

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 1 2 Q 1/68	A 2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/68			Z 2 G 0 5 4
		G 0 1 N 21/78	C 4 B 0 2 4
G 0 1 N 21/78		27/62	V 4 B 0 6 3
27/62		33/53	M
審査請求 未請求 請求項の数 23 O L (全 17数) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2002 - 89960(P2002 - 89960)	(71)出願人	591108880 国立循環器病センター総長 大阪府吹田市藤白台5丁目7番1号
(22)出願日	平成14年3月27日(2002.3.27)	(71)出願人	598004952 医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構 東京都千代田区霞が関3丁目3番2号 新霞が 関ビル9階
		(72)発明者	岩井 直温 大阪府吹田市藤白台5丁目7番地1号 国立循 環器病センター内
		(74)代理人	100102978 弁理士 清水 初志 (外 1 名)
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 酸化ストレスが関与する疾患の発症しやすさに影響する遺伝性素因を有するか否かを検査するための方法

(57)【要約】

【課題】 酸化ストレスが関与する疾患の発症しやすさに影響する遺伝性素因を有するか否かを検査するための方法を提供することを課題とする。また、該検査のための試薬を提供することを課題とする。

【解決手段】 本発明者らは、H0-1 のプロモーター領域において新たに見出した多型と酸化ストレスが関与する疾患である虚血性心疾患との関連を検討した。その結果、片方のアレルのみに多型が検出される場合または両方のアレル共に多型が検出されない場合に酸化ストレスが関与する疾患に発症しやすい遺伝性素因を有し、両方のアレル共に多型が検出される場合に該疾患に発症しにくい遺伝性素因を有することが判明した。従って、H0-1 遺伝子のプロモーター領域における多型を解析することで、酸化ストレスが関与する疾患の発症しやすさに影響する遺伝性素因を有するか否かを検査することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 酸化ストレスが関与する疾患の発症しやすさに影響する遺伝性素因を有するか否かを検査するための方法であって、ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の多型を検出する工程を含み、片方のアレルのみに多型が検出される場合または両方のアレル共に多型が検出されない場合に該疾患に発症しやすい遺伝性素因を有すると判定され、両方のアレル共に多型が検出される場合に該疾患に発症しにくい遺伝性素因を有すると判定される方法。

【請求項 2】 ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の多型が、酸化ストレスに応答して該遺伝子の発現を上昇させる多型である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 多型が一塩基多型である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】 多型が、ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の多型であって、配列番号：1 に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の多型である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】 疾患が、循環器疾患または炎症性疾患である、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】 疾患が、虚血性心疾患、動脈硬化、腎疾患、閉塞性肺疾患、または、リウマチである、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】 以下の (a) ～ (d) の工程を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の方法。

- (a) 被検者からDNA試料を調製する工程
- (b) ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1 に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAを単離する工程
- (c) 単離したDNAの塩基配列を決定する工程
- (d) 工程 (c) により決定したDNAの塩基配列を、対照と比較する工程

【請求項 8】 以下の (a) ～ (d) の工程を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の方法。

- (a) 被検者からDNA試料を調製する工程
- (b) 調製したDNA試料を制限酵素により切断する工程
- (c) DNA断片をその大きさに応じて分離する工程
- (d) 検出されたDNA断片の大きさを、対照と比較する工程

【請求項 9】 以下の (a) ～ (e) の工程を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の方法。

- (a) 被検者からDNA試料を調製する工程
- (b) ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1 に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAを増幅する工程
- (c) 増幅したDNAを制限酵素により切断する工程
- (d) DNA断片をその大きさに応じて分離する工程
- (e) 検出されたDNA断片の大きさを、対照と比較する工程

工程

【請求項 10】 以下の (a) ～ (e) の工程を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の方法。

- (a) 被検者からDNA試料を調製する工程
- (b) ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1 に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAを増幅する工程
- (c) 増幅したDNAを一本鎖DNAに解離させる工程
- (d) 解離させた一本鎖DNAを非変性ゲル上で分離する工程

10

- (e) 分離した一本鎖DNAのゲル上での移動度を対照と比較する工程

【請求項 11】 以下の (a) ～ (d) の工程を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の方法。

- (a) 被検者からDNA試料を調製する工程
- (b) ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1 に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAを増幅する工程
- (c) 増幅したDNAを、DNA変性剤の濃度が次第に高まるゲル上で分離する工程
- (d) 分離したDNAのゲル上での移動度を対照と比較する工程

20

【請求項 12】 以下の (a) ～ (d) の工程を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の方法。

- (a) (i) ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1 に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNA、および (ii) 該DNAにハイブリダイズするヌクレオチドプローブが固定された基板、を提供する工程
- (b) 工程 (a) (i) のDNAと工程 (a) (ii) の基板を接触させる工程
- (c) 該DNAと該基板に固定されたヌクレオチドプローブとのハイブリダイズの強度を検出する工程、
- (d) 検出したハイブリダイズの強度を対照と比較する工程

【請求項 13】 以下の (a) ～ (f) の工程を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の方法。

- (a) 被検者からDNA試料を調製する工程
- (b) ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1 に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基の1塩基3'側の塩基から3'側の塩基配列に相補的な配列を有するプライマーを調製する工程
- (c) 工程 (a) で調製したDNAを鋳型とし、工程 (b) で調製したプライマーを用いて、プライマー伸長反応を行う工程
- (d) 工程 (c) で得られたプライマー伸長反応産物を質量分析機にかけ、質量測定を行う工程
- (e) 質量測定の結果から遺伝子型を決定する工程
- (f) 工程 (e) で決定した遺伝子型を対照と比較する工程

50

工程

【請求項 14】 以下の (a) ~ (f) の工程を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

- (a) 被検者から DNA 試料を調製する工程
- (b) ヘム・オキシゲナーゼ 1 遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1 に記載の塩基配列の 1004 番目に相当する部位の塩基を含む DNA にハイブリダイズする、レポーター蛍光およびクエンチャー蛍光が標識されたヌクレオチドプローブを調製する工程
- (c) 工程 (a) で調製した DNA に、工程 (b) で調製したヌクレオチドプローブをハイブリダイズさせる工程
- (d) ヘム・オキシゲナーゼ 1 遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1 に記載の塩基配列の 1004 番目に相当する部位の塩基を含む DNA を増幅する工程
- (e) レポーター蛍光の発光を検出する工程
- (f) 工程 (e) で検出したレポーター蛍光の発光を対照と比較する工程

【請求項 15】 以下の (a) ~ (h) の工程を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

- (a) 被検者から DNA 試料を調製する工程
- (b) ヘム・オキシゲナーゼ 1 遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1 に記載の塩基配列の 1004 番目に相当する部位の塩基から 5' 側の塩基配列と相補的な配列および該塩基の 1 塩基 3' 側の塩基から 3' 側の塩基配列とハイブリダイズしない配列 (フラップ) を有するヌクレオチドプローブを調製する工程
- (c) ヘム・オキシゲナーゼ 1 遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1 に記載の塩基配列の 1004 番目に相当する部位の塩基に対応する塩基 (任意の塩基) が 3' 末端であり、該 1004 番目に相当する部位の塩基の 1 塩基 3' 側の塩基から 3' 側の塩基配列と相補的な配列を有するヌクレオチドプローブを調製する工程
- (d) 工程 (a) で調製した DNA に、工程 (b) および工程 (c) で調製したヌクレオチドプローブをハイブリダイズさせる工程
- (e) 工程 (d) でハイブリダイズした DNA を一本鎖 DNA 切断酵素で切断し、フラップを遊離させる工程
- (f) フラップと相補的な配列を有するヌクレオチドプローブであって、レポーター蛍光およびクエンチャー蛍光が標識されたヌクレオチドプローブをフラップにハイブリダイズさせる工程
- (g) 工程 (f) により発生する蛍光の強度を測定する工程
- (h) 工程 (g) で測定した蛍光の強度を対照と比較する工程

【請求項 16】 以下の (a) ~ (f) の工程を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

- (a) 被検者から DNA 試料を調製する工程
- (b) ヘム・オキシゲナーゼ 1 遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1 に記載の塩基配列の 1004 番目に相当する部位の塩基を含む DNA を増幅する工程
- (c) 増幅した DNA を一本鎖に解離させる工程
- (d) 解離させた一本鎖 DNA のうち、片鎖のみを分離する工程
- (e) ヘム・オキシゲナーゼ 1 遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1 に記載の塩基配列の 1004 番目に相当する部位の塩基の近傍より 1 塩基ずつ伸長反応を行い、その際に生成されるピロリン酸を酵素的に発光させ、発光の強度を測定する工程
- (f) 工程 (e) で測定した蛍光の強度を対照と比較する工程

- (c) 増幅した DNA を一本鎖に解離させる工程
- (d) 解離させた一本鎖 DNA のうち、片鎖のみを分離する工程
- (e) ヘム・オキシゲナーゼ 1 遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1 に記載の塩基配列の 1004 番目に相当する部位の塩基の近傍より 1 塩基ずつ伸長反応を行い、その際に生成されるピロリン酸を酵素的に発光させ、発光の強度を測定する工程
- (f) 工程 (e) で測定した蛍光の強度を対照と比較する工程

【請求項 17】 以下の (a) ~ (f) の工程を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

- (a) 被検者から DNA 試料を調製する工程
- (b) ヘム・オキシゲナーゼ 1 遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1 に記載の塩基配列の 1004 番目に相当する部位の塩基を含む DNA を増幅する工程
- (c) ヘム・オキシゲナーゼ 1 遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1 に記載の塩基配列の 1004 番目に相当する部位の塩基の 1 塩基 3' 側の塩基から 3' 側の塩基配列に相補的な配列を有するプライマーを調製する工程
- (d) 蛍光ラベルしたヌクレオチド存在下で、工程 (b) で増幅した DNA を鋳型とし、工程 (c) で調製したプライマーを用いて一塩基伸長反応を行う工程
- (e) 蛍光の偏光度を測定する工程
- (f) 工程 (e) で測定した蛍光の偏光度を対照と比較する工程

【請求項 18】 以下の (a) ~ (f) の工程を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

- (a) 被検者から DNA 試料を調製する工程
- (b) ヘム・オキシゲナーゼ 1 遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1 に記載の塩基配列の 1004 番目に相当する部位の塩基を含む DNA を増幅する工程
- (c) ヘム・オキシゲナーゼ 1 遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1 に記載の塩基配列の 1004 番目に相当する部位の塩基の 1 塩基 3' 側の塩基から 3' 側の塩基配列に相補的な配列を有するプライマーを調製する工程
- (d) 蛍光ラベルしたヌクレオチド存在下で、工程 (b) で増幅した DNA を鋳型とし、工程 (c) で調製したプライマーを用いて、一塩基伸長反応を行う工程
- (e) 工程 (d) で反応に使われた塩基種を判定する工程
- (f) 工程 (e) で判定された塩基種を対照と比較する工程

【請求項 19】 配列番号：2 に記載の塩基配列の 1004 番目の塩基を含む、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチド。

【請求項 20】 ヘム・オキシゲナーゼ 1 遺伝子のプロ

モーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAにハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチドを含む、酸化ストレスが関与する疾患の発症しやすさに影響する遺伝性素因を有するか否かを検査するための試薬。

【請求項21】 ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAを増幅するように設計されたフォワードプライマーおよびリバープライマーを含む、酸化ストレスが関与する疾患の発症しやすさに影響する遺伝性素因を有するか否かを検査するための試薬。

【請求項22】 疾患が、循環器疾患または炎症性疾患である、請求項20または21に記載の試薬。

【請求項23】 疾患が、虚血性心疾患、動脈硬化、腎疾患、閉塞性肺疾患、または、リウマチである、請求項20または21に記載の試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、酸化ストレスが関与する疾患の発症しやすさに影響する遺伝性素因を有するか否かを検査するための方法に関する。

【0002】

【従来の技術】ヘム・オキシゲナーゼ1(HO-1)は、ヘムを一酸化炭素とビリルジンに分解する律速酵素である。1型は2型と異なり種々の刺激で誘導される性質を持つ。HO-1の誘導により、生体は種々の酸化ストレスに適応すると考えられている。実際HO-1の発現レベルが動脈硬化の進展に大きな影響をおよぼすことが示されている(Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer inhibits the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Circulation, 2001, 104, 1519-1525.) 又、すでに、動脈硬化性病変の形成に、リボ蛋白質の酸化修飾が重要な役割を持っていることは知られている。

【0003】動物実験のレベルでは、血圧レベル、動脈硬化の進展、心筋梗塞後の再灌流障害などに関与すると報告があるが、ヒトに於いて、この遺伝子の変異と疾患の関連を調査した報告は、未だ少ない。HO-1の欠損症例の報告は一例のみあり(exon 2の完全欠失、exon3の欠失)、発育遅滞、溶血性貧血、内皮細胞障害を特徴とする(J Clin Invest 1999; 103: 129-135)。HO-P3(GTリピート(repeat))の遺伝型と肺気腫(Am J Hum Genet 2000; 66: 187-195)の関連の報告があるが、同じ日本人を対象とした研究であるにもかかわらず、リピート数に大きな違いがあり、実験上での誤りと思われる。HO-P3(GTリピート)と血管形成術後の再狭窄の頻度の関連(J Endovasc Ther 2001; 8: 433-440)がオーストリアから報告されているが、対象数はわずかに96人であ

り信用性のあるものではない。

【0004】一方、虚血性心疾患は循環器疾患の1つであり、高血圧症の大きな合併症の1つである。これまでに、HO-1遺伝子の変異と虚血性心疾患との関連を示す報告例は皆無である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、HO-1遺伝子の多型と酸化ストレスが関与する疾患との関連を明らかにし、得られた知見に基づいて、酸化ストレスが関与する疾患の発症しやすさに影響する遺伝性素因を有するか否かを検査するための方法を提供することである。また、該検査のための試薬を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、HO-1のプロモーター領域における多型の同定を試みた。その結果、HO-1のプロモーター領域には、3種類の変異が見出された(HO-P1、HO-P2、HO-P3)。次いで、これら3種類の遺伝型と虚血性心疾患の関連を検討した。具体的には、心臓カテーテル検査に於いて、虚血性心疾患であることが確認された597人と、検診受診者で、虚血性心疾患の無いことが確認された1973人で検討した。その結果、HO-P2の遺伝型に関しては、AA型の出現頻度が虚血性心疾患群で16.08%と、対照群の21.29%より低く、統計的にも有意差(p=0.0136)が認められた。

【0007】一方、虚血性心疾患の危険因子として、糖尿病・現在の喫煙習慣・性・体容積指数(Body mass index)などが挙げられている。そこで、これらの関与を考えた上での虚血性心疾患と遺伝型の影響を明らかにするため、Multiple Logistic解析を行った。この際、HO-P2の遺伝型であるAA型、AT型、およびTT型を、AA型とAT+TT型の2群に分けた。検討の結果、AT+TT型は、AA型に比べオッズ比1.516(95%CI 1.123~2.070)で虚血性心疾患群の素因遺伝型であることが判明した。以上よりHO-P2におけるAA型は、虚血性心疾患に対してprotectiveに作用することがわかった。

【0008】さらに、AアレルとTアレルのプロモーター活性を、牛内皮細胞を用い、過酸化水素刺激下で検討した。その結果、Aアレルのプロモーター活性はTアレルのプロモーター活性よりも高いことが判明した。このことから、AA型における虚血性心疾患の発症の抑制は、HO-1遺伝子のプロモーター活性の上昇によるHO-1の発現量の増大によるものであると考えられた。

【0009】以上の知見は、片方のアレルのみに多型が検出される場合または両方のアレル共に多型が検出されない場合に虚血性心疾患などの酸化ストレスが関与する疾患に発症しやすい遺伝性素因を有し、両方のアレル共に多型が検出される場合に該疾患に発症しにくい遺伝性素因を有することを示している。従って、HO-1遺伝子

のプロモーター領域における多型を解析することで、酸化ストレスが関与する疾患の発症しやすさに影響する遺伝性素因を有するか否かを検査することができる。

【0010】即ち、本発明は、〔1〕酸化ストレスが関与する疾患の発症しやすさに影響する遺伝性素因を有するか否かを検査するための方法であって、ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の多型を検出する工程を含み、片方のアレルのみに多型が検出される場合または両方のアレル共に多型が検出されない場合に該疾患に発症しやすい遺伝性素因を有すると判定され、両方のアレル共に多型が検出される場合に該疾患に発症しにくい遺伝性素因を有すると判定される方法、〔2〕ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の多型が、酸化ストレスに応答して該遺伝子の発現を上昇させる多型である、〔1〕に記載の方法、〔3〕多型が一塩基多型である、〔1〕に記載の方法、〔4〕多型が、ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の多型であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の多型である、〔1〕に記載の方法、

〔5〕疾患が、循環器疾患または炎症性疾患である、〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の方法、〔6〕疾患が、虚血性心疾患、動脈硬化、腎疾患、閉塞性肺疾患、または、リウマチである、〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の方法、〔7〕以下の（a）～（d）の工程を含む、〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の方法、

（a）被検者からDNA試料を調製する工程
（b）ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAを単離する工程
（c）単離したDNAの塩基配列を決定する工程
（d）工程（c）により決定したDNAの塩基配列を、対照と比較する工程

〔8〕以下の（a）～（d）の工程を含む、〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の方法、

（a）被検者からDNA試料を調製する工程
（b）調製したDNA試料を制限酵素により切断する工程
（c）DNA断片をその大きさに応じて分離する工程
（d）検出されたDNA断片の大きさを、対照と比較する工程

〔9〕以下の（a）～（e）の工程を含む、〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の方法、

（a）被検者からDNA試料を調製する工程
（b）ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAを増幅する工程
（c）増幅したDNAを制限酵素により切断する工程
（d）DNA断片をその大きさに応じて分離する工程
（e）検出されたDNA断片の大きさを、対照と比較する工程

〔10〕以下の（a）～（e）の工程を含む、〔1〕～

〔6〕のいずれかに記載の方法、

（a）被検者からDNA試料を調製する工程
（b）ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAを増幅する工程
（c）増幅したDNAを一本鎖DNAに解離させる工程
（d）解離させた一本鎖DNAを非変性ゲル上で分離する工程

（e）分離した一本鎖DNAのゲル上での移動度を対照と比較する工程

〔11〕以下の（a）～（d）の工程を含む、〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の方法、

（a）被検者からDNA試料を調製する工程
（b）ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAを増幅する工程
（c）増幅したDNAを、DNA変性剤の濃度が次第に高まるゲル上で分離する工程

（d）分離したDNAのゲル上での移動度を対照と比較する工程

〔12〕以下の（a）～（d）の工程を含む、〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の方法、（a）（i）ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNA、および（ii）該DNAにハイブリダイズするヌクレオチドプローブが固定された基板、を提供する工程

（b）工程（a）（i）のDNAと工程（a）（ii）の基板を接触させる工程
（c）該DNAと該基板に固定されたヌクレオチドプローブとのハイブリダイズの強度を検出する工程、
（d）検出したハイブリダイズの強度を対照と比較する工程

〔13〕以下の（a）～（f）の工程を含む、〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の方法、

（a）被検者からDNA試料を調製する工程
（b）ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基の1塩基3'側の塩基から3'側の塩基配列に相補的な配列を有するプライマーを調製する工程

（c）工程（a）で調製したDNAを鋳型とし、工程（b）で調製したプライマーを用いて、プライマー伸長反応を行う工程

（d）工程（c）で得られたプライマー伸長反応産物を質量分析機にかけ、質量測定を行う工程

（e）質量測定の結果から遺伝子型を決定する工程
（f）工程（e）で決定した遺伝子型を対照と比較する工程

〔14〕以下の（a）～（f）の工程を含む、〔1〕～

（a）被検者からDNA試料を調製する工程
（b）ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基の1塩基3'側の塩基から3'側の塩基配列に相補的な配列を有するプライマーを調製する工程

（c）工程（a）で調製したDNAを鋳型とし、工程（b）で調製したプライマーを用いて、プライマー伸長反応を行う工程

（d）工程（c）で得られたプライマー伸長反応産物を質量分析機にかけ、質量測定を行う工程

（e）質量測定の結果から遺伝子型を決定する工程
（f）工程（e）で決定した遺伝子型を対照と比較する工程

〔 6 〕 のいずれかに記載の方法、
 (a) 被検者からDNA試料を調製する工程
 (b) ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号： 1 に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAにハイブリダイズする、レポーター蛍光およびクエンチャー蛍光が標識されたヌクレオチドプローブを調製する工程
 (c) 工程 (a) で調製したDNAに、工程 (b) で調製したヌクレオチドプローブをハイブリダイズさせる工程
 (d) ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号： 1 に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAを増幅する工程
 (e) レポーター蛍光の発光を検出する工程
 (f) 工程 (e) で検出したレポーター蛍光の発光を対照と比較する工程
 [15] 以下の (a) ~ (h) の工程を含む、〔 1 〕 ~〔 6 〕 のいずれかに記載の方法、
 (a) 被検者からDNA試料を調製する工程
 (b) ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号： 1 に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基から5'側の塩基配列と相補的な配列および該塩基の1塩基3'側の塩基から3'側の塩基配列とハイブリダイズしない配列 (フラップ) を有するヌクレオチドプローブを調製する工程
 (c) ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号： 1 に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基に対応する塩基 (任意の塩基) が3'末端であり、該1004番目に相当する部位の塩基の1塩基3'側の塩基から3'側の塩基配列と相補的な配列を有するヌクレオチドプローブを調製する工程
 (d) 工程 (a) で調製したDNAに、工程 (b) および工程 (c) で調製したヌクレオチドプローブをハイブリダイズさせる工程
 (e) 工程 (d) でハイブリダイズしたDNAを一本鎖DNA切断酵素で切断し、フラップを遊離させる工程
 (f) フラップと相補的な配列を有するヌクレオチドプローブであって、レポーター蛍光およびクエンチャー蛍光が標識されたヌクレオチドプローブをフラップにハイブリダイズさせる工程
 (g) 工程 (f) により発生する蛍光の強度を測定する工程
 (h) 工程 (g) で測定した蛍光の強度を対照と比較する工程
 [16] 以下の (a) ~ (f) の工程を含む、〔 1 〕 ~〔 6 〕 のいずれかに記載の方法、
 (a) 被検者からDNA試料を調製する工程
 (b) ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号： 1 に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAを増幅する工程
 (c) 増幅したDNAを一本鎖に解離させる工程

(d) 解離させた一本鎖DNAのうち、片鎖のみを分離する工程
 (e) ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号： 1 に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基の近傍より1塩基ずつ伸長反応を行い、その際に生成されるピロリン酸を酵素的に発光させ、発光の強度を測定する工程
 (f) 工程 (e) で測定した蛍光の強度を対照と比較する工程
 [17] 以下の (a) ~ (f) の工程を含む、〔 1 〕 ~〔 6 〕 のいずれかに記載の方法、
 (a) 被検者からDNA試料を調製する工程
 (b) ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号： 1 に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAを増幅する工程
 (c) ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号： 1 に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基の1塩基3'側の塩基から3'側の塩基配列に相補的な配列を有するプライマーを調製する工程
 (d) 蛍光ラベルしたヌクレオチド存在下で、工程 (b) で増幅したDNAを鋳型とし、工程 (c) で調製したプライマーを用いて一塩基伸長反応を行う工程
 (e) 蛍光の偏光度を測定する工程
 (f) 工程 (e) で測定した蛍光の偏光度を対照と比較する工程
 [18] 以下の (a) ~ (f) の工程を含む、〔 1 〕 ~〔 6 〕 のいずれかに記載の方法、
 (a) 被検者からDNA試料を調製する工程
 (b) ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号： 1 に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAを増幅する工程
 (c) ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号： 1 に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基の1塩基3'側の塩基から3'側の塩基配列に相補的な配列を有するプライマーを調製する工程
 (d) 蛍光ラベルしたヌクレオチド存在下で、工程 (b) で増幅したDNAを鋳型とし、工程 (c) で調製したプライマーを用いて、一塩基伸長反応を行う工程
 (e) 工程 (d) で反応に使われた塩基種を判定する工程
 (f) 工程 (e) で判定された塩基種を対照と比較する工程
 [19] 配列番号： 2 に記載の塩基配列の1004番目の塩基を含む、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチド、
 [20] ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号： 1 に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAにハイブリダ

イズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチドを含む、酸化ストレスが関与する疾患の発症しやすさに影響する遺伝性素因を有するか否かを検査するための試薬、

〔21〕ヘム・オキシゲナーゼ1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAを増幅するように設計されたフォワードプライマーおよびリバースプライマーを含む、酸化ストレスが関与する疾患の発症しやすさに影響する遺伝性素因を有するか否かを検査するための試薬、

〔22〕疾患が、循環器疾患または炎症性疾患である、

〔20〕または〔21〕に記載の試薬、

〔23〕疾患が、虚血性心疾患、動脈硬化、腎疾患、閉塞性肺疾患、または、リウマチである、〔20〕または〔21〕に記載の試薬、を、提供するものである。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明者らは、ヘム・オキシゲナーゼ1 (H0-1) 遺伝子のプロモーター領域 (GenBankアクセッション番号Z82244) の多型を明らかにした。具体的には、配列番号：1に記載の塩基配列の222番目の塩基GがAに変異している多型、および、該塩基配列の1004番目の塩基TがAに変異している多型を新たに見出した。さらに、該塩基配列の1004番目の塩基TがAに変異している多型を検出することにより、虚血性心疾患の発症しやすさに影響する遺伝性素因を有するか否かを検査することができることを明らかにした。具体的には、片方のアレルのみにTがAに変異している多型が検出される場合または両方のアレル共に該多型が検出されない場合 (AT型またはTT型の場合) に、虚血性心疾患に発症しやすい遺伝性素因を有し、両方のアレル共に該多型が検出される場合 (AA型の場合) に、該疾患に発症しにくい遺伝性素因を有することが見出された。さらに、該多型 (AA型) は、H0-1の発現を上昇させることが判明した。一方、すでにH0-1は酸化ストレスに対し防御的に作用することが知られている。以上を考慮すれば、該多型を検出することにより、酸化ストレスが関与する疾患の発症しやすさに影響する遺伝性素因を有するか否かを検査することが可能である。実際、実施例において該多型との関連が示された虚血性心疾患は、酸化ストレスが関与する疾患であることが知られている。本発明は、これらの知見に基づいたものである。なお、本発明においては、正常な (より高頻度な) H0-1遺伝子のプロモーター領域の塩基配列 (野生型塩基配列) を配列番号：1、および、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目の塩基TがAに置換された変異体の塩基配列を配列番号：2に記載する。

【0012】本発明は、酸化ストレスが関与する疾患の発症しやすさに影響する遺伝性素因を有するか否かを検査するための方法であって、H0-1遺伝子のプロモーター領域の多型を検出する工程を含み、片方のアレルのみに

多型が検出される場合または両方のアレル共に多型が検出されない場合に該疾患に発症しやすい遺伝性素因を有すると判定され、両方のアレル共に多型が検出される場合に該疾患に発症しにくい遺伝性素因を有すると判定される方法を提供する。

【0013】本発明において、H0-1とは、ヘムを一酸化炭素とビリベルジンに分解する律速酵素のうち1型を意味する。1型は2型と異なり種々の刺激で誘導される性質を持つ。H0-1の活性としてはヘムの分解活性が挙げられる。該活性は以下の方法で評価することができる。NADPH (0.8mM)、グルコース6リン酸 (2mM)、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ (0.2units)、ビリベルジンレダクターゼ源としての105,000×gで得られる上清フラクションから調整したラット肝臓サイトゾル (3mg)、リン酸カリウム緩衝液 (PBS, 100mM, pH 7.4)、MgCl₂ (0.2mM)、および、ヘミン (20μM) を含む反応液に、細胞由来のミクロソームを添加する。反応は、1時間暗条件において37℃で行ない、1mlのクロロホルムを添加することで停止させる。抽出したビリルビンを吸光度464と530nm ($\epsilon = 40\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) の違いによって測定する。H0-1活性は、ビリルビン/細胞内タンパク質mg/時間のピコモル数として示される。本発明における「H0-1遺伝子」とは、上記H0-1の活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を意味する。

【0014】多型とは、遺伝学的には、母集団中1%以上の頻度で存在している塩基変化と一般的に定義される。しかしながら、本発明における「多型」は、この定義に制限されず、1%未満の塩基の変化も「多型」に含む。本発明における多型の種類としては、例えば、一塩基多型、一から数十塩基 (時には数千塩基) が欠失、置換あるいは挿入している多型等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。さらに、多型部位の数についても特に制限はなく、1個以上の多型を有していてもよい。本発明における多型としては、例えば、H0-1遺伝子のプロモーター領域の多型であって、酸化ストレスにตอบสนองして該遺伝子の発現を上昇させる多型、H0-1遺伝子のプロモーター領域の多型であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の多型 (H0-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基が変異している多型) が挙げられるが、これらに制限されるものではない。また、本発明における多型としては、例えばTからAへの置換変異が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0015】本発明において、「H0-1遺伝子のプロモーター領域の多型であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の多型」とは、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目の塩基の多型だけではなく、配列番号：1に記載の塩基配列において1もしくは複数の塩基が置換、欠失、付加、および/または挿入さ

れた塩基配列における塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基の多型をも含む概念である。また、本発明において、配列番号：1に記載の塩基配列において1もしくは複数の塩基が置換、欠失、付加、および/または挿入された塩基配列としては、例えば、実施例に記載のH0-P1、H0-P2またはH0-P3に、本発明の多型が存在する塩基配列が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0016】また、本発明において、「H0-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基」とは、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目の塩基だけではなく、配列番号：1に記載の塩基配列において1もしくは複数の塩基が置換、欠失、付加、および/または挿入された塩基配列における塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基をも含む概念である。

【0017】本発明において、酸化ストレスが関与する「疾患」としては、特に制限はなく、循環器疾患または炎症性疾患が例示できる。上記酸化ストレスが関与する循環器疾患としては、例えば、虚血性心疾患、動脈硬化、腎疾患、閉塞性肺疾患が挙げられ、上記酸化ストレスが関与する炎症性疾患としては、例えば、リウマチが挙げられるが、これらに限定されるものではない。その他の例としては、痴呆などが挙げられる。

【0018】本発明においては、片方のアレルのみに多型が検出される場合または両方のアレル共に多型が検出されない場合に酸化ストレスが関与する疾患に発症しやすい遺伝性素因を有すると判定され、両方のアレル共に多型が検出される場合に該疾患に発症しにくい遺伝性素因を有すると判定される。さらに、酸化ストレスが関与する疾患に罹患している被検者は、その原因が、H0-1遺伝子のプロモーター領域の多型にあると判定される。

【0019】以下、本発明の検査方法の好ましい態様を記載するが、本発明の方法はそれらの方法に限定されるものではない。

【0020】本発明の検査方法の好ましい態様においては、まず、被検者からDNA試料を調製する。DNA試料は、例えば被検者の血液、皮膚、口腔粘膜、毛髪、手術により採取あるいは切除した組織または細胞から抽出した染色体DNA、あるいはRNAを基に調製することができる。

【0021】本方法においては、次いで、H0-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAを単離する。該DNAの単離は、例えば、H0-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAにハイブリダイズするプライマーを用いて、染色体DNA、あるいはRNAを鋳型としたPCR等によって行うことができる。

【0022】本方法においては、次いで、単離したDNAの塩基配列を決定する。単離したDNAの塩基配列の決定は、当業者に公知の方法で行うことができる。

【0023】本方法においては、次いで、決定したDNAの塩基配列を、対照と比較する。本方法における対照とは、正常な（野生型）H0-1遺伝子のプロモーター領域を含むDNAの配列を言う。一般に健康人のH0-1遺伝子のプロモーター領域を含むDNAの配列は正常であるものと考えられることから、上記「対照と比較する」とは、通常、健康人のH0-1遺伝子のプロモーター領域を含むDNAの配列と比較することを意味するが、GenBank等の各種遺伝子データベースまたは文献等に野生型として記載されているH0-1遺伝子のプロモーター領域を含むDNAの配列と比較してもよい。

【0024】本発明の検査方法は、上記の如く被検者由来のDNAの塩基配列を直接決定する方法以外に、多型の検出が可能な種々の方法によって行うことができる。

【0025】例えば、本発明における多型の検出は、以下のような方法によっても行うことができる。まず、被検者からDNA試料を調製する。次いで、調製したDNA試料を制限酵素により切断する。次いで、DNA断片をその大きさに応じて分離する。次いで、検出されたDNA断片の大きさを、対照と比較する。また、他の一つの態様においては、まず、被検者からDNA試料を調製する。次いで、H0-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAを増幅する。さらに、増幅したDNAを制限酵素により切断する。次いで、DNA断片をその大きさに応じて分離する。次いで、検出されたDNA断片の大きさを、対照と比較する。

【0026】このような方法としては、例えば、制限酵素断片長多型（Restriction Fragment Length Polymorphism / RFLP）を利用した方法やPCR-RFLP法等が挙げられる。具体的には、制限酵素の認識部位に変異が存在する場合、あるいは制限酵素処理によって生じるDNA断片内に塩基挿入または欠失がある場合、制限酵素処理後に生じる断片の大きさが対照と比較して変化する。この変異を含む部分をPCR法によって増幅し、それぞれの制限酵素で処理することによって、これらの変異を電気泳動後のバンドの移動度の差として検出することができる。あるいは、染色体DNAをこれらの制限酵素によって処理し、電気泳動した後、本発明のプロブDNAを用いてサザンブロッティングを行うことにより、変異の有無を検出することができる。用いられる制限酵素は、それぞれの変異に応じて適宜選択することができる。この方法では、ゲノムDNA以外にも被検者から調製したRNAを逆転写酵素でcDNAにし、これをそのまま制限酵素で切断した後、サザンブロッティングを行うことも可能である。また、このcDNAを鋳型としてPCRでH0-1遺伝子のプロモーター領域を含むDNAを増幅し、それを制限酵素で切断し

た後、移動度の差を調べることも可能である。

【0027】さらに別の方法においては、まず、被検者からDNA試料を調製する。次いで、HO-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAを増幅する。さらに、増幅したDNAを一本鎖DNAに解離させる。次いで、解離させた一本鎖DNAを非変性ゲル上で分離する。分離した一本鎖DNAのゲル上での移動度を対照と比較する。

【0028】該方法としては、例えばPCR-SSCP(single-strand conformation polymorphism、一本鎖高次構造多型)法(Cloning and polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis of anonymous Alu repeats on chromosome 11. Genomics. 1992 Jan 1; 12(1): 139-146.、Detection of p53 gene mutations in human brain tumors by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. Oncogene. 1991 Aug 1;6(8): 1313-1318.、Multiple fluorescence-based PCR-SSCP analysis with postlabeling.、PCR Methods Appl. 1995 Apr 1; 4(5): 275-282.)が挙げられる。この方法は操作が比較的簡便であり、また被検試料の量も少なく済む等の利点を有するため、特に多数のDNA試料をスクリーニングするのに好適である。その原理は次の通りである。二本鎖DNA断片を一本鎖に解離すると、各鎖はその塩基配列に依存した独自の高次構造を形成する。この解離したDNA鎖を、変性剤を含まないポリアクリルアミドゲル中で電気泳動すると、それぞれの高次構造の差に応じて、相補的な同じ鎖長の一本鎖DNAが異なる位置に移動する。一塩基の置換によってもこの一本鎖DNAの高次構造は変化し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動において異なる移動度を示す。従って、この移動度の変化を検出することによりDNA断片に点突然変異や欠失、あるいは挿入等による変異の存在を検出することができる。

【0029】具体的には、まず、HO-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAをPCR法等によって増幅する。増幅される範囲としては、通常200～400bp程度の長さが好ましい。PCRは、当業者においては反応条件等を適宜選択して行うことができる。PCRの際に、³²P等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識したプライマーを用いることにより、増幅DNA産物を標識することができる。あるいはPCR反応液に³²P等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識された基質塩基を加えてPCRを行うことにより、増幅DNA産物を標識することも可能である。さらに、PCR反応後にクレノウ酵素等を用いて、³²P等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識された基質塩基を、増幅DNA断片に付加することによっても標識を行うことができる。こうして得られた標識DN

A断片を、熱を加えること等により変性させ、尿素などの変性剤を含まないポリアクリルアミドゲルによって電気泳動を行う。この際、ポリアクリルアミドゲルに適量(5から10%程度)のグリセロールを添加することにより、DNA断片の分離の条件を改善することができる。また、泳動条件は各DNA断片の性質により変動するが、通常、室温(20から25℃)で行い、好ましい分離が得られないときには4から30℃までの温度で最適の移動度を与える温度の検討を行う。電気泳動後、DNA断片の移動度を、X線フィルムを用いたオートラジオグラフィーや、蛍光を検出するスキャナー等で検出し、解析を行う。移動度に差があるバンドが検出された場合、このバンドを直接ゲルから切り出し、PCRによって再度増幅し、それを直接シーケンシングすることにより、変異の存在を確認することができる。また、標識したDNAを使わない場合においても、電気泳動後のゲルをエチジウムブロマイドや銀染色法などによって染色することによって、バンドを検出することができる。

【0030】さらに別の方法においては、まず、被検者からDNA試料を調製する。次いで、HO-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAを増幅する。さらに、増幅したDNAを、DNA変性剤の濃度が次第に高まるゲル上で分離する。次いで、分離したDNAのゲル上での移動度を対照と比較する。

【0031】このような方法としては、例えば、変性剤濃度勾配ゲル(denaturant gradient gel electrophoresis: DGGE法)等を例示することができる。DGGE法は、変性剤の濃度勾配のあるポリアクリルアミドゲル中で、DNA断片の混合物を泳動し、それぞれの不安定性の違いによってDNA断片を分離する方法である。ミスマッチのある不安定なDNA断片が、ゲル中のある変性剤濃度の部分まで移動すると、ミスマッチ周辺のDNA配列はその不安定さのために、部分的に1本鎖へと解離する。この部分的に解離したDNA断片の移動度は、非常に遅くなり、解離部分のない完全な二本鎖DNAの移動度と差がつくことから、両者を分離することができる。具体的には、HO-1遺伝子プロモーターの領域を含むDNAを本発明のプライマー等を用いたPCR法等によって増幅し、これを尿素などの変性剤の濃度が移動するに従って徐々に高くなっているポリアクリルアミドゲル中で電気泳動し、対照と比較する。変異が存在するDNA断片の場合、より低い変性剤濃度位置でDNA断片が一本鎖になり、極端に移動速度が遅くなるため、この移動度の差を検出することにより変異の有無を検出することができる。

【0032】さらに別の方法においては、まず、被検者から調製したHO-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNA、および該DNAにハイブリダイズするヌクレオチドプローブが固定された基板、を提供

する。

【0033】本発明において「基板」とは、ヌクレオチドプローブを固定することが可能な板状の材料を意味する。本発明においてヌクレオチドには、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドが含まれる。

【0034】本発明の基板は、ヌクレオチドプローブを固定することができれば特に制限はないが、一般にDNAアレイ技術で使用される基板を好適に用いることができる。一般にDNAアレイは、高密度に基板にプリントされた何千ものヌクレオチドで構成されている。通常これら10のDNAは非透過性(non-porous)の基板の表層にプリントされる。基板の表層は、一般的にはガラスであるが、透過性(porous)の膜、例えばニトロセルロースメンブレンを使用することができる。

【0035】本発明において、ヌクレオチドの固定(アレイ)方法として、Affymetrix社開発によるオリゴヌクレオチドを基本としたアレイが例示できる。オリゴヌクレオチドのアレイにおいて、オリゴヌクレオチドは通常インサイチュ(in situ)で合成される。例えば、photolithographicの技術(Affymetrix社)、および化学物質を固定させるためのインクジェット(Rosetta Inpharmatics社)技術等によるオリゴヌクレオチドのインサイチュ合成法が既に知られており、いずれの技術も本発明の基板の作製に利用することができる。

【0036】基板に固定するヌクレオチドプローブは、H0-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基の多型を検出することができるものであれば、特に制限されない。即ち該プローブは、例えば、H0-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAにハイブリダイズするようなプローブである。特異的なハイブリダイズが可能であれば、ヌクレオチドプローブは、H0-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAに対し、完全に相補的である必要はない。本発明において基板に結合させるヌクレオチドプローブの長さは、オリゴヌクレオチドを固定する場合は、通常10~100ベースであり、好ましくは10~50ベースであり、さらに好ましくは15~25ベースである。

【0037】本方法においては、次いで、該DNAと該基板を接触させる。この過程により、上記ヌクレオチドプローブに対し、DNAをハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションの反応液および反応条件は、基板に固定するヌクレオチドプローブの長さ等の諸要因により変動しうるが、一般的に当業者に周知の方法により行うことができる。

【0038】本方法においては、次いで、該DNAと該基板に固定されたヌクレオチドプローブとのハイブリダイズの強度を検出する。この検出は、例えば、蛍光シグナ

ルをスキャナー等によって読み取ることによって行うことができる。尚、DNAアレイにおいては、一般的にスライドガラスに固定したDNAをプローブといい、一方溶液中のラベルしたDNAをターゲットという。従って、基板に固定された上記ヌクレオチドを、本明細書においてヌクレオチドプローブと記載する。本方法においては、さらに、検出したハイブリダイズの強度を対照と比較する。

【0039】このような方法としては、例えば、DNAアレイ法(SNP遺伝子多型の戦略、松原謙一・榊佳之、中山書店、p128-135、Nature Genetics(1999)22:164-167)等が挙げられる。

【0040】さらに別の方法においては、まず、被検者からDNA試料を調製する。また、H0-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基の1塩基3'側の塩基から3'側の塩基配列に相補的な配列を有するプライマーを調製する。次いで、該DNAを鋳型とし、該プライマーを用いて、プライマー伸長反応を行う。次いで、プライマー伸長反応産物を質量分析機にかけ、質量測定を行う。次いで、質量測定の結果から遺伝子型を決定する。次いで、決定した遺伝子型を対照と比較する。

【0041】このような方法としては、例えば、MALDI-TOF/MS法(SNP遺伝子多型の戦略、松原謙一・榊佳之、中山書店、p106-117、Trends Biotechnol (2000):18:77-84)等が挙げられる。具体的には、まず、被検者からDNA試料を調製する。この際、H0-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAをPCRなどを使用して増幅することで調製することが好ましい。次いで、PCR産物を鋳型として、ジェノタイピングプライマー(H0-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基の1塩基3'側の塩基から3'側の塩基配列に相補的な配列を有するプライマー)のddNTPプライマー伸長反応を行う。この反応に用いるPCR産物は、PCRプライマーを除去するための精製が行われていることが好ましい。ジェノタイピングプライマーは、通常、15bp以上の長さを有する。プライマー伸長反応においては、通常、PCR産物に対して10倍以上の過剰のジェノタイピングプライマーを加えるが、これに制限されるものではない。サーマルサイクルの条件は適宜選択しうるが、ジェノタイピングプライマーのうち30~60%程度が伸長する条件が好ましい。例えば、94 と37 の2温度間で25回程度行うことで適当な伸長効率を得ることができる。次いで、プライマー伸長反応産物のMALDIプレートへのスポットを行い、次いで、質量測定を行う(マスペクトログラムを作成する)。次いで、マスペクトログラム解析から遺伝子型を決定し、対照と比較する。

【0042】さらに別の方法においては、まず、被検者

からDNA試料を調製する。次いで、HO-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAにハイブリダイズする、レポーター蛍光およびクエンチャー蛍光が標識されたヌクレオチドプローブを調製する。次いで、該DNAに、該ヌクレオチドプローブをハイブリダイズさせる。次いで、HO-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAを増幅する。次いで、レポーター蛍光の発光を検出する。次いで、検出したレポーター蛍光の発光を対照と比較する。

【0043】上記方法としては、TaqMan PCR法（SNP遺伝子多型の戦略、松原謙一・榊佳之、中山書店、p94-105、Genet Anal. (1999)14:143-149）等を挙げることができる。具体的には、HO-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAにハイブリダイズするヌクレオチドプローブの5'末端にレポーター蛍光を標識する。本発明において、レポーター蛍光としては、FAMやVICなどが例示できるが、これらに限定されない。さらに、上記プローブの3'末端にクエンチャー蛍光を標識する。本発明において、クエンチャー蛍光としては、レポーター蛍光を消光できる物質であれば特に制限されない。次いで、HO-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAにハイブリダイズする、レポーター蛍光およびクエンチャー蛍光が標識されたヌクレオチドプローブを、被検者から調製したDNAにハイブリダイズさせる。次いで、HO-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAを、5'ヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを用いて増幅する。その結果、レポーター蛍光とクエンチャー蛍光を標識したヌクレオチドプローブのレポーター蛍光標識部分が切断され、レポーター蛍光が遊離する。本発明において、5'ヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼとしては、好適にはTaqDNAポリメラーゼが例示できるが、これに限定されるものではない。本方法においては、次いで、遊離したレポーター蛍光を検出し、さらに、該レポーター蛍光の発光を対照と比較する。なお、本方法においては、HO-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基が正常型である場合と変異型である場合で異なるレポーター蛍光を標識した2種類のヌクレオチドプローブを用いることで、1回の反応でタイピングすることが可能である。

【0044】さらに別の方法においては、まず、被検者からDNA試料を調製する。次いで、HO-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基から5'側の塩基

配列と相補的な配列および該塩基の1塩基3'側の塩基から3'側の塩基配列とハイブリダイズしない配列（フラップ）を有するヌクレオチドプローブを調製する。また、HO-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基に対応する塩基（任意の塩基）が3'末端であり、該1004番目に相当する部位の塩基の1塩基3'側の塩基から3'側の塩基配列と相補的な配列を有するヌクレオチドプローブを調製する。次いで、調製したDNAに、上記2種類のヌクレオチドプローブをハイブリダイズさせる。次いで、ハイブリダイズしたDNAを一本鎖DNA切断酵素で切断し、フラップを遊離させる。本発明において、一本鎖DNA切断酵素としては、特に制限はなく、例えば下記のcleavaseが例示できる。本方法においては、次いで、フラップと相補的な配列を有するヌクレオチドプローブであって、レポーター蛍光およびクエンチャー蛍光が標識されたヌクレオチドプローブをフラップにハイブリダイズさせる。次いで、発生する蛍光の強度を測定する。次いで、測定した蛍光の強度を対照と比較する。

【0045】上記方法としては、例えば、Invader法（SNP遺伝子多型の戦略、松原謙一・榊佳之、中山書店、p94-105、Genome Research (2000)10:330-343）等が挙げられる。具体的には、まず、HO-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基から5'側の塩基配列と相補的な配列および該塩基の1塩基3'側の塩基から3'側の塩基配列とハイブリダイズしない配列（フラップ）を有するヌクレオチドプローブ（プローブA）を合成する。また、HO-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基に対応する塩基（任意の塩基）が3'末端であり、該1004番目に相当する部位の塩基の1塩基3'側の塩基から3'側の塩基配列と相補的な配列を有するヌクレオチドプローブ（プローブB）を合成する。次いで、これらプローブを調製した鋳型DNAにハイブリダイズさせる。この際、HO-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基に対応するプローブBの塩基（任意の塩基）が鋳型DNAとプローブAとの間に侵入する。この侵入部位を認識して、該部位に対応するプローブAの塩基と該塩基の1塩基3'側の塩基の間を切断するエンドヌクレアーゼ（cleavase）を用いてハイブリダイズしたDNAを切断する。これにより、フラップ部分が遊離する。次いで、遊離したフラップ部分とフラップと相補的な配列を有するヌクレオチドプローブであって、レポーター蛍光およびクエンチャー蛍光が標識されたヌクレオチドプローブ（検出用プローブ）をハイブリダイズさせる。該検出用プローブは、一般的にfluorescence resonance energy transfer（FRET）プローブとよばれる。該

プローブにおいて、5'側は自身で相補的に結合できる。また、3'側はフラップと相補的な配列を有している。また、自身で相補的に結合できる5'側において、5'末端にはレポーター蛍光が標識され、該5'末端の3'側にはクエンチャー蛍光が標識されている。遊離したフラップの3'末端の塩基が、FRETプローブにハイブリダイズする結果、該プローブのレポーター蛍光が標識された相補結合部位に侵入することで、cleavaseが認識する構造が生成される。本方法においては、cleavaseによるレポーター蛍光標識部分の切断によって遊離したレポーター蛍光を検出し、さらに、測定した蛍光の強度を対照と比較する。

【0046】さらに別の方法においては、まず、被検者からDNA試料を調製する。次いで、H0-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAを増幅する。次いで、増幅したDNAを一本鎖に解離させる。次いで、解離させた一本鎖DNAのうち、片鎖のみを分離する。次いで、H0-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基の近傍より1塩基ずつ伸長反応を行い、その際に生成されるピロリン酸を酵素的に発光させ、発光の強度を測定する。次いで、測定した蛍光の強度を対照と比較する。このような方法としては、例えば、Pyrosequencing法(Anal. Biochem. (2000)10:103-110)等が挙げられる。

【0047】さらに別の方法においては、まず、被検者からDNA試料を調製する。次いで、H0-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAを増幅する。次いで、H0-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基の1塩基3'側の塩基から3'側の塩基配列に相補的な配列を有するプライマーを調製する。次いで、蛍光ラベルしたヌクレオチド存在下で、増幅したDNAを鋳型とし、調製したプライマーを用いて一塩基伸長反応を行う。次いで、蛍光の偏光度を測定する。次いで、測定した蛍光の偏光度を対照と比較する。このような方法としては、例えば、AcycloPrime法(Genome Research (1999)9:492-498)等が挙げられる。

【0048】さらに別の方法においては、まず、被検者からDNA試料を調製する。次いで、H0-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAを増幅する。次いで、H0-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基の1塩基3'側の塩基から3'側の塩基配列に相補的な配列を有するプライマーを調製する。次いで、蛍光ラベルしたヌクレオチド存在下で、増幅したDNAを鋳型とし、調製したプライマーを用いて、一塩基

伸長反応を行う。次いで、一塩基伸長反応に使われた塩基種を判定する。次いで、判定された塩基種を対照と比較する。このような方法として、例えば、SNUPE法(Rapid Commun Mass Spectrom. (2000)14:950-959)等が挙げられる。

【0049】上記の方法以外にも、特定位置の変異のみを検出する目的にはアレル特異的オリゴヌクレオチド(Allele Specific Oligonucleotide/ASO)ハイブリダイゼーション法が利用できる。変異が存在すると考えられる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを作製し、これとDNAでハイブリダイゼーションを行わせると、変異が存在する場合、ハイブリッド形成の効率が低下する。それをサザンブロット法や、特殊な蛍光試薬がハイブリッドのギャップにインターカレーションすることにより消光する性質を利用した方法等により検出することができる。

【0050】本発明は、本発明の検査方法などに利用することができる、配列番号：2に記載の塩基配列の1004番目の塩基を含む、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチドを提供する。本発明において、オリゴヌクレオチドには、ポリヌクレオチドが含まれる。

【0051】さらに、本発明は、本発明の検査方法に使用するための試薬を提供する。その一つの態様としては、H0-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAにハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチドを含む検査試薬が挙げられる。

【0052】該オリゴヌクレオチドは、H0-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAに特異的にハイブリダイズするものである。ここで「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下(例えば、サンプルックら,Molecular Cloning,ColdSpring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 第2版1989に記載の条件)において、他のタンパク質をコードするDNAとクロスハイブリダイゼーションを有意に生じないことを意味する。特異的なハイブリダイズが可能であれば、該オリゴヌクレオチドは、H0-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAに対し、完全に相補的である必要はない。

【0053】H0-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAにハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチドは、上記本発明の検査方法におけるプローブ(該プローブ

ブが固定された基板を含む)やプライマーとして用いることができる。該オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる場合、その長さは、通常15bp～100bpであり、好ましくは17bp～30bpである。プライマーは、多型部分を含むH0-1遺伝子のプロモーター領域の少なくとも一部を増幅しうるものであれば、特に制限されない。

【0054】また、上記オリゴヌクレオチドをプローブとして使用する場合、該プローブは、H0-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAに特異的にハイブリダイズするものであれば、特に制限されない。該プローブは、合成オリゴヌクレオチドであってもよく、通常少なくとも15bp以上の鎖長を有する。

【0055】本発明のオリゴヌクレオチドは、例えば市販のオリゴヌクレオチド合成機により作製することができる。プローブは、制限酵素処理等によって取得される二本鎖DNA断片として作製することもできる。

【0056】本発明のオリゴヌクレオチドをプローブとして用いる場合は、適宜標識して用いることが好ましい。標識する方法としては、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、オリゴヌクレオチドの5'端を³²Pでリン酸化することにより標識する方法、およびクレノウ酵素等のDNAポリメラーゼを用い、ランダムヘキサマーオリゴヌクレオチド等をプライマーとして³²P等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識された基質塩基を取り込ませる方法(ランダムプライム法等)を例示することができる。

【0057】また、本発明における検査試薬の別の態様は、H0-1遺伝子のプロモーター領域の塩基であって、配列番号：1に記載の塩基配列の1004番目に相当する部位の塩基を含むDNAを増幅するように設計されたフォワードプライマーおよびリバースプライマーを含む検査試薬である。プライマーの長さは、通常15bp～100bpであり、好ましくは17bp～30bpである。プライマーは、多型*

*部分を含むH0-1遺伝子のプロモーター領域の少なくとも一部を増幅しうるものであれば、特に制限されない。

【0058】上記の検査薬においては、有効成分であるオリゴヌクレオチド以外に、例えば、滅菌水、生理食塩水、植物油、界面活性剤、脂質、溶解補助剤、緩衝剤、保存剤等が必要に応じて混合されていてもよい。

【0059】

【実施例】以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0060】[実施例1]本発明者らは、H0-1のプロモーター領域における多型の同定を試みた。その結果、H0-1のプロモーター領域には、3種類の変異が見出された(H0-P1、H0-P2、H0-P3)(図1)。このうち、H0-P1およびH0-P2は、本実施例において新たに見出された変異である。なお、H0-P3は、GTリピートの繰り返しの数が異なる変異である。

【0061】[実施例2]実施例1に記載の3種類の遺伝型と虚血性心疾患の関連を検討した。具体的には、心臓カテーテル検査に於いて、虚血性心疾患であることが確認された597人と、検診受診者で、虚血性心疾患の無いことが確認された1973人で検討した。H0-P1のAA型は、虚血性心疾患群で10.84%の出現頻度であり、対照群での8.15%よりも高い傾向にあったが、統計的には有意差はなかった(P=0.17)。H0-P3のGTリピートは、15回から43回まで認められたが、アレルの出現頻度は、虚血性心疾患群と対照群で異なる傾向を認めたが(アレル30リピートの出現頻度が虚血性心疾患で低い。P=0.0565)、強い有意差ではなかった。一方、H0-P2に関しては、表1に示すように、AA型の出現頻度が虚血性心疾患群で16.08%と、対照群の21.29%より低く、統計的にも有意差(p=0.0136)が認められた。

【0062】

【表1】

	AA 型	AT 型	TT 型
正常群	420 21.29%	929 47.09%	624 31.63%
虚血性心疾患	96 16.08%	309 51.76%	192 32.16%

P=0.0136 (分割表分析)

【0063】[実施例3]虚血性心疾患の危険因子として、糖尿病・現在の喫煙習慣・性・体容積指数(Body mass index: BMI)などが挙げられている。そこで、これらの関与を考えた上での虚血性心疾患と遺伝型の影響を明らかにするため、Multiple Logistic 解析を行った。この際、H0-P2の遺伝型であるAA型、AT型、およびTT型を、AA型とAT+TT型の2群に分けた。検討の結果、AT+TT遺伝型は、AA型に比べオッズ比1.516(95%CI 1.123～2.

070)で虚血性心疾患群の素因遺伝型であることが判明した。また、H0-P2におけるAA型は、虚血性心疾患に対してprotectiveに作用することがわかった(表2)。なお、表2において、オッズ比下限およびオッズ比上限は、それぞれ、95%の信頼区間におけるオッズ比下限およびオッズ比上限を意味する。

【0064】

【表2】

26

	オッズ比	オッズ比下限	オッズ比上限	p
切片	1.715			
HO-P2 (AA/AT+TT)	1.516	1.123	2.070	0.0075
糖尿病(無/有)	16.124	12.034	21.81	<0.0001
喫煙(無/有)	2.912	2.293	3.707	<0.0001
体容積指数(BMI)	0.088	0.024	0.329	0.0003
性(女/男)	3.104	2.362	4.107	<0.0001

【0065】[実施例4]AアレルとTアレルのプロモーター活性を、牛内皮細胞を用い、過酸化水素刺激下で検討した。Aアレルのプロモーター活性はTアレルのプロモーター活性よりも高かった。Aアレルの方が酸化ストレスに対するHO-1の誘導が大きく、より防御的に作用するため、動脈硬化の進展発症も遅れ、虚血性心疾患の発症も少ないと思われる。従来報告されていたHO-P3 がプロモーター活性に影響を与えるとの報告は、HO-P2 と連鎖不平衡のあるため、本質的影響力を持つのは HO-P2 であるとの結果も得ている。以上のことから、AA型における虚血性心疾患の発症の抑制は、HO-1 遺伝子のプロモーター活性上昇によるHO-1 の発現量の増大によるものであると考えられる。

【0066】

【発明の効果】本発明によって、酸化ストレスが関与す

る疾患の発症しやすさに影響する遺伝性素因を有するか否かを検査するための方法および該検査のための試薬が提供された。該検査方法および該検査試薬を使用することで、酸化ストレスが関与する疾患の発症しやすさに影響する遺伝性素因を有するか否かを検査できるようになった。また、該検査方法および該検査試薬を使用することで、酸化ストレスが関与する疾患に罹患している被検者は、その原因が、酸化ストレスが関与する疾患に発症しやすい遺伝性素因にあることを認識することができるようになった。このような検査によって、酸化ストレスが関与する疾患の効果的な発症予防または適切な治療を行うことができるものと大いに期待される。

【0067】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> President of National Cardiovascular Center
The Organization for Pharmaceutical Safety and Research
Genox Research, Inc.

<120> A method to identify susceptibility to oxidative stress-related diseases

<130> G1-A0206

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1440

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gaattccagg aagttttttt tttttttttt tggt
tttttt tttttttgag ggacagcgtc 60
ttgttctgtt gcccaggtta gaatacagta gcgt
ggtcac agctcactcc agcctctaca 120
tcccaggctc aagtgaacct ccagcctcag cctc
ccaagt agctgggacc acaggcatgt 180
gccacatgc ccagctaatt tattttatat ttg

tgggccctga gcaggcactg agtataagtc agac
 ctgaat gtgcctggaa gagggtccca 600
 cgcattccag caggaagca gtttgtatga cagg
 tgtccc agtccaggcg gataccaggt 660
 gctgccagag tgtggaggag gcaggcgggg actt
 agtctc ctccctgggt ttggacactg 720
 gcatcctgct ttatgtgtga caccactgca cccc
 tctgag cctcggtttc cccatctgta 780
 aatagaagc gatctaccct cacaggtcag ttgt
 agggat gaaccatgaa aatactagag 840
 tctctgtttt ttgacaggaa ctcaaaaaac agat
 cctaaa tgtacattta aagaggggtgt 900
 gaggaggcaa gcagtcagca gaggattcca gcag
 gtgaca ttttagggag ctggagacag 960
 cagagcctgg ggttgctaag ttcttgatgt tgcc
 caccag gcttttgctc tgagcagcgc 1020
 tgctcccag ctttctggaa ctttctggga cgcc
 tgggggt gcatcaagtc ccaaggggac 1080
 agggagcaga agggggggct ctggaaggag caaa
 atcaca ccagagcct gcagcttctc 1140
 agatttcctt aaaggttttg tgtgtgtgtg tgtg
 tgtgtg tgtgtgtgta tgtgtgtgtg 1200
 tgtgtgtgtg tgtgtgtgtt ttctctaaaa gtcc
 tatggc cagactttgt ttcccaaggg 1260
 tcatatgact gctcctctcc accccacact ggcc
 cggggc gggctgggag cggggcccctg 1320
 cgggtgttgc aacgcccggc cagaaagtgg gcat
 cagctg ttccgcctgg ccacgtgac 1380
 ccgccgagca taaatgtgac cggccgcggc tccg
 gcagtc aacgcctgcc tcctctcgag 1440
 <210> 2
 <211> 1440
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

gaattccagg aagttttttt tttttttttt tggt
 tttttt tttttttgag ggacagcgtc 60
 ttgttctgtt gccagggtta gaatacagta gcgt
 ggtcac agctcactcc agcctctaca 120
 tcccaggctc aagtgaacct ccagcctcag cctc
 ccaagt agctgggacc acaggcatgt 180
 gccacatgc ccagctaatt tattttatat ttig
 tagaga cggggtctcc ctatgttgcc 240
 caggccag 27 tcgaactcaa agcaatcttc ccac

28

【図面の簡単な説明】 図1は、H0-1のブローカー領域における多型部位を示す図である。

【図1】 H0-1のブローカー領域における多型部位
 cagctc aggt
 gtgagc taccatgcca ggcctgaaag 360
 ccatcttaaa aaaaaaatct tagaatgaga tcac
 agtatt gggaaaggac tgtatgaatc 420
 atctggtcca ttctgtttgt cctctgggtt cacc
 cagtga ccctatttcc cccagattct 480
 aaggagtcca cctcatgcag aattgattca atag
 gcgac agcaagggcc agctctgctc 540

【図1】

1 gaattccagg aagttttttt tttttttttt tgtttttttt tttttttgag ggacagcgto
 61 ttgtttotgtt gccaggtta gaatacagta gcgtggtcac agctcactcc agcctotaca
 121 tcccaggctc aagtgaacct ccagcctcag cctcccaagt agctgggacc acaggcatgt
 181 gccaccatgc ccagctaatt ttttttatat tttgtagaga cggggtctcc ctatgttgcc

HO-P1 G>A

241 caggccagtc tcgaactcaa agcaatcttc ccacctcgac tgggctcaaa gcgctcttcc
 301 cacctoaacc toccaaagta ctgggactac aggtgtgagc taccatgcc a ggcctgaaag
 361 ccatcttaaa aaaaaaatct tagaatgaga tcacagtatt gggaaaggac tgtatgaatc
 421 atctgggtcca ttggttttgt cctotgggtt caccagtgta cctatttcc ccgagttct
 481 aaggagtcca cctcatgcag aattgattca ataggcgatc agcaagggcc agctctgctc
 541 tgggcctga gcaggcactg agtataagtc agacctgaat gtgcctggaa gagtgtocca
 601 cgcattccag cagggaagca gttgtatga caggtgtccc agtccaggcg gataccaggt
 661 gctgccagag tgtggaggag gcaggcgggg acttagtctc ctccctgggt ttggacactg
 721 gcatcctgct ttatgtgtga caccactgca cccctctgag cctcggttcc cccatctgta
 781 aaatagaagc gatctacct cacaggtcag ttgtagggat gaacctgaa aatactagag
 841 tctctgtttt ttgacaggaa ctcaaaaaac agatcctaaa tgtacattta aagagggtgt
 901 gaggaggcaa gcagtcagca gaggattcca gcaggtgaca ttttagggag ctggagacag
 961 cagagcctgg ggttgctaag ttctgatgt tgcccaccag gottttgctc tgagcagcgc

HO-P2 T>A

1021 tgcctccag ctttctggaa ccttotggga cgcttgggt gcatcaagtc ccaaggggac
 1081 agggagcaga agggggggct ctggaaggag caaaatcaca ccagagcct gcagottctc
 1141 agatttctt aaaggttttg ~~tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgta tgtgtgtgtg~~
 1201 ~~tgtgtgtgtg tgtgtgtgtt~~ ttctotaaaa gtcctatggc cagactttgt ttcccaagg

HO-P3 TG repeat

1261 tcatatgact gctcctctcc accccacact ggcccggggc gggctgggag cgggcccctg
 1321 cgggtgttgc aacgccgggc cagaaagtgg gcatcagctg ttccgctgg cccacgtgac
 1381 ccgcagagca taaatgtgac cggccggggc tccggcagtc ~~aacgcctgac tctctctgag~~

Exon 1

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)
G 0 1 N	33/53	G 0 1 N	33/566
	33/566		33/58
	33/58	C 1 2 N	15/00
			Z N A A
(72)発明者	後藤 葉一	F タ-ム (参考)	2G045 AA35 DA13 FB02 FB12 GC15
	大阪府吹田市藤白台5丁目7番地1号 国		JA01
	立循環器病センター内		2G054 CA22 CE02 EA03 GA04
			4B024 AA11 CA04 HA08 HA11
			4B063 QA01 QA17 QQ02 QQ08 QQ42
			QQ49 QR32 QR42 QR55 QR72
			QS34

专利名称(译)	一种测试其是否具有影响涉及氧化应激的疾病易感性的遗传倾向的方法		
公开(公告)号	JP2003284558A	公开(公告)日	2003-10-07
申请号	JP2002089960	申请日	2002-03-27
[标]申请(专利权)人(译)	KOKURITSU JUNKANKIBYO SENTAA SOCHO		
申请(专利权)人(译)	国家心血管中心一般 药品不良反应救济和研究促进调查机制		
[标]发明人	岩井直温 後藤葉一		
发明人	岩井 直温 後藤 葉一		
IPC分类号	G01N27/62 C12N15/09 C12Q1/68 G01N21/78 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/58		
FI分类号	C12Q1/68.A C12Q1/68.Z G01N21/78.C G01N27/62.V G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/58.A C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/DA13 2G045/FB02 2G045/FB12 2G045/GC15 2G045/JA01 2G054/CA22 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/GA04 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/HA08 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA17 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ49 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR72 4B063/QS34 2G041/CA01 2G041/DA04 2G041/EA01 2G041/FA11 2G041/FA13 2G041/GA06 2G041/JA20		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种检查人是否具有遗传易感性的方法，该遗传易感性会影响发生与氧化应激有关的疾病的易感性。另一个目的是提供用于测试的试剂。本发明人研究了HO-1的启动子区域中新发现的多态性与缺血性心脏病之间的关系，所述缺血性心脏病是与氧化应激相关的疾病。结果，当仅在一个等位基因中检测到多态性时或当在两个等位基因中均未检测到多态性时，存在易患与氧化应激相关的疾病的遗传易感性，并且两个等位基因均为多态性。已经发现该疾病具有遗传倾向，使得该疾病难以发展。因此，通过分析HO-1基因的启动子区域中的多态性，可以测试其是否具有遗传易感性，该遗传易感性影响与氧化应激相关的疾病的发展的易感性。

長さは、通常15bp~100bpであ 【0062】

30bpである。プライマーは、多型* 【表1】

	AA型	AT型	TT型
正常群	420 21.29%	929 47.09%	624 31.63%
虚血性心疾患	96 16.08%	309 51.76%	192 32.16%