et al., 1998)。このことは、アルコール服用におけるNPYの効果はおそらく食物およびカロリー摂取と同様な機序を通しては媒介されないことを示す。

【0047】

我々の理解のために、神経ペプチドYと依存症との間の可能性のある関連性を検討するただ1つの以前のヒトでの研究がある。ロイおよびその共同研究者ら(1990)は、男性のアルコール依存症と正常な対照との間での脳脊髄液(CFS)のNPYレベルの有意差については観察しなかった。しかしながら、アルコール依存症は、おおむね群を占めているのではない。また、NPYのCFSレベルが、中樞神経系の生理学的に重要な位置においてこのペプチドの活性に反映するかどうかについては明らかではない。

【0048】

プラズマNPYは交感神経系の末端神経に由来し、したがって、プラズマ内のNPYレベルは交感神経活性レベルに反映する(Lundberg et al., 1990)。有意な正相関は、NPYレベルとコルチコトロピン放出ホルモン、ソマトスタチンおよび脳脊髄液内の成長ホルモンとの間に観察されている(Roy et al., 1990)。これらの研究と我々の研究結果に基づいて、飲用行為における可能な交感神経系の機序についてのさらなる研究が保証される。

【0049】

本発明の方法は多様な実施態様の形で具体化されることができ、本明細書中にはその実施態様のほんの少ししか開示されていないことが理解されるだろう。ほかの実施態様が存在し、それが本発明の精神から逸脱しないことは、本分野の専門家には明白であろう。したがって、記載された実施態様は説明のためのものであり、限定として解釈されるべきものではない。

【0050】

[参考文献]

- Ault DT, Radeff JM, Werling LL. 1998. Modulation of (3H)dopamine release from rat nucleus accumbens by neuropeptide Y may involve a signal-like receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 284:553-560.
- Billington CJ, Briggs JE, Grace M, Levine AS. 1991. Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *Am J Physiol* 260: R321-R327.
- Billington CJ, Briggs JE, Harker S, Grace M, Levine AS. 1994. Neuropeptide Y in hypothalamic paraventricular nucleus: a center coordinating energy metabolism. *Am J Physiol* 266: R1765-R1770.
- Clark JT, Kalra PS, Kalra SP. 1985. Neuropeptide Y stimulates feeding but inhibits sexual behavior in rats. *Endocrinology* 117:2435-2442.
- Cockerill M. 1998. Low levels of brain chemicals drives mice to drink. *Brit Med J* 317: 1544.
- Ehlers CL, Li TK, Lumeng L, Hwang BH, Somes C, Jimenez P, Mathe AA. Neuropeptide Y levels in ethanol-naive alcohol-preferring and nonpreferring

- rats and in Wistar rats after ethanol exposure. 1998a. *Alcohol Clin Exp Res* 8:1778-1782.
- Ehlers CL, Somes C, Cloutier D. 1998b. Are some of the effects of ethanol mediated through NPY? *Psychopharmacology* 139:136-144.
- Gray TS, Morley JE. 1986. Neuropeptide Y: anatomical distribution and possible function in mammalian nervous system. *Nature* 38:389-401.
- Heilig M, McLeod S, Koob GK, Britton KT. 1992. Anxiolytic-like effect of neuropeptide Y (NPY), but not other peptides in an operant conflict test. *Regul Pept* 41:61-69.
- Jewett DC, Cleary J, Levine AS, Schaal DW, Thompson T. 1992. Effects of neuropeptide Y on food-reinforced behavior in satiated rats. *Pharmacol Biochem Behav* 42:207-212.
- Karvonen MK, Pesonen U, Koulu M, Niskanen L, Laakso M, Rissanen A, Dekker JM, Hart LM, Valve R, Uusitupa MIJ. 1998. Association of a leucine(7)-to-proline(7) polymorphism in the signal peptide of neuropeptide Y with high serum cholesterol and LDL cholesterol levels. *Nature Med* 4:1434-1437.
- Kauhanen J, Kaplan GA, Goldberg DE, Salonen JT. 1997a. Beer drinking and mortality: results from the Kuopio ischaemic heart disease risk factor study, a prospective population based study. *Brit Med J* 315:846-851.
- Kauhanen J, Kaplan GA, Goldberg D, Cohen RD, Lakka TA, Salonen JT. 1997b. Frequent hangovers and cardiovascular mortality in middle-aged men. *Epidemiology* 8:310-314.
- Lakka TA, Venalainen JM, Rauramaa R, Salonen R, Tuomilehto J, Salonen JT. 1994. Relation of leisure-time physical activity and cardiorespiratory fitness to the risk of acute myocardial infarction in men. *N Engl J Med* 330:149-154.
- Lamme VAF. 1995. The neurophysiology of figure-ground segregation in primary visual cortex. *J Neurosci* 15:1605-1615.

Levine AS, Morley JE. 1985. Neuropeptide Y: a potent inducer of consummatory behavior in rats. *Peptides* 5:1025-1029.

Lundberg JM, Terenius L, Hokfelt T, Martling CR, Tatemoto K, Mutt V, Polak J, Bloom S, Goldstein M. 1982. Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function. *Acta Physiol. Scand* 116:477-480.

Lundberg JM, Franco-Cereceda A, Hemsén A, Lacroix JS, Pernow J. 1990. Pharmacology of noradrenaline and neuropeptide tyrosine (NPY)-mediated sympathetic cotransmission. *Fundam Clin Pharmacol* 4:373-391.

Palmiter RD, Erickson JC, Hollopeter G, Baraban SC, Schwartz MW. 1998. Life without neuropeptide Y. *Recent Prog Horm Res* 53:163-199.

Roy A, Berrettini W, DeJong J, Adinoff B, Ravitz B, Linnoila M. 1990. CSF neuropeptide Y in alcoholics and normal controls. *Psychiatry Res* 33:215-219.

Salonen JT. 1988. Is there a continuing need for longitudinal epidemiologic research? The Kuopio ischemic heart disease risk factor study. *Ann Clin Res* 20:46-50.

Stanley BG, Leibowitz SF. 1985. Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: a powerful stimulant of feeding behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 3940-3943.

Stewart RB, Gatto GJ, Lumeng L, Li T-K, Murphy JM. 1993. Comparison of alcohol-preferring (P) and nonpreferring (NP) rats on tests of anxiety and for the anxiolytic effects of alcohol. *Alcohol* 10:1-10.

Tecott LH, Heberlein U. 1998. Y do we drink? *Cell* 95:733-735.

Thiele TE, Marsh DJ, Ste Marie L, Bernstein IL, Palmiter RD. 1998. Ethanol consumption and resistance are inversely related to neuropeptide Y levels. *Nature* 396:366-369.

【図面の簡単な説明】

【図1 a】

図1 aはヒトNPY遺伝子、プレプロNPYペプチドおよび成熟NPYペプチドの分子構造を図式的に説明したものである。

【図1 b】

図1 bはヒトNPY遺伝子のヌクレオチド配列を示す。大文字はエキソン配列、小文字はイントロン配列を示す。ジーンバンク登録番号をカッコ内に示す。矢印は正常な遺伝子のチミジン(T)がシトシン(C)によって置きかえられ、突然変異遺伝子が生じる位置を示す。エキソン2の下線の配列は28アミノ酸のシグナルペプチドをコードする配列である(エキソン1は配列番号1であり、エキソン2は配列番号2、エキソン3は配列番号3およびエキソン4は配列番号4である)。

【図1 c】

図1 cはヒトプレプロNPY mRNAのヌクレオチド配列を示す(配列番号5、配列番号6に示すタンパク質配列を有する)。矢印は、正常なmRNAのチミジン(t)がシトシン(c)によって置きかえられ、変異mRNAが生じる位置を示す。

【配列表】


```

<210> 4
<211> 300
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4
ccttacatgc ttcgcttctt atgttttaca ggcttgaaga ccttgcaatg tggatgatggg 60
aatgagact tgcctctctgg ccttttcccta ttttcagccc atatttcato gtgtaaaacg 120
agaatccacc catcctacca atgcatgcag ccactgtgct gaattctgca atgttttccct 180
ttgtcatcat tgtatatatg tgtgttttaa taaagtatca tgcattcaaa agtgtatcct 240
cctcaatgaa aaatctatta caatagttag gattattttc gttaaactta ttattaacaa 300

<210> 5
<211> 551
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (87)..(377)

<220>
<221> sig_peptide
<222> (87)..(170)

<400> 5
accccatccg ctggctctca ccctcggag acgctcgccc gacagcatag tacttgccgc 60
ccagccaecg ccgcgcgcca gccacc atg cta ggt aac aag cga ctg ggg ctg 113
Met Leu Gly Asn Lys Arg Leu Gly Leu
1 5

tcc gga ctg acc ctg gcc ctg tcc ctg ctg gtc tgc ctg ggt gcg ctg 161
Ser Gly Leu Thr Leu Ala Leu Ser Leu Leu Val Cys Leu Gly Ala Leu
10 15 20 25

gcc gag gcg tac ccc tcc aag ccg gac aac ccg ggc gag gac gca cca 209
Ala Glu Ala Tyr Pro Ser Lys Pro Asp Asn Pro Gly Glu Asp Ala Pro
30 35 40

gcg gag gac atg gcc aga tac tac tcc gcg ctg cga cac tac atc aac 257
Ala Glu Asp Met Ala Arg Tyr Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn
45 50 55

ctc atc acc agg cag aga tat gga aaa cga tcc agc cca gag aca ctg 305
Leu Ile Thr Arg Gln Arg Tyr Gly Lys Arg Ser Ser Pro Glu Thr Leu
60 65 70

att tca gac ctg ttg atg aga gaa agc aca gaa aat gtt ccc aga act 353
Ile Ser Asp Leu Leu Met Arg Glu Ser Thr Glu Asn Val Pro Arg Thr
75 80 85

cgg ctt gaa gac cct gca atg tgg tgatgggaaa tgagacttgc tctctggcct 407
Arg Leu Glu Asp Pro Ala Met Trp
90 95

tttctatttt tcagcccata tttcatcgtg taaaacgaga atccacccat cctaccaatg 467
catgcagcca ctgtgctgaa ttttgcaatg ttttcttttg tcatcattgt atatatgtgt 527
gtttaaataa agtatcatgc attc 551

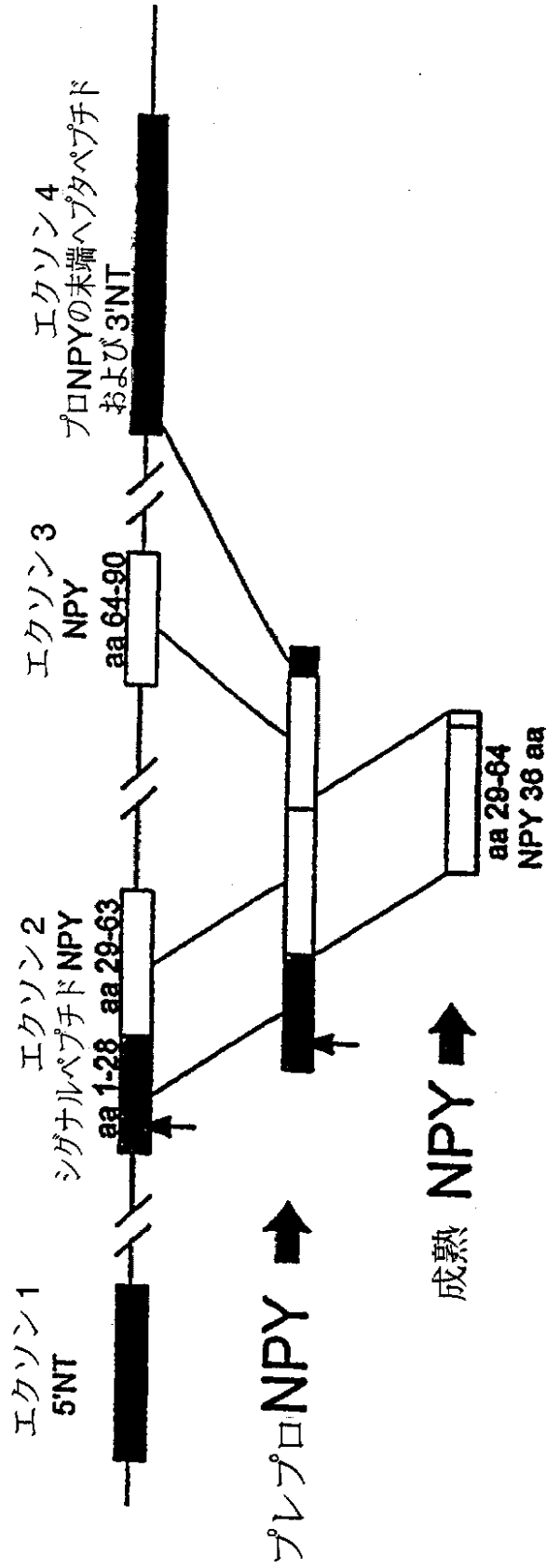
```

<210> 6
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 6
 Met Leu Gly Asn Lys Arg Leu Gly Leu Ser Gly Leu Thr Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Val Cys Leu Gly Ala Leu Ala Glu Ala Tyr Pro Ser Lys
 20 25 30
 Pro Asp Asn Pro Gly Glu Asp Ala Pro Ala Glu Asp Met Ala Arg Tyr
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr Arg Gln Arg Tyr
 50 55 60
 Gly Lys Arg Ser Ser Pro Glu Thr Leu Ile Ser Asp Leu Leu Met Arg
 65 70 75 80
 Glu Ser Thr Glu Asn Val Pro Arg Thr Arg Leu Glu Asp Pro Ala Met
 85 90 95

 Trp

【図1a】



【図1b】

ヒト神経ペプチド Y (NPY) 遺伝子

エクソン1 (M14295)

```

1   cegcttcttc aggcagtgcc tggggcgga gggttgggt gtgggtgget ccctaagtcg
61  acactcgtgc ggtgcgggt ccagccccct ccccccgcca ctcaggggcy ggaagtggcg
121 ggtgggagtc acccaagcgt gactgceega ggeccctcct gccgcggcga ggaagctcca
181 taaaagccct gtegcgacc gctctctgca CCCCATCCGC TGGCTCTCAC CCCTCGGAGA
241 CGCTCGCCCG ACAGCATAGT ACTTGCCGCC CAGCCACGCC CGCGCGCCAG CCACCGTGAG
301 tgctacgacc cgtctgtcta ggggt

```

エクソン2 (M14296)

```

1   cccgtccggt gagccttctg tgectgcaga TGCTAGGTAA CAAGCGACTG GGGCTGTCCG
61  GACTGACCCT CGCCCTGTCC CTGCTCGTGT GCCTGGGTGC GCTGGCCGAG GCGTACCCCT
121 CCAAGCCGGA CAACCCGGGC GAGGACGCAC CAGCGGAGGA CATGCCAGA TACTACTCAG
181 CGCTGCGACA CTACATCAAC CTCATCACCA GGCAGAGgtg gytgggaccg cgggaccgat
241 tccggga

```

エクソン3 (M14297)

```

1   acttgcttta aaagactttt tttttccag ATATGGAAA CGATCTAGCC CAGAGACACT
61  GATTTCAGAC CTCTGATGA GAGAAAGCAC AGAAATGTT CCCAGAACTC Ggtatgacaa
121 ggcttgtgat ggggacattg tt

```

エクソン4 (M14298)

```

1   CCTTACATGC TTTGCTTCTT ATGTTTACA Ggcttgaaga ccctgcaatg tggatgatggg
61  aaatgagact tgetctctgg ccttttcta ttttcagccc atatttcate gtgtaaaacg
121 agaatccacc catcctacca atgcatgcag ccactgtgct gaattctgca atgttttctt
181 ttgtcatcat tgtatatatg tgtgtttaa taaagtatca tgcattcaaa agtgtatcct
241 cctcaatgaa aaatctatta caatagtgag gattattttc gttaaactta ttattaacaa

```

【図1c】

ヒト神経ペプチド Y (NPY) mRNA

K01911

```

1   acccatccg ctggctctca cccctcggag acgctcgccc gacagcatag tacttgccgc
61  ccagccacgc ccgcgcgcca gccaccatgc taggtaacaa gcgacgggg ctgtccggac
121 tgaccctcgc cctgtccctg ctcgtgtgcc tgggtgcgct ggccgagcgc taccctcca
181 agccggacaa cccgggcgag gacgcaccag cggaggacat ggccagatac tactcggcgc
241 tgcgacacta catcaacctc atcaccaggc agagatatgg aaaacgatcc agcccagaga
301 cactgatttc agacctctg atgagagaaa gcacagaaa tgttcccaga actcggcttg
361 aagaccctgc aatgtggtga tgggaatga gacttgctct ctggcctttt cctattttca
421 gccatattt catcgtgtaa aacgagaatc cacccatcct accaatgcat gcagccactg
481 tgctgaattc tgcaatgttt tcctttgtca tcattgtata tatgtgtgtt taaataaagt
541 atcatgcatt c

```

【国際調査報告】

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No. PCT/FI 01/00103
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: C12Q 1/68, C07K 14/575, A61K 48/00 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)		
IPC7: C12Q, G01N, C07K, A61K, C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	Alcoholism: clinical and experimental research, Volume 24, No 5, 2000, T. Okubo et al, "Polymorphism of the neuropeptide Y gene an association study with alcohol withdrawal" column 35 --	1-9
A	WO 9932518 A1 (HORMOS MEDICAL OY LTD.), 1 July 1999 (01.07.99), claims 1-20, abstract --	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family 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 application or patent 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 June 2001		Date of mailing of the international search report 28 -06- 2001
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86		Authorized officer Lars Wallentin/ELY Telephone No. +46 8 782 25 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI 01/00103

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Alcohol Clin Exp Res, Volume 6, June 1999, Hwang BH et al, "Innate differences of neuropeptide Y (NPY) in hypothalamic nuclei and central nucleus of the amygdala between selectively bred rats with high and low alcohol preference", abstract --	1
A	Alcohol Clin Exp Res, Volume 22, No 8, November 1998, Ehlers CL et al, "Neuropeptide Y levels in ethanol-naive alcohol-preferring and nonpreferring rats and in Wistar rats after ethanol exposure", page 1778 - page 1782, abstract -- -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/FI01/00103

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item I 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.: 7
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 7 relate to a method of treatment of the human body by therapy/ Rule 39.1(iv). Nevertheless, a search has been executed for this claim. The search has been based on the alleged effects of the treatment.
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:

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.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

28/05/01

International application No.

PCT/FI 01/00103

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WD 9932518 A1	01/07/99	AU 1673599 A	12/07/99
		CN 1282338 T	31/01/01
		EP 1037922 A	27/09/00
		NO 20003116 A	18/08/00
		US 6046317 A	04/04/00

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
C 1 2 Q	1/68	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/15		33/50	Z
	33/50		33/53	D
	33/53			M
			33/566	
	33/566	C 1 2 N	15/00	Z N A A
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E , T R) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W			
(72)発明者	カルボネン、マツチ フィンランド共和国、フィン - 20700 ツ ルク、カスケンカツ 11 セー 54			
(72)発明者	ベソネン、ウツラマリ フィンランド共和国、フィン - 20900 ツ ルク、ルオディッコクヤ 6			
(72)発明者	コウル、マルック フィンランド共和国、フィン - 20700 ツ ルク、コチカツ 4 ベー 8			
(72)発明者	ウーシツパ、マツチ フィンランド共和国、フィン - 70260 ク オピオ、ベリラハデンチエ 10			
Fターム(参考)	2G045 AA25 AA29 AA40 CA26 CB17 DA12 DA13 DA14 DA36 DA77 FB02 FB03 FB07 4B024 AA01 AA11 CA03 CA09 DA02 HA01 HA12 HA17 4B063 QA01 QA12 QA19 QQ43 QR32 QR55 QS34 4C084 AA16 NA14 ZC392 4C086 AA01 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZC39			

专利名称(译)	诊断与人体酒精依赖有关的风险		
公开(公告)号	JP2003527865A	公开(公告)日	2003-09-24
申请号	JP2001569409	申请日	2001-02-06
[标]申请(专利权)人(译)	Yusshikauhanen		
申请(专利权)人(译)	Horomосу医疗公司 尤西Kauhanen		
[标]发明人	カウハネンユッシ カルボネンマツチ ペソネンウツラマリ コウルマルック ウーシツパマツチ		
发明人	カウハネン、ユッシ カルボネン、マツチ ペソネン、ウツラマリ コウル、マルック ウーシツパ、マツチ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K38/00 A61K45/00 A61K48/00 A61P25/32 C07K14/575 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6883 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/00 A61K48/00 A61P25/32 C07K14/57545 C12Q1/6883 C12Q2600/156		
FI分类号	A61K31/7088 A61K45/00 A61K48/00 A61P25/32 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53. D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/CA26 2G045/CB17 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045 /DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB07 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA03 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/HA01 4B024/HA12 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063 /QA12 4B063/QA19 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS34 4C084/AA16 4C084/NA14 4C084/ZC392 4C086/AA01 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086 /ZC39		
优先权	60/219324 2000-03-21 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及诊断人类易患酒精中毒的易感性的方法。本发明还涉及一种治疗被诊断为有酗酒危险的人以预防所述病症发作的方法。本发明还涉及使用动物模型例如转基因动物来研究或筛选可用于预防或治疗酒精依赖的药物或遗传靶标的方法。

(リニテ) FIELD of: 0081.000 0: 37.0 調査: 5173 from: 1 to: 139 2月
頁数: 139 工業部: -28,4

