

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5721150号
(P5721150)

(45) 発行日 平成27年5月20日 (2015. 5. 20)

(24) 登録日 平成27年4月3日 (2015. 4. 3)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A
G O 1 N 33/53 (2006. 01)	G O 1 N 33/53 M

請求項の数 3 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2013-52314 (P2013-52314)	(73) 特許権者	504013775
(22) 出願日	平成25年3月14日 (2013. 3. 14)		学校法人 埼玉医科大学
(62) 分割の表示	特願2007-194922 (P2007-194922) の分割		埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38
原出願日	平成19年7月26日 (2007. 7. 26)	(74) 代理人	100163647
(65) 公開番号	特開2013-126422 (P2013-126422A)		弁理士 進藤 卓也
(43) 公開日	平成25年6月27日 (2013. 6. 27)	(74) 代理人	100182084
審査請求日	平成25年4月8日 (2013. 4. 8)		弁理士 中道 佳博
		(74) 代理人	100123489
			弁理士 大平 和幸
		(72) 発明者	井上 聡
			埼玉県日高市山根1397-1 学校法人
			埼玉医科大学内
		(72) 発明者	井上 公仁子
			埼玉県日高市山根1397-1 学校法人
			埼玉医科大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 加齢黄斑変性症の発症リスクの予測方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

加齢黄斑変性症の発症リスクの予測システムであって、
被験試料における一塩基多型 (SNP) のタイピングの結果を入力するための手段；
加齢黄斑変性症の易罹患性に関連するSNPを設定するための手段；および
該入力されたタイピング結果と該設定とに基づいて、該易罹患性であるか否かを判定する手段；
を備え、

該加齢黄斑変性症の易罹患性に関連するSNPが、以下の米国バイオテクノロジー情報センター (NCBI) SNPデータベースのrs番号で示されるSNPおよび該rs番号で示されるSNPと連鎖不均衡の関係にあるすべてのSNPからなる群より選択される少なくとも1つのSNPであり、ここで、該rs番号で示されるSNPが、TRIM29遺伝子イントロン1に存在する配列番号1で示される塩基配列の31番目の塩基 (rs666432で示される遺伝子多型の部位)、およびTRIM29遺伝子プロモーター領域に存在する配列番号2で示される塩基配列の31番目の塩基 (rs2511023で示される遺伝子多型の部位) であり、

該易罹患性の設定が、それぞれ、rs666432ではアレルT；rs2511023ではアレルC；およびこれらの連鎖不均衡の関係にあるアレルであり、そして

該判定手段において、該タイピング結果が、該易罹患性の設定の少なくとも1つに該当する場合を易罹患性であると判定し、そして該当しない場合を易罹患性でないと判定する

予測システム。

【請求項 2】

前記加齢黄斑変性症の易罹患性に関連する SNP が、配列番号 1 で示される塩基配列の 3 1 番目の塩基 (r s 6 6 6 4 3 2 で示される遺伝子多型の部位)、配列番号 3 で示される塩基配列の 3 1 番目の塩基 (r s 6 2 0 6 0 2 で示される遺伝子多型の部位)、配列番号 4 で示される塩基配列の 3 1 番目の塩基 (r s 5 8 2 0 7 1 で示される遺伝子多型の部位)、配列番号 5 で示される塩基配列の 3 1 番目の塩基 (r s 6 5 7 8 9 8 で示される遺伝子多型の部位)、配列番号 6 で示される塩基配列の 3 1 番目の塩基 (r s 6 7 3 2 9 2 で示される遺伝子多型の部位)、配列番号 7 で示される塩基配列の 3 1 番目の塩基 (r s 5 9 0 0 0 5 で示される遺伝子多型の部位)、配列番号 8 で示される塩基配列の 3 1 番目の塩基 (r s 5 9 6 9 1 1 で示される遺伝子多型の部位)、配列番号 9 で示される塩基配列の 3 1 番目の塩基 (r s 6 5 9 9 1 2 で示される遺伝子多型の部位)、配列番号 1 0 で示される塩基配列の 3 1 番目の塩基 (r s 1 2 4 1 8 6 0 1 で示される遺伝子多型の部位)、および配列番号 2 で示される塩基配列の 3 1 番目の塩基 (r s 2 5 1 1 0 2 3 で示される遺伝子多型の部位) からなる群より選択される、請求項 1 に記載の予測システム。

10

【請求項 3】

前記被験試料において前記 SNP をタイピングするための手段をさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の予測システム。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、加齢黄斑変性症の発症リスクの予測システムおよびその方法に関する。

【背景技術】

【0002】

加齢黄斑変性症 (AMD) は、高齢者の眼底において、網膜中心部の黄斑部に組織の変性や血管新生が起こって視機能障害に至る加齢性眼科疾患であり、我が国を含む先進国において増加傾向にある疾患である。

【0003】

AMD は、近年その患者数が増加しており、現在 50 歳以上の人口の約 0.9% が罹患していると考えられている。そのため、数百万人単位の高齢者の QOL が著しく損なわれる疾患として注目されている。

30

【0004】

本症に対する治療としては、視力低下発症後のものが主体であるため、病状が進行してからの治療については効果が限られているのが現状である。したがって、AMD の早期診断を可能にする予後予測因子、さらにはピンポイントに効果的な治療を可能にする分子標的を解明することは、診断技術の向上、新たな治療薬の開発、高齢者の視力維持などの面から重要な課題である。

【0005】

AMD の発症リスク因子として、近年、補体 H 因子 (CFH) (非特許文献 1 ~ 3) およびセリンプロテアーゼ遺伝子 HTRA1 近傍 (非特許文献 4 および 5) の遺伝子多型が同定され、本症が遺伝的背景により強く影響を受ける可能性が示された。しかしながら、これらの従来報告された遺伝子多型がどのように疾患発症に関与するかのメカニズムについては不明な点が多く、AMD の診断・治療の分子標的として十分であるかについては明らかでない。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献 1】 Klein RJ ら、Science 308(5720), p.385-389 (2005)

【非特許文献 2】 Edwards AO ら、Science 308(5720), p.421-424 (2005)

50

【非特許文献3】Haines JLら、Science 308(5720), p.419-421 (2005)

【非特許文献4】Yang Zら、Science 314(5801), p.992-993 (2006)

【非特許文献5】Dewan Aら、Science 314(5801), p.989-92 (2006)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、加齢黄斑変性症の発症リスクの予測システムおよびその方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、加齢黄斑変性症の発症リスクの予測システムを提供し、該予測システムは、被験試料における一塩基多型(SNP)のタイピングの結果を入力するための手段；加齢黄斑変性症の易罹患性に関連するSNPを設定するための手段；および該入力されたタイピング結果と該設定とに基づいて、該易罹患性であるか否かを判定する手段；を備え、

該加齢黄斑変性症の易罹患性に関連するSNPが、以下の米国バイオテクノロジー情報センター(NCBI)SNPデータベースのrs番号で示されるSNPおよび該rs番号で示されるSNPと連鎖不均衡の関係にあるすべてのSNPからなる群より選択される少なくとも1つのSNPであり、ここで、該rs番号で示されるSNPが、ANKRD38 20 遺伝子イントロン7に存在するrs2765241、ANKRD38 遺伝子エクソン7に存在するrs2666472およびrs2258470；XRCC4 遺伝子上流領域に存在するrs40214、XRCC4 遺伝子プロモーター領域に存在するrs1993948およびrs2075685、XRCC4 遺伝子エクソン6に存在するrs3734091、およびXRCC4 遺伝子上流領域に存在するrs6869366；TRIM29 遺伝子イントロン1に存在するrs666432およびTRIM29 遺伝子プロモーター領域に存在するrs2511023；CHST11 遺伝子イントロン4に存在するrs10507180；およびIBSP 遺伝子イントロン4に存在するrs1870964であり、

該易罹患性の設定が、それぞれ、rs2765241ではアレルC；rs2666472ではアレルC；rs2258470ではアレルG；rs40214ではアレルA；rs 30 1993948ではアレルT；rs2075685ではアレルG；rs3734091ではアレルC；rs6869366ではアレルT；rs666432ではアレルT；rs2511023ではアレルC；rs10507180ではアレルC；rs1870964ではアレルT；およびこれらの連鎖不均衡の関係にあるアレルであり、そして

該判定手段において、該タイピング結果が、該易罹患性の設定の少なくとも1つに該当する場合を易罹患性であると判定し、そして該当しない場合を易罹患性でないと判定する。

【0009】

1つの実施態様では、上記加齢黄斑変性症の易罹患性に関連するSNPは、rs2765241、rs958803、rs2765270、rs2666474、rs2666 40 473、rs2765244、rs2765247、rs2666472、rs2258470、rs2260581、rs2262106、rs2765248、rs2765249、rs2666503；rs40214、rs1993948、rs2075685、rs255561、rs10462394、rs1871203、rs6860752、rs6452501、rs6895174、rs6452503、rs4266384、rs1478487、rs3734091、rs16876476、rs4343818、rs6869366、rs1157801、rs27214、rs40213、rs37541、rs2731853、rs6882057、rs9885046、rs6864054；rs666432、rs620602、rs582071、rs657898、rs673292、rs590005、rs596911、rs659912、r 50

s 1 2 4 1 8 6 0 1、rs 2 5 1 1 0 2 3；rs 1 0 5 0 7 1 8 0；rs 1 8 7 0 9 6 4、およびrs 4 6 9 3 8 7 7からなる群より選択される。

【0010】

1つの実施態様では、上記予測システムは、上記被験試料において上記SNPをタイピングするための手段をさらに含む。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、AMD感受性遺伝子マーカー（AMD易罹患リスクマーカー）として、5遺伝子領域に関連した連鎖不均衡ハプロタイプブロックが明らかになり、これらを疾患罹患の難易を判定するマーカーとして利用できる。AMD感受性遺伝子マーカーは、著しい視力低下を来し得るAMDの発症と進行を予測する因子として有用である。そのため、早期にAMD発症リスクのある人の診断が可能となり、リスクが高い人に関しては、より頻回に眼科検査を受けることにより、発症した場合に早期から治療を開始することが可能になり、高齢者における視力障害患者数の減少が期待される。したがって、本発明を利用して、疾患発症以前から罹患リスクを予測して疾患予防を行うこと、さらにはAMD患者に対して、最適な薬剤と治療法を選択することが可能になる。また、これら疾患遺伝子そのものを分子標的とした治療法・予防方法への実用化も期待できる。

【発明を実施するための形態】

【0012】

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、NCBI（NLM、NIH）のSNPデータベースおよびIMS-JST（東京大学、科学技術振興財団）のJSNP（登録商標）データベースが挙げられる。本発明におけるSNPは、上記NCPI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、本発明においては、特定のSNPを、このNCPIのSNPデータベースのrs番号で記載する。

【0013】

生物集団において2つの密に連鎖した遺伝子座における特定の対立遺伝子の組み合わせ出現頻度が、それぞれの遺伝子頻度から推定される期待値と異なる場合を連鎖不均衡という。連鎖不均衡が起こるためには、2つの遺伝子座の物理的距離が非常に近いことが必須である。本発明においては、2つのSNPにおける特定のアレルの組み合わせがある集団内で頻度が高く、2つのSNPの挙動が独立ではない状態を、「連鎖不均衡の関係にあるSNP」という。また、ハプロタイプとは、一倍体染色体上の連続した遺伝子群または遺伝子領域のことである。同一染色体上で統計学的に見て関連のある、つまり遺伝的に連鎖しているSNPなどの組合せをいう。

【0014】

本発明において、「加齢黄斑変性症（AMD）の遺伝子マーカー」とは、AMDに関する遺伝因子の目印（マーカー）となる遺伝子をいう。このような遺伝子はSNPを含み、そしてその対立遺伝子（アレル）としてAMD感受性遺伝子を含む。「AMD感受性遺伝子」とは、この遺伝子を保有することにより、単独でまたは他の環境因子や遺伝因子との相互作用により、AMDの易罹患性を高める遺伝子をいう。

【0015】

本発明者らは、AMD罹患者と非罹患者において、ヒトゲノム遺伝子のマーカーとして選択された5万余のSNPを集めたDNAアレイによる網羅的解析を行い、AMD罹患と強く相関し（ $P < 0.0005$ ）、遺伝子領域および近傍領域に存在するSNPの同定を行った。その中には、AMD罹患との相関が既知であるHTRA1プロモーター領域も含まれていたことから、被験者集団と解析技術の妥当性が検証された。新規AMD感受性

10

20

30

40

50

遺伝子として、過去に眼科疾患の易罹患性との相関が知られていない複数個のSNPが同定され、さらにそれらSNPと連鎖不均衡の関係にあり、遺伝子転写調節を行い得る転写因子の結合性が変化し得るSNPとコードする蛋白質のアミノ酸が変異するSNPについて、罹患リスクとの相関を検出した。

【0016】

本発明では、AMD感受性遺伝子として、新たにANKRD38 (ankyrin repeat domain 38) 遺伝子 (NM_181712)、XRC4 (X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4) 遺伝子 (NM_003401、NM_022406、およびNM_022550)、TRIM29 (tripartite motif-containing 29) 遺伝子 (NM_012101)、CHST11 (carbohydrate sulfotransferase 11) 遺伝子 (NM_018413)、およびIBSP (integrin-binding sialoprotein) 遺伝子 (NM_004967) の5遺伝子を明らかにした。ここで、NM番号は、各遺伝子のmRNAを特定するNCBIのヌクレオチドデータベースのアクセッション番号である。

10

【0017】

AMD感受性遺伝子マーカーとして、以下の領域に含まれるSNPが挙げられる：

- (1) ANKRD38 遺伝子エクソン7領域およびイントロン7領域；
- (2) XRC4 遺伝子上流領域およびプロモーター領域 (転写開始点より100キロ塩基対までを含む) およびエクソン6領域；
- (3) TRIM29 遺伝子プロモーター領域およびイントロン1領域；
- (4) CHST11 遺伝子イントロン4領域；および
- (5) IBSP 遺伝子イントロン4領域。

20

【0018】

以下、これらのAMD感受性遺伝子マーカーについて、それぞれ具体的に説明する。

【0019】

(1) ANKRD38 遺伝子におけるAMD感受性遺伝子マーカーとしては、ANKRD38 遺伝子イントロン7に存在するC/T多型のrs2765241、ANKRD38 遺伝子エクソン7に存在するC/T多型のrs2666472およびA/G多型のrs2258470、およびこれらのSNPと連鎖不均衡の関係にあるすべてのSNPが挙げられる。rs2765241ではアレルC；rs2666472ではアレルC；およびrs2258470ではアレルGである場合が、易罹患性を示すアレルである。以下の表1に、rs2765241に対して連鎖不均衡の関係にあるSNPを示す。なお、上記rs2765241、rs2666472、およびrs2258470は、互いに連鎖不均衡の関係にあり、以下の表1ではこれらを太字で示す。

30

【0020】

【表 1】

ANKRD38

SNP	易罹患性	難罹患性	r^2
rs2765241	C	T	-
rs12122645	G	A	0.812
rs2457810	A	G	0.845
rs2457808	G	T	0.845
rs2457806	A	T	0.845
rs2666482	T	G	0.845
rs982504	C	T	0.845
rs958803	A	G	1
rs2765270	C	T	1
rs2666474	A	C	1
rs2666473	C	T	1
rs2765244	G	T	1
rs2765247	C	T	1
rs2666472	C	T	1
rs2258470	G	A	1
rs2260581	G	A	1
rs2262110	T	C	0.921
rs2262106	T	C	1
rs2765248	C	T	1
rs2765249	A	G	1
rs2666503	C	T	1
rs2666506	C	T	0.813
rs2666507	C	T	0.862
rs2666508	G	A	0.921
rs2765251	C	A	0.796

10

20

30

【0021】

表 1 中、 r^2 値は、一番上に太字で記載した rs 番号の SNP に対する相関係数を表す。例えば、 $r^2 = 0.81$ の場合は $r = 0.9$ であるので、約 90% の確率で SNP が対応することを意味する。したがって、 $r^2 = 1$ の場合は、100% の確率で SNP が対応する。 r^2 値については、以下の表 2 ~ 5 についても同様である。

【0022】

上記遺伝子マーカーの SNP タイピングの結果、上記表 1 に示す易罹患性のアレルを保有している場合に、特に、 r^2 値が 1 の SNP において易罹患性を示すアレルである場合に、AMD に罹患し易いと判定できる。

40

【0023】

(2) XRCC4 遺伝子における AMD 感受性遺伝子マーカーとしては、XRCC4 遺伝子上流領域に存在する A/G 多型の rs40214、XRCC4 遺伝子プロモーター領域に存在する A/T 多型の rs1993948 および G/T 多型の rs2075685、XRCC4 遺伝子エクソン 6 に存在する A/C 多型の rs3734091、および XRCC4 遺伝子上流領域に存在する G/T 多型の rs6869366、およびこれらの各 SNP と連鎖不均衡の関係にあるすべての SNP が挙げられる。rs40214 ではアレル A；rs1993948 ではアレル T；rs2075685 ではアレル G；rs3734091 ではアレル C；ならびに rs6869366 ではアレル T である場合が、易罹患性を示すアレルである。以下の表 2 に、太字で記載した上記各 rs 番号の SNP について連鎖

50

不均衡の関係にあるSNPを示す。

【0024】

【表2】

XRCC4

SNP	易罹患性	難罹患性	r^2
rs40214	A	G	-
rs256795	G	A	0.938

SNP	易罹患性	難罹患性	r^2
rs1993948	T	A	-

SNP	易罹患性	難罹患性	r^2
rs3734091	C	A	-
rs16876476	T	C	1
rs4343818	T	A	1

SNP	易罹患性	難罹患性	r^2
rs2075685	G	T	-
rs1875992	C	T	0.928
rs899548	C	G	0.878
rs1044363	G	A	0.882
rs255561	G	T	1
rs10462394	A	C	1
rs1871203	C	A	1
rs6867727	A	G	0.715
rs6860752	A	G	1
rs6452501	G	A	1
rs6895174	A	T	1
rs6452503	T	A	1
rs4266384	A	G	1
rs1478487	T	A	1
rs7736289	G	A	0.748
rs7736296	G	T	0.766
rs7718284	T	C	0.717
rs7718472	T	G	0.766
rs11750799	G	T	0.809
rs1017794	C	A	0.753
rs6896953	G	T	0.766
rs9293330	G	C	0.766
rs10076059	G	A	0.712
rs1564211	T	C	0.766
rs7703318	A	T	0.766

SNP	易罹患性	難罹患性	r^2
rs6869366	T	G	-
rs37547	G	T	0.837
rs1157801	T	C	1
rs1875993	A	G	0.885
rs1875992	C	T	0.718
rs378147	A	T	0.917
rs27214	T	G	1
rs40213	T	C	1
rs37541	A	G	1
rs43218	G	A	0.917
rs2731853	T	C	1
rs7734651	G	T	0.896
rs6882057	T	A	1
rs9885046	A	T	1
rs6864054	A	G	1
rs10462397	C	T	0.836
rs10474081	C	G	0.836

【0025】

上記遺伝子マーカーのSNPタイピングの結果、上記表2に示す易罹患性のアレルを保有している場合に、特に、 r^2 値が1のSNPにおいて易罹患性を示すアレルである場合に、AMDに罹患し易いと判定できる。

【0026】

(3) TRIM29遺伝子におけるAMD感受性遺伝子マーカーとしては、TRIM29遺伝子イントロン1に存在するC/T多型のrs666432、TRIM29遺伝子プロモーター領域に存在するC/T多型のrs2511023、およびこれらの各SNPと連鎖不均衡の関係にあるすべてのSNPが挙げられる。rs666432ではアレルT；ならびにrs2511023ではアレルCである場合が、易罹患性を示すアレルである。

10

20

30

40

50

以下の表 3 に、太字で記載した上記各 r s 番号の S N P について連鎖不均衡の関係にある S N P を示す。

【 0 0 2 7 】

【表 3】

TRIM29

SNP	易罹患性	難罹患性	r^2
rs666432	T	C	-
rs620602	G	A	1
rs582071	A	G	1
rs657898	C	T	1
rs673292	T	C	1
rs590005	A	T	1
rs596911	T	C	1
rs659912	C	T	1
rs12418601	T	C	1
rs11217755	A	G	0.955
rs4938791	A	G	0.948

10

SNP	易罹患性	難罹患性	r^2
rs2511023	C	T	-

20

【 0 0 2 8 】

上記遺伝子マーカーの S N P タイピングの結果、上記表 3 に示す易罹患性のアレルを保有している場合に、特に、 r^2 値が 1 の S N P において易罹患性を示すアレルである場合に、A M D に罹患し易いと判定できる。

【 0 0 2 9 】

(4) C H S T 1 1 遺伝子における A M D 感受性遺伝子マーカーとしては、C H S T 1 1 遺伝子イントロン 4 に存在する C / T 多型の r s 1 0 5 0 7 1 8 0、および該 S N P と連鎖不均衡の関係にあるすべての S N P が挙げられる。r s 1 0 5 0 7 1 8 0 ではアレル C である場合が、易罹患性を示すアレルである。以下の表 4 に、太字で記載した上記各 r s 番号の S N P について連鎖不均衡の関係にある S N P を示す。

30

【 0 0 3 0 】

【表 4】

CHST11

SNP	易罹患性	難罹患性	r^2
rs10507180	C	T	-
rs17035997	A	G	0.742
rs10861259	C	T	0.742
rs12426450	G	A	0.742

40

【 0 0 3 1 】

上記遺伝子マーカーの S N P タイピングの結果、上記表 4 に示す易罹患性のアレルを保有している場合に、特に、 r^2 値が 1 の S N P において易罹患性を示すアレルである場合に、A M D に罹患し易いと判定できる。

【 0 0 3 2 】

(5) I B S P 遺伝子における A M D 感受性遺伝子マーカーとしては、I B S P 遺伝子イントロン 4 に存在する G / T 多型の r s 1 8 7 0 9 6 4、および該 S N P と連鎖不均衡

50

の関係にあるすべてのSNPが挙げられる。rs1870964ではアレルTである場合が、易罹患性を示すアレルである。以下の表5に、太字で記載した上記各rs番号のSNPについて連鎖不均衡の関係にあるSNPを示す。

【0033】

【表5】

IBSP

SNP	易罹患性	難罹患性	r ²
rs1870964	T	G	-
rs17013159	G	C	0.806
rs3805376	A	G	0.854
rs4693877	C	G	1
rs17013175	A	G	0.734
rs17013181	A	G	0.743

10

【0034】

上記遺伝子マーカーのSNPタイピングの結果、上記表5に示す易罹患性のアレルを保有している場合に、特に、r²値が1のSNPにおいて易罹患性を示すアレルである場合に、AMDに罹患し易いと判定できる。

20

【0035】

このように、本発明においては、被験者について上記AMD感受性遺伝子マーカーのSNPをタイピングすることにより、被験者がAMDに罹患し易いかどうかについて予測することができる。

【0036】

被験者がAMDに罹患し易いかどうかについて予測するための、本発明のAMDの発症リスクの予測システムは、

被験試料におけるSNPのタイピングの結果を入力するための手段；

加齢黄斑変性症（AMD）の易罹患性に関連するSNPを設定するための手段；および該入力されたタイピング結果と該設定とに基づいて、該易罹患性であるか否かを判定する手段；を備える。好ましくは、この予測システムは、被験試料においてSNPをタイピングするための手段をさらに含む。

30

【0037】

被験試料は、被験者の核酸またはゲノムDNAを含む試料、あるいは核酸またはゲノムDNA自体である。例えば、血液や体液などの生体試料や、これらから調製された核酸やゲノムDNAが挙げられる。生体試料の採取方法、採取部位などは、特に制限されず、また、核酸やゲノムDNAの調製方法も従来公知の方法を適用でき、特に制限されない。

【0038】

本発明において、「遺伝子マーカーのSNPのタイピング」とは、上記遺伝子マーカーの遺伝子に含まれるSNPをタイピングすることをいう。本発明において、「SNPのタイピング」とは、ゲノム上の位置が明らかとなっている上記SNPの多型部位がどの塩基であるかを同定することであって、例えば、AとGとから構成されるSNPを対立遺伝子で見た場合、その被験試料の被験者の遺伝子型が、AとGとのいずれであるかを同定することをいう。SNPのタイピング方法は、特に制限されず、従来公知の方法により行うことができ、例えば、Invader（登録商標）（Third Wave Technologies社）法、TaqMan（登録商標）（Applied Biosystems社）法、MALDI-TOF質量分析法、PCR法、またはPCR法によらない迅速DNA増幅法（SMAF法）、マイクロアレイ法、シーケンズ法などが挙げられる。本発明のAMD感受性遺伝子マーカーについては、既にSNPの多型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。

40

50

【0039】

本発明においては、好適には、SNPのタイピングは、目的のSNPについての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ポリヌクレオチド、ならびに該ポリヌクレオチドにおいて該SNPの部分以外の1個から数個の塩基が、欠失、置換、または付加されかつ該ポリヌクレオチドと相補的な配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドからなる群より選択されるポリヌクレオチドを、プローブやプライマーとして用いて行われる。

【0040】

本発明において、「ポリヌクレオチド」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體や類縁体などをいう。一本鎖であってもよく、二本鎖であってもよい。このようなポリヌクレオチドにおいて、欠失、置換、または付加が可能な塩基数としては、例えば、1~10個、好ましくは、1~5個、より好ましくは、1または2個である。上記ストリンジェントな条件は、例えば、 $5 \times SSC + 0.3\% SDS$ 中で熱変性した後、65℃で4~16時間ハイブリダイゼーションし、常温の $2 \times SSC + 0.1\% SDS$ 、および、 $2 \times SSC$ でそれぞれ5分間洗浄し、 $0.05 \times SSC$ でリンスすることなどが挙げられる。ポリヌクレオチドの製造方法は、特に制限されず、例えば、従来公知の方法により化学合成により製造してもよく、酵素的にインビボまたはインビトロで製造してもよい。また、ポリヌクレオチドは、必要に応じて、例えば、蛍光物質およびクエンチャーが結合されていてもよい。

【0041】

このような「ポリヌクレオチド」は、SNPのタイピングにおいて、プローブやプライマーとして使用され得る。その塩基配列は、当業者であれば、容易に設計できる。ポリヌクレオチドの長さとしては、特に制限されず、例えば、10mer~500mer、好ましくは15mer~250mer、より好ましくは20mer~100merである。配列の設計には、配列表に記載の配列の他、上記NM番号などのデータベースアクセス番号で特定されるAMD感受性遺伝子マーカーの各遺伝子の配列も利用できる。また、ポリヌクレオチドは、必要に応じて、SNPの多型部位を含むのであっても、SNPの多型部位を含まずその周辺配列からなるものであってもよい。

【0042】

被験試料においてSNPをタイピングするための手段とは、上記のSNPのタイピング方法を行うための手段をいう。例えば、SNPのタイピング用マイクロアレイやSNPのタイピングキットが挙げられる。

【0043】

例えば、マイクロアレイには、上記ポリヌクレオチドのスポットが配置される。マイクロアレイの製造方法は、特に制限されず、例えば、基板表面上で直接プローブのポリヌクレオチドを合成する方法（オンチップ法）や、予め調製したプローブを基板表面に固定する方法などの従来公知の方法が挙げられる。オンチップ法としては、例えば、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方法が挙げられる。また、予め調製したプローブを用いる方法としては、例えば、プローブ溶解液をインクジェット法により基材に微小滴下して、化学的または物理的に固定する方法が挙げられる。マイクロアレイに用いる基材としては、特に制限されず、例えば、ガラス、金属、プラスチックなどが挙げられる。

【0044】

上記ポリヌクレオチドやマイクロアレイは、AMD感受性遺伝子マーカーのSNPのタイピングキットに用いられ得る。SNPタイピングキットは、上記ポリヌクレオチドおよび/またはマイクロアレイの他、SNPのタイピング方法に応じて、適切な試薬などを含むことが好ましい。

【0045】

上記のSNPのタイピング手段によって得られた結果は、通常、被験試料におけるSN

10

20

30

40

50

Pのタイピングの結果を入力するための手段によって、コンピュータなどに手動でまたは自動的に入力される。入力された結果は、AMDの易罹患性に関連するSNPを設定するための手段により予め設定された易罹患性または難罹患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、易罹患性であるか否かについて判定される。これらの手段は、例えば、コンピュータやコンピュータで作動するソフトウェアプログラムであり得る。

【0046】

SNPのタイピングは、1つのSNPのみについて行ってもよく、判定の精度の向上を考慮すると、2以上のSNPについて行われることが好ましい。複数のSNPタイピングの結果を組み合わせると総合的に判定することがさらに好ましい。複数のSNPで易罹患性であると判定されると、より罹患のリスクが高いと推定される。そのため、より頻回に眼科検査を受けることにより、発症した場合に早期から治療を開始することが可能になる。さらに、疾患発症以前から罹患リスクを予測して疾患予防を行うことも可能である。

10

【実施例】

【0047】

文書署名にて遺伝子解析の同意が得られた51～88歳の日本人で、AMD罹患者134名および対照者106名について、血液よりDNAを抽出し、DNAアレイ(AFFYMETRIX社製のGeneChip(登録商標) Mapping 50K Array Hind)により5万余のSNPにおけるアレルを決定した。各SNPとAMD易罹患性との相関解析を行った。具体的には、Agilent Technologies社ソフトウェア「GeneSpring GT(登録商標)」による「ケース・コントロール相関解析」および「回帰分析」を行った。その結果、以下のSNPを、AMD罹患性難易と有意に相関するAMD感受性候補遺伝子マーカーとして選定した。

20

【0048】

(1) ANKRD38 遺伝子イントロン6に存在する2つのSNP(rs2765249およびrs2765248)、ならびにイントロン7に存在するSNP(rs2765241)；

(2) XRCC4 遺伝子上流領域[転写開始点より76～78キロ塩基対(kbp)上流]に存在する2つのSNP(rs256795およびrs40214)；

(3) TRIM29 遺伝子イントロン1に存在するSNP(rs666432)；

(4) CHST11 遺伝子イントロン4に存在するSNP(rs10507180)；
および

30

(5) IBSP 遺伝子イントロン4に存在するSNP(rs1870964)。

【0049】

次に、さらに多くの遺伝子解析対象者数について、すなわち、上記の対象者を含むAMD罹患者185名および対照者133名について、上記AMD感受性候補遺伝子マーカーおよびその周辺に存在しかつ連鎖不均衡の関係(2つのSNPにおける特定のアレルの組み合わせが、ある集団内で頻度が高く、そして2つのSNPの挙動が独立ではない関係)にあるSNP、ならびにAMD感受性候補遺伝子マーカー周辺のアミノ酸変異を起こす(ミスセンス変異)SNPについて、Applied Biosystems社製のTaqMan(登録商標) SNP Genotyping Assaysを用いて、AMD感受性遺伝子マーカー探索の2次スクリーニングを行った。罹患者と対象者との間で各アレルの出現頻度(P値)およびオッズ比(OR)について、Fisher's exact testにて検定を行った。その結果、上記(1)～(3)の遺伝子について、以下のrs番号のSNPが、統計学的に有意であることが明らかになった。それぞれの結果を、以下の表6～8に示す。また、(4)および(5)については、上記AMD罹患者134名および対照者106名についての詳細な解析結果を、それぞれ表9および10に示す。

40

【0050】

(1) ANKRD38 遺伝子において、rs2765241はアレルCが疾患易罹患性、アレルTが難罹患性と有意に相関した($P = 6.8E - 5$)。rs2765241と連鎖不均衡の関係にあるANKRD38 遺伝子エクソン7上の2つのミスセンス変異SNP(rs2666472; A840V、rs2258470; R822H)については、前

50

者でアレルC（アラニンをコード）が疾患易罹患性、アレルT（バリンをコード）が難罹患性と有意に相関し（ $P = 1.1 \times 10^{-4}$ ）、後者でアレルG（アルギニンをコード）が疾患易罹患性、アレルA（ヒスチジンをコード）が難罹患性と有意に相関した（ $P = 1.1 \times 10^{-4}$ ）。

【0051】

【表6】

rs2765241

	C	T	p(C)	p(T)
罹患者	318	52	0.859	0.141
対象者	194	72	0.729	0.271
	易罹患性	難罹患性	易罹患性	難罹患性

$P = 6.8 \times 10^{-5}$

OR = 2.7

10

rs2666472

A840V

	Ala	Val	Ala	Val
	C	T	p(C)	p(T)
罹患者	315	53	0.856	0.144
対象者	194	72	0.729	0.271
	易罹患性	難罹患性	易罹患性	難罹患性

$P = 1.1 \times 10^{-4}$

OR = 2.2

20

rs2258470

R822H

	Arg	His	Arg	His
	G	A	p(G)	p(A)
罹患者	316	54	0.854	0.146
対象者	192	72	0.727	0.273
	易罹患性	難罹患性	易罹患性	難罹患性

$P = 1.1 \times 10^{-4}$

OR = 2.2

30

【0052】

(2) XRCC4 遺伝子において、転写開始点より 77 kbp 上流の rs40214 は、アレルAが易罹患性、アレルGが難罹患性と有意に相関した（ $P = 0.0064$ ）。XRCC4 遺伝子プロモーター領域にある rs1993948（-1,036bp）と rs2075685（-651bp）は、前者でアレルTが易罹患性、アレルAが難罹患性と有意に相関し（ $P = 0.011$ ）、後者でアレルGが易罹患性、アレルTが難罹患性と有意に相関した（ $P = 0.0084$ ）。rs1993948とrs2075685は、それぞれ転写因子結合部位における結合能変化に關与する塩基位置に相当すると予想され、前者はPOU2F1およびOct-2、後者はSPI-1の結合性を变化させる可能性が考

40

【0053】

【表7】

rs40214

	A	G	p(A)	p(G)
罹患者	242	62	0.796	0.204
対象者	159	71	0.691	0.309
	易罹患性	難罹患性	易罹患性	難罹患性

P=0.0064

OR=1.7

rs1993948

	T	A	p(T)	p(A)
罹患者	276	82	0.771	0.229
対象者	180	86	0.677	0.323
	易罹患性	難罹患性	易罹患性	難罹患性

P=0.011

OR=1.6

rs2075685

	G	T	p(G)	p(T)
罹患者	281	83	0.772	0.228
対象者	180	86	0.677	0.323
	易罹患性	難罹患性	易罹患性	難罹患性

P=0.0084

OR=1.6

rs3734091

A247S

	Ala	Ser	p(C)	p(A)
罹患者	335	33	0.910	0.090
対象者	224	42	0.842	0.158
	易罹患性	難罹患性	易罹患性	難罹患性

P=0.012

OR=1.9

rs6869366

	T	G	p(T)	p(G)
罹患者	318	52	0.859	0.141
対象者	204	62	0.767	0.233
	易罹患性	難罹患性	易罹患性	難罹患性

P=0.0033

OR=1.9

【0054】

(3) TRIM29 遺伝子において、イントロン1のrs666432はアレルTが易罹患性、アレルCが難罹患性と有意に相関した ($P = 5.1 \times 10^{-4}$)。TRIM29 遺伝子プロモーター領域にあるrs2511023 (-281bp)は、アレルCが易罹患性、アレルTが難罹患性と有意に相関した ($P = 0.012$)。rs666432とrs2511023は、それぞれ転写因子結合部位における結合能変化に關与する塩基位置に相当すると予想され、前者はGATA-2、SPI-1、POU2F1およびOct-2の結合性を、そして後者はUSF2、Sp1、E47、CAC-結合蛋白質などの複数の転写因子の結合性を变化させる可能性が考えられる。

【0055】

10

20

30

40

【表 8】

rs666432

	T	C	p(T)	p(C)
罹患者	188	182	0.508	0.492
対象者	98	168	0.368	0.632
	易罹患性	難罹患性	易罹患性	難罹患性

P=5.1E-4

OR=1.8

rs2511023

	C	T	p(C)	p(T)
罹患者	337	29	0.921	0.079
対象者	226	38	0.856	0.144
	易罹患性	難罹患性	易罹患性	難罹患性

P=0.012

OR=2.0

【0056】

(4) CHST11 遺伝子イントロン4のrs10507180は、転写因子結合部位における結合能変化に関与する塩基位置に相当すると予想され(A P - 1の結合性に関与)、転写調節に関連するSNPである可能性が考えられる。

【0057】

【表 9】

rs10507180

	C	T	p(C)	p(T)
罹患者	136	130	0.511	0.489
対象者	74	138	0.349	0.651
	易罹患性	難罹患性	易罹患性	難罹患性

P=4.3E-4

OR=1.9

【0058】

(5) IBSP 遺伝子イントロン4のrs1870964は、転写因子結合部位における結合能変化に関与する塩基位置に相当すると予想され(ICSBPの結合性に関与)、転写調節に関連するSNPである可能性が考えられる。

【0059】

【表 10】

rs1870964

	T	G	p(T)	p(G)
罹患者	58	192	0.232	0.768
対象者	20	186	0.097	0.903
	易罹患性	難罹患性	易罹患性	難罹患性

P=1.5E-4

OR=2.8

【0060】

本解析によりANKRD38、XRCC4、TRIM29、CHST11、およびIBSPの5遺伝子周辺におけるSNPは、AMD易罹患性を診断・予測する有効な遺伝子マーカーであることが示された。

【産業上の利用可能性】

【0061】

10

20

30

40

50

本発明によれば、AMD易罹患性と有意な相関を示すANKRD38、XRCC4、TRIM29、CHST11、およびIBSP各遺伝子周辺のSNPをタイピングすることにより、AMDの発症リスクを予測することができる。AMD診断・予防への応用可能な遺伝子マーカーとして産業上の利用価値があり、早期に実用化が可能であると考えられる。DNAチップや、PCRを用いない迅速で簡便な診断装置の開発も進んでおり、これらの技術を用いた臨床検査方法へも活用できる。受託解析や簡便な検査方法を用いて、AMD感受性遺伝子マーカーの遺伝子型を決定することにより、AMD発症ハイリスク群を同定し、早期にAMD発症リスクのある人の診断が可能となる。リスクが高い人に関しては、より頻回に眼科検査を受けることにより、発症した場合に早期から治療を開始することが可能になり、高齢者における視力障害患者数の減少が期待される。このように、早期予防ならびに早期治療を行うことで、高齢者の視機能の維持とQOL向上を目指すこともできる。さらには高齢者の医療費の削減も期待される。

10

【0062】

ANKRD38、XRCC4、TRIM29、CHST11、およびIBSP遺伝子が、AMD感受性遺伝子であることが明らかになったため、これらの遺伝子を標的とした新たなAMD治療方法および創薬の開発に応用することができると考えられる。

【0063】

さらに、AMD感受性遺伝子の発現量を調節することにより、培養細胞や動物レベルで、該遺伝子が発症にどれだけ貢献し得るかを研究することが可能になり、AMD分子標的治療への直接的実用化が期待される。

20

【0064】

上記AMD感受性遺伝子を分子標的とした薬剤の開発に関しては、遺伝子発現量を直接調節できる核酸および核酸を発現させる組換えウイルスや蛋白質発現量を調節する中和抗体の作製、また既存の薬物をスクリーニングすることにより、各遺伝子の発現量を制御する薬剤を決定することにより、新規AMD治療薬の開発が可能である。また、AMDのテーラーメイド医療も可能となり得る。現在、我が国においても増加傾向にあり、高齢者の中途失明原因として重要性が高まっているAMDに対する分子標的治療薬が実用化されることは、製薬産業上の価値が高く、罹患者およびその家族、さらには社会全体にも利益還元が期待される。

【配列表】

30

0005721150000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 森 圭介
埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 学校法人 埼玉医科大学内
- (72)発明者 米谷 新
埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 学校法人 埼玉医科大学内
- (72)発明者 神田 将和
埼玉県日高市山根1397-1 学校法人 埼玉医科大学内
- (72)発明者 岡崎 康司
埼玉県日高市山根1397-1 学校法人 埼玉医科大学内

審査官 藤井 美穂

- (56)参考文献 国際公開第2006/062716(WO, A1)
国際公開第01/016364(WO, A1)
Science, 2005年, Vol.308, p.385-389
Science, 2005年, Vol.308, p.419-421
Science, 2005年, Vol.308, p.421-424
Science, 2006年, Vol.314, p.992-993
Science, 2006年, Vol.314, p.989-992

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90
C12Q 1/68
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/WPIDS/MEDLINE/BIOSIS(STN)
Thomson Innovation