

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-508199

(P2005-508199A)

(43) 公表日 平成17年3月31日(2005.3.31)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 9
C 1 2 M 1/34	C 1 2 M 1/34	Z 4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09	G O 1 N 33/53	D
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	M

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 83 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-542659 (P2003-542659)	(71) 出願人	598115199
(86) (22) 出願日	平成14年11月8日 (2002. 11. 8)		ボード、アヴ、リージェンツ、ズィ、ユー ニヴァーサティ、アヴ、テクサス、システ ィム
(85) 翻訳文提出日	平成16年5月7日 (2004. 5. 7)		アメリカ合衆国テクサス州オースティン、 ウエスト・セヴンス・ストリート 201 番
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/035902	(74) 代理人	100073841
(87) 国際公開番号	W02003/040414		弁理士 真田 雄造
(87) 国際公開日	平成15年5月15日 (2003. 5. 15)	(74) 代理人	100058136
(31) 優先権主張番号	60/338, 270		弁理士 中島 宣彦
(32) 優先日	平成13年11月8日 (2001. 11. 8)	(74) 代理人	100104053
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 尾原 静夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイクロアレイを使用してアルコール依存症および関連疾病の検出および監視を行うための方法
および装置

(57) 【要約】

アルコール依存症および関連疾病状態の検出、診断および/または監視を行うための装置および方法を開示する。該装置は、基体と、基体に結合した1つまたは複数のアルコール依存症特異的核酸とを含む。基体を、アルコール依存症またはアルコール中毒あるいはアルコール関連疾病状態のヒトから採取した試料に接触させ、接触は、コンピュータによって収集、記録できる情報を提供するあらかじめ選択された条件で行われる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アルコール依存症に関連する遺伝子の存在を検出するための装置であって、
基体と、
基体に結合した 1 つまたは複数のアルコール依存症特異的核酸とを含む装置。

【請求項 2】

基体は、分子を共有結合または非共有結合により結合することができる微細加工した固表面を含む請求項 1 に記載の装置。

【請求項 3】

基体は、平面または球面に導入されたアミノ、カルボキシル、チオールまたはヒドロキシル官能基を含むラングミュア・ボジエット膜、ガラス、機能ガラス、ゲルマニウム、シリコン、PTFE、ポリスチレン、砒化ガリウム、金、銀、または任意の材料をさらに含む請求項 2 に記載の装置。 10

【請求項 4】

1 つまたは複数のアルコール依存症特異的核酸は、異なる決定可能配列を有する 1 つまたは複数のペプチド核酸のヒト核酸標的要素を含む請求項 1 に記載の装置。

【請求項 5】

ヒト核酸標的要素は、それぞれ 1 平方センチメートル当たり 100 から 10000 個の標的要素の密度で基体上の異なる位置で 1 つまたは複数のペプチドを含む請求項 4 に記載の装置。 20

【請求項 6】

ヒト核酸標的要素は、ゲノム DNA、cDNA、オリゴヌクレオチド、RNA、それらの一本鎖二本鎖またはそれらの任意の化学的修飾体を含む請求項 4 に記載の装置。

【請求項 7】

ヒト核酸標的要素は、M6 神経糖タンパク質、ミエリン関連糖タンパク質、ミエリン関連乏突起膠細胞塩基性タンパク質、ミエリン塩基性タンパク質、ミエリンプロテオリピドタンパク質、ミエリン乏突起膠細胞糖タンパク質、ミエリンタンパク質 Po、乏突起膠細胞ミエリン糖タンパク質、PMP2、PMP22、MAL 遺伝子、ApoD、ApoE、炭酸脱水酵素 II、2', 3'-環状ヌクレオチド 3'-ホスホジエステラーゼ、ガラクトセレブロシダーゼ、トランスアルドラーゼ、UDP-ガラクトースセラミドガラクトシルトランスフェラーゼ、MyT1、プアルファ (Pur alpha)、Edg-2、神経膠線維酸性タンパク質、ケラチン 6B、ベータ III スペクトリン、プロテアーゼ、セリン、9 (ニューロシン)、プロプロテインコンバーターゼサブチリシン/ケキシン 4 型、カルパイン、大ポリペプチド L3、プロテアーゼ、セリン、11 (IGF 結合)、膜貫通プロテアーゼ、セリン 2、エンドセリン受容体タイプ B 様 (GPCR37)、アクアポリン 1 (チャンネル形成膜内在タンパク質)、内向き整流性カリウムチャンネル、サブファミリー J、メンバー 10、グルタメート受容体、AMPA1、N-エチルマレイミド感受性因子、EGF 含有フィブリン様細胞外マトリックスタンパク質 1、CD44 抗原、カドヘリン 18、テトラスパン NET-6、インターフェロン、ガンマ誘導性タンパク質 16、主要組織適合性複合体、クラス II、DR ベータ 1、小誘導性サイトカインサブファミリー C、メンバー 1、エポキシドヒドロラーゼ 1、ミクロソーム (生体異物)、プロリンデヒドロゲナーゼ (プロリンオキシダーゼ)、グルタチオン S-トランスフェラーゼ M5、ユビキノール-シトクロム c レダクターゼコアタンパク質 II、セリン/スレオニンキナーゼ、TU3A タンパク質 (優性ラパマイシン耐性 1、DRR1 としても知られる)、分泌収縮関連 (secreted frizzled-related) タンパク質 1、GTP 結合タンパク質、ホスホリパーゼ A2 (14-3-3 タンパク質)、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ、イソ型 Ib、アルファサブユニット、G タンパク質シグナリング制御因子 4 (RGS-4)、シヌクレイン、アルファ、リボフォリン II、130kD Golgi 局在型リンタンパク質、自己免疫制御因子 (自己免疫多腺性内分泌障害カンジダ症外胚葉性異栄養症)、SPY-ボックス 9 転写因子、スプライセオソーム関連タンパク 30 40 50

質 (U2snRNP)、レチノイドX受容体、ガンマ、核転写因子、Xボックス結合1、TATAボックス結合タンパク質関連因子、RNAポリメラーゼII、F、基本転写因子3、マクロファージ刺激1(肝細胞成長因子様)、LIM領域限定2(ロンボチン様1)、骨形態形成タンパク質7(骨形成タンパク質1)、レクイエム、アポトーシス反応垂鉛フィンガー遺伝子、ジスコイジン領域受容体ファミリー、メンバー1、CDC様キナーゼ2、CDC様キナーゼ1、腫瘍タンパク質p53結合タンパク質、2、ヒト成長/分化因子1、RACH1(補体ラッド1-1細胞周期チェックポイント突然変異体)、RAN(メンバーRASオンコ遺伝子ファミリー)、nel様2、サルコリピン、KIAA0043遺伝子生産物、EST、高システインおよび高グリシントタンパク質1、骨肉腫で増幅する保存遺伝子、KIAA0027遺伝子生産物、ホモ・サピエンス・クローン23916、KIAA0202遺伝子生産物、セレンタンパク質P、血漿、1、1、25-ジヒドロキシビタミンD-3によってアップレギュレートされた染色体16BACクローンCIT987SK-A-69G12、タイトジャンクションタンパク質2、HREV107様タンパク質、クローン23555mRNA配列、クローン25030mRNA配列、KIAA0237遺伝子生産物、KIAA0725遺伝子生産物、KIAA0293遺伝子生産物、神経芽細胞腫(神経組織)タンパク質、レチキュロン1、cAMP調節グアニンヌクレオチド交換因子IIにわずかに類似したEST、遺伝子pp2タンパク質にわずかに類似したEST、またはKIAA0195に極めて類似したEST、ユビキチンC、微小管関連タンパク質4、カルシウム依存性プロテアーゼ(小サブユニット、プロテアソームサブユニットz、ガンマ-アミノブチル酸(GABA)A受容体ベータ2サブユニット、グルタメート/アスパルテート輸送体II、リソソーム膜糖タンパク質-1(LAMP1)、心臓ギャップ結合タンパク質、オートタキシン-t(atx-t)、Igスーパーファミリー細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質(CTLA-4)、主要組織適合性複合体(MHC)のHLA-DRアルファ重鎖aクラスII抗原、ヒトアシル-CoAチオエステールヒドロラーゼ、シトクロムcオキシダーゼサブユニットVic、液胞H+ATPaseEサブユニット、ATPシンターゼ、リゾチームmRNA、プロスタグランジンD2シンターゼ、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼの肝臓mRNA、SURF-1、カルモジュリン、カルシニューリンA2、GDI解離阻害剤Rhogdiガンマ、14.3.3タンパク質(タンパク質キナーゼ調節因子)、hPTPA、タンパク質キナーゼCゼータ、小GTP結合タンパク質、S10、タンパク質チロシンホスファターゼ、睾丸特異的cAMP依存タンパク質キナーゼ触媒サブユニット(Cベータ・イソ型)、ADPリボシル化因子3、90kD熱ショックタンパク質遺伝子、熱ショックタンパク質HSPA2遺伝子、ミトコンドリアマトリックスタンパク質P1(核コード)、ヒストンH2A.2、RNAポリメラーゼII伸長因子SIII p15サブユニット、酸性リボソームリントタンパク質P0、グリシル-tRNAシンセターゼ、リボソームタンパク質L27a、色素上皮由来因子、TRPM-2タンパク質、アンギオテンシノゲン、トランスフェリン、メラノーマ遍在性突然変異タンパク質(MUM-1)、KIAA0080遺伝子生産物、KIAA0084遺伝子タンパク質またはKIAA0174生成物を含む、アルコール依存者またはアルコール中毒者が発現する、細胞信号伝達、免疫反応および/または細胞間相互作用に対する構造遺伝子、代謝遺伝子、転写遺伝子または他の遺伝子に特異的な配列を有するアルコール依存症特異的遺伝子の部分である請求項4に記載の装置。

【請求項8】

アルコール依存症特異的核酸が試料に接触する請求項1に記載の装置。

【請求項9】

試料は、全体的または部分的に、血漿、尿、精液、唾液、リンパ液、髄膜液、羊水、腺液および脳脊髄液、細胞または任意の他の体液、細胞あるいは体組織調製物を含む高分子を含む請求項8に記載の装置。

【請求項10】

アルコール依存症もしくはアルコール中毒またはアルコール関連疾病と考えられるヒトか

ら試料を採取する請求項 8 に記載の装置。

【請求項 1 1】

試料の部分が、1 つまたは複数のヒト核酸標的要素に特異的に結合する請求項 8 に記載の装置。

【請求項 1 2】

光学顕微鏡法、X 線撮影法、化学発光法、蛍光顕微鏡法、共焦点顕微鏡法、干渉分光法、表面プラズマ共鳴、質量分析法、原子間力顕微鏡法および走査トンネル顕微鏡法を含む、光源、コンデンサ、イオンまたはプラズマ・ビームで結合を検出する請求項 8 に記載の装置。

【請求項 1 3】

アルコール依存症特異的核酸と試料が、選択的結合条件下で接触する請求項 8 に記載の装置。

【請求項 1 4】

選択的結合条件は、信号強度の検出可能な変化として収集できる情報を提供する請求項 1 3 に記載の装置。

【請求項 1 5】

情報はコンピュータにより記録される請求項 1 4 に記載の装置。

【請求項 1 6】

コンピュータは、情報を記録し、情報をデータベースに記憶し、かつ / または情報を表示する請求項 1 5 に記載の装置。

【請求項 1 7】

情報は、各ヒト核酸標的要素における検出可能な変化の位置および大きさを含む請求項 1 4 に記載の装置。

【請求項 1 8】

試料情報と対照情報の情報比を求める請求項 1 5 に記載の装置。

【請求項 1 9】

対照情報は、試料の条件と類似の条件で、アルコール依存症およびアルコール中毒でないヒト、および / またはアルコール関連疾病ではないヒトから採取された試料から得られる請求項 1 5 に記載の装置。

【請求項 2 0】

情報は、当ヒトに関する遺伝子発現情報、ならびに診断および / または予後の医学的情報を生成する請求項 1 8 に記載の装置。

【請求項 2 1】

アルコール依存症特異的遺伝子を同定するための方法であって、アルコール依存症、アルコール中毒またはアルコール関連疾病と考えられるヒトから採取された試料と、アルコール依存症に関連する 1 つまたは複数の遺伝子を含む基体とを接触させるステップと、試料の発現のレベルと非アルコール依存症の対照試料の発現のレベルとを比較するステップであって、発現レベルの変化はアルコール依存症に相関するステップとを含む方法。

【請求項 2 2】

試料は、全体的または部分的に、血漿、尿、精液、唾液、リンパ液、髄膜液、羊水、腺液および脳脊髄液、細胞または任意の他の体液、細胞あるいは身体組織調製物を含む高分子を含む請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

基体は、分子を共有結合または非共有結合により結合することができる微細加工した固表面を含む請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

基体は、平面または球面に導入されたアミノ、カルボキシル、チオールまたはヒドロキシル官能基を含むラングミュア・ボジエット膜、ガラス、機能ガラス、ゲルマニウム、シリコン、PTFE、ポリスチレン、砒化ガリウム、金、銀、または任意の物質をさらに含む

10

20

30

40

50

請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 5】

ヒト核酸標的要素を基体に結合させる請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 6】

ヒト核酸標的要素は、ゲノム DNA、cDNA、オリゴヌクレオチド、RNA、それらの一本鎖もしくは二本鎖、または任意の化学的修飾体を含む請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

ヒト核酸標的要素は、アルコール依存症関連遺伝子からの決定可能配列をさらに含む請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 8】

各ヒト核酸標的要素は、1 平方センチメートル当たり 100 から 10000 個の標的要素の密度で基体上の異なる位置に少なくとも 1 つのペプチドを含む請求項 2 5 に記載の方法。

10

【請求項 2 9】

ヒト核酸標的要素は、プロテアーゼ、受容体、チャネル、シプナスタンパク質、細胞間もしくは細胞と基体の相互作用、免疫もしくは炎症反応、細胞信号伝達、分子シャペロンもしくは他の担体タンパク質、分子合成、細胞周期調節、細胞成長、細胞増殖または細胞死をコードする遺伝子を含む構造遺伝子、代謝遺伝子、転写遺伝子または他の遺伝子の部分である請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 30】

基体はマイクロアレイである請求項 2 1 に記載の方法。

20

【請求項 3 1】

結合は、試料の部分の、1 つまたは複数のヒト核酸標的要素への特異的な結合を含む請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 3 2】

結合は、選択的結合条件で行われる請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

光学顕微鏡法、X線撮影法、化学発光法、蛍光顕微鏡法、共焦点顕微鏡法、干渉分光法、表面プラズマ共鳴、質量分析法、原子間力顕微鏡法および走査トンネル顕微鏡法を含む、光源、コンデンサ、イオンまたはプラズマ・ビームで結合を検出する請求項 2 1 に記載の方法。

30

【請求項 3 4】

選択的結合は、信号強度の検出可能な変化として収集できる情報を提供する請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 3 5】

情報はコンピュータにより記録される請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

コンピュータは、情報を記録し、情報をデータベースに記憶し、かつ/または情報を表示する請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

情報は、各ヒト核酸標的要素における検出可能な変化の位置および大きさを含む請求項 3 4 に記載の方法。

40

【請求項 3 8】

試料情報と対照情報の情報比を求める請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 9】

対照情報は、試料の条件と類似の条件で、アルコール依存症およびアルコール中毒でないヒト、および/またはアルコール関連疾病ではないヒトから採取された試料から得られる請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 40】

情報は、該ヒトに関する遺伝子発現情報、ならびに診断および/または予後の医学的情報

50

を生成する請求項 38 に記載の方法。

【請求項 41】

血液試料からアルコール依存症に関連する遺伝子の存在を検出するための装置であって、1つまたは複数のアルコール依存症特異的核酸と1つまたは複数の対照核酸とを含む基体を含み、血液の試料から採取された核酸から1つまたは複数のアルコール依存症特異的核酸の発現を検出する装置。

【請求項 42】

ヒト核酸標的要素は、ゲノムDNA、cDNA、オリゴヌクレオチド、RNA、それらの一本鎖もしくは二本鎖、または任意の化学的修飾体質を含む請求項 41 に記載の装置。

【請求項 43】

血液試料の核酸は、アポリポタンパク質；アクアポリン；CD44抗原；ドーパミン受容体D2；ヒスタミン受容体H1；ホモ・サピエンス・ベータ-1アドレナリン受容体mRNA、3'UTR；ミエリン関連糖タンパク質；ミエリン塩基性タンパク質；ミエリン遺伝子発現因子2；ミエリン乏突起膠細胞糖タンパク質；ミエリンタンパク質ゼロ様1；ミエリン転写因子1様；ミエリン関連乏突起神経膠芽細胞塩基性タンパク質；神経ペントラキシンI；神経ペントラキシンIi；神経ペントラキシン受容体；神経カリウムチャンネル・アルファサブユニット；神経タンパク質；神経タンパク質17.3；神経Shc；神経Shcアダプター同族体；神経特異的転写因子DAT1；ニューロナチン；神経特異的タンパク質；神経ペントラキシン受容体；神経ペプチドY受容体Y1；ニューロテンシン受容体2；神経向性チロシンキナーゼ、受容体、2型；末梢ミエリンタンパク質2；末梢ミエリンタンパク質22；ホスホリパーゼA2受容体；プロテオリピドタンパク質2；ナトリウムチャンネル、電圧ゲート型、VII型、アルファポリペプチド；ナトリウムチャンネル、電圧ゲート型、II型、ベータポリペプチド；シタキシン、およびそれらの組合せよりなる群から選択されるアルコール依存症特異的遺伝子の部分を含む請求項 41 に記載の装置。

10

20

【請求項 44】

1つまたは複数のアルコール依存症特異的遺伝子に対してスクリーニングを行うための方法であって、

血液試料から得られた核酸と、1つまたは複数のアルコール依存症に関連する遺伝子を含む基体とを接触させるステップと、

試料の発現のレベルと非アルコール依存症の対照試料の発現のレベルとを比較するステップであって、発現レベルの変化はアルコール依存症と相関するステップとを含む方法。

30

【請求項 45】

ヒト核酸標的要素は、ゲノムDNA、cDNA、オリゴヌクレオチド、RNA、一本鎖または二本鎖、あるいはそれらの任意の化学的修飾体質を含む請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

血液試料の核酸は、アポリポタンパク質；アクアポリン；CD44抗原；ドーパミン受容体D2；ヒスタミン受容体H1；ホモ・サピエンス・ベータ-1アドレナリン受容体mRNA、3'UTR；ミエリン関連糖タンパク質；ミエリン塩基性タンパク質；ミエリン遺伝子発現因子2；ミエリン乏突起膠細胞糖タンパク質；ミエリンタンパク質ゼロ様1；ミエリン転写因子1様；ミエリン関連乏突起神経膠芽細胞塩基性タンパク質；神経ペントラキシンI；神経ペントラキシンIi；神経ペントラキシン受容体；神経カリウムチャンネル・アルファサブユニット；神経タンパク質；神経タンパク質17.3；神経Shc；神経Shcアダプター同族体；神経特異的転写因子DAT1；ニューロナチン；神経特異的タンパク質；神経ペントラキシン受容体；神経ペプチドY受容体Y1；ニューロテンシン受容体2；神経向性チロシンキナーゼ、受容体、2型；末梢ミエリンタンパク質2；末梢ミエリンタンパク質22；ホスホリパーゼA2受容体；プロテオリピドタンパク質2；ナトリウムチャンネル、電圧ゲート型、VII型、アルファポリペプチド；ナトリウムチャンネル、電圧ゲート型、II型、ベータポリペプチド；シタキシン、およびそれらの組合せよりなる群から選択されるアルコール依存症特異的遺伝子の部分を含む請求項 44 に記載

40

50

の装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、広くは、アルコール依存症および関連疾病状態の検出、監視および診断を行うための方法および装置に関し、より詳細には、マイクロアレイを使用して、対象、好ましくはヒト患者におけるアルコール依存症および関連疾病状態の進行を分析するための方法および装置に関する。

【背景技術】

【0002】

米国政府は、DOD認可番号：517-9-8444に基づいて本発明の一定の権利を所有することができる。

【0003】

本発明の範囲を制限することなく、例として、核酸マイクロアレイを使用して、ヒトにおけるアルコール依存症およびその進行の検出、診断または監視を行う方法に関連してその背景を説明する。

【0004】

これまで、この分野では、アルコール依存症またはアルコール中毒および関連挙動の診断および/または検出は、実質的に、インタビュー、過去の記録の考察または臨床な印象に依存してきた(Allen, J P, Columbus M, and Fertig J. 1995. アルコール依存症治療における評価：概要. NIAAA治療ハンドブックシリーズ4、アルコール問題の評価：臨床医および研究者のための手引き (Assessment in Alcoholism Treatment: An Overview. In: NIAAA Treatment Handbook Series 4, Assessing Alcohol Problems: A Guide for Clinicians and Researchers.) NIH Publication No. 95-3745. pp. 1-9)。一般に、病歴と臨床的兆候の項目を組み合わせで診断指標を形成する。加えて、これらの項目と、指標の一部を形成する飲酒歴、CAGEアンケートおよび早期指示アンケートとを比較することができる。

【0005】

この方法に伴う1つの問題は、指標を得るのが困難なことである。例えば、指標は、1つのアンケートから得られたデータに基づくことは希で、その代わりに、信頼性を示すためにいくつかのアンケートを行うことを必要とする。この方法は、最低限2つの異なる時点で、一般には少なくとも1週間おいてアンケートを行わなければならないことを意味し、診断を得る即時性を制限する。また、アンケートは冗長で、それらを評価する中心的、またはコンピュータ化された手段をもたない可能性がある。これは、冗長であるばかりでなく、複数の尺度を含むアルコール使用記録や中毒重症度指標などの測度に対しては特に不便である。加えて、多くの尺度を管理するための手順は簡単であるが、中毒重症度指標、包括的飲酒者プロフィール、アルコール経時追跡手順、およびいくつかの診断尺度は、それらを正しく使用できるまで長期間の訓練を必要とする。それらの尺度のうち、性別または民族に基づく可変的な評価を提供するものはほとんどなく、それらの普遍的な適用可能性を制限する。

【0006】

アルコール依存症および飲酒を初期段階で検出するために、判別評価の診断値、および臨床検査の組合せがしばしば用いられる。しかし、判別評価は、低い感受性および特異性しか与えず、しばしばアルコールの摂取に限定される。例えば、ガンマ-グルタミルトランスファーゼ、アセトアルデヒド誘導ホモグロビンフラクションおよび平均血球体積は、それぞれ72%および73%の低い感受性および特異性を示し、検査は重度の飲酒者に対して最適に実施される(Sillanauke P. 1992. アルコール中毒の検出における判別評価の診断値(The diagnostic value of a di

10

20

30

40

50

iscriminant score in the detection of alcohol abuse) Arch Pathol Lab Med 116:924-9)。他の検査の組合せを使用すると、より良好な結果を提供することができるが、すべての年齢、性別または民族群にわたって機能するものはない。これにより、単に1つの標識を用いても、あるいはそれらの組合せを用いたとしても、アルコール依存症や重度の飲酒のような前段階のアルコール中毒を最適に検出できないことが確認される。

【0007】

残念なことに、また一部に上記の制限により、アルコール依存症またはアルコール中毒およびその関連拳動を診断または検出するためのすぐに利用可能で、標準化された方法が存在しない。その結果、医師は、しばしばアルコール関連疾病を誤診または過小診断する。加えて、標準化された診断法が欠如するときは、医師は、患者のみから得られた情報に頼ることができないため、疾病の進行を迅速かつ日常的に監視することは、不可能でなくても、困難である。アルコール中毒者が、彼らの真のアルコール消費量を開示することは希で、しばしば彼らのアルコール使用と彼らの他の症状および問題とのいかなる関連性も否定し、最小限にとどめる。

10

【0008】

先述の説明によって証明されたように、アルコール依存症またはアルコール中毒の検出、診断および監視を行うための簡単で確実な方法が真に必要とされている。アルコール依存症または関連疾病の早期診断は、アルコール依存症またはその関連疾病からの想定される回復がより好ましい段階での建設的な介入治療をも可能にするであろう。さらに、アルコール依存症の病理学的影響を含めて、アルコール依存症および関連疾病状態の進行を正確かつ迅速に監視する能力は、医師が患者を効果的に早期に治療することを可能にするとともに、研究者が、アルコール依存症および関連疾病に対する様々な治療法の効果をより適切に評価することを可能にする。

20

【0009】

したがって、アルコール中毒および関連疾病の進行の検出および監視を行う確実で、再現性があり、経済的な方法が必要とされる。アルコール消費の正確かつ客観的な生理学的測定値を提供する体系的な方法および装置を開発することは、医師が意志決定過程において、またこれらの患者における罹患および死亡転帰を改善するために必要とされる手段である。該方法および装置は、治療目標への患者の遵守状況を監視するための偏りがなく、信用できるツールを医療従事者および研究者に提供する。

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

現在、アルコール依存症またはアルコール中毒あるいは関連疾病をかかえるヒトに対する検出、診断または監視は、簡単で、迅速で、標準化された方法および装置の欠如によって制約されている。現行の方法、特にアンケートおよび判別評価は、著しいコストおよび時間を必要とし、性別、年齢および/または民族の偏りが示されると不確実であるとしばしば見なされる。加えて、アルコール中毒者は、真のアルコール消費量を開示することは希で、しばしば彼らの症状または問題を否定し、できるだけ小さいものとしようとするため、そのヒトの直接的な検査を含むすべての技術に固有の不確実性が加わる。加えて、アルコール消費に対する現行の測定値は、直接的な消費を測定するにすぎず、中毒またはその進行の度合について何も示さない。

40

【0011】

アルコール中毒の検出および測定の分野において、現行のシステムの大きな問題は、アルコール消費を扱ういくつかの技術があるが、それぞれが独立的にアルコール摂取に反応することである。加えて、各技術は特異的で、しばしば感受性、特異性および予想値を制限する。これらの従来的な技術は、アルコール以外に、年齢、性別および様々な物質ならびに非アルコール関連疾病にしばしば影響される。例えば、アルコール消費の早期検出評価、すなわち35以下の血液化学および血液学的検体の組合せに対する分析から導かれる直

50

線的な判別関数は、40歳以上のヒトにおける重度飲酒を識別する場合にのみ最良の機能を果たす(Harasyimiw JW、Bean P. 2001. アルコール消費評価の早期検出を用いることによる重度飲酒者の識別(Identification of heavy drinkers by using the early detection of alcohol consumption score) Alcohol Clin Exp Res 25:228-35)。より重要なことには、アルコール消費を測定する現行の技術は、直接的な消費を測定するにすぎず、中毒またはその進行の度合について何も示さない。また、それらは、アルコール消費に対する全体的な時間軸を扱わない。生物学的標識に対する検査は、特定の検出時間枠を必要とする。例えば、1つの標識であるエチルグルクロニドは、高い感受性および特異性を有すると考えられるが、アルコールが身体から消失した後の80時間以内の短い期間にわたってしか検出できない(Wurst FM、Kempter C、Metzger J、Seidl S、Alt A. 2000. エチルグルクロニド:臨床および法医学的かわりを有する最近のアルコール消費の標識(Ethyl glucuronide: a marker of recent alcohol consumption with clinical and forensic implications) Alcohol 20:111-6)。

10

【0012】

現行のアルコール依存症の検出および管理は、一部には、主に主観的情報または直接的なアルコール摂取に頼るため、その幅広い用法を制限する原理に基づいている。本明細書に開示されるように、現行の検出および管理技術は、現行の技術そのものの使用に固有の同一の非効率性によって阻害されていることが認識される。本発明は、現行の技術におけるコスト効率性、精度および確実性が、アルコール依存症およびその関連疾病の検出に有効ではないという認識に基づいている。

20

【課題を解決するための手段】

【0013】

より具体的には、本発明は、アルコール依存症および関連疾病の検出、診断および監視を行うための装置であって、基質を支えるための固体支持体と、固体支持体に結合した1つまたは複数のアルコール依存症固有核酸の集合体としての基質とを備えた装置でありうる。本発明に使用する基質は、ゲノムDNA、cDNA、オリゴヌクレオチド、RNA、それらの一本鎖もしくは二本鎖、または任意の化学的修飾体の如き異なる決定可能配列を有するペプチド核酸のヒト核酸標的要素である。代替的な実施形態において、ヒト核酸標的要素は、例えば、アルコール依存者またはアルコール中毒者が発現する、細胞信号伝達、免疫反応および/または細胞間相互作用に対する構造遺伝子、代謝遺伝子、転写遺伝子または他の遺伝子に特異的な配列を有するアルコール依存症特異的遺伝子でありうる。基質を支える固体支持体は、共有結合または非共有結合により分子を結合させることができる任意の微細加工した固表面である。分子が結合できる微細加工した固表面を使用する利点は、アミノ、カルボキシル、チオールまたはヒドロキシル分子基、すなわちヒト核酸を容易に結合させる分子基のその固表面への導入を促進することである。

30

【0014】

固体支持体によって支えられる基質は、アルコール依存症もしくはアルコール中毒またはアルコール関連疾病と考えられるヒトから採取した試料、例えば体液に接触することができる。代替的な実施形態において、試料は、血漿、尿、精液、唾液、リンパ液、髄膜液、羊水、腺液、脳脊髄液、細胞、または任意の他の体液、細胞または体組織調製物でありうる。試料を随意に細分して、プローブを作製することができる。同様に、光源またはコンデンサを備えた装置で検出できる標識を試料またはプローブに随意に標識付けすることができる。例えば、蛍光標識で標識付けしたプローブを光源、例えば傾向顕微鏡で観察することができる。装置の一部としてプログラム化されたコンピュータを使用して、試料からの情報、例えば各標的要素における検出可能な変化の位置および大きさを記録することができる。試料と対照の比率情報を記録することもできる。対照とは、アルコール依存症ま

40

50

たはアルコール中毒でないヒトから試料を採取し、アルコール依存症の試料と同様に処理できることを意味する。試料および対照からの記録情報を例えばコンピュータデータベースに生情報および/または比率情報として記録し、プログラム化されたコンピュータから、生情報および/または比率情報として表示することができる。

【0015】

本発明は、アルコール依存症および関連疾病状態の進行を分析するための方法であって、アルコール依存症もしくはアルコール中毒またはアルコール関連疾病と考えられるヒトから得られた試料をマイクロアレイに接触させて、結合を可能にするステップと、結合に関する情報を収集するステップとを含む方法でありうる。本発明の方法は、試料と対照の間の検出可能な変化を識別するステップであって、検出可能な変化をプログラム化されたコンピュータで記録し、処理し、表示し、かつ記憶できるステップとをさらに含むことができる。本発明の方法を経時的に実施される一連の分析として用いることによって、個人の疾病の進行を観察することができる。この方法を用いて、アルコール依存者またはアルコール中毒者が発現する、細胞信号伝達、免疫反応および/または細胞間相互作用に対する構造遺伝子、代謝遺伝子、転写遺伝子または他の遺伝子に特異的な配列を担持するマイクロアレイにより、単一点または経時的にアルコール特有遺伝子の発現を分析することができる。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

本発明の特徴および利点をより深く理解するために、添付の図面とともに、本発明の詳細な説明を次に参照する。

20

【0017】

本発明の様々な実施形態の構成および使用を以下に詳細に述べるが、本発明は、広範囲な具体的脈絡において具体化できる多くの応用可能な発明の概念を提供することを理解すべきである。本明細書に述べられる具体的な実施形態は、本発明を構成し、使用する具体的な様式を単に例示したもので、本発明の範囲を限定するものではない。説明を参照すれば、例示的な実施形態、ならびに本発明の他の実施形態の様々な改造および組合せを当業者なら理解するであろう。したがって、添付の請求項は、あらゆる当該改造または実施形態を包括することを意図している。

【0018】

本発明は、アルコール依存症および関連疾病状態の検出、診断および/または監視を行うための装置および方法を含む。該装置は、基体と、基体に結合した1つまたは複数のアルコール依存症特異的核酸とを使用し、コンピュータによって採取し、記録することができる情報を提供するあらかじめ選択された結合条件で、基体を、アルコール依存症またはアルコール中毒あるいはアルコール関連疾病状態のヒトから採取された試料に接触させる。該情報と、アルコール依存症、アルコール中毒またはアルコール関連疾病をもたないヒトから得られた試料からの対照情報とを比較することができるが、そのヒトに関する遺伝子発現情報、ならびに診断および/または予後の医学的情報を生成する。該方法は、アルコール依存症またはアルコール中毒であると見なされるヒト、あるいはアルコール関連疾病を有すると見なされるヒトから得られた試料と基体とを接触させて、結合を可能にするステップと、結合に関する情報を収集するステップとを含む。該情報をコンピュータに記録し、対照情報と比較し、そのヒトに関する遺伝子発現情報ならびに診断および/または予後の医学的情報を生成する。

30

40

【0019】

以下は、本願に適用される用語である。アルコール依存症とは、アルコールの連続的、過剰または慢性的な使用であり、アルコール依存症、アルコール中毒、および任意のアルコール関連疾病を含む。基体とは、共有結合または非共有結合により分子を結合させることができる任意の微細加工した固表面である。これは、ラングミュア・プロジェクト膜、機能ガラス、ゲルマニウム、シリコン、PTFE、ポリスチレン、砒化ガリウム、金および銀を含むが、それらに限定されない。その表面に導入されるアミノ、カルボキシル、チオ

50

ールまたはヒドロキシルなどの官能基を有することが可能な当該技術分野において知られている任意の他の物質も企図される。これは、平面を含み、球面も含む。

【0020】

本明細書に用いられるように、「1つまたは複数のアルコール依存症特異的核酸」などは、DNA、RNA、それらの一本鎖または二本鎖および化学的修飾体、あるいはタンパク質核酸である。改質物としては、追加的な電荷、極性、水素結合、静電相互作用および可動性を核酸基体、または核酸全体に導入する他の化学基を提供する改質物が挙げられるが、それらに限定されない。本明細書に用いられるように、「あらかじめ選択された結合条件」とは、1つまたは複数のアルコール特異的核酸、その生成物、または当該遺伝子の発現の変化の生理的結果の検出に対する信号体雑音比を最大にする条件である。以下に併用して記載される結合条件の例としては、発現マイクロアレイの技術分野の当業者なら知っているであろうDNAマイクロアレイの使用が挙げられる。

10

【0021】

「核酸標的要素」は、基体の異なる箇所に位置する少なくとも1つのペプチドを含む決定可能配列である。決定可能配列は、DNA、RNA、それらの一本鎖または二本鎖および任意の化学的修飾体を含むことができる。改質物としては、追加的な電荷、極性、水素結合、静電相互作用および可動性を個々の核酸基体、または核酸全体に導入する他の化学基を提供する改質物が挙げられるが、それらに限定されない。決定可能配列は、プロテアーゼ、受容体、チャンネル、シブナスタンパク質、細胞間もしくは細胞と基体の相互作用、免疫もしくは炎症反応、細胞信号伝達、分子シャペロンもしくは他の担体タンパク質、分子合成、細胞周期調節、細胞成長、細胞増殖または細胞死をコードする遺伝子を含む構造遺伝子、代謝遺伝子、転写遺伝子または他の遺伝子の部分でありうる。

20

【0022】

「試料」は、ヒトから得られた巨大分子、例えば源からの組織または細胞から抽出された核酸の任意の混合物である。試料としては、全血液、全血液の部分、血漿、尿、精液、唾液、リンパ液、髄膜液、羊水、腺液および脳脊髄液が挙げられるが、それらに限定されない。先述のすべての試料から分離される単離核酸もこれに含まれる。「試料」は、排泄物、細胞、組織および生検試料の如き均質化された固体物質を含有する溶液または混合物をも含む。本明細書の試料は、診断、予後および定期的な監視を含む任意の時点で得られた1つまたは複数の試料を含む。

30

【0023】

アルコール依存症は、西洋諸国において大きな健康問題であるが、疾病に関連する遺伝子変化、あるいはこれらの変化が、アルコール依存症またはアルコール中毒の検出、診断または監視にどのように変換されるかに関する分子的情報はほとんどない。アルコールは身体のあらゆる器官に影響し、主たる標的は、アルコールが神経伝達に影響して中毒症状を生じさせる中枢神経系である。長期間のアルコール使用は、中毒、依存または耐性をもたらす可能性があり、耐性および禁断の現象には、薬物依存のメカニズムにかかわる仮説が形づくられる。長期間の薬物乱用は、細胞レベルで適応応答を開始させる可能性が高い。すなわち、薬物が除去されると、神経適応がアンマスキングされ、禁断症候群の症状に至る。実質的な証拠は、少なくとも一部に、遺伝子発現の変化がこの適応過程を仲介することを暗示している。

40

【0024】

持続的なアルコール接触は、神経伝達物質受容体、ホルモンおよびその受容体、信号伝達分子、分子シャペロン、転写因子およびサイトカインをコードする遺伝子を含む選択遺伝子の発現の変化をもたらす(Miles, 1995)。動物モデルを使用し、または培養細胞をエタノールに接触させることによってアルコール依存症に関する多くの研究が実施されているが、ヒトの慢性アルコール依存症は、特定のミトコンドリアおよびGABA_A受容体サブユニット遺伝子の発現に変化をもたらすことが最近報告された(Fan L、van der Brug M、Chen W-B、Dodd PR、Matsumoto I、Niwa S、Wilce PA. 1999. ディファレンシャル・ディスプレイ

50

イによって示されたヒトのアルコール脳におけるミトコンドリア遺伝子の発現の増加 (Increased expression of a mitochondrial gene in human alcoholic brain revealed by differential display)。Alcohol Clin Exp Res 23:408-413; Lewohl JM, Crane DI, Dodd PR. 1997. ヒトのアルコール脳におけるGABA_A受容体のアルファ1、アルファ2およびアルファ3イソ型の発現 (Expression of alpha 1, alpha 2 and alpha 3 isoforms of the GABA_A receptor in human alcoholic brain)。Brain Res 751:102-12)。

10

【0025】

アルコールはアルコール応答遺伝子に直接影響するか、または多くのシステムを含む間接的なメカニズムを介して作用するかは知られていない。例えば、転写因子活性化または第2の伝達系の変化は、遺伝子発現系列を開始させることができる。アルコール応答転写因子の活性化または抑制は、対応する制御要素を有する遺伝子の発現に変化をもたらす (Miles, 1995)。これらの可能性の各々は、遺伝子発現の特異的なパターンをもたらすことになる。当該パターンは、いくつかのmRNAの従来測定によって検出するのが困難であるが、マイクロアレイ分析に十分に適する (Iyer他、1999)。マイクロアレイ分析は、遺伝子発現パターンのゲノム全体にわたる偏りのない調査を提供する。これは、アルコールの如き潜在的に多面的な作用を有する薬物を調査する上で特に重要になる可能性がある。また、マイクロアレイ分析を用いて、タンパク質、神経伝達物質、サイトカイン、またはアルコールおよびアルコール乱用によって生じる他の分子を調べることができる。

20

【0026】

アルコール依存症および関連疾病状態の検出、診断または監視を行うための装置
本発明は、アルコール特有遺伝子発現を分析することで、現在存在し、アルコール依存症またはその潜在的に病理的な経時的進行の迅速かつ特異的な分析を制約する制限を克服するための装置を提供する。

【0027】

マイクロアレイ装置を使用して、アルコール依存症またはアルコール中毒であると見なされるヒト、あるいはアルコール関連疾病をかかえるヒトに関する遺伝子発現情報、ならびに診断および/または予後の医学的情報を生成することができる。本発明は、患者の血液におけるアルコール依存症に関連する遺伝子の存否、またはその発現の改変を特定することが可能であることを実証するものである。本発明は、血液を検出用の核酸源として使用することにより、患者または潜在的な患者の検出を著しく簡素化し、広範囲な使用により適するものにする。分子生物学の技術分野の当業者が理解する条件で、1つまたは複数のアルコール依存症特異的核酸が基体の表面に結合する。

30

【0028】

アルコール特有核酸は、ゲノムDNA、cDNA、オリゴヌクレオチド、RNA、それらの一本鎖または二本鎖、ならびに追加的な電荷、極性、水素結合、静電相互作用、および可動性を個々の核酸基体、または核酸全体に導入する化学基を含むが、それらに限定されない任意のそれらの化学的修飾体であってもよい。また、アルコール依存症特異的核酸は、それぞれが異なる決定可能配列を有する1つまたは複数のペプチド核酸のヒト核酸標的要素を含む。各ペプチドは、1平方センチメートル当たり100から10000個の標的要素の密度で、基体の異なる箇所に位置する。基体に結合したアルコール依存症特異的核酸は、例えば、およそ5600の全長ヒト遺伝子を識別する標的要素を含む、Affymetrix社のHuGeneFLチップの如き市販のマイクロアレイに類似したものであってもよい。

40

【0029】

本発明の重要な知見は、ヒト核酸標的要素は、アルコール依存者もしくはアルコール中毒

50

者、またはアルコール関連疾病をかかえるヒトが特異的に発現する、細胞信号伝達、免疫反応または細胞間相互作用に対する構造遺伝子、代謝遺伝子、転写遺伝子または他の遺伝子に特異的な配列を有するアルコール依存症特異的遺伝子の部分でありうることである。本明細書に用いられるように、「アルコール依存症特異的核酸」という用語は、核酸マイクロアレイによって検出可能な遺伝子発現の統計的に重要な変化を示す遺伝子を包括する。発現の変化は、統計的に重要な遺伝子発現の増加または減少、例えば増加または減少（アップレギュレートまたはダウンレギュレーション）、遺伝子発現の完全な欠如、またはこれまで観察されなかった遺伝子の発現の存在であってもよい。発現の変化は、核酸の変化、タンパク質の変化、またはタンパク質の発現の変化の効果、例えば酵素活性または酵素活性の効果の変化（例えば、リン酸エステル化、タンパク質への翻訳後修飾、炭水化物、脂質などへの変化）であってもよい。

10

【0030】

本発明を用いて検出される「アルコール依存症特異的核酸」の例としては、以下の遺伝子、すなわちM6神経糖タンパク質、ミエリン関連糖タンパク質、ミエリン関連乏突起膠細胞塩基性タンパク質、ミエリン塩基性タンパク質、ミエリンプロテオリピドタンパク質、ミエリン乏突起膠細胞糖タンパク質、ミエリンタンパク質Po、乏突起膠細胞ミエリン糖タンパク質、PMP2、PMP22、MAL遺伝子、ApoD、ApoE、炭酸脱水酵素I1、2'、3'-環状ヌクレオチド3'-ホスホジエステラーゼ、ガラクトセレブロシダーゼ、トランスアルドラーゼ、UDP-ガラクトースセラミドガラクトシルトランスフェラーゼ、MyT1、プラルファ(Puralpha)、Edg-2、神経膠線維酸性タンパク質、ケラチン6B、ベータIIIスペクトリン、プロテアーゼ、セリン、9(ニューロシン)、プロプロテインコンバターゼサブチリシン/ケキシシ4型、カルパイン、大ポリペプチドL3、プロテアーゼ、セリン、11(IGF結合)、膜貫通プロテアーゼ、セリン2、エンドセリン受容体タイプB様(GPCR37)、アクアポリン1(チャネル形成細胞膜内在タンパク質)、内向き整流性カリウムチャネル、サブファミリーJ、メンバー10、グルタメート受容体、AMPA1、N-エチルマレイミド感受性因子、EGF-含有フィブリン類似細胞外マトリックスタンパク質1、CD44抗原、カドヘリン18、テトラスパンNET-6、インターフェロン、ガンマ誘導性タンパク質16、主要組織適合性複合体、クラスII、DRベータ1、小誘導性サイトカインサブファミリーC、メンバー1、エポキシドヒドロラーゼ1、ミクロソーム(生体異物)、プロリンデヒドロゲナーゼ(プロリンオキシダーゼ)、グルタチオンS-トランスフェラーゼM5、ユビキノール-シトクロムcレダクターゼコアタンパク質I1、セリン/スレオニンキナーゼ、TU3Aタンパク質(優性ラパマイシン耐性1、DRR1としても知られる)、分泌収縮関連(secreted frizzled-related)タンパク質1、GTP結合タンパク質、ホスホリパーゼA2(14-3-3タンパク質)、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ、イソ型Ib、アルファサブユニット、Gタンパク質シグナリング制御因子4(RGS-4)、シヌクレイン、アルファ、リボフォリンI1、130kD Golgi局在型リントタンパク質、自己免疫制御因子(自己免疫多腺性内分泌障害カンジダ症外胚葉性異栄養症)、SPY-ボックス9転写因子、スプライセオソーム関連タンパク質(U2snRNP)、レチノイドX受容体、ガンマ、核転写因子、Xボックス結合1、TATAボックス結合タンパク質関連因子、RNAポリメラーゼI1、F、基本転写因子3、マクロファージ刺激1(肝細胞成長因子様)、LIM領域限定2(ロンボチン様1)、骨形態形成タンパク質7(骨形成タンパク質1)、レクイエム、アポトーシス反応Znフィンガー遺伝子、ジスコイジン領域受容体ファミリー、メンバー1、CDC様キナーゼ2、CDC様キナーゼ1、腫瘍タンパク質p53結合タンパク質、2、ヒト成長/分化因子1、RACH1(補体ラッド1-1細胞周期チェックポイント突然変異体)、RAN(メンバーRASオンコ遺伝子ファミリー)、ne1様2、サルコリピン、KIAA0043遺伝子生産物、EST、システインおよび高グリシントタンパク質1、骨肉腫で増幅する保存遺伝子、KIAA0027遺伝子生産物、ホモ・サピエンス・クローン23916、KIAA0202遺伝子生産物、セレンタンパク質P、血漿、1、1、25-ジヒドロキシ

20

30

40

50

ビタミンD - 3によってアップレギュレートされた染色体16BACクローンCIT98
 7SK-A-69G12、タイトジャンクションタンパク質2、HREV107様タンパ
 ク質、クローン23555mRNA配列、クローン25030mRNA配列、KIAA0
 237遺伝子生産物、KIAA0725遺伝子生産物、KIAA0293遺伝子生産物、
 神経芽細胞腫(神経組織)タンパク質、レチキュロン1、cAMP調節グアニンヌクレオ
 チド交換因子IIにわずかに類似したEST、遺伝子pp2タンパク質にわずかに類似し
 たEST、またはKIAA0195に極めて類似したEST、ユビキチンC、微小管関連
 タンパク質4、カルシウム依存性プロテアーゼ(小サブユニット、プロテアソームサブユ
 ニットz、ガンマ-アミノブチル酸(GABA)A受容体ベータ2サブユニット、グルタ
 メート/アスパルテート輸送体II、リソソーム膜糖タンパク質-1(LAMP1)、心
 臓ギャップ結合タンパク質、オートタキシン-t(atx-t)、Igスーパーファミリ
 ー細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質(CTLA-4)、主要組織適合性複合体(MH
 C)のHLA-DRアルファ重鎖aクラスII抗原、ヒトアシル-CoAチオエステルヒ
 ドロラーゼ、シトクロムcオキシダーゼサブユニットVic、液胞H+ATPaseE
 サブユニット、ATPシンターゼ、リゾチームmRNA、プロスタグランジンD2シンタ
 ーゼ、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼの肝臓mRNA、SUR
 F-1、カルモジュリン、カルシニューリンA2、GDI解離阻害剤RhoGDIガンマ、
 14.3.3タンパク質(タンパク質キナーゼ調節因子)、hPTPA、タンパク質キナ
 ーゼCゼータ、小GTP結合タンパク質、S10、タンパク質チロシンホスファターゼ、
 睾丸特異的cAMP依存タンパク質キナーゼ触媒サブユニット(Cベータ・イソ型)、A
 DPリボシル化因子3、90kD熱ショックタンパク質遺伝子、熱ショックタンパク質H
 SPA2遺伝子、ミトコンドリアマトリックスタンパク質P1(核コード)、ヒストンH
 2A.2、RNAポリメラーゼII伸長因子SIII p15サブユニット、酸性リボソ
 ームリントタンパク質P0、グリシル-tRNAシンセターゼ、リボソームタンパク質L2
 7a、色素上皮由来因子、TRPM-2タンパク質、アンジオテンシノゲン、トランスフ
 エリン、メラノーマ、遍在性突然変異タンパク質(MUM-1)、KIAA0080遺伝
 子生産物、KIAA0084遺伝子産物および/またはKIAA0174遺伝子産物、あ
 るいはそれらの組合せの1つまたは複数の遺伝子の少なくとも一部が挙げられるが、それ
 らに限定されない。

【0031】

分子生物学の技術分野の当業者が理解するように、基体に結合したアルコール依存症特異
 的核酸と試料は選択的結合条件で接触する。選択的結合条件は、最大の信号体雑音比を可
 能にする条件で、緩衝条件(pH、塩濃度、洗剤など)および温度などを変更することによ
 って達成できる。例えば、基体に結合したアルコール特有核酸および試料を、試料のアル
 コール依存症特異的核酸への結合を促進させる試薬または化学物質に接触させ、次いで
 未結合試料の除去を促進させる追加的な試薬または化学物質で洗浄することによって、試
 料、アルコール依存症特異的核酸または基体の分子構造を変化させずに、結合試料のみを
 残すことができる。あるいは、1つまたは複数の試料を、基体に結合したアルコール依存
 症特異的核酸に接触させ、1つまたは複数の試料に標識付けすることができる。例えば、
 標識は、露光すると信号を発する蛍光または非蛍光分子でありうる。目的とする試料は、
 アルコール依存症もしくはアルコール中毒またはアルコール関連疾病と考えられるヒトと
 してここに定義されるアルコール依存者から採取される試料である。そのようなヒトから
 採取された試料としては、血漿、尿、精液、唾液、リンパ液、髄膜液、羊水、腺液および
 脳脊髄液、または身体組織調製物の如き高分子の任意の混合物が挙げられることができ
 るが、それらに限定されない。異なる起源または類似の起源をもつ1つまたは複数の試料を
 ヒトから採取して、すぐにまたは後に使用することができる。

【0032】

基体に結合したアルコール依存症特異的核酸に試料を結合させることによって、信号強度
 の変化としてコンピュータにより収集できる様々な情報が提供される。本発明の1つの利
 点は、光学顕微鏡法、X線撮影法、化学発光法、蛍光顕微鏡法、共焦点顕微鏡法、干渉分

光法、表面プラズマ共鳴、質量分析法、原子間力顕微鏡法および走査トンネル顕微鏡法を含む、光源、コンデンサ、イオンまたはプラズマ・ビームで結合を検出できることである。

【0033】

次いで、コンピュータを使用して、情報を記録し、情報をデータベースに記憶し、かつ/または情報を表示することができる。加えて、収集した情報は、各ヒト核酸標的要素における信号強度の検出可能な変化の位置および/または大きさを示すことができる。検出可能な変化は、例えば、各標的要素における蛍光や信号強度の変化、または導電性もしくは屈折率の如き物理的パラメータの変化であってもよい。また、試料情報と対照から収集した情報との情報率を求めることができ、ここで対照とは、アルコール依存症またはアルコール中毒であると見なされないヒト、あるいはアルコール関連疾病をかかえていると見なされないヒトから採取されるものである。対照情報は、アルコール依存者から収集される情報と平行して収集される。とりわけ、市販のコンピュータを使用して、試料および対照情報を収集することができる。本発明の利点は、収集される情報が、患者に関する遺伝子発現情報、ならびに診断および/または予後の医学的情報を生成できることである。

10

【0034】

アルコール依存症および関連疾病状態の検出、診断または監視を行うための方法
本発明は、アルコール依存症またはアルコール中毒の検出、監視および/または診断を行うための方法に、商業的または非商業的に入手可能なマイクロアレイを使用できる。本発明は、アルコール特有遺伝子発現、またはその潜在的に病理的な経時的進行を分析するための方法であってもよい。

20

【0035】

図1のフローチャートに示されるように、ヒトに関する診断および予後の医学的情報を生成することができる方法にステップが含まれる。ステップ10において、アルコール依存症もしくはアルコール中毒またはアルコール関連疾病と考えられるヒトから抽出した試料からプローブを作製する。ステップ12において、基体と、アルコール依存症もしくはアルコール中毒またはアルコール関連疾病と考えられるヒトとしてここで定義されるアルコール依存者から採取された試料とを接触させる。アルコール依存者から採取される試料としては、血漿、尿、精液、唾液、リンパ液、髄膜液、羊水、腺液および脳脊髄液、細胞、もしくは他の任意の体液、細胞または身体組織調製物の如き高分子の任意の混合物が挙げられることができるが、それらに限定されない。異なる起源または類似の起源をもつ1つまたは複数の試料をそのようなヒトから採取して、すぐにまたは後に使用することができる。この方法の1つの利点は、分子生物学の技術分野の当業者が理解するように、露光すると信号を発する蛍光または非蛍光分子で1つまたは複数の試料を標識付けることができることである。あるいは、試料は、標識付けされずに、その検出のための蛍光または非蛍光光源以外の源、例えば導電性または屈折率の如き物理的パラメータを記録する源を必要とすることもできる。

30

【0036】

基体は、表面に導入されたアミノ、カルボキシル、チオールもしくはヒドロキシル官能基を含むラングミュア・ボジエット膜、ガラス、機能ガラス、ゲルマニウム、シリコン、PTFE、ポリスチレン、砒化ガリウム、金、銀、または任意の材料の如き、分子が共有結合または非共有結合によって結合できる任意の微細加工した固表面でありうる。この方法の他の利点は、基体の表面を平面または球面とすることができることである。例えば、基体は、商業的に製造されるマイクロアレイでありうる。あるいは、基体は、商業的に製造されるものでなくてもよい。基体には、1つまたは複数のヒト核酸標的要素を結合させることができる。ヒト核酸標的要素の基体への結合は、分子生物学の技術分野の当業者が理解する条件で生じる。

40

【0037】

ヒト核酸標的要素は、ゲノムDNA、cDNA、オリゴヌクレオチド、RNA、それらの一本鎖または二本鎖、ならびに追加的な電荷、極性、水素結合、静電相互作用および可動

50

性を個々の核酸基体または核酸全体に導入する化学基を含むが、それらに限定されない任意の化学的修飾体であってもよい。また、ヒト核酸標的要素は、それぞれが異なる決定可能配列を有する1つまたは複数のペプチド核酸であってもよい。各ペプチドは、1平方センチメートル当たり100から10000個の標的要素の密度で、基体上の異なる箇所に位置する。本発明の重要な知見は、ヒト核酸標的要素は、プロテアーゼ、受容体、チャネル、シプナスタンパク質、細胞間もしくは細胞と基体の相互作用、免疫もしくは炎症反応、細胞信号伝達、分子シャペロンもしくは他の担体タンパク質、分子合成、細胞周期調節、細胞成長、細胞増殖または細胞死をコードする遺伝子を含む構造遺伝子、代謝遺伝子、転写遺伝子または他の遺伝子の部分でありうることである。

【0038】

ステップ12において、ゲノムDNA、cDNA、オリゴヌクレオチド、RNA、それらの一本鎖または二本鎖、ならびに追加的な電荷、極性、水素結合、静電相互作用および可動性を個々の核酸基体または核酸全体に導入する化学基を含むが、それらに限定されない任意の化学的修飾体のいずれかでありうるマイクロアレイ基体に試料を接触させる。ヒト核酸で構成される基体は、1平方センチメートルの表面積当たり100から10000個の標的要素の密度で少なくとも1つの核酸標的要素をさらに含む。この方法の1つの利点は、1つの基体を使用して、1つまたは複数の試料に接触させることができることである。あるいは、それぞれ同一または異なるヒト核酸標的要素から構成される1つまたは複数の基体を使用して、1つまたは複数の試料に接触させることができる。

【0039】

試料と基体を接触させた後に、ステップ14において試料を基体に接触させる。結合は、分子生物学の技術分野の当業者が理解する選択的結合条件で行われる。例えば、試料および基体を、試料の基体への結合を促進させる試薬または化学物質に接触させた後に、未結合試料の除去を促進させる追加的な試薬または化学物質で洗浄することによって、試料の分子構造および基体を変化させずに結合試料のみを残すことができる。

【0040】

ステップ16において、結合から、結合に関する情報をコンピュータによって収集できる。光学顕微鏡法、X線撮影法、化学発光法、蛍光顕微鏡法、共焦点顕微鏡法、干渉分光法、表面プラズマ共鳴、質量分析法、原子間力顕微鏡法および走査トンネル顕微鏡法を含む光源、コンデンサ、イオンまたはプラズマ・ビームによって検出できる信号強度の変化として情報を収集することができる。コンピュータは、情報を記録し、情報をデータベースに記憶し、かつ/または情報を表示することができる。加えて、収集される情報は、各ヒト核酸標的要素における信号強度の検出可能な変化の位置および/または大きさを示すことができる。検出可能な変化は、例えば、各標的要素における蛍光や信号強度の変化、または導電性もしくは屈折率の如き物理的パラメータの変化であってもよい。また、試料情報と対照から収集した情報との情報率を求めることができ、ここで対照とは、アルコール依存症またはアルコール中毒であると見なされないヒト、あるいはアルコール関連疾病をかかえていると見なされないヒトから採取されるものである。対照情報は、アルコール依存者から収集される情報と平行して収集される。市販のコンピュータを使用して、試料および対照情報を収集することができる。ステップ18において、収集される情報は、患者に関する遺伝子発現情報、ならびに診断および/または予後の医学的情報を生成できる。

【0041】

アルコール依存症および関連疾病状態の検出、診断または監視の例
 神経病理学の研究により、慢性的なアルコール中毒は脳、特に前頭葉の萎縮をもたらし、これは、脳の白質の体積の減少によるところが大きいということが示されている（Kri1他、1997）に考察されている）。灰質の形態計測学的研究により、前頭葉皮質神経を含む脳の特定領域の神経が選択的に損傷を受けることが示されている（Kri1 J J、Harper CG（1989）アルコール依存症の脳の4つの皮質領域からの神経単位のカウント（neuronal counts from four cortical regions of alcoholic brains.）Acta Neu

10

20

30

40

50

ropathol (Berl) 79:200-4)。加えて、前頭葉皮質は、アルコールに誘発される損傷の影響を受けやすく、判断、意志決定および他の執行機能に重要性を有し (Rahman S、Sahakian BJ、Hodges JR、Rogers RD、Robbins TW (1999) 軽度の前頭葉変異前頭側頭骨痲呆における特異的認識欠乏 (Specific cognitive deficits in mild frontal variant frontotemporal dementia) Brain 122:1469-93; Godefroy O、Rousseaux M (1997) 前頭葉前方または後方脳損傷患者の新奇の意志決定 (Novel decision making in patients with prefrontal or posterior brain damage) Neurology 49:695-70)、この脳の領域をDNAマイクロアレイによる分析に使用する理由を説明する。 10

【0042】

cDNA (UniGeneMV) およびオリゴヌクレオチド (HuGeneFL) アレイをともに使用する。多くの遺伝子が、これらのアレイ上に示され、また各アレイに特有の多くの遺伝子が存在する。したがって、両方の種類のアレイを使用することで、いくつかの遺伝子に対する相互検証、およびいずれか一方のアレイのみを使用する場合より多くの遺伝子の調査が可能になる

試料の選択

対照の症例とアルコール依存症の症例をアルコール摂取に基づいて分類する。国立保健医学研究会議 (NHMRC) / 世界保健機構の基準によれば、アルコール依存症は、一日の平均エタノール摂取量が80gを上回るものとして定義づけられ、患者の多くは、成人生活の大半 (通常は30年を超える期間) にわたって一日当たり200グラム以上のエタノールを消費していた。すべての対照は、禁酒者、または一日当たりの平均エタノール消費量が20gを (通常は大きく) 下回る社交的飲酒家である。可能な限り、症例を死亡年齢、死後遅延 (post-mortem delay)、性別、死因、飲酒歴に対応させる。多種薬剤乱用の履歴を伴う症例は排除された。完全な倫理基準 #97/36、および近親者からの通知同意書に基づいて、認定された病理学者が試料を採取することができる。 20

【0043】

2つの対照群と2つのアルコール依存症試料群を選択する。臨床的詳細を表1に示す。各群 (試料プール) は、5名のアルコール依存者と5つの対応する対照症例とを含む。第1の症例群は、PCRディファレンシャル・ディスプレイ実験に用いられたものと同様である。この群のアルコール依存者は、3名の合併症のないアルコール依存者の不均一な集団を表し、1名のアルコール依存者は肝硬変で、1名のアルコール依存者は随伴性ウェルニッケ脳症である。症例群2に対する選択基準はより厳格である。男性のみが含まれ、肝硬変またはウェルニッケ・コルサコフ症候群の如き随伴性疾病を伴う症例はすべて症例群から排除される。加えて、それらの症例、すなわち検屍解剖の際に神経病理学的異常を示さなかった対照またはアルコール依存者のみを選択するように注意する。したがって、第2の症例群は「合併症のない」アルコール依存者の部分集合に限定される。 30

【0044】

【表1】

表 1 : 症例情報

	年齢	PMD	性別	死因	神経病理	
症例群1						
対照						
1	61	15	M	冠状動脈血栓症	NSA	
2	54	16	F	肺動脈塞栓	NSA	
3	89	17	M	心不全	NSA	
4	73	22	M	心筋梗塞	アルツハイマー様変化	10
5	70	46	M	心筋梗塞	n/a	
アルコール依存者						
1	69	30	M	冠状動脈アテローム	NSA	
2	70	16	M	心筋梗塞	ウェルニッケ・コルサコフ病変 (治癒)	
3	43	21.5	M	誤嚥性肺炎 冠状動脈アテローム性動脈硬化症	NSA	
4	59	15	M	首つり自殺	NSA	
5	56	19	M	心不全	慢性肝炎 脳症	20
症例群2						
対照						
6	71	4.5	M	急性腎不全	NSA	
7	75	36	M	肺炎	NSA	
8	67	67	M	心筋梗塞	NSA	
9	52	61.4	M	心筋梗塞	NSA	
10	67	34	M	冠状動脈アテローム性動脈硬化症	n/a	30
アルコール依存者						
6	49	16	M	心筋症	NSA	
7	34	31	M	胃内容物の嚥下	n/a	
8	44	22	M	呼吸循環停止	NSA	
9	57	24	M	溺水	NSA	
10	64	27	M	虚血性心疾患	NSA	

【 0 0 4 5 】

試料からのプローブ調製

40

改変グアジニンイソチオシアナート抽出手順 (Chomoczynski and Sacchi 1987) を用いて、全 RNA を抽出した。全 RNA を各症例から個別に抽出し、試料と一緒にプールして、アルコール依存症に関連しない個々の症例毎の差を小さく (低減) した。各々の対照およびアルコール依存者群を構成する 5 つの症例の各々は、30 μ g の全 RNA をプールに寄与した。プールされた対照およびアルコール依存者全 RNA 試料は、UniGEMV (ゲノム・システムズ社) および HuGeneFL (Affymetrix) アレイに対するハイブリダイゼーションに使用される。

【 0 0 4 6 】

cDNA マイクロアレイを使用した遺伝子発現の分析

Qiagen (カリフォルニア州Valencia)のオリゴテクス・ポリA+RNA抽出キットを使用して100 μ gの全RNAからポリA+RNAを抽出した。二工程手順を用いて、製造者の取扱説明書に従ってプロトコルを実施した。200ngのポリA+RNAをプローブ生成およびマイクロアレイ・ハイブリダイゼーションのためにゲノム・システムズに送った。

【0047】

オリゴヌクレオチド・アレイを使用した遺伝子発現の分析

各試料に対して、25 μ gの全RNAを出発物質として使用して、スーパースクリプト・チョイス・キット(Gibco BRLライフ・テクノロジーズ、メリーランド州Rockville)を用いたcDNA合成を行った。次いで、バイオアレイRNA転写体標識キット(Enzo、ニューヨーク州Farmingdale)を使用してin vitroで転写を行った。Affymetrix(カリフォルニア州Santa Clara)規定に従ってプロトコルを実施する。ハイブリダイゼーションに先立って、40mMトリス酢酸(pH 8.1)、100mM酢酸カリウムおよび30mM酢酸マグネシウムに94で35分間インキュベートすることによって、ビオチン標識cRNAを30から60塩基の平均サイズに無作為に細分化することができる。次いで、細分化したcRNAの一定分量(マスタ混合物200 μ l中10 μ g)をヒト・オリゴヌクレオチド・アレイ(HuGeneFL、Affymetrix)に対してハイブリダイズする。HuGeneFLチップは、およそ5600の全長ヒト遺伝子を識別するプローブを含有する。60rpmに設定されたロッキー・オープン(Affymetrix)において45で16時間ハイブリダイゼーション反応を行うことができる。次いで、ハイブリダイズ化アレイを洗浄し、Affymetrixプロトコルに記載されているようにストレプトアビジン・フィコエリスリン(分子プローブ)で着色する。最後に、専用の共焦点顕微鏡(ヒューレット・パカード、カリフォルニア州Santa Clara)でアレイを走査する。

【0048】

情報分析

GEMToolsと呼ばれるプログラム(インサイト製薬)でcDNAマイクロアレイの分析を行うことができる。このプログラムは、HuGeneFLチップ上の5600の標的要素を既知の遺伝子に対する配列に翻訳する。次いで、バックグラウンドを上回る信号強度、ならびに試料および対照マイクロアレイの両方に対する結合に際して信号を生成するスポットの比率についての所定の既定基準を満たす遺伝子を選択することができる。試料対照における1.4倍の発現の増加または減少を示す遺伝子を選択することによって、遺伝子をさらにフィルタリングすることができる。

【0049】

GeneChip(登録商標)ソフトウェア3.1(Affymetrix)を使用して、オリゴ・マイクロアレイの絶対および比較分析を行うことができる。すべての遺伝子平均強度(合計強度/遺伝子数)を190の固定値に正規化することによって、すべてのオリゴ・マイクロアレイの全信号強度を均一な値に合わせてスケール調整することができる。これらの条件下では、オリゴ・マイクロアレイに対する倍率は0.82と4.04の間で変動しうる。Affymetrixアレイの分析に対するプロトコルについては、詳細に記載されており(Lockhart他、1996; Wodicka他、1997)、製造者が提供するマニュアルの該当部分と同様に、該当部分が参照により本明細書に組み込まれている。GeneChipプログラムの出力は、信号強度(「平均差」)、および試料と対照の比較(「倍率変化」)に関するデータを含む。行列ベースの決定アルゴリズムを用いて、所定のmRNAプローブの存否に対する信頼測度(「絶対コール」)、および倍率変化(「差異コール」)を生成することができる(Wodicka L、Dong H、Mittmann M、Ho MH、Lockhart DJ、1997、酵母におけるゲノム全体の発現の監視(Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*) Nat Biotechnol 15:1359-67)。いずれの場合も、GeneChipプ

10

20

30

40

50

プログラムにおける既定値を採用することができる。

【0050】

オリゴヌクレオチド・マイクロアレイに対しては、試料と対照の間で生成された比較ファイルからのデータをフィルタリングすることによって、発現が変化した遺伝子を選択することができる。オリゴ・マイクロアレイ上の少なくとも10の標的要素対で表される遺伝子の選択は、比較ファイルにおいて、少なくとも約1.4倍だけ対照と異なる発現レベルを有する遺伝子を含むことができる。結合のいずれか1つにおいて、GeneChipプログラムにおける「絶対コール」アルゴリズムによって識別される任意の「不在」遺伝子を候補遺伝子リストから削除する。

【0051】

遺伝子発現の変化、予後および診断用の医学的情報

アルコール依存者は、特に乱用および禁断症状の周期の発生頻度に関して、アルコール乱用の様式、性質および持続期間が著しく異なる。アルコール依存者および非アルコール依存者は、環境、栄養、投薬および遺伝子素因を含む多くの終局前因子において著しい多様性を示す。これらの因子の影響を低減するために、1つまたは複数の独立した対照群を利用することができる。加えて、1つまたは複数の対照群を分析のためにプールすることができる(表1)。試料のプーリングは、最近のマイクロアレイ研究に用いられており(Alizadeh他、2000)、個々の症例による差を減少または低減させる。また、類似性に基づく試料のプーリングは、人口の多様性によるそれらとの遺伝子発現の差を視覚的に示すことができる。同一のヒトからの試料をプールまたは同時にランして、人工物との小さな差を視覚的に示すことができる。

【0052】

アルコールによる脳損傷に特に影響されやすい脳の領域の適応応答の基礎を成す可能性のある遺伝子を識別するために、特定組織、例えば前頭皮質からの組織を使用して、対照とアルコール依存者の比較を行うことができる(Krill JJ、Harper CG、1989、アルコール脳4つの皮質領域からの神経カウント(Neural counts from four cortical regions of alcoholic brains) Acta Neuropathol (Berl) 79:200-4)。例えば、プールされた試料をcDNAおよびマイクロアレイに対してハイブリダイズし、示差発現比の観点でデータを表すことができる。症例群1プールを使用して実施されるハイブリダイゼーションは、GS-1(UniGEMV、ゲノム・システムズ)およびA-1(HuGeneFL、Affymetrix)と名付けられ、症例群2に対するハイブリダイゼーションはGS-2およびA-2と名付けられる(表1)。

【0053】

マイクロアレイは、これまで、細胞培養系および腫瘍試料にほぼ独占的に適用されてきた比較的新しい技術で、2から10倍の遺伝子発現の差は珍しくない。アルコール中毒の動物モデル、およびこれまで実施された人アルコール依存症の研究では、確認された遺伝子発現の変化は比較的小さい。すなわち40%の遺伝子発現の変化が一般的である。このため、対象となる遺伝子を識別するのに比較的低い閾値(1.4倍)を選択できる。一部に、アルコール依存症に想定される変化が小さいため、少なくとも2つの異なるマイクロアレイ基体を使用することができる。また、両方の症例群および両方の種類のマイクロアレイに同様の結果を伴う遺伝子に重点をおくことができる。

【0054】

2つの症例群における対照とアルコール依存者の間の遺伝子発現変化の再現性をcDNAマイクロアレイによって測定する。2つの症例群に対してプロットした差分発現比の自然対数は、0.48の相関係数(r)によって反映されるように一定の結果を示す。1.4倍の選択閾値における2つの症例群間の同一方向の変化を示す遺伝子の数を比較することによっても再現性を判断できる。例えば、cDNAアレイ上の両方の症例群において、100より多いの遺伝子が、少なくとも1.4倍の上向きまたは下向きの変化を示すとする。これが、ランダムな変動によるものであれば、100より多い遺伝子の期待値を用いて

10

20

30

40

50

、2つの症例群の間の1.4倍の反対方向の変化を示すことができる。しかし、わずか7つの遺伝子が、1つの症例群において少なくとも1.4倍の増加を示し、第2の症例群において-1.4倍の減少を示す。同様に、データをランダム化し、次いで両方の症例群において少なくとも1.4倍の同一方向の変化を有する遺伝子に対する選択を行うと、ここに示される結果について見られるよりはるかに小さい遺伝子が選択される。したがって、両方の症例群において1.4倍の閾値レベルを上回る遺伝子を選択すると、極めて大きな変化を有する群が識別される。いくつかの「偽陽性」が存在する可能性があるが、II型誤差が大きくなるのを避けるために、「緩和した」閾値を有するほうがよい場合がある。選択したリスト内の機能的に関連した遺伝子の部分集合を識別すると、結果の統計的力が著しく高められる。

10

【0055】

これらの研究による驚くべき発見は、たいていの遺伝子が、アルコール依存症および対照において同様の発現を示すことである。cDNAマイクロアレイでは、3825の遺伝子が「出現」としての基準を上回り、オリゴ・マイクロアレイ分析では、705の遺伝子が、4つの試料(2つの標準対象群および2つのアルコール依存者群)において、常に「出現」と呼ばれる状態にある。cDNAまたはオリゴヌクレオチド・マイクロアレイにより観察されるように、両方の症例群において、少なくとも64の遺伝子が1.4倍に増加し、99の遺伝子が1.4分の1に減少しているのを見いだすことができる。1.4倍という比は、マイクロアレイ上の2つの試料の40%の発現レベルの差を表す。

【0056】

発現が変化した遺伝子に対する初期の調査は、ミエリンタンパク質に対する多くのmRNAな符号化における驚くべき協調的減少を示している。両方の種類のマイクロアレイをミエリンまたは乏突起膠細胞に関連する遺伝子に対してスクリーニングすることができる。これらの遺伝子の半分以上(12/21)が、4つのハイブリダイゼーションのうちの少なくとも2つにおいて(1.4倍以上の)発現の現象を示す(表2)。

20

【0057】**【表2】**

表 2 : ミエリン関連発現データ

CDNA 受入番号	オリゴ 受入番号	遺伝子名	GS-1	GS-2	A-1	A-2	
構造遺伝子							
NR	U45955	M6神経糖タンパク質	NR	NR	-1.6	-1.5	
M29273	M29273	ミエリン関連糖タンパク質 (MAG)	-2.1	-1.9	-1.7	-1.7	
H23197	D28114	ミエリン関連乏突起膠細胞 (MOBP)	-1.2	-1.2	-1.9	1.2	
NR	M13577	ミエリン塩基性タンパク質	NR	NR	-1.7	-1.1	
M27110	M54927	ミエリンプロテオリピドタンパク質 (PLP)	-2.1	-1.9	-2.1	-1.3	10
NR	Z48051	ミエリン乏突起膠細胞糖タンパク質 (MOG)	NR	NR	-1.2	-1.1	
D14720	D10537	ミエリンタンパク質Po	-1.2	-1.1	-1.2	-1.7	
NR	L24893	ミエリンタンパク質Po	NR	NR	1.1	2.4	
M63623	M63623	乏突起膠細胞ミエリン糖タンパク質 (OMGP)	ND	ND	-2.7	-1.2	
D16181	D16181	PMP2	-1.4	-1.6	-2.4	-1	
AA777648	U08049	PMP22	-1.5	-1.8	1.4	1	20
NR	U08096	PMP22	NR	NR	3.3	1.3	
NR	D11428	PMP22	NR	NR	-5.7	-4.8	
X76220	X76223	MAL遺伝子	-2.3	-2.3	-2.6	-3.5	
代謝遺伝子							
702611	J02611	ApoD	-1.6	-1.8	-1.8	-1.4	
AI188519	NR	ApoD	-1.5	-1.9	NR	NR	
K00396	M12529	ApoE	-1.3	-1.6	-1.3	-1.6	
J03037	Y00339	カルボニックアンヒドラーゼ	-1.2	-1.3	-1.6	-1.6	
D13146	M19650	2',3'-環状ヌクレオチド3'-ホスホジエステラーゼ (CNP)	ND	ND	-1.7	-2.5	30
D13146	D13146	2',3'-環状ヌクレオチド3'-ホスホジエステラーゼ (CNP)	ND	ND	-1.4	1	
L38559	L23116	ガラクトセレブロシダーゼ (GALC)	ND	1.4	-1.2	1.4	
L19437	L19437	トランスアルドラーゼ	-1.1	-1.6	-1.6	-1.1	
AA811893	U30930	UDP-ガラクトースセラミドガラクトシルトランスフェラーゼ (CGT, E.C.2.4.1.45)	-1	-1.4	-1.9	-1.7	
転写遺伝子							
AB020642	M96980	MyT1	1.1	1.2	-1.2	-1.8	40
NR	X91648	プラルファ (Puralpha)	NR	NR	1	-1.9	
その他							
AA059335	U11861	Edg-2	NR	NR	-1.1	1.1	

【 0 0 5 8 】

ミエリン関連糖タンパク質 (MAG)、ミエリンおよびT細胞分化タンパク質 (MAL) ならびにアポリポタンパク質 D (ApoD) は、すべての4つの結合において低下を示す。しかし、ミエリン - 乏突起膠細胞糖タンパク質 (MOG) および Edg-2、すなわちミエリン形成に関連するテトラスパンは、発現の変化を示さず、豊富ミエリンタンパク質

を含む他の6つの遺伝子は1つの結合のみにおいて発現の低下を示すため、ミエリン遺伝子発現の変化は選択的でありうる。対照的に、ガラクトセレブロシダーゼ(GALC)、すなわちガラクトシルセラミドの分解にとって重要な主要酵素は、4つのハイブリダイゼーションのうち2つにおいて発現が増加する。ミエリン遺伝子の部分集合のみ発現が低下するという観察結果は、可能な説明としての(対照においてより多くの白質を与える)組織解体の変化に異議を唱えるものである。

【0059】

表2における遺伝子の大多数は、ミエリン構造において役割を果たすが(Boison and Stoffel 1994); Montag他、1994)、生合成遺伝子も変化する(Schaeren-Wiemers他、1995)。興味深いことには、これは、ともに脂質輸送に關与するApoDおよびApoEに対する遺伝子を含む。これらの遺伝子は、アルツハイマー病の如き神経退行性疾病にもかかわる(Roses 1997; Terrisse他、1998)。ミエリン関連転写因子、MyT1およびプアルファ(Puralpha)は、アルコール依存症試料において一定的に変化せず、極めて多くのミエリン遺伝子の協調的ダウンレギュレーションにおける追加的な因子を暗示していることも驚くべきことである。

10

【0060】

神経膠線維酸性タンパク質(GFAP)は、アルコール中毒の動物モデルで広く研究されてきたアストロサイトの主な構造タンパク質である。GFAPは、急性エタノール治療の後にアップレギュレートされるが、慢性治療では低下し、エタノールによって転写調節されうる(Valles他、1997)。GFAPの欠乏は、脱髄をももたらす(Liedtke他、1996)。GFAP遺伝子に無発現変異を生じたマウスは、異常なミエリン形成、および白質欠如に關連する水頭症を示す。したがって、CNSにおける有髄化繊維および白質を維持するのにGFAP発現が必要とされる。

20

【0061】

アルコール依存者の前頭葉皮質におけるミエリン関連遺伝子の発現の低下は、慢性アルコール中毒は、直接または間接的にミエリン関連遺伝子に影響を与えて、ミエリンタンパク質の量を低下させることを示唆するものといえる。あるいは、ミエリン遺伝子発現の欠如は、乏突起膠細胞が特にエタノールの神経毒効果に影響されやすいことを示唆するものであるといえる。

30

【0062】

ミエリン遺伝子発現は、アルコール中毒の動物モデルでさほど詳細に研究されていないが、ミエリン生合成は、胎児アルコール症候群(FAS)の動物モデルで十分に実証されている。出生前にエタノールに接触されたラットは、ミエリン形成の遅延を示し(Jacobson S、Rich J、Tovskey NJ(1979)胎児アルコール症候群の結果としてのアルビノ・ラットの大脳皮質におけるミエリン形成および成層の遅延(Delayed myelination and lamination in the cerebral cortex of the albino rat as a result of the fetal alcohol syndrome. Currents in Alcoholism 5:123-133)、これは、GFAP、PLP、MAG、Malおよびミエリン塩基性タンパク質を含むミエリン関連遺伝子の発現の時間的パターンの異常の結果である可能性が高い(Naus and Bechberger 1991; Milner他、1987; Chiappelli他、1991)。出生後(出生後4から10日目)エタノールに接触すると、特定のミエリン塩基性タンパク質およびMAGイソ型の発現が低下する(Zoeller他、1994)。白質欠如およびミエリン生合成の変化は、胎児アルコール症候群を伴う児童において実証されている(Riley他、1995)。

40

【0063】

脱髄および白質欠如は、ヒトの神経画像(Pfefferbaum他、1993)および神経病理学(Kril他、1997)の研究において広く実証され、これらの症例に見ら

50

れる脳の萎縮を説明するものと考えられる。白質欠如は、硬化性アルコール依存症、および随伴性WEおよびWKSを伴うアルコール依存症において最も深刻であるが、合併症のないアルコール依存症にも見いだすことができ(Kiril他、1997)、それは、アルコールの直接的な神経毒効果に起因することを暗示している。慢性アルコール依存症は、脳の灰質構造体の1つ、すなわち脳梁を萎縮させる。脳梁の大きさおよび厚さは、同年齢および同性の対照に比べてアルコール依存症の男性では著しく縮小し(Oishi他、1999)、出生前にアルコールに接触した小児においても著しく縮小している(Riley他、1995)。

【0064】

神経イメージングの研究によって、白質欠如は、禁酒により可逆的であるため(Shear他、1994)、アキソンまたは乏突起膠細胞の不可逆的な欠如ではなく、ミエリン形成の可逆的な変化を表すことができることに留意することが重要である。非飲酒対照、または死亡時に積極的に飲酒していたことが知られる症例と比較した場合の禁酒したアルコール依存者の前頭葉皮質から抽出したRNAに対する将来的なマイクロアレイ分析により、ミエリン遺伝子発現の変化が可逆的であるかどうかを明らかにすることができる。加えて、アルコール中毒の動物モデルにおけるこれらの遺伝子の発現の分析を、これらの変化を逆転するのに必要な禁酒の期間を定めるのに役立てることができる。

10

【0065】

重要なことは、アルコール依存者は、中心性橋脱髄症およびマルキアファーヴァ-ピニャーミ病の発生率も高くなる(Miles and Diamond 1998)。これらの脱髄性疾病は、アルコール以外の毒性または代謝性因子に起因しうる。ミエリン遺伝子発現のダウンレギュレーションによって、アルコール依存者が中心性橋脱髄症およびマルキアファーヴァ-ピニャーミ病におけるミエリン障害に陥りやすくなる。

20

【0066】

cDNAアレイ(表3)またはオリゴヌクレオチド・アレイ(表4)による両方の症例群において、1.4倍の差分発現比の基準を用いて、非ミエリン遺伝子を官能基に構成することができる。

【0067】

【表3】

表3 : cDNA (GS-1、GS-2) アレイ上の差分発現に対する基準を満たす遺伝子 : オリゴヌクレオチド (A-1、A-2) アレイからのデータの追加が可能であった

受入番号	遺伝子名	GS-1	GS-2	A-1	A-2
構造タンパク質					
AA059335	神経膠線維酸性タンパク質	-3.1	-2.2	-1.9	-2.4
L42611	ケラチン6B	-1.6	-2.8	N/R	-2.6
AB008567	ベータIIIスペクトリン	1.4	1.5	N/R	N/R
プロテアーゼ					
U62801	プロテアーゼ、セリン、9 (ニューロシン)	-2.1	-2	-1.5	-4
D87993	プロプロテイン転換酵素サブチリシン/ ケクシン4型	-1.9	-2.1	N/R	N/R
AI978885	カルパイン、大ポリペプチドL3	-1.7	-1.8	N/R	N/R
Y07921	プロテアーゼ、セリン、11 (IGF結合)	-1.5	-1.6	-1.9	-1.6
U75329	トランスメンブレン・プロテアーゼ、セリン2	1.4	1.6	N/D	N/D
受容体、チャネルおよび他のシブナスタンパク質					
Y12476	エンドセリン受容体タイプB様 (GPCR37)	-2.5	-2.1	-1.7	-1.8
U41517	アクアポリン1 (チャネル形成細胞膜内在タンパク質)	-1.8	-2.2	-4.1	-4.5
U52155	内向き整流性カリウムチャネル、 サブファミリーJ、メンバー10	-1.5	-1.9	N/D	N/D
M64752	グルタミン受容体、AMPA1	1.4	1.6	N/D	2.2
U03985	N-エチルマレイミド感受性因子	1.6	1.4	N/R	N/R
細胞間または細胞と基体の相互作用					
U03877	EGF-含有フィブリン類似細胞外マトリックス タンパク質1	-1.6	-2.9	N/D	N/D
XSS15Q	CD44抗原	-1.4	-1.4	N/D	N/D
U59325	カドヘリン18	1.4	1.7	N/D	N/D
AF120265	テトラスパンNET-6	1.4	1.4	N/R	N/R
免疫または炎症反応					
S75433	インターフェロン、ガンマ誘導性タンパク質16	-1.6	-1.4	N/D	N/D
V00522	主要組織適合性複合体、クラスII、DRベータ1	-1.4	-1.5	N/R	N/R
AL031736	小誘導性サイトカインサブファミリーC、 メンバー1	1.8	1.6	N/D	N/D
代謝					
J03518	エポキシドヒドロラーゼ1、ミクロソーム (生体異物)	-1.4	-1.4	-1.4	1.8
U82381	プロリンデヒドロゲナーゼ (プロリンオキシダーゼ)	-1.4	-1.9	N/R	N/R
AI797367	グルタチオンS-トランスフェラーゼM5	-1.4	-1.7	N/D	N/D
J04973	ユビキノール-シトクロムcレダクターゼコアタ ンパク質II	1.5	1.4	N/D	1.7

10

20

30

40

細胞信号伝達

AB004884	セリン/スレオニンキナーゼ	-1.9	-1.5	N/D	N/D	
AF089853	TU3Aタンパク質 (優性ラパマイシン耐性1、 DRR1としても知られる)	-1.6	-2.6	1.2	-1.7	
AF056087	分泌収縮関連 (secreted frizzled-related) タンパ ク質 1	-1.5	-1.4	N/R	N/R	
AF054183	GTP結合タンパク質	1.4	1.4	N/R	N/R	
AL008725	ホスホリパーゼA2 (14-3-3タンパク質)	1.4	1.4	1.2	1.3	
L13385	血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ、 イソ型Ib、アルファサブユニット	1.4	1.5	N/R	N/R	10
AI651602	Gタンパク質シグナリング制御因子4(RGS-4)	1.5	1.8	N/D	2.8	
L08850	シヌクレイン、アルファ	1.6	1.4	-1.1	1.4	
転写またはタンパク質合成						
Y00282	リボフォリンII	-1.8	-1.8	1.1	-1.1	
U55853	130kD Golgi局在型リンタンパク質	-1.7	-2	-2.1	N/D	
AJ009610	自己免疫制御因子 (自己免疫多腺性内分泌障害 カンジダ症外胚葉性異栄養症)	-1.5	-1.6	N/R	N/R	
S74506	SRYボックス9転写因子	-1.4	-1.9	-1.5	-1.5	20
L35013	スプライセオソーム関連タンパク質 (U2snRNP)	-1.4	-1.4	N/R	N/R	
U38480	レチノイドX受容体、ガンマ	-1.4	-1.4	N/D	N/D	
U15306	核転写因子、Xボックス結合1	1.4	1.4	N/D	N/D	
X97999	TATAボックス結合タンパク質関連因子、 RNAポリメラーゼII、F	1.4	1.4	1.1	1.1	
Z48042	基本転写因子3	1.4	1.4	1.1	N/D	
細胞周期調節: 成長、増殖および死						
U28054	マクロファージ刺激1 (肝細胞成長因子様)	-3	-1.8	N/D	N/D	30
X61118	LIM領域限定2 (ロンボチン様1)	-2.3	-1.8	-1.7	N/D	
X51801	骨形態形成タンパク質7 (骨形成タンパク質1)	-1.6	-1.4	N/D	N/D	
AF001433	レクイエム、アポトーシス反応Znフィンガー 遺伝子	-1.5	-1.5	-1.3	N/D	
Z29093	ジスコイジン領域受容体ファミリー、 メンバー1	-1.5	-2	N/R	N/R	
AF023268	CDC様キナーゼ2	-1.5	-1.5	-1.1	-1.2	
AA044407	CDC様キナーゼ1	-1.5	-1.6	N/R	N/R	
AI123916	腫瘍タンパク質p53結合タンパク質、2	-1.4	-1.5	-1.3	-1	
AI936592	ヒト成長/分化因子1	-1.4	-1.5	-1.7	-1.7	40
U35735	RACH1 (補体ラッド1-1細胞周期チェックポイ ント突然変異体)	-1.4	-1.9	1	-1.1	
AF052578	RAN (メンバーRASオンコ遺伝子ファミリー)	1.4	1.4	N/R	N/R	
D83018	nel様2	1.6	1.6	-1.2	1.6	
その他						
U96094	サルコリピン	1.7	1.7	N/D	N/D	

未知						
AI888282	ESTs	-4.2	-2.9	N/D	N/D	
D26362	KIAA0043遺伝子生産物	-2.4	-2.2	-1.6	-1	
AI683914	ESTs	-1.8	-1.9	N/R	N/R	
M76378	システインおよび高グリシンタンパク質1	-1.6	-1.6	-1.8	-1.3	
AF022231	骨肉腫で増幅する保存遺伝子	-1.6	-1.5	N/R	N/R	
AA703765	KIAA0027遺伝子生産物	-1.6	-1.7	-2.4	-3.9	
FI3434	ホモ・サピエンス・クローン23916	-1.6	-2.6	N/R	N/R	
D86957	KIAA0202遺伝子生産物	-1.5	-1.4	N/D	N/D	10
AI521556	セレンタンパク質P、血漿、1	-1.5	-1.7	-1.2	-1.7	
AI677769	ESTs	-1.4	-1.4	N/R	N/R	
AC002550	染色体16BACクローンCIT987SK-A-69G12	-1.4	-1.6	N/R	N/R	
S73591	1,25-ジヒドロキシビタミンD-3によるアップレギュレート	-1.4	-1.4	-2.3	-4.2	
L27476	タイトジャンクションタンパク質	-1.4	-1.6	N/R	N/R	
AI375733	HREV107様タンパク質	-1.4	-1.6	N/R	N/R	
AI936592	ESTs	-1.4	-1.5	-1.7	-1.7	
AA235116	ESTs	1.4	2.4	-1.5	N/D	20
AA102395	ESTs	1.4	1.7	N/D	N/D	
AI003191	ESTs	1.4	1.4	N/R	N/R	
AI375991	ESTs	1.4	1.6	N/R	N/R	
AA283901	ESTs	1.4	1.5	N/D	N/D	
W05842	ESTs	1.4	2.1	N/R	N/R	
AI669775	ESTs	1.4	1.6	N/R	N/R	
AA417208	ESTs	1.4	1.9	N/D	N/D	
AI018181	ESTs	1.4	1.8	N/R	N/R	
N76371	ESTs	1.4	1.4	N/D	N/D	
AA167722	ESTs	1.4	1.4	N/R	N/R	30
AI801966	ESTs	1.4	1.7	N/R	N/R	
AA436947	ESTs	1.4	1.6	N/R	N/R	
AF038201	クローン23555mRNA配列	1.4	1.4	N/R	N/R	
AA313794	クローン25030mRNA配列	1.4	1.5	N/R	N/R	
D87074	KIAA0237遺伝子生産物	1.4	1.6	-1.3	1.3	
AB018268	KIAA0725遺伝子生産物	1.4	1.4	N/R	N/R	
ABD06631	KIAA0293遺伝子生産物	1.4	1.4	N/R	N/R	
D82343	神経芽細胞腫 (神経組織) タンパク質	1.4	1.8	-1	2.3	40
L10333	レチキュロン1	1.4	1.4	1.4	1.3	
AI937119	ESTs	1.5	1.6	N/R	N/R	
AI831729	ESTs	1.5	1.4	N/R	N/R	
AA707689	EST、AMP調節グアニンヌクレオチド交換因子IIにわずかに類似している	1.5	1.7	N/R	N/R	
AA424109	EST、遺伝子pp21タンパク質にわずかに類似している	1.5	1.4	N/R	N/R	

Z99387	ESTs	1.6	1.8	N/R	N/R
AI004627	ESTs	1.6	2.4	N/R	N/R
AI306588	ESTs	1.7	1.5	N/D	N/D
AI827127	EST、KIAA0195に著しく類似している	1.8	1.4	N/D	N/D
AA679059	ESTs	12.8	20.4	N/R	N/R
AA912329	ESTs	14.9	20.4	N/R	N/R

【 0 0 7 1 】

【 表 4 】

表4：オリゴヌクレオチド（A-1、A-2）アレイ上の差分発現に対する基準を満たす遺伝子：cDNA（GS-1、GS-2）アレイからのデータ(の追加)が可能であった

受入番号	遺伝子名	A-1	A-2	GS-1	GS-2	
構造タンパク質						
M26880	ユビキチンC	-1.5	-1.5	N/R	N/R	
M64571	微小管関連タンパク質4	-1.4	-1.5	-1.1	-1	
プロテアーゼ						
X04106	カルシウム依存性プロテアーゼ (小サブユニット)	1.4	1.5	N/R	N/R	10
D38048	プロテアソームサブユニットz	-1.7	-1.4	N/R	N/R	
受容体、チャネルおよび他のシブナスタンパク質						
S67368	ガンマ-アミノブチル酸 (Gaba) A受容体ベータ2サブユニット	-1.7	-1.4	N/R	N/R	
U01824	グルタメート/アスパルテート輸送体II	-5.1	-1.5	1.1	-1.9	
細胞間または細胞と基体の相互作用						
J04182	リソソーム膜糖タンパク質-1 (LAMP1)	-1.6	-1.5	N/D	N/D	
X52947	心臓ギャップ結合タンパク質	-1.4	-1.8	-1	-2.1	20
L46720	オートタキシン-t (atx-t)	-1.6	-1.8	N/R	N/R	
免疫または炎症反応						
M37245	Igスーパーファミリー細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質 (CTLA-4)	-1.6	-1.4	N/R	N/R	
X00274	主要組織適合性複合体 (MHC) のHLA-DRアルファ重鎖aクラスII抗原	-1.7	-1.6	N/R	N/R	
代謝						
U91316	ヒトアシル-CoAチオエステルヒドロラーゼ	1.4	2.6	1.1	-1.2	
X13238	シトクロムcオキシダーゼサブユニットVic	1.4	1.5	N/R	N/R	30
X76228	液胞H ⁺ ATPase Eサブユニット		1.8	N/R	N/R	
X83218	ATPシンターゼ	1.5	1.5	N/R	N/R	
M19045	リゾチームmRNA	-1.6	-2.5	N/R	N/R	
M98539	プロスタグランジンD2シンターゼ	-2	-2.2	N/R	N/R	
X01677	グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼの肝臓mRNA	-1.9	-1.6	N/R	N/R	
Z35093	SURF-1	-1.4	-1.7	N/R	N/R	
細胞信号伝達						
J04046	カルモジュリン	1.4	1.4	N/R	N/R	40
M29551	カルシニューリンA2	2.4	2.5	1.2	1.3	
U82532	GDI解離阻害剤RhoGDIガンマ	1.4	2.4	N/R	N/R	
X56468	14.3.3タンパク質 (タンパク質キナーゼ調節因子)	1.7	1.4	1.1	1.1	
X73478	hPTPA	2.1	2.5	1.2	1.1	

Z15108	タンパク質キナーゼCゼータ	1.4	1.8	1.1	1	
D14889	小GTP結合タンパク質、S10	-2.2	-1.5	-1.2	1.6	
L77886	タンパク質チロシンホスファターゼ	-1.5	-1.4	N/R	N/R	
M34181	睾丸特異的cAMP依存タンパク質キナーゼ触媒サブユニット (Cベータ・イソ型)	-2	-1.7	1.2	1.2	
M74491	ADPリボシル化因子3	-1.5	-1.4	1.2	1.1	
分子シャペロンおよび他の担体タンパク質						
J04988	90kD熱ショックタンパク質遺伝子	1.4	1.5	N/R	N/R	
L26336	熱ショックタンパク質HSPA2遺伝子	-3	-1.6	N/R	N/R	10
M22382	ミトコンドリアマトリックスタンパク質P1 (核コード)	-1.8	-1.8	1.4	1.2	
転写またはタンパク質合成						
L19779	ヒストンH2A.2	1.4	1.5	N/R	N/R	
L34587	RNAポリメラーゼII伸長因子SIH p15サブユニット	1.4	2.4	N/R	N/R	
M17885	酸性リボソームリンタンパク質P0	-1.4	-1.4	N/R	N/R	
U09587	グリシル-tRNAシンセターゼ	-1.5	-2.1	N/R	N/R	
U14968	リボソームタンパク質L27a	-2	-2.2	N/R	N/R	20
細胞周期調節: 成長、増殖および死						
U29953	色素上皮由来因子	1.6	1.4	1.1	1.2	
M63379	TRPM-2タンパク質	-1.7	-1.5	-1.1	-1.3	
その他						
K02215	アンギオテンシノゲン	-1.7	-1.6	N/R	N/R	
S95936	トランスフェリン	-3.1	-1.9	N/R	N/R	
U20908	メラノーマ遍在性突然変異タンパク質 (MUM-1)	-1.6	-1.4	N/R	N/R	
未知						
D38522	KIAA0080遺伝子生産物	-1.5	-1.7	1.3	1	30
D42043	KIAA0084遺伝子生産物	-1.4	-2.3	N/R	N/R	
D79996	KIAA0174遺伝子生産物	-1.6	-2	-1.1	-1.2	

【 0 0 7 3 】

アルコール依存者試料では、シナプス伝達に関与するいくつかの遺伝子の発現が変化している。特に、 α -シヌクレインの発現が増加している(表3)。 α -シヌクレインは、薬物依存に対して中心的なプロセスであるドーパミン神経伝達の活性依存調節因子で(Abeliovich他、2000)、 α および β -シヌクレインはともに神経変性にある役割を果たすことができる(Galvin他、1999)。同様に、AMPA1受容体サブユニット、RGS-4およびN-エチルマレイドミド感受性因子(表3)の発現が増加する一方、内向き整流性カリウムチャンネル(表3)、ガンマアミノブチル酸A(GABA_A)受容体 α -2サブユニットおよびADPリボシル化因子-3(表4)遺伝子は、アルコール依存者において、発現の低下を示す。いくつかの内向き整流性カリウムチャンネルは、アルコール作用の生体内標的である可能性が高く(Lewohl他、1999)、RGSタンパク質によって変調され、またGTPase活性化タンパク質として作用することによってタンパク質のGタンパク質信号ファミリーを調節して、ホルモンおよび神経伝達物質受容体媒介信号を変調する(Heppler 1999)。重要なことは、長時間のエタノール

ール処理によって、GluR1グルタメート受容体サブユニットの発現を増加できることが動物における研究によって示されている(Ortiz他、1995)。アルコール依存症の動物モデルで研究された遺伝子の数は限られているが、GluR1およびGFAPに対するヒト・アルコール依存症との一致は、アルコール依存者における発現変化は、栄養または傷害の如き混乱因子ではなく、アルコール消費によるものであることを暗示している。

【0074】

細胞増殖を調節することが知られている遺伝子群は、アルコール依存者試料においてダウンレギュレーションされる。これは、レクイエム、p53結合タンパク質、ジスコイジン領域受容体ファミリー・メンバーおよび2つのCDC様キナーゼをコードする遺伝子を含んでいた。p53結合タンパク質は、野生型p53、抗アポトーシス遺伝子Bcl-2およびNF κ Bのp65(RelA)サブユニットと相互作用する(Yang JP、Horri M、Takahashi N、Kawabe T、Kato H、Okamoto T(1999)NF- κ Bサブユニットp65は、53BP2に結合し、53BP2によって誘発される細胞死を抑制する(NF- κ B subunit p65 binds to 53BP2 and inhibits cell death induced by 53BP2). Oncogene 18:5177-86)。p53結合タンパク質は、p53媒介転写活性を高め、アポトーシスおよび細胞成長の調節に中心的な役割を果たすことができる。受容体チロシンキナーゼ・ファミリーのメンバーであるジスコイジン領域受容体1(Sakuma他、1996)は、p53によって調節されることが知られている。このチロシンキナーゼは、コラーゲンを結合することによって活性化され、細胞外マトリックスに対する細胞応答を媒介するものと考えられる(Vogel 1999)。他の2つの遺伝子、すなわち細胞成長の調節に機能を果たすことが知られているne1様2およびRANは、アルコール依存者においてアップレギュレートされる。レクイエムおよびp53結合タンパク質のダウンレギュレーションの如き、これらの応答のいくつかは、「抗アポトーシス」応答を示唆する。これは、エタノールに直接起因するものであるか、または親アポトーシス的に作用するエタノールに対する補足的応答である可能性がある。この点で、アルコールは、発達途上の動物および成体動物の両方において、親アポトーシス効果を有することが証明される(Ikonomidou他、2000; Wu and Cederbaum 2000)。

【0075】

アルコール依存者はしばしば比較的若齢で死亡するため、培検組織を使用する1つの問題は、年齢の対応付けである。症例群1では、アルコール依存者は対照より平均で10歳若く(有意差なし、t-検定)、症例群2では、対照より16歳若い(p=0.03、t-検定)。したがって、対照とアルコール依存者の間に見られる遺伝子発現の差に年齢が寄与しているかどうかを考慮することが重要である。年齢における脳遺伝子発現の変化に対する第1のアレイ調査は、(1.4倍より大きい基準および6347遺伝子アレイを使用して)70個の遺伝子の発現が増加し、86個の遺伝子の発現が低下していることを証明している(Lee他、2000および捕捉資料)。生後5カ月と30カ月のマウスの新皮質の比較では、アルコール中毒と対照の間に見いだされたほとんどの遺伝子において変化が検出されない。例えば、この調査で顕著であるミエリン遺伝子の一連の変化は、年齢調査には現れていない。しかし、アポリポタンパク質D、アルファシヌクレイン、マクロファージコロニー刺激因子1、ミエリン乏突起膠細胞糖タンパク質およびGFAPの発現は、両調査において変化し、変化の方向は、年齢差がアルコール依存者に見られる遺伝子発現に寄与しているものである。アルコール依存症と年齢の遺伝子発現の変化の重複が限られていることは、被験者の年齢の差が観察された変化の多くに寄与するものでなかったことを示唆している。

【0076】

遺伝子発現変化、予後および診断の医学的情報

本発明は、患者の血液におけるアルコール依存症に関連する遺伝子の存否、または発現に

10

20

30

40

50

おける変化を識別することが可能であることを実証するものである。本発明は、血液を検出用核酸の源として使用することによって、患者または潜在的な患者の検出を著しく簡素化し、広範囲な使用に適するものとする。1つまたは複数のアルコール依存症特異的核酸が、分子生物学の技術分野の当業者が理解する条件で基体の表面に結合する。

【0077】

図2は、PAX遺伝子およびアンピオン・システムを一日間使用して、アルコール依存症に関連する遺伝子に対する対象の血液中を検出可能な発現のレベルを評価した後の血液tRNAからの結果を示すグラフである。あるいは、他のプローブを使用して遺伝子発現を比較することもできる。脳組織から識別される遺伝子に対応する血液中に識別される支配的な遺伝子に基づいて、血液試料を採取し、該試料から抽出された核酸を本発明のアルコール特有アレイに対して検査することにより、アルコール依存症に関連する遺伝子の存否または発現における変化を検出することができる。適切な対照をアレイに含める。本発明を用いれば、単一の支配的な遺伝子を使用してもアルコール依存症に対する検査を行うことができるが、複数の遺伝子を使用して結果の精度を高めることができる。単一の遺伝子分析は、予備的なスクリーニング、例えば特定の資源を患者に集中させて彼らの治療を支援することができるように入院患者をあらかじめスクリーニングする法執行機関による使用に有益である。このように、危険性のない患者に資源を費やすことなく、サイクルの早い段階で患者を識別し、これらの患者は必要とする治療を受ける。

10

【0078】

図3は、1日目および3日目における異なる対象の遺伝子のレベルを比較したグラフである。図4および図5は、基準グラフ、および基準と、個々の血液試料から検出されたヒト血液試料の遺伝子発現とを比較したグラフである。図2から図5を得るために使用した基礎データは次の通りである。基礎データは、血液中に検出された同じ遺伝子のいくつかは、本明細書で既に概略説明した、ヒトの脳に対するこれまでの研究において識別されていることを実証しているため、アルコール依存者の脳の試料から識別された遺伝子は関連し、血液中に検出可能である。

20

【0079】

血液試料から検出する「アルコール依存症特異的核酸」の例は、以下の遺伝子、すなわちアポリポタンパク質（各種）；アクアポリン（各種）；CD44抗原（ホーミング機能およびインディアン血液型体系）；ドーパミン受容体D2；ヒスタミン受容体H1；ホモ・サピエンス・ベータ-1アドレナリン受容体mRNA、3'UTR；ミエリン関連糖タンパク質；ミエリン塩基性タンパク質；ミエリン遺伝子発現因子2；ミエリン突起膠細胞糖タンパク質；ミエリンタンパク質・ゼロ様1；ミエリン転写因子1様；ミエリン関連突起膠細胞塩基性タンパク質；神経ペントラキシンI；神経ペントラキシンIi；神経ペントラキシン受容体；神経カリウムチャンネル・アルファサブユニット；神経タンパク質；神経タンパク質17.3；神経Shc；神経Shcアダプター同族体；神経特異的転写因子DAT1；ニューロナチン；神経特異的タンパク質；神経ペントラキシン受容体；神経ペプチドY受容体Y1；ニューロテンシン受容体2；神経向性チロシンキナーゼ、受容体、2型；末梢ミエリンタンパク質2；末梢ミエリンタンパク質22；ホスホリパーゼA2受容体；プロテオリピドタンパク質2；ナトリウムチャンネル、電圧ゲート型、V1I1型、アルファポリペプチド；ナトリウムチャンネル、電圧ゲート型、I1型、ベータポリペプチド；シタキシン（多様）；多様な伝達物質に少なくとも部分を含む。

30

40

【0080】

本発明は、アルコール依存症および関連疾病状態の検出、監視および診断を行うための方法を提供できる。疾病の進行を監視しない不十分な測定値に加えて、アルコール依存症の発症および範囲を判断するための標準化された方法の欠如により、既存の検出、監視および診断方法に代わる方法を模索する必要性が生じていた。本発明は、広範囲であるが選択的なミエリン遺伝子発現の再プログラミングを示唆するものでもある。多数のミエリン遺伝子の協調的調節は、突起膠細胞の機能または生存に対するエタノールの毒性作用の可能性を示唆する。該毒性作用は、アルコール依存者が白質欠如および脱髄疾患にかかる可

50

能性に対する分子的基礎を提供することができる。加えて、シヌクレインおよび細胞内周期遺伝子発現の如き新奇の神経遺伝子の予期せぬ変化は、アルコール依存症の特徴である濃厚増および機能の変化を理解し、おそらくは阻止または回復させるための新たな機会を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0081】

【図1】本発明のアルコール依存症またはアルコール中毒の検出および監視装置に含まれるステップのフローチャートである。

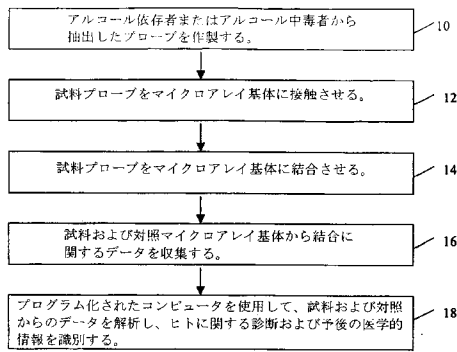
【図2】アルコール依存症関連遺伝子について、対象からの血液において検出可能な発現のレベルを評価するために、PAX遺伝子およびアンピオン対照を一日間使用した後の血液の全RNAからの結果を示すグラフである。

【図3】1日目および3日目における異なる対象からの遺伝子のレベルを比較するグラフである。

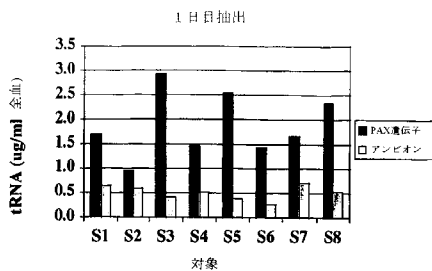
【図4】遺伝子アレイ上の発現の制御レベルを説明する基準グラフである。

【図5】基準と、個々の血液試料から検出されたヒト血液試料遺伝子発現とを比較するグラフである。

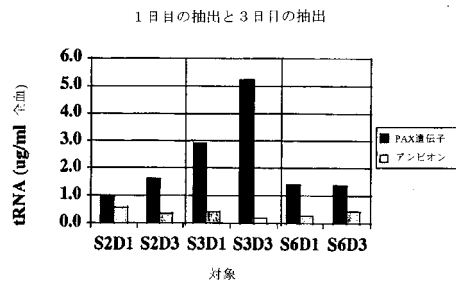
【図1】



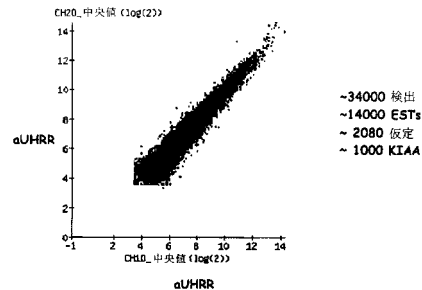
【図2】



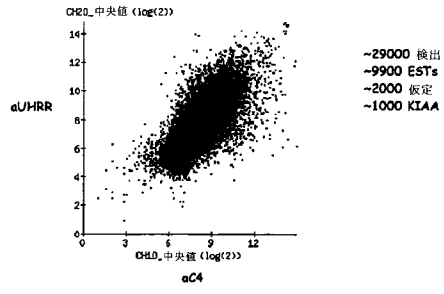
【図3】



【図4】



【 図 5 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
15 May 2003 (15.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/040414 A1

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68, A61K 31/24
(21) International Application Number: PCT/US02/35902
(22) International Filing Date: 8 November 2002 (08.11.2002)
(25) Filing Language: English
(26) Publication Language: English
(30) Priority Data: 60/338,270 8 November 2001 (08.11.2001) US
(71) Applicant: BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM [US/US]; 201 West 7th Street, Austin, TX 78701 (US).

(81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(72) Inventors: HARRIS, Adron, 3309 Lake Cliff Ct., Austin, TX 78746 (US); MAYFIELD, Dayne, R., 12322 Triple Creek Dr., Austin, TX 78746 (US); LEWOHL, Jo, 27 Blackwood Rd., West End 4104, Queensland (AU); DODD, Peter, R., 459 Montague Rd., West End 4104, Queensland (AU).

(74) Agent: FLORES, Edwin, S., Chalker Flores, LLP, Suite 455, 12700 Park central, Dallas, TX 75251 (US).



WO 03/040414 A1

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR DETECTING AND MONITORING ALCOHOLISM AND RELATED DISEASES USING MICROARRAYS

(57) Abstract: A device and method for detecting, diagnosing, and/or monitoring alcoholism and related disease states is disclosed. The device includes a substrate and one or more alcoholism-specific nucleic acids attached to the substrate. The substrate is contacted by a sample collected from a person with alcoholism or alcohol abuse or an alcohol related disease state, wherein contact occurs under pre-selected binding conditions that provides information that can be collected and recorded by a computer.

WO 03/040414

PCT/US02/35902

METHOD AND DEVICE FOR DETECTING AND MONITORING ALCOHOLISM AND RELATED DISEASES USING MICROARRAYS

TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates in general to the method and device for detecting, monitoring or
5 diagnosing alcoholism and related disease states, and more particularly, to the method and
device for analyzing the progression of alcoholism and related disease states in a subject,
preferably a human patient, using microarrays.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The United States Government may own certain rights in this invention under DOD Grant
10 No.: 517-9-8444.

Without limiting the scope of the invention, its background is described in connection with
the method of detecting, diagnosing or monitoring alcoholism and its progression in a person
using nucleic acid microarrays, as an example.

Heretofore, in this field, the diagnosis and or detection of alcoholism or alcohol abuse and
15 related behaviors has in practice depended on interviews, review of past records, or clinical
impression. (Allen, JP, Columbus M, and Fertig J. 1995. Assessment in Alcoholism
Treatment: An Overview. In: NIAAA Treatment Handbook Series 4, Assessing Alcohol
Problems: A Guide for Clinicians and Researchers. NIH Publication No. 95-3745. pp. 1-9)
20 Generally, items from the medical history and clinical signs are combined to form a
diagnostic index. In addition, these items can be compared with the alcohol consumption
history, CAGE questionnaire, and early indicator questionnaires that also form part of the
index.

One problem with this method is the difficulty in obtaining the index. For example the index
is rarely based on data obtained from one questionnaire but instead requires that several be
25 made in order to show reliability. This process means the questionnaire must be taken at a
minimum of two different points in time and generally at least one week apart, which limits
the immediacy of obtaining a diagnosis. Furthermore, questionnaires can be lengthy with no

WO 03/040414

PCT/US02/35902

central or computerized means of scoring them. This is particularly inconvenient for measures such as the Alcohol Use Inventory and the Addiction Severity Index, which are not only lengthy but also include multiple scales. In addition, while procedures for administering many scales are straightforward, others, such as the Addiction Severity Index, the

5 Comprehensive Drinker Profile, the Alcohol Timeline Followback procedure, and several diagnostic scales, require extensive training before they can be properly used. Few of the scales offer variable scoring based on gender or ethnicity, which limits their universal applicability.

To detect alcoholism and alcohol consumption in its early phase, the diagnostic values of a

10 discriminant score and a combination of laboratory tests are often used. The discriminant scores, however, give low sensitivity and specificity and are often limited to the intake of alcohol. For example, discriminant scores formed from gamma-glutamyltransferase, acetaldehyde-induced hemoglobin fraction, and the mean corpuscular volume reveal a low

15 sensitive and specificity of 72% and 73%, respectively, and the test is optimally performed on heavy drinkers. (Sillanaukee P. 1992. The diagnostic value of a discriminant score in the detection of alcohol abuse. Arch Pathol Lab Med 116:924-9) Using other test combinations may offer better results, but none work across all age, sex, or ethnic groups. This confirms the assumption that alcohol abuse in all phases, like alcoholism and heavy drinking, may not be detected optimally with the use of only one marker or even combinations of them.

20 Unfortunately, and in part due to the above limitations, there is no immediately available and standardized method for diagnosis or detection of alcoholism or alcohol abuse and its related behaviors. As a result, physicians frequently misdiagnose or underdiagnose alcohol-related disorders. In addition, when lacking a standardized method of diagnosis, it is difficult if not

25 impossible to rapidly and routinely monitor disease progression because physicians cannot rely on information obtained solely from the patient. Alcoholics rarely disclose the true extent of their alcohol consumption, and often deny and minimize any association between their use of alcohol and their other symptoms or problems.

As evidenced by the foregoing explanation, there is a real need for a simple and reliable method to detect, diagnose, and monitor alcoholism or alcohol abuse. An early diagnosis of

WO 03/040414

PCT/US02/35902

alcoholism or a related abuses would also allow constructive intervention therapy at a stage when predicted recovery from alcoholism or its related diseases would be more favorable. Moreover, the ability to accurately and rapidly monitor the progression of alcoholism and related disease states, including the pathologic effects of alcoholism, permits physicians to effectively treat patients early and allows researchers to better assess the efficacy of various treatment regimens for alcoholism and related diseases.

Thus, reliable, reproducible, and economic methods of detecting and monitoring progression of alcohol abuse and related disease are needed. Developing a systematic method and device that provides an accurate and objective, physiologic measure of alcohol consumption is a necessary measure for physicians in their decision-making process and for improving morbidity and mortality outcomes in these patients. The method and device would provide healthcare professionals and researchers with an unbiased and credible tool for monitoring patient compliance with treatment goals.

SUMMARY OF THE INVENTION

Currently, the detection, diagnosis, and or monitoring of persons with alcoholism or alcohol abuse or related disorders is limited by the lack of a simple, rapid, and standardized method and device. Present methods, especially questionnaires and discriminant scores, also require significant time, cost and are often considered unreliable given their gender, age, and or ethnicity bias. In addition, alcoholics rarely disclose the true extent of their alcohol consumption, and often deny and minimize their symptoms or problems adding intrinsic unreliability to any technology that includes direct testing of the person. In addition, present measurements of alcohol consumption only measure immediate consumption and reveal nothing about the extent of the abuse or its progression.

In the area of alcoholism detection and management, a significant problem of current systems is that while there are several technologies that address alcoholic consumption, each react independently to alcohol intake. In addition, each technology is unique and often offers limited sensitivity, specificity and predictive value. These traditional technologies are often influenced besides by alcohol, by age, gender and various of substances and non-alcohol-associated diseases. For example, the Early Detection of Alcohol Consumption score, a

WO 03/040414

PCT/US02/35902

linear discriminant function derived from the analysis of a combination of up to 35 blood chemistry and hematology analytes, performs best only when identifying heavy drinking in those age 40 and above. (Harasymiw JW, Bean P. 2001. Identification of heavy drinkers by using the early detection of alcohol consumption score. *Alcohol Clin Exp Res* 25:228-35)

- 5 More importantly, present technologies that measure alcohol consumption only measure immediate consumption and reveal nothing about the extent of the abuse or its progression. Furthermore, they do not cover the entire time axis for alcohol consumption. Tests for biological markers require a specific time frame of detection. For example, one marker, ethyl glucuronide is thought to have a high sensitivity and specificity, but can only be
10 detected for short time periods of up to 80 hours after alcohol is eliminated from the body. (Wurst FM, Kempter C, Metzger J, Seidl S, Alt A. 2000. Ethyl glucuronide: a marker of recent alcohol consumption with clinical and forensic implications. *Alcohol* 20:111-6)

- Current alcoholism detection and management is based on principles that limit their broad usage due, in part, because they rely primarily on subjective information or on direct alcohol
15 intake. It is recognized, as disclosed herein, that current detection and management technologies are afflicted by the same inefficiencies intrinsic to the use of the current technologies themselves. The present invention is based on the recognition that cost effectiveness, accuracy and reliability in current technologies is not available for detecting and diagnosing alcoholism and its related disorders.

- 20 More particularly, the present invention can be a device for detecting, diagnosing and monitoring alcoholism and related diseases comprising a solid support for sustaining a substrate and a substrate as a collection of one or more alcoholism-specific nucleic acids attached to the solid support. A substrate for use with the present invention is human nucleic acid target elements of peptide nucleic acids with different determinable sequences, such as
25 genomic DNA, cDNA, oligonucleotides, RNA, single-stranded or double-stranded or any chemical modifications thereof. In an alternative embodiment the human nucleic acid target elements can be, e.g., alcohol-specific genes with sequences specific for structural, metabolic, transcriptional or other genes for cell signaling, immune response, and or cell-cell interactions that are expressed by alcoholics or alcohol abusers. The solid support sustaining
30 the substrate is any microfabricated solid surface to which molecules may be attached

WO 03/040414

PCT/US02/35902

through either covalent or non-covalent bonds. One advantage of using a microfabricated solid surface to which molecules may attach is that it promotes amino, carboxyl, thiol or hydroxyl molecular groups to be incorporated onto its solid surface, molecular groups that readily bind human nucleic acids.

- 5 The substrate sustained by the solid support can come in contact with a sample, e.g., a fluid collected from a person who is considered to be alcoholic, alcohol abusive or have an alcohol-related disease. In an alternative embodiment, the sample can be blood plasma, urine, semen, saliva, lymph fluid, meningeal fluid, amniotic fluid, glandular fluid, and cerebrospinal fluid, cells, or any other fluid, cell or body tissue preparation. The sample can
- 10 be optionally fractionated to create a probe. Likewise, the sample or probe can be optionally tagged with a label that can be detected by an apparatus with a light source or a capacitor. For example, a probe that is tagged with a fluorescent label can be viewed by a light source, e.g., a fluorescent microscope. A programmed computer, as part of the apparatus, can be used to record information from the sample, e.g., the location and magnitude of the
- 15 detectable change at each target element. Ratio information between the sample and a control can also be recorded. By control it is meant that a sample can be collected from a person who is not an alcoholic or alcohol abusive and processed in the same manner as the alcoholic sample. The recorded information from the sample and the control can be stored as raw and or ratio information, e.g., in a computer database and can be displayed as raw and or
- 20 ratio information, e.g., from a programmed computer.

- The present invention can also be a method for analyzing the progression of alcoholism and related disease states comprising the steps of contacting a sample obtained from a person considered to be alcoholic or alcohol abusive or has an alcohol-related disease with a microarray to allow binding and collecting information about the binding. The method of the
- 25 present invention can further comprise the step of identifying detectable changes between the sample and the control, the detectable changes that can be recorded, processed, displayed and stored on a programmed computer. By using the method of the present invention as a series of analyses taken over time, the progression of the disease in an individual person can be observed. The present method can also be used to analyze the expression of alcohol-specific
- 30 genes at a single point or over time with a microarray carrying sequences specific for

WO 03/040414

PCT/US02/35902

structural, metabolic, transcriptional or other genes for cell signaling, immune response, and or cell-cell interactions that are expressed by alcoholics or alcohol abusers.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

For more complete understanding of the features and advantages of the present invention, reference is now made to the detailed description of the invention along with the accompanying Figures.

Figure 1 is a flow chart of the steps involved in the detection and monitoring of alcoholism or alcohol abuse device of the present invention; and

Figure 2 is a graph with the results from blood total RNA after one day using the PAX gene and Ambion controls to evaluate the level of expression detectable in blood from subjects for genes associated with alcoholism;

Figure 3 is a graph comparing the levels of genes from different subjects at day 1 and day 3;

Figure 4 is a reference graph that demonstrates control levels of expression on the gene arrays; and

Figure 5 is a graph comparing reference to human blood sample gene expression detected from an individual blood sample.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

While the making and using of various embodiments of the present invention are discussed in detail below, it should be appreciated that the present invention provides many applicable inventive concepts that may be embodied in a wide variety of specific contexts. The specific embodiment discussed herein are merely illustrative of specific ways to make and use the invention and do not delimit the scope of the invention. Various modifications and combinations of the illustrative embodiments, as well as other embodiments of the invention, will be apparent to persons skilled in the art upon reference to the description. It is therefore intended that the appended claims encompass any such modifications or embodiments.

WO 03/040414

PCT/US02/35902

the present invention includes a device and method for detecting, diagnosing, and or monitoring alcoholism and related disease states. The device uses a substrate and one or more alcoholism-specific nucleic acids attached to the substrate, wherein substrate is contacted by a sample collected from a person with alcoholism or alcohol abuse or an alcohol related disease state, under pre-selected binding conditions that provides information that can be collected and recorded by a computer. The information can be compared to control information from a sample obtained from a person without alcoholism, alcohol abuse, or an alcohol related disease and yields gene expression information and diagnostic and or prognostic medical information about the person. The method includes the steps of contacting a sample obtained from a person considered to be alcoholic or alcohol abusive or to have an alcohol-related disease with a substrate to allow binding and collecting information about the binding. The information is recorded on a computer, compared to control information and yields gene expression information and diagnostic and or prognostic medical information about the person.

The following are terms as they apply to this application: Alcoholism is a continued, excessive or chronic use of alcohol, including alcoholism, alcohol abuse and any alcohol-related disease. A substrate is any microfabricated solid surface to which molecules may be attached through either covalent or non-covalent bonds. This includes, but is not limited to, Langmuir-Bodgett films, functionalized glass, germanium, silicon, PTFE, polystyrene, gallium arsenide, gold, and silver. Any other material known in the art that is capable of having functional groups such as amino, carboxyl, thiol or hydroxyl incorporated on its surface, is contemplated. This includes planar surfaces, and also spherical surfaces.

As used herein "one or more alcoholism-specific nucleic acid" and the like is either DNA, RNA, single-stranded or double-stranded and any chemical modifications thereof or protein nucleic acids. Modifications include, but are not limited to, those that provide other chemical groups that incorporate additional charge, polarizability, hydrogen bonding, electrostatic interaction, and fluxionality to the individual nucleic acid bases or to the nucleic acid as a whole. As used herein the term "pre-selected binding conditions" are those conditions that maximize the signal-to-noise ratio for the detection of one or more alcohol-specific nucleic acids, the products thereof, or the physiological result of a change in the expression of such a

WO 03/040414

PCT/US02/35902

gene. An example of binding conditions is described herein below in conjunction is the use of a DNA microarray, as will be known to those of skill in the art of expression microarrays.

A "nucleic acid target element" is a determinable sequence that contains at least one peptide located at a different location on the substrate. The determinable sequence may include
5 either DNA, RNA, single-stranded or double-stranded and any chemical modifications thereof. Modifications include, but are not limited to, those that provide other chemical groups that incorporate additional charge, polarizability, hydrogen bonding, electrostatic interaction, and fluxionality to the individual nucleic acid bases or to the nucleic acid as a whole. The determinable sequence can further be portions of structural, metabolic,
10 transcriptional or other genes, including ones that code for a proteases, receptors, channels, synaptic proteins, cell-cell or cell-matrix interactions, immune or inflammatory responses, cell signaling, molecular chaperones or other carrier proteins, molecular synthesis, cell cycle regulation, cell growth, cell proliferation, or cell death.

A "sample" is any mixture of macromolecules obtained from a person, e.g., nucleic acids
15 extracted from the tissue or cells from the source. Sample includes, but is not limited to, whole blood, portions of whole blood, blood plasma, urine, semen, saliva, lymph fluid, meningeal fluid, amniotic fluid, glandular fluid, and cerebrospinal fluid. This also includes isolated nucleic acids separated from all of the preceding. "Sample" also includes solutions or mixtures containing homogenized solid material, such as feces, cells, tissues, and biopsy
20 samples. Samples herein include one or more that are obtained at any point in time, including diagnosis, prognosis, and periodic monitoring.

Alcoholism is a major health problem in Western countries, but there is little molecular information about the genetic changes associated with the disease or how these changes
25 translate into the detection, diagnosis or monitoring of alcoholism or alcohol abuse. Alcohol affects all organs of the body; the primary target is the central nervous system, where it influences neurotransmission to produce intoxication. Long-term alcohol use can lead to addiction, dependence, or tolerance and the phenomena of tolerance and withdrawal have shaped hypotheses concerning the mechanism of drug dependence. Long-term drug abuse is likely to initiate an adaptive response at the cellular level: when the drug is removed the

WO 03/040414

PCT/US02/35902

neuroadaptations are unmasked, leading to the manifestation of the withdrawal syndrome. Substantial evidence suggests that this adaptive process is mediated, at least in part, by changes in gene expression.

- Sustained alcohol exposure results in changes in the expression of selected genes, including those coding for neurotransmitter receptors, hormones and their receptors, signaling molecules, molecular chaperones, transcription factors, and cytokines. (Miles 1995)
- Although most studies regarding alcoholism are carried out using animal models or by exposing cells in culture to ethanol, it has recently been reported that chronic alcoholism in humans results in changes in the expression of certain mitochondrial and GABA_A receptor subunit genes. (Fan L, van der Brug M, Chen W-B, Dodd PR, Matsumoto I, Niwa S, Wilce PA. 1999. Increased expression of a mitochondrial gene in human alcoholic brain revealed by differential display. *Alcohol Clin Exp Res* 23:408-413; Lewohl JM, Crane DI, Dodd PR. 1997. Expression of the alpha 1, alpha 2 and alpha 3 isoforms of the GABA_A receptor in human alcoholic brain. *Brain Res* 751:102-12)
- It is not known whether alcohol directly effects alcohol-responsive genes, or acts through an indirect mechanism involving many systems. For example, changes in transcription factor activation or in second messenger systems may initiate gene expression cascades. Activation or repression of alcohol-responsive transcription factors is also likely to result in changes in the expression of those genes with the corresponding control elements (Miles 1995).- Each of these possibilities would result in distinct patterns of gene expression. Such patterns are difficult to detect by traditional measurements of a few mRNAs, but are well suited to microarray analysis. (Iyer et al., 1999) Microarray analysis also provides a genome-wide, non-biased study of gene expression patterns. This could be of particular importance in studying a drug with potentially pleiotropic actions, such as alcohol. Furthermore, microarray analysis may be used to study the protein, neurotransmitters, cytokines or other molecules effected by alcohol and alcohol abuse.

WO 03/040414

PCT/US02/35902

Device for Detecting, Diagnosing or Monitoring Alcoholism and Related Disease States

The present invention creates a device for analyzing alcohol-specific gene expression thus overcoming the limitations that currently exist and limit the rapid and specific analysis of alcoholism or its potentially pathologic progression over time.

5 A microarray device may be used to yield gene expression information as well as diagnostic and or prognostic medical information about a person considered to be alcoholic, alcohol abusive, or who has an alcohol-related disease. The present invention demonstrates that it is possible to identify the presence, absence, or modifications in the expression of genes related to alcoholism in the blood of patients. By using blood as the source of the nucleic acids for
10 detection, the present invention greatly simplifies and makes detection of patients or potential patients more amenable to widespread use. One or more alcoholism-specific nucleic acids attach to the surface of the substrate under conditions apparent to those of skill in the art of molecular biology.

The alcoholism-specific nucleic acids may be genomic DNA, cDNA, oligonucleotides, RNA,
15 single-stranded or double-stranded and any chemical modifications thereof, including but not limited to chemical groups that incorporate additional charge, polarizability, hydrogen bonding, electrostatic interaction, and fluxionality to the individual nucleic acid bases or to the nucleic acid as a whole. Furthermore, the alcoholism-specific nucleic acids include human nucleic acid target elements of one or more peptide nucleic acid, each with different
20 determinable sequences. Each peptide is at a different location on the substrate at a density of 100 to 10,000 target elements per square centimeter. The alcoholism-specific nucleic acids attached to the substrate may be similar, e.g., to commercially available microarrays such as the HuGeneFL chip from Affymetrix, Inc., that contains target elements interrogating approximately 5,600 full length human genes.

25 An important finding of the present invention is that the human nucleic acid target elements may be portions of alcohol-specific genes with sequences specific to structural, metabolic, transcriptional or other genes for cell signaling, immune response, and or cell-cell interactions that are specifically expressed by alcoholics, alcohol abusers, or those with an alcohol-related disease. As used herein, the term "alcoholism-specific nucleic acids" include

WO 03/040414

PCT/US02/35902

those genes that show a statistically significant change in gene expression detectable by a nucleic acid microarray. The change in expression may be a statistically significant increase or decrease of gene expression, e.g., an increase or decrease (up-regulation or down-regulation), a complete lack of gene expression or the presence of expression of a gene not
 5 observed before. The change in expression may be of nucleic acids, of proteins or in the effect of the change in expression of a protein, e.g., enzymatic activity or the effects of the enzymatic activity (e.g., phosphorylation, post-translational modification to proteins, changes to carbohydrates, lipids, and the like).

Examples of "alcoholism-specific nucleic acids" detected using the present invention,
 10 include but are not limited to, at least a portion of one or more of the following genes: M6 neuronal glycoprotein, myelin associated glycoprotein, myelin-associated oligodendrocyte basic protein, myelin basic protein, myelin proteolipid protein, myelin-oligodendrocyte glycoprotein, myelin protein Po, oligodendrocyte-myelin glycoprotein, PMP2, PMP22, MAL gene, ApoD, ApoE., carbonic anhydrase II, 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase,
 15 Galactocerebrosidase, Transaldolase, UDP-galactose ceramide galactosyltransferase, MyT1, Puralpha, Edg-2, glial fibrillary acidic protein, keratin 6B, beta III spectrin, protease, serine, 9 (neurosin), proprotein convertase subtilisin/kexin type 4, calpain, large polypeptide L3, protease, serine, 11 (IGF binding), transmembrane protease, serine 2, endothelin receptor type B-like (GPCR 37), aquaporin 1 (channel-forming integral protein), potassium inwardly-
 20 rectifying channel, subfamily J, member 10, glutamate receptor, AMPA 1, N-ethylmaleimide-sensitive factor, EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1, CD44 antigen, cadherin 18, tetraspan NET-6, interferon, gamma-inducible protein 16, major histocompatibility complex, class II, DR beta 1, small inducible cytokine subfamily C, member 1, epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic), proline dehydrogenase (proline
 25 oxidase), glutathione S-transferase M5, ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II, serine/threonine kinase, TU3A protein (also known as dominant rapamycin resistance 1, DRR1), secreted frizzled-related protein 1, GTP binding protein, phospholipase A2 (14-3-3 protein), platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, alpha subunit, regulator of G-protein signaling 4 (RGS-4), synuclein, alpha, ribophorin II, 130 kD Golgi-localized
 30 phosphoprotein, autoimmune regulator (automimmune polyendocrinopathy candidiasis

WO 03/040414

PCT/US02/35902

ectodermal dystrophy), SRY-box 9 transcription factor, spliceosome-associated protein (U2 snRNP), retinoid X receptor, gamma, nuclear transcription factor, X-box binding 1, TATA box binding protein-associated factor, RNA polymerase II, F, basic transcription factor 3, macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like), LIM domain only 2 (rhombotin-like 1), bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1), requiem, apoptosis response zinc finger gene, discoidin domain receptor family, member 1, CDC-like kinase 2, CDC-like kinase 1, tumor protein p53-binding protein, 2, Human growth/differentiation factor 1, RACH1 (complements rad1-1 cell cycle checkpoint mutant), RAN (member RAS oncogene family), nel-like 2, sarcolipin, KIAA0043 gene product, ESTs, cysteine and glycine-rich protein 1, conserved gene amplified in osteosarcoma, KIAA0027 gene product, Homo sapiens clone 23916, KIAA0202 gene product, selenoprotein P, plasma, 1, chromosome 16 BAC clone CIT987SK-A-69G12, upregulated by 1,25-dihydroxyvitamin D-3, tight junction protein 2, HREV107-like protein, clone 23555 mRNA sequence, clone 25030 mRNA sequence, KIAA0237 gene product, KIAA0725 gene product, KIAA0293 gene product, neuroblastoma (nerve tissue) protein, reticulon 1, ESTs weakly similar to cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II, ESTs weakly similar to gene pp21 protein, or ESTs highly similar to KIAA0195, ubiquitin C, microtubule-associated protein 4, calcium dependent protease (small subunit, proteasome subunit z, gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor beta 2 subunit, glutamate/aspartate transporter II, lysosomal membrane glycoprotein-1 (LAMP1), cardiac gap junction protein, autotaxin-t (atx-t), Ig superfamily cytotoxic T-lymphocyte-associated protein (CTLA-4), HLA-DR alpha heavy chain a class II antigen of the major histocompatibility complex (MHC), Human acyl-CoA thioester hydrolase, cytochrome c oxidase subunit Vic, vacuolar H+ ATPase E subunit, ATP synthase, lysozyme mRNA, prostaglandin D2 synthase, liver mRNA for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, SURF-1, calmodulin, calcineurin A2, GDI-dissociation inhibitor RhoGDIgamma, 14.3.3 protein (a protein kinase regulator), hPTPA, protein kinase C zeta, small GTP-binding protein, S10, protein tyrosine phosphatase, testis-specific cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit (C-beta isoform), ADP-ribosylation factor 3, 90 kD heat shock protein gene, heat shock protein HSPA2 gene, mitochondrial matrix protein P1 (nuclear encoded), histone H2A.2, RNA polymerase II elongation factor SIII p15 subunit, acidic ribosomal phosphoprotein P0, glycyl-tRNA synthetase, ribosomal protein L27a,

WO 03/040414

PCT/US02/35902

pigment epithelium-derived factor, TRPM-2 protein, angiotensinogen, transferrin, melanoma ubiquitous mutated protein (MUM-1), KIAA0080 gene product, KIAA0084 gene product, and or KIAA0174 gene product, or combinations thereof.

Contact between the alcoholism-specific nucleic acids attached to the substrate and a sample
5 occurs under selective binding conditions, apparent to those of skill in the art of molecular
biology. Selective binding conditions are those that permit the highest signal-to-noise ratio,
and may be achieved by modifying the buffer conditions (pH, salt concentrations, detergents,
etc.), temperature, and the like. For example, the alcoholism-specific nucleic acids attached
10 to the substrate and the sample can be exposed to reagents or chemicals that facilitate binding
of the sample to the alcoholism-specific nucleic acids and then washed with additional
reagents or chemicals that facilitate removal of unbound sample, thereby leaving only bound
sample and without changing the molecular structure of the sample, alcoholism-specific
nucleic acids, or the substrate. Alternatively, one or more samples may come in contact with
15 the alcoholism-specific nucleic acids attached to the substrate, in which one or more samples
may be tagged with a label. For example, the label can be a fluorescent or non fluorescent
molecule that emits a signal upon exposure to light. The intended sample is one that is
collected from an alcoholic hereto defined as a person considered to be alcoholic, alcohol
abusive or to have an alcohol-related disease. The sample collected from the person can
include but is not limited to any mixture of macromolecules such as blood plasma, urine,
20 semen, saliva, lymph fluid, meningeal fluid, amniotic fluid, glandular fluid, and
cerebrospinal fluid or body tissue preparation. One or more samples, that may have different
or like origins, may be collected from the person for immediate or later use.

Binding of the sample with the alcoholism-specific nucleic acid attached to substrate
provides various information that may be collected by a computer as a change in signal
25 intensity. One advantage of the present invention is that binding may be detected by a light
source, capacitor, ion or plasma beam, including light microscopy, radiography,
chemiluminescence, fluorescence microscopy, confocal microscopy, interferometry, surface
plasma resonance, mass spectroscopy, atomic force microscopy, scanning tunneling
microscopy.

WO 03/040414

PCT/US02/35902

The computer can then be used to record the information, store the information in a database, and or display the information. In addition, the information that is collected can reveal the location and or magnitude of the detectable change in signal intensity at each human nucleic acid target element. The detectable change can be, e.g., a change in fluorescence, signal
5 intensity, or a change in a physical parameter, such as electrical conductance or refractive index, at each target element. Furthermore, an information ratio can be determined between the sample information and information collected from a control, in which the control is from a sample obtained from a person not considered to be alcoholic, alcohol abusive or to have an alcohol-related disease. Control information is collected in parallel to information collected
10 from the alcoholic. Notably, commercially available computer programs may be used to collect sample and control information. An advantage of the present invention is that the information that is collected may yield gene expression information and diagnostic and or prognostic medical information about the person.

Method for Detecting, Diagnosing or Monitoring Alcoholism and Related Disease States

15 The present invention may use commercially or non-commercially available microarrays in a method for detecting, monitoring and or diagnosing alcoholism or alcohol abuse. The present invention may also be a method for analyzing alcohol-specific gene expression or its potentially pathologic progression over time.

As shown in the flow chart of Figure 1, the steps involved in a method that can yield
20 diagnostic and prognostic medical information about a person. In step 10, a probe is created from a sample extracted from a person considered to be alcoholic, alcohol abusive or to have an alcohol-related disease. In step 12, there is contact between a substrate and a sample that, collected from an alcoholic hereto defined as a person considered to be alcoholic, alcohol abusive or to have an alcohol-related disease. The sample collected from the alcoholic can
25 include but is not limited to any mixture of macromolecules such as blood plasma, urine, semen, saliva, lymph fluid, meningeal fluid, amniotic fluid, glandular fluid, and cerebrospinal fluid, cells, or any other fluid, cell or body tissue preparation. One or more samples with different or like origin, may be collected from the person for immediate or later use. One advantage of the present method is that one or more samples may be labeled with a

WO 03/040414

PCT/US02/35902

fluorescent or non fluorescent molecule that emits a signal upon exposure to light as apparent to those of skill in the art of molecular biology. Alternatively, the sample can remain unlabeled and require a source other than fluorescent or non fluorescent light for its detection, e.g., source that records a physical parameter, such as electrical conductance or refractive index.

The substrate can be any microfabricated solid surface to which molecules may attach through either covalent or non-covalent bonds, such as Langmuir-Blodgett films, glass, functionalized glass, germanium, silicon, PTFE, polystyrene, gallium arsenide, gold, silver, or any materials comprising amino, carboxyl, thiol or hydroxyl functional groups incorporated onto a surface. Another advantage of the present method is that the surface of the substrate can be planar or spherical. For example, the substrate can be a microarray that is commercially manufactured. Alternatively, the substrate may not be manufactured commercially. Attached to the substrate may be one or more human nucleic acid target elements. The attachment of the human nucleic acid target elements to the substrate occur under conditions apparent to those of skill in the art of molecular biology.

The human nucleic acid target elements may be genomic DNA, cDNA, oligonucleotides, RNA, single-stranded or double-stranded and any chemical modifications thereof, including but not limited to chemical groups that incorporate additional charge, polarizability, hydrogen bonding, electrostatic interaction, and fluxionality to the individual nucleic acid bases or to the nucleic acid as a whole. Furthermore, the human nucleic acid target elements may be one or more peptide nucleic acid, each with different determinable sequences. Each peptide is at a different location on the substrate at a density of 100 to 10,000 target elements per square centimeter. An important finding of the present invention is that the human nucleic acid target elements may be portions of genes with sequences specific to structural, metabolic, transcriptional or other genes, including ones that code for proteases, receptors, channels, synaptic proteins, cell-cell or cell-matrix interactions, immune or inflammatory responses, cell signaling, molecular chaperones or other carrier proteins, molecular synthesis, cell cycle regulation, cell growth, cell proliferation, or cell death.

WO 03/040414

PCT/US02/35902

The sample is allowed in step 12 to contact the microarray substrate, which can be either genomic DNA, cDNA, oligonucleotides, RNA, single-stranded or double-stranded and any chemical modifications thereof, including but not limited to chemical groups that incorporate additional charge, polarizability, hydrogen bonding, electrostatic interaction, and fluxionality to the individual nucleic acid bases or to the nucleic acid as a whole. The substrate is composed of human nucleic acids further comprises nucleic acid target elements of at least one peptide at a density of 100 to 10,000 target elements per square centimeter of surface area. One advantage of the present method is that one substrates may be used to contact one or more samples. Alternatively, the one or more substrates each comprised of the same or different human nucleic acid target elements may be used to contact one or more samples.

After contact between the sample and the substrate, the sample is allowed to bind to the substrate in step 14. Binding occurs under selective binding conditions apparent to those of skill in the art of molecular biology. For example, the sample and the substrate may be exposed to reagents or chemicals that facilitate binding of the sample to substrate followed by a wash with additional reagents or chemicals that facilitate removal of unbound sample, thereby leaving only bound sample without changing the molecular structure of the sample, or the substrate.

From the binding, information about the binding may be collected by a computer in step 16. The information may be collected as a change in signal intensity that can be detected by a light source, capacitor, ion or plasma beam, including light microscopy, radiography, chemiluminescence, fluorescence microscopy, confocal microscopy, interferometry, surface plasma resonance, mass spectroscopy, atomic force microscopy, scanning tunneling microscopy. The computer can record the information, store the information in a database, and or display the information. In addition, the information that is collected can reveal the location and or magnitude of the detectable change in signal intensity at each human nucleic acid target element. The detectable change may be, e.g., a change in fluorescence, signal intensity, or a change in a physical parameter, such as electrical conductance or refractive index, at each target element. Furthermore, an information ratio can be determined between the sample information and information collected from a control, in which the control is from a sample obtained from a person not considered to be alcoholic, alcohol abusive or to have an

WO 03/040414

PCT/US02/35902

alcohol-related disease. Control information is collected in parallel to information collected from the alcoholic. Commercially available computer programs may be used to collect sample and control information. In step 18, the collected information can yield gene expression information and diagnostic and or prognostic medical information about the person.

Example of Detecting, Diagnosing or Monitoring Alcoholism and Related Disease States

Neuropathological studies show that chronic alcohol abuse results in brain shrinkage, particularly of the frontal lobes, which is largely due to a reduction in volume of the cerebral white matter (Reviewed in (Kril et al., 1997). Morphometric studies of gray matter indicate that neurons in specific regions of the brain, including frontal lobe cortical neurons, are selectively damaged (Kril JJ, Harper CG (1989) Neuronal counts from four cortical regions of alcoholic brains. Acta Neuropathol (Berl) 79:200-4) In addition, the frontal cortex is susceptible to alcohol-induced damage and is important in judgement, decision making and other executive functions (Rahman S, Sahakian BJ, Hodges JR, Rogers RD, Robbins TW (1999) Specific cognitive deficits in mild frontal variant frontotemporal dementia. Brain 122:1469-93; Godefroy O, Rousseaux M (1997) Novel decision making in patients with prefrontal or posterior brain damage. Neurology 49: 695-70) and explains why this brain regions is used for analysis by DNA microarrays.

A cDNA (UniGEMV) and an oligonucleotide (HuGeneFL) array are both used. Many genes are represented on these arrays, and there are also many genes unique to each array. Thus, use of both types of arrays allows cross-validation for some genes and study of a larger number of genes than would be possible with either array alone.

Sample Selection

Control and alcoholic cases are divided on the basis of alcohol intake. In accordance with National Health and Medical Research Council (NHMRC)/World Health Organization criteria, alcoholism is defined by an average daily intake of greater than 80 g of ethanol: many of the patients had consumed over 200 grams ethanol per day for most of their adult lives (usually >30 years). All controls are teetotalers or social drinkers who consume less

WO 03/040414

PCT/US02/35902

(usually, much less) than 20 g of ethanol per day on average. Cases are matched for age at death, post-mortem delay, gender, cause of death, and drinking history where possible.

Cases with a history of polydrug abuse were excluded. Samples may be taken by qualified pathologists under full ethical clearance #97/36 and informed written consent from the next of kin.

Two groups of control and two groups of alcoholic samples are selected; clinical details are given in Table 1. Each group (sample pool) includes five alcoholics and five matched control cases. The first set of cases are identical to those used in PCR-differential display experiments. The alcoholics in this group represent a heterogeneous population of three uncomplicated alcoholics, one alcoholic with cirrhosis and one alcoholic with concomitant Wernicke Encephalopathy. The selection criteria for Case Group Two is more stringent: only males are included, and any case with concomitant disease such as cirrhosis of the liver or Wernicke-Korsakoff Syndrome are excluded from the case set. In addition, care is taken to choose only those cases, controls or alcoholics, that exhibited no neuropathological abnormality at autopsy. Hence, the second case group is restricted to a subset of 'uncomplicated' alcoholics.

Table 1: Case Information

	Age	PMD	Gender	Cause of Death	Neuropathology
Case Group One					
<i>Controls</i>					
1	61	15	M	coronary thrombosis	NSA
2	54	16	F	pulmonary embolism	NSA
3	89	17	M	cardiac failure	NSA
4	73	22	M	myocardial infarction	Alzheimer like changes
5	70	46	M	myocardial infarction	n/a
<i>Alcoholics</i>					
1	69	30	M	coronary atheroma	NSA
2	70	16	M	myocardial infarction	Wernicke-Korsakoff lesions (healed)
3	43	21.5	M	aspiration pneumonitis coronary atherosclerosis	NSA

WO 03/040414				PCT/US02/35902	
4	59	15	M	suicide/hanging	NSA
5	56	19	M	cardiac failure	chronic hepatic encephalopathy
Case Group Two					
<i>Controls</i>					
6	71	4.5	M	acute renal failure	NSA
7	75	36	M	pneumonia	NSA
8	67	67	M	myocardial infarction	NSA
9	52	61.4	M	myocardial infarction	NSA
10	67	34	M	coronary atherosclerosis	n/a
<i>Alcoholics</i>					
6	49	16	M	cardiomyopathy	NSA
7	34	31	M	aspiration of gastric contents	n/a
8	44	22	M	cardiorespiratory arrest	NSA
9	57	24	M	drowning	NSA
10	64	27	M	ischemic heart disease	NSA

Probe Preparation from the Sample

Total RNA was extracted using a modified guanidine isothiocyanate extraction procedure (Chomczynski and Sacchi 1987). Total RNA was extracted from each case individually and the samples pooled together to reduce (dilute) individual case-to-case differences that are unrelated to alcoholism. Each of the five cases making up each control and alcoholic group contributed 30 µg of total RNA to the pool. The same pooled control and alcoholic total RNA samples are used for hybridization to UniGEMV (Genome Systems Inc) and HuGeneFL (Affymetrix) arrays.

Analysis of Gene Expression Using cDNA Microarrays

- 10 PolyA⁺ RNA was extracted from 100 µg of total RNA using the Oligotex PolyA⁺ RNA Extraction kit from Qiagen (Valencia, CA). The protocol was carried out as per the manufacturer's instructions using a double-pass procedure. 200 ng of polyA⁺ RNA may be shipped to Genome Systems for probe generation and microarray hybridization.

WO 03/040414

PCT/US02/35902

Analysis of Gene Expression Using Oligonucleotide Arrays

For each sample, 25 µg of total RNA may be used as starting material for cDNA synthesis using a Superscript Choice kit (Gibco BRL Life Technologies, Rockville, MD). In vitro transcription was then performed using a Bioarray RNA transcript labeling kit (Enzo, Farmingdale, NY). The protocols are performed according to Affymetrix (Santa Clara, CA) recommendations. Prior to hybridization, biotin-labeled cRNA may be fragmented randomly to an average size of 30-60 bases by incubation at 94 °C for 35 min in 40 mM Tris-acetate pH 8.1, 100 mM potassium acetate and 30 mM magnesium acetate. Aliquots of fragmented cRNA (10 µg in a 200 µl master mix) are then hybridized to human oligonucleotide arrays (HuGeneFL, Affymetrix). The HuGeneFL chip contains probes interrogating approximately 5,600 full length human genes. The hybridization reactions may be conducted at 45 °C for 16 hr in a rotisserie oven (Affymetrix) set at 60 rpm. Hybridized arrays are then washed and stained with streptavidin-phycoerythrin (Molecular Probes) as described by Affymetrix protocols. Finally, arrays are scanned with a dedicated confocal microscope (Hewlett Packard, Santa Clara, CA).

Information Analysis

Analysis of cDNA microarray may be performed with a program called GEMTools (Incyte Pharmaceuticals). The program translates the 5600 target elements on the HuGeneFL chip into sequences for known genes. Genes can then be selected that pass a predefined default criteria for signal intensity above background and percent of a spot yielding signal in binding for both sample and control microarrays. Genes may be further filtered by selecting those that show a 1.4-fold increase or decrease in expression in the sample versus control.

Absolute and comparison analyses of oligo microarrays may be analyzed using GeneChip® Software 3.1 (Affymetrix). The total signal intensity of all oligo microarrays can be scaled to a uniform value by normalizing the average intensity of all genes (total intensity/number of genes) to a fixed value of 190. Under these conditions, the scaling factor for oligo microarrays may vary between 0.82 and 4.04. The protocols for analysis of Affymetrix arrays are described in detail (Lockhart et al., 1996; Wodicka et al., 1997), relevant portions

WO 03/040414

PCT/US02/35902

incorporated herein by reference, as are the relevant portions of manuals provided by the manufacturer. The output of the GeneChip program includes data on signal intensity ("average difference") and comparison between a sample and control ("fold-change"). Confidence measures for the presence or absence of a given mRNA probe ("absolute call") and fold-change values ("difference call") can be generated using a matrix-based decision algorithm. (Wodicka L, Dong H, Mittmann M, Ho MH, Lockhart DJ. 1997. Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* 15:1359-67) In all cases, the default values in the GeneChip program may be employed.

For oligonucleotide microarrays, genes with altered expression on may be selected by filtering data from comparison files generated between sample and control. The selection of genes represented by at least 10 target element pairs on the oligo microarrays, may include those with expression levels that differ from the control by at least about a 1.4 fold in both comparison files. Any "absent" gene as identified by the "absolute call" algorithms in the GeneChip program in any one of the bindings is eliminated from the candidate gene list.

15 Gene Expression Changes, Prognostic and Diagnostic Medical Information

Human alcoholics vary considerably in the mode, nature and duration of their alcohol abuse, especially with respect to the incidence of cycles of abuse and withdrawal. Alcoholics and non-alcoholics also exhibit considerable diversity in many pre-terminal factors, including environment, nutrition, medication, and genetic predisposition. To reduce the impact of these factors, one or more independent groups of controls may be used. In addition, one or more control group can be pooled for analysis (Table 1). Pooling of samples is used in recent microarray studies (Alizadeh et al., 2000) and reduces or dilutes the individual case-to-case differences. Furthermore, pooling of samples on the basis of similarity may delineate differences in gene expression from those due to population diversity. Samples from the same person may be pooled or run simultaneously to delineate small differences from artifact.

To identify genes that could underlie the adaptive response of brain regions particularly susceptible to alcoholic brain damage, comparisons may be made between controls and alcoholics using tissue from specific tissue, e.g. superior frontal cortex. (Kril JJ, Harper CG.

WO 03/040414

PCT/US02/35902

1989. Neuronal counts from four cortical regions of alcoholic brains. *Acta Neuropathol (Berl)* 79:200-4). For example, pooled samples can be hybridized to cDNA and oligo microarrays and data can be expressed in terms of a differential expression ratio. The hybridizations performed using Case Group One pools are termed GS-1 (UniGEMV, 5 Genome Systems) and A-1 (HuGeneFL, Affymetrix), and hybridizations for Case Group Two are termed GS-2 and A-2 (Table 1).

Microarrays are a relatively new technology which to date have been applied almost exclusively to cell culture systems and tumor samples, where differences in gene expression of two- to ten-fold are not uncommon. In animal models of alcohol abuse and in studies of 10 human alcoholics conducted so far, the changes in gene expression which have been identified are relatively small: a 40% change in gene expression is common. Because of this, a relatively low threshold (1.4 fold) may be selected to identify genes of interest. In part because of the small changes expected in alcoholism, at least two different microarray substrates may be used. Furthermore, emphasis on genes with similar results in both case 15 groups and both types of microarrays can be made.

The replicability of gene expression changes between controls and alcoholics in the two case groups is measured by the cDNA microarrays. The natural log of the differential expression ratios plotted for the two case groups shows consistent results, as reflected by the correlation coefficient (r) of 0.48. The replicability may also be judged by comparing how many genes 20 show the same direction change between the two case groups at the chosen cutoff of 1.4-fold. For example, >100 genes show changes of at least 1.4-fold, up or down, in both case groups on the cDNA arrays. If this is due to random fluctuations, then an expectation of >100 genes may be used to show 1.4-fold changes of opposite direction between the two case groups. However, only 7 genes show an increase of at least 1.4-fold in one case group and a decrease 25 of -1.4-fold in the second case group. Similarly, randomizing the data and then selecting for genes having at least 1.4-fold changes of the same direction in both case groups chooses far fewer genes than seen with the results shown herein. Thus, selecting genes beyond the 1.4-fold cutoff level in both case groups identifies a group of highly significant changes. While there may be some "false-positives," it may be better to have a "relaxed" cutoff so as to avoid

WO 03/040414

PCT/US02/35902

greater type II errors. Identifying a subset of functionally related genes within the selected list greatly increases the statistical power of the findings.

- A striking finding from these studies is that most genes show similar expression in alcoholics and controls. The cDNA microarrays results in 3825 genes exceeding criteria as "present" while the oligo microarray analysis results in 705 genes being consistently called "present" in the four samples (2 control groups and 2 alcoholic groups). At least 64 genes may be found to increase and 99 decrease by 1.4-fold in both case groups as observed by either the cDNA or oligonucleotide microarrays. A ratio of 1.4 represents a 40% difference in expression level between the two samples on the microarray.
- 10 An initial inspection of the genes with altered expression indicates striking coordinate decreases in many mRNAs coding for myelin proteins. Both types of microarrays may be screened for genes related to myelin or oligodendrocytes. Over half (12/21) of these genes show decreases in expression (1.4-fold or greater) in at least two of the four hybridizations (Table 2).

Table 2: Myelin-related expression data

CDNA Accession	Oligo Accession	Gene Name	GS-1	GS-2	A-1	A-2
<i>Structural</i>						
NR	U45955	M6 neuronal glycoprotein	NR	NR	-1.6	-1.5
M29273	M29273	myelin associated glycoprotein (MAG)	-2.1	-1.9	-1.7	-1.7
H23197	D28114	myelin-associated oligodendrocyte basic protein (MOBP)	-1.2	-1.2	-1.9	1.2
NR	M13577	myelin basic protein	NR	NR	-1.7	-1.1
M27110	M54927	myelin proteolipid protein (PLP)	-2.1	-1.9	-2.1	-1.3
NR	Z48051	myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG)	NR	NR	-1.2	-1.1
D14720	D10537	Myelin protein Po	-1.2	-1.1	-1.2	-1.7
NR	L24893	Myelin protein Po	NR	NR	1.1	2.4
M63623	M63623	oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMGP)	ND	ND	-2.7	-1.2
D16181	D16181	PMP2	-1.4	-1.6	-2.4	-1
AA777648	U08049	PMP22	-1.5	-1.8	1.4	1
NR	U08096	PMP22	NR	NR	3.3	1.3
NR	D11428	PMP22	NR	NR	-5.7	-4.8
X76220	X76223	MAL gene	-2.3	-2.3	-2.6	-3.5
<i>Metabolic</i>						
J02611	J02611	ApoD	-1.6	-1.8	-1.8	-1.4
A1188519	NR	ApoD	-1.5	-1.9	NR	NR

WO 03/040414			PCT/US02/35902			
K00396	M12529	ApoE	-1.3	-1.6	-1.3	-1.6
J03037	Y00339	Carbonic anhydrase II	-1.2	-1.3	-1.6	-1.6
D13146	M19650	2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP)	ND	ND	-1.7	-2.5
D13146	D13146	2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP)	ND	ND	-1.4	1
L38559	L23116	Galactocerebrosidase (GALC)	ND	1.4	-1.2	1.4
L19437	L19437	Transaldolase	-1.1	-1.6	-1.6	1.1
AA811893	U30930	UDP-galactose ceramide galactosyltransferase (CGT, E.C. 2.4.1.45)	-1	-1.4	-1.9	-1.7
<i>Transcription</i>						
AB020642	M96980	MyT1	1.1	1.2	-1.2	-1.8
NR	X91648	Puralpha	NR	NR	1	-1.9
<i>Other</i>						
AA059335	U11861	Edg-2	NR	NR	-1.1	1.1

Myelin-associated glycoprotein (MAG), myelin and T cell differentiation protein (MAL), and apolipoprotein D (ApoD) show decreases in all four bindings. However, the changes in myelin gene expression may be selective because myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG) and Edg-2, a tetraspan receptor linked with myelination, show no changes in expression and six other genes, including the abundant myelin basic protein, show decreased expression in only one binding. In contrast, galactocerebrosidase (GALC), the major enzyme important for degradation of galactosylceramide, is increased in expression in two out of four hybridizations. The observation that only a subset of myelin genes may decrease in expression argues against variation in tissue dissection (giving more white matter in controls) as a possible explanation.

The majority of the genes in Table 2 play a role in myelin structure (Boison and Stoffel 1994; Montag et al., 1994) but biosynthetic genes are also altered (Schaeren-Wiemers et al., 1995). Interestingly, this includes the genes for ApoD and ApoE that are both involved in lipid transport. These genes are also implicated in neuronal degenerative diseases such as Alzheimer's Disease (Roses 1997; Terrisse et al., 1998). It is also striking that the myelin-related transcription factors, MyT1 and Puralpha, are not consistently altered in the alcoholic samples, suggesting additional factors in the coordinate down-regulation of so many myelin genes.

WO 03/040414

PCT/US02/35902

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is a major structural protein of astrocytes that has been widely studied in animal models of alcohol abuse. GFAP is up-regulated after acute ethanol treatment but decreases with chronic treatment and may be transcriptionally regulated by ethanol (Valles et al., 1997). A deficiency in GFAP also results in demyelination (Liedtke et al., 1996): mice with a null mutation in the GFAP gene exhibit abnormal myelination and hydrocephalous associated with white matter loss. Hence, GFAP expression is required for the maintenance of myelinated fibers and white matter in the CNS.

The decrease in expression of myelin-related genes in the frontal cortex of alcoholics may indicate that chronic alcohol abuse either directly or indirectly affects the transcription of myelin-related genes, resulting in a decrease in the amount of myelin proteins. Alternatively, the loss of myelin gene expression may indicate that oligodendrocytes are particularly susceptible to the neurotoxic effects of ethanol.

Myelin gene expression is studied with less detail in animal models of alcohol abuse although alterations in myelin biogenesis are well-documented in animal models of Fetal Alcohol Syndrome (FAS). Rats prenatally exposed to ethanol exhibit delays in myelination (Jacobson S, Rich J, Tovsky NJ (1979) Delayed myelination and lamination in the cerebral cortex of the albino rat as a result of the fetal alcohol syndrome. *Currents in Alcoholism* 5:123-133) which is likely to be the result of abnormalities in the temporal pattern of expression of myelin-related genes including GFAP, PLP, MAG, Mal and myelin basic protein (Naus and Bechberger 1991; Milner et al., 1987; Chiappelli et al., 1991). Exposure to ethanol postnatally (postnatal days 4-10) reduces the expression of specific myelin basic protein and MAG isoforms (Zoeller et al., 1994). White-matter loss and altered myelin biogenesis is documented in children with fetal alcohol syndrome (Riley et al., 1995)

Demyelination and white-matter loss is extensively documented in neuroimaging (Pfefferbaum et al., 1993) and neuropathological (Kril et al., 1997) studies of humans and are thought to account for the brain shrinkage seen in these cases. White-matter loss is most severe in cirrhotic alcoholics and alcoholics with concomitant WE and WKS but can also be found in uncomplicated alcoholics (Kril et al., 1997), suggesting that it results from a direct neurotoxic effect of alcohol. Chronic alcoholism results in atrophy of one of the main white

WO 03/040414

PCT/US02/35902

matter structures in the brain, the corpus callosum. Corpus callosum size and thickness are significantly reduced in alcoholic males compared with age and sex matched controls (Oishi et al., 1999) as well as in children prenatally exposed to alcohol (Riley et al., 1995).

It is important to note that neuroimaging studies demonstrate that white matter loss is reversible with abstinence (Shear et al., 1994), and hence may represent a reversible change in myelination rather than an irreversible loss of axons or oligodendrocytes. Future microarray analyses of RNA extracted from the frontal cortex of abstinent alcoholics compared with non-drinking controls or cases known to be actively drinking at the time of death may reveal whether the changes in myelin gene expression are reversible. In addition, analysis of the expression of these genes in animal models of alcohol abuse may help define the period of abstinence required to reverse these changes.

Importantly, alcoholics also suffer a disproportionate incidence of central pontine myelinolysis and Marchiafava-Bignami disease (Miles and Diamond 1998). These demyelinating disorders may result from toxic or metabolic factors other than alcohol. Down-regulation of myelin gene expression may predispose alcoholics to myelin injury in central pontine myelinolysis and Marchiafava-Bignami disease.

Non-myelin genes can be arranged into functional groups using the criteria of differential expression ratios of 1.4 fold in both case groups with either cDNA arrays (Table 3) or oligonucleotide arrays (Table 4).

Table 3: Genes which meet the criteria for differential expression on the cDNA (GS-1, GS-2) array: Data from oligonucleotide (A-1, A-2) arrays have been added where possible

Accession	GeneName	GS-1	GS-2	A-1	A-2
<i>Structural Proteins</i>					
AA059335	glial fibrillary acidic protein	-3.1	-2.2	-1.9	-2.4
L42611	keratin 6B	-1.6	-2.8	N/D	-2.6
AB008567	beta III spectrin	1.4	1.5	N/R	N/R
<i>Proteases</i>					
U62801	protease, serine, 9 (neurosin)	-2.1	-2	-1.5	-4
D87993	proprotein convertase subtilisin/kexin type 4	-1.9	-2.1	N/R	N/R
AI978885	calpain, large polypeptide L3	-1.7	-1.8	N/R	N/R
Y07921	protease, serine, 11 (IGF binding)	-1.5	-1.6	-1.9	-1.6
U75329	transmembrane protease, serine 2	1.4	1.6	N/D	N/D
<i>Receptors, Channels and other Synaptic Proteins</i>					

WO 03/040414		PCT/US02/35902			
Y12476	endothelin receptor type B-like (GPCR 37)	-2.5	-2.1	-1.7	-1.8
U41517	aquaporin 1 (channel-forming integral protein)	-1.8	-2.2	-4.1	-4.5
U52155	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 10	-1.5	-1.9	N/D	N/D
M64752	glutamate receptor, AMPA 1	1.4	1.6	N/D	2.2
U03985	N-ethylmaleimide-sensitive factor	1.6	1.4	N/R	N/R
<i>Cell-Cell or Cell-Matrix Interactions</i>					
U03877	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	-1.6	-2.9	N/D	N/D
X55150	CD44 antigen	-1.4	-1.4	N/D	N/D
U59325	cadherin 18	1.4	1.7	N/D	N/D
AF120265	tetraspan NET-6	1.4	1.4	N/R	N/R
<i>Immune or Inflammatory Response</i>					
S75433	interferon, gamma-inducible protein 16	-1.6	-1.4	N/D	N/D
V00522	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1	-1.4	-1.5	N/R	N/R
AL031736	small inducible cytokine subfamily C, member 1	1.8	1.6	N/D	N/D
<i>Metabolism</i>					
J03518	epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)	-1.4	-1.4	-1.4	1.8
U82381	proline dehydrogenase (proline oxidase)	-1.4	-1.9	N/R	N/R
A1797367	glutathione S-transferase M5	-1.4	-1.7	N/D	N/D
J04973	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II	1.5	1.4	N/D	1.7
<i>Cell Signalling</i>					
AB004884	serine/threonine kinase	-1.9	-1.5	N/D	N/D
AF089853	TU3A protein (also known as dominant rapamycin resistance 1, DRR1)	-1.6	-2.6	1.2	-1.7
AF056087	secreted frizzled-related protein 1	-1.5	-1.4	N/R	N/R
AF054183	GTP binding protein	1.4	1.4	N/R	N/R
AL008725	phospholipase A2 (14-3-3 protein)	1.4	1.4	1.2	1.3
L13385	platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, alpha subunit	1.4	1.5	N/R	N/R
AI651602	regulator of G-protein signalling 4 (RGS-4)	1.5	1.8	N/D	2.8
L08850	synuclein, alpha	1.6	1.4	-1.1	1.4
<i>Transcription or Protein Synthesis</i>					
Y00282	ribophorin II	-1.8	-1.8	1.1	-1.1
U55853	130 kD Golgi-localized phosphoprotein	-1.7	-2	-2.1	N/D
AJ009610	autoimmune regulator (autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy)	-1.5	-1.6	N/R	N/R
S74506	SRY-box 9 transcription factor	-1.4	-1.9	-1.5	-1.5
L35013	spliceosome-associated protein (U2 snRNP)	-1.4	-1.4	N/R	N/R
U38480	retinoid X receptor, gamma	-1.4	-1.4	N/D	N/D
U15306	nuclear transcription factor, X-box binding 1	1.4	1.4	N/D	N/D
X97999	TATA box binding protein-associated factor, RNA polymerase II, F	1.4	1.4	1.1	1.1

WO 03/040414		PCT/US02/35902			
Z48042	basic transcription factor 3	1.4	1.4	1.1	N/D
<i>Cell Cycle Regulation: Growth, Proliferation and Death</i>					
U28054	macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like)	-3	-1.8	N/D	N/D
X61118	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)	-2.3	-1.8	-1.7	N/D
X51801	bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1)	-1.6	-1.4	N/D	N/D
AF001433	requiem, apoptosis response zinc finger gene	-1.5	-1.5	-1.3	N/D
Z29093	discoidin domain receptor family, member 1	-1.5	-2	N/R	N/R
AF023268	CDC-like kinase 2	-1.5	-1.5	-1.1	-1.2
AA044407	CDC-like kinase 1	-1.5	-1.6	N/R	N/R
AI123916	tumor protein p53-binding protein, 2	-1.4	-1.5	-1.3	-1
AI936592	Human growth/differentiation factor 1	-1.4	-1.5	-1.7	-1.7
U35735	RACH1 (complements rad1-1 cell cycle checkpoint mutant)	-1.4	-1.9	1	-1.1
AF052578	RAN, member RAS oncogene family	1.4	1.4	N/R	N/R
D83018	ncl-like 2	1.6	1.6	-1.2	1.6
<i>Other</i>					
U96094	sarcolipin	1.7	1.7	N/D	N/D
<i>Unknown</i>					
AI888282	ESTs	-4.2	-2.9	N/D	N/D
D26362	KIAA0043 gene product	-2.4	-2.2	-1.6	-1
AI683914	ESTs	-1.8	-1.9	N/R	N/R
M76378	cysteine and glycine-rich protein 1	-1.6	-1.6	-1.8	-1.3
AF022231	conserved gene amplified in osteosarcoma	-1.6	-1.5	N/R	N/R
AA703765	KIAA0027 gene product	-1.6	-1.7	-2.4	-3.9
F13434	Homo sapiens clone 23916	-1.6	-2.6	N/R	N/R
D86957	KIAA0202 gene product	-1.5	-1.4	N/D	N/D
AI521556	selenoprotein P, plasma, 1	-1.5	-1.7	-1.2	-1.7
AI677769	ESTs	-1.4	-1.4	N/R	N/R
AC002550	chromosome 16 BAC clone CIT987SK-A-69G12	-1.4	-1.6	N/R	N/R
S73591	upregulated by 1,25-dihydroxyvitamin D-3	-1.4	-1.4	-2.3	-4.2
L27476	tight junction protein 2	-1.4	-1.6	N/R	N/R
AI375733	HREV107-like protein	-1.4	-1.6	N/R	N/R
AI936592	ESTs	-1.4	-1.5	-1.7	-1.7
AA235116	ESTs	1.4	2.4	-1.5	N/D
AA102395	ESTs	1.4	1.7	N/D	N/D
AI003191	ESTs	1.4	1.4	N/R	N/R
AI375991	ESTs	1.4	1.6	N/R	N/R
AA283901	ESTs	1.4	1.5	N/D	N/D
W05842	ESTs	1.4	2.1	N/R	N/R
AI669775	ESTs	1.4	1.6	N/R	N/R
AA417208	ESTs	1.4	1.9	N/D	N/D
AI018181	ESTs	1.4	1.8	N/R	N/R
N76371	ESTs	1.4	1.4	N/D	N/D

WO 03/040414		PCT/US02/35902			
AA167722	ESTs	1.4	1.4	N/R	N/R
AI801966	ESTs	1.4	1.7	N/R	N/R
AA436947	ESTs	1.4	1.6	N/R	N/R
AF038201	clone 23555 mRNA sequence	1.4	1.4	N/R	N/R
AA313794	clone 25030 mRNA sequence	1.4	1.5	N/R	N/R
D87074	KIAA0237 gene product	1.4	1.6	-1.3	1.3
AB018268	KIAA0725 gene product	1.4	1.4	N/R	N/R
AB006631	KIAA0293 gene product	1.4	1.4	N/R	N/R
D82343	neuroblastoma (nerve tissue) protein	1.4	1.8	-1	2.3
L10333	reticulin 1	1.4	1.4	1.4	1.3
AI937119	ESTs	1.5	1.6	N/R	N/R
AI831729	ESTs	1.5	1.4	N/R	N/R
AA707689	ESTs, Weakly similar to cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II	1.5	1.7	N/R	N/R
AA424109	ESTs, Weakly similar to gene pp21 protein	1.5	1.4	N/R	N/R
Z99387	ESTs	1.6	1.8	N/R	N/R
AI004627	ESTs	1.6	2.4	N/R	N/R
AI306588	ESTs	1.7	1.5	N/D	N/D
AI827127	ESTs, Highly similar to KIAA0195	1.8	1.4	N/D	N/D
AA679059	ESTs	12.8	20.4	N/R	N/R
AA912329	ESTs	14.9	20.4	N/R	N/R

Table 4: Genes which meet the criteria for differential expression on the oligonucleotide (A-1, A-2) arrays: Data from cDNA (GS-1, GS-2) arrays have been added where possible

Accession	Gene Name	A-1	A-2	GS-1	GS-2
<i>Structural Proteins</i>					
M26880	ubiquitin C	-1.5	-1.5	N/R	N/R
M64571	microtubule-associated protein 4	-1.4	-1.5	-1.1	-1
<i>Proteases</i>					
X04106	calcium dependent protease (small subunit)	1.4	1.5	N/R	N/R
D38048	proteasome subunit z	-1.7	-1.4	N/R	N/R
<i>Receptors, Channels and other Synaptic Proteins</i>					
S67368	gamma-aminobutyric acid (Gaba) A receptor beta 2 subunit	-1.7	-1.4	N/R	N/R
U01824	glutamate/aspartate transporter II	-5.1	-1.5	1.1	-1.9
<i>Cell-Cell or Cell-Matrix Interactions</i>					
J04182	lysosomal membrane glycoprotein-1 (LAMP1)	-1.6	-1.5	N/D	N/D
X52947	cardiac gap junction protein	-1.4	-1.8	-1	-2.1
L46720	autotaxin-t (atx-t)	-1.6	-1.8	N/R	N/R
<i>Immune or Inflammatory Response</i>					
M37245	Ig superfamily cytotoxic T-lymphocyte-associated protein (CTLA-4)	-1.6	-1.4	N/R	N/R
X00274	HLA-DR alpha heavy chain a class II antigen of the major histocompatibility complex (MHC)	-1.7	-1.6	N/R	N/R
<i>Metabolism</i>					
U91316	Human acyl-CoA thioester hydrolase	1.4	2.6	1.1	-1.2

WO 03/04014		PCT/US02/35902			
X13238	cytochrome c oxidase subunit VIc	1.4	1.5	N/R	N/R
X76228	vacuolar H+ ATPase E subunit	1.5	1.8	N/R	N/R
X83218	ATP synthase	1.5	1.5	N/R	N/R
M19045	lysozyme mRNA	-1.6	-2.5	N/R	N/R
M98539	prostaglandin D2 synthase	-2	-2.2	N/R	N/R
X01677	liver mRNA for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-1.9	-1.6	N/R	N/R
Z35093	SURF-1	-1.4	-1.7	N/R	N/R
<i>Cell Signaling</i>					
J04046	calmodulin	1.4	1.4	N/R	N/R
M29551	calcineurin A2	2.4	2.5	1.2	1.3
U82532	GDI-dissociation inhibitor RhoGDIgamma	1.4	2.4	N/R	N/R
X56468	14.3.3 protein, a protein kinase regulator	1.7	1.4	1.1	1.1
X73478	hPTPA	2.1	2.5	1.2	1.1
Z15108	protein kinase C zeta	1.4	1.8	1.1	1
D14889	small GTP-binding protein, S10	-2.2	-1.5	-1.2	1.6
L77886	protein tyrosine phosphatase	-1.5	-1.4	N/R	N/R
M34181	testis-specific cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit (C-beta isoform)	-2	-1.7	1.2	1.2
M74491	ADP-ribosylation factor 3	-1.5	-1.4	1.2	1.1
<i>Molecular Chaperones and other Carrier Proteins</i>					
J04988	90 kD heat shock protein gene	1.4	1.5	N/R	N/R
L26336	heat shock protein HSPA2 gene	-3	-1.6	N/R	N/R
M22382	mitochondrial matrix protein P1 (nuclear encoded)	-1.8	-1.8	1.4	1.2
<i>Transcription or Protein Synthesis</i>					
L19779	histone H2A.2	1.4	1.5	N/R	N/R
L34587	RNA polymerase II elongation factor SIII, p15 subunit	1.4	2.4	N/R	N/R
M17885	acidic ribosomal phosphoprotein P0	-1.4	-1.4	N/R	N/R
U09587	glycyl-tRNA synthetase	-1.5	-2.1	N/R	N/R
U14968	ribosomal protein L27a	-2	-2.2	N/R	N/R
<i>Cell Cycle Regulation: Growth, Proliferation and Death</i>					
U29953	pigment epithelium-derived factor	1.6	1.4	1.1	1.2
M63379	TRPM-2 protein	-1.7	-1.5	-1.1	-1.3
<i>Other</i>					
K02215	angiotensinogen	-1.7	-1.6	N/R	N/R
S95936	transferrin	-3.1	-1.9	N/R	N/R
U20908	melanoma ubiquitous mutated protein (MUM-1)	-1.6	-1.4	N/R	N/R
<i>Unknown</i>					
D38522	KIAA0080 gene product	-1.5	-1.7	1.3	1
D42043	KIAA0084 gene product	-1.4	-2.3	N/R	N/R
D79996	KIAA0174 gene product	-1.6	-2	-1.1	-1.2

Expression of several genes involved in synaptic transmission are altered in the alcoholic samples. In particular, the expression of α -synuclein is increased (Table 3). α -synuclein is

WO 03/040414

PCT/US02/35902

an activity-dependent regulator of dopaminergic neurotransmission (Abeliovich et al., 2000), a process central to drug dependence, and both α and β -synuclein may have a role in neurodegeneration (Galvin et al., 1999). Similarly, there is increased expression of the AMPA1 receptor subunit, RGS-4, and N-ethylmaleimide-sensitive factor (Table 3) while an inwardly-rectifying potassium channel (Table 3), the gamma-aminobutyric acid A (GABA_A) receptor beta-2 subunit and ADP ribosylation factor-3 (Table 4) genes show decreases in expression in the alcoholics. Some inwardly rectifying potassium channels are likely *in vivo* targets of alcohol action (Lewohl et al., 1999) and are modulated by RGS proteins which also regulate the G-protein signaling family of proteins by acting as GTPase activating proteins to modulate hormone and neurotransmitter receptor mediated signaling (Hepler 1999). Importantly, studies in animals show that prolonged ethanol treatment can increase expression of the GluR1 glutamate receptor subunit (Ortiz et al., 1995). Although the number of genes studied in animal models of alcoholism are limited, the concordance with human alcoholism for GluR1 and GFAP suggests that expression changes in alcoholics are due to alcohol consumption rather than confounding factors such as nutrition or trauma.

A cluster of genes known to regulate cell proliferation is down-regulated in the alcoholic samples. This included the genes coding for requiem, p53-binding protein, a discoidin-domain receptor family member and two CDC-like kinases. p53-Binding protein interacts with wildtype p53, the anti-apoptotic gene Bcl-2, and the p65(RelA) subunit of NF κ B. (Yang JP, Hori M, Takahashi N, Kawabe T, Kato H, Okamoto T (1999) NF-kappaB subunit p65 binds to 53BP2 and inhibits cell death induced by 53BP2. *Oncogene* 18:5177-86). p53-Binding protein enhances p53-mediated transcriptional activation and may play a central role in the regulation of apoptosis and cell growth. Discoidin domain receptor 1, a member of the receptor tyrosine kinase family (Sakuma et al., 1996) is known to be regulated by p53. This tyrosine kinase is activated by binding of collagen and is thought to mediate cellular responses to the extracellular matrix (Vogel 1999). Two other genes, Nel-like 2 and RAN, also known to function in regulation of cell growth, are up-regulated in the alcoholics. Some of these responses, such as the down-regulation of requiem and p53-binding protein, suggest an "anti-apoptotic" response. This could either be directly due to ethanol or be a compensatory response to ethanol acting in a pro-apoptotic manner. In this regard, alcohol is

WO 03/040414

PCT/US02/35902

shown to have pro-apoptotic effects in both developing and adult animals (Ikonomidou et al., 2000; Wu and Cederbaum 2000).

Because alcoholics often die at a relatively young age, one difficulty using autopsy tissue is matching of age. In case group 1, the alcoholics are an average of 10 years younger than controls (not significantly different, t-test), and in case group 2 they are 16 years younger than controls (p=0.03, t-test). Thus, it is important to consider if age may contribute to the differences in gene expression seen between controls and alcoholics. The first array study of changes in brain gene expression in aging documents increased expression of 70 genes and decreased expression of 86 genes (using a >1.4 fold criterion and a 6347 gene array) (Lee et al., 2000 and supplementary material). This comparison of neocortex of 5 and 30 month old mice does not detect changes in most of the genes that were found were altered between alcoholics and controls. For example, the cluster of myelin gene changes that is so prominent in this study does not appear in the aging study. However, expression of apolipoprotein D, alpha-synuclein, macrophage colony stimulating factor 1, myelin oligodendrocyte glycoprotein and GFAP, changes in both studies and the direction of change is such that age differences could contribute to the changes in gene expression seen in alcoholics. The limited overlap between the changes in gene expression in alcoholism and aging suggests that differences in age in the subjects did not contribute to most of the changes observed.

20 Gene Expression Changes, Prognostic and Diagnostic Medical Information

The present invention demonstrates that it is possible to identify the presence, absence, or modifications in the expression of genes related to alcoholism in the blood of patients. By using blood as the source of the nucleic acids for detection, the present invention greatly simplifies and makes detection of patients or potential patients more amenable to widespread use. One or more alcoholism-specific nucleic acids attach to the surface of the substrate under conditions apparent to those of skill in the art of molecular biology.

Figure 2 is a graph with the results from blood tRNA after one day using the PAX gene and Ambion systems as probes to evaluate the level of expression detectable in blood from subjects for genes associated with alcoholism. Alternatively, other probes may be used to

WO 03/040414

PCT/US02/35902

compare gene expression. Based on the predominant genes identified in blood, which match the genes identified from brain tissue, the presence, absence or modification in the expression of genes associated with alcoholism may be detected by taking a blood sample and testing the nucleic acids extracted from the sample against an alcohol specific array of the present invention. Appropriate controls are included in the array. Using the present invention even a single predominant gene may be used to test for alcoholism, however, more than one gene may be used to increase the accuracy of the results. A single gene assay is useful for preliminary screening, e.g., for use by law enforcement agencies to pre-screen inmates so that specific resources may be focused on that patient to aid in their treatment. In this manner, the patient is identified early in the cycle and those patients receive the treatment that they need, without expending resources on patients that are not at risk.

Figure 3 is a graph comparing the levels of genes from different subjects at day 1 and day 3. Figures 4 and 5 are reference graph and a graph comparing reference to human blood sample gene expression detected from an individual blood sample. The underlying data that was used to obtain Figures 2 – 5, follows. The underlying data demonstrates that a number of the same genes detected in blood that have been identified in previous studies of human brain, outlined herein above, and therefore the genes identified from alcoholic brain samples correlate and are detectable in blood.

Examples of "alcoholism-specific nucleic acids" for detection from a blood sample include at least a portion of the following genes: apolipoprotein (various); aquaporin (various); CD44 antigen (homing function and Indian blood group system); dopamine receptor D2; histamine receptor H1; Homo sapiens beta-1 adrenergic receptor mRNA, 3' UTR; myelin associated glycoprotein; myelin basic protein; myelin gene expression factor 2; myelin oligodendrocyte glycoprotein; myelin protein zero-like 1; myelin transcription factor 1-like; myelin-associated oligodendrocyte basic protein; neuronal pentraxin I; neuronal pentraxin II; neuronal pentraxin receptor; neuronal potassium channel alpha subunit; neuronal protein; neuronal protein 17.3; neuronal Shc; neuronal Shc adaptor homolog; neuronal specific transcription factor DAT1; neuronatin; neuron-specific protein; neuronal pentraxin receptor; neuropeptide Y receptor Y1; neurotensin receptor 2; neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2; peripheral myelin protein 2; peripheral myelin protein 22; phospholipase A2

WO 03/040414

PCT/US02/35902

receptors; proteolipid protein 2; sodium channel, voltage gated, type VIII, alpha polypeptide; sodium channel, voltage-gated, type II, beta polypeptide; syntaxin (various); various transporters.

The present invention can provide a method for the detection, monitoring, and diagnosis of alcoholism and alcohol-related diseases. The lack of standardized methods to determine the onset or scope of alcoholism, in addition to inadequate measures that do not monitor disease progression have contributed to the need to search for alternatives to existing detection, monitoring, and diagnostic methods. The present invention is also suggestive of an extensive, but selective, re-programming of myelin gene expression. The coordinate regulation of multiple myelin genes suggests a possible toxic action of ethanol on oligodendrocyte function or survival. The toxic action may provide a molecular basis for the susceptibility of alcoholics to white-matter loss and demyelinating diseases. In addition, the unanticipated changes in novel neuronal genes such as synuclein and in cell cycle gene expression provide new opportunities for understanding, and perhaps halting or reversing, the changes in brain structure and function that are hallmarks of alcoholism.

WO 03/040414

PCT/US02/35902

CLAIMS

1 1. A device for detecting the presence of genes related to alcoholism comprising:
2 a substrate; and
3 one or more alcoholism-specific nucleic acids attached to the substrate.

1 2. A device of claim 1 wherein the substrate comprises a microfabricated solid
2 surface to which molecules may be attached through either covalent or non-covalent bonds.

1 3. The device of claim 2 wherein the substrate further comprises Langmuir-
2 Bodgett films, glass, functionalized glass, germanium, silicon, PTFE, polystyrene, gallium
3 arsenide, gold, silver, or any materials comprising amino, carboxyl, thiol or hydroxyl
4 functional groups incorporated on a planar or spherical surface.

1 4. The device of claim 1 wherein one or more alcoholism-specific nucleic acids
2 comprise human nucleic acid target elements of one or more peptide nucleic acids with
3 different determinable sequences.

1 5. The device of claim 4 wherein the human nucleic acid target elements
2 comprise one or more peptides, each at a different locations on the substrate at a density of
3 100 to 10,000 target elements per square centimeter.

1 6. The device of claim 4 wherein the human nucleic acid target elements
2 comprise genomic DNA, cDNA, oligonucleotides, RNA, single-stranded or double-stranded
3 or any chemical modifications thereof.

1 7. The device of claim 4 wherein the human nucleic acid target elements are
2 portions of alcoholism-specific genes with sequences specific to structural, metabolic,
3 transcriptional or other genes for cell signaling, immune response, and or cell-cell
4 interactions that are expressed by alcoholics or alcohol abusers, including M6 neuronal
5 glycoprotein, myelin associated glycoprotein, myelin-associated oligodendrocyte basic
6 protein, myelin basic protein, myelin proteolipid protein, myelin-oligodendrocyte
7 glycoprotein, myelin protein Po, oligodendrocyte-myelin glycoprotein, PMP2, PMP22, MAL
8 gene, ApoD, ApoE,, carbonic anhydrase II, 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase,

WO 03/040414

PCT/US02/35902

9 Galactocerebrosidase, Transaldolase, UDP-galactose ceramide galactosyltransferase, MyT1,
10 Puralpha, Edg-2, glial fibrillary acidic protein, keratin 6B, beta III spectrin, protease, serine,
11 9 (neurosin), proprotein convertase subtilisin/kexin type 4, calpain, large polypeptide L3,
12 protease, serine, 11 (IGF binding), transmembrane protease, serine 2, endothelin receptor
13 type B-like (GPCR 37), aquaporin 1 (channel-forming integral protein), potassium inwardly-
14 rectifying channel, subfamily J, member 10, glutamate receptor, AMPA 1, N-
15 ethylmaleimide-sensitive factor, EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1,
16 CD44 antigen, cadherin 18, tetraspan NET-6, interferon, gamma-inducible protein 16, major
17 histocompatibility complex, class II, DR beta 1, small inducible cytokine subfamily C,
18 member 1, epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic), proline dehydrogenase (proline
19 oxidase), glutathione S-transferase M5, ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II,
20 serine/threonine kinase, TU3A protein (also known as dominant rapamycin resistance 1,
21 DRR1), secreted frizzled-related protein 1, GTP binding protein, phospholipase A2 (14-3-3
22 protein), platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform Ib, alpha subunit, regulator of G-
23 protein signaling 4 (RGS-4), synuclein, alpha, ribophorin II, 130 kD Golgi-localized
24 phosphoprotein, autoimmune regulator (autoimmune polyendocrinopathy candidiasis
25 ectodermal dystrophy), SRY-box 9 transcription factor, spliceosome-associated protein (U2
26 snRNP), retinoid X receptor, gamma, nuclear transcription factor, X-box binding 1, TATA
27 box binding protein-associated factor, RNA polymerase II, F, basic transcription factor 3,
28 macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like), LIM domain only 2 (rhombotin-
29 like 1), bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1), requiem, apoptosis response
30 zinc finger gene, discoidin domain receptor family, member 1, CDC-like kinase 2, CDC-like
31 kinase 1, tumor protein p53-binding protein, 2, Human growth/differentiation factor 1,
32 RACH1 (complements rad1-1 cell cycle checkpoint mutant), RAN (member RAS oncogene
33 family), nel-like 2, sarcophilin, KIAA0043 gene product, ESTs, cysteine and glycine-rich
34 protein 1, conserved gene amplified in osteosarcoma, KIAA0027 gene product, Homo
35 sapiens clone 23916, KIAA0202 gene product, selenoprotein P, plasma, 1, chromosome 16
36 BAC clone CIT987SK-A-69G12, upregulated by 1,25-dihydroxyvitamin D-3, tight junction
37 protein 2, HREV107-like protein, clone 23555 mRNA sequence, clone 25030 mRNA
38 sequence, KIAA0237 gene product, KIAA0725 gene product, KIAA0293 gene product,
39 neuroblastoma (nerve tissue) protein, reticulon 1, ESTs weakly similar to cAMP-regulated

WO 03/040414

PCT/US02/35902

40 guanine nucleotide exchange factor II, ESTs weakly similar to gene pp21 protein, or ESTs
41 highly similar to KIAA0195, ubiquitin C, microtubule-associated protein 4, calcium
42 dependent protease (small subunit, proteasome subunit z, gamma-aminobutyric acid (GABA)
43 A receptor beta 2 subunit, glutamate/aspartate transporter II, lysosomal membrane
44 glycoprotein-1 (LAMP1), cardiac gap junction protein, autotaxin-1 (atx-1), Ig superfamily
45 cytotoxic T-lymphocyte-associated protein (CTLA-4), HLA-DR alpha heavy chain a class II
46 antigen of the major histocompatibility complex (MHC), Human acyl-CoA thioester
47 hydrolase, cytochrome c oxidase subunit Vic, vacuolar H+ ATPase E subunit, ATP synthase,
48 lysozyme mRNA, prostaglandin D2 synthase, liver mRNA for glyceraldehyde-3-phosphate
49 dehydrogenase, SURF-1, calmodulin, calcineurin A2, GDI-dissociation inhibitor
50 RhoGDIgamma, 14.3.3 protein (a protein kinase regulator), hPTPA, protein kinase C zeta,
51 small GTP-binding protein, S10, protein tyrosine phosphatase, testis-specific cAMP-
52 dependent protein kinase catalytic subunit (C-beta isoform), ADP-ribosylation factor 3, 90
53 kD heat shock protein gene, heat shock protein HSPA2 gene, mitochondrial matrix protein
54 P1 (nuclear encoded), histone H2A.2, RNA polymerase II elongation factor SIII p15 subunit,
55 acidic ribosomal phosphoprotein P0, glycyl-tRNA synthetase, ribosomal protein L27a,
56 pigment epithelium-derived factor, TRPM-2 protein, angiotensinogen, transferrin, melanoma
57 ubiquitous mutated protein (MUM-1), KIAA0080 gene product, KIAA0084 gene product, or
58 a KIAA0174 gene product.

1 8. The device of claim 1 wherein the alcoholism-specific nucleic acids come in
2 contact with a sample.

1 9. The device of claim 8 wherein the sample comprises macromolecules, in
2 whole or in part, including blood plasma, urine, semen, saliva, lymph fluid, meningeal fluid,
3 amniotic fluid, glandular fluid, and cerebrospinal fluid, cells, or any other fluid, cell or body
4 tissue preparation.

1 10. The device of claim 8 wherein the sample is collected from a person who is
2 considered to be alcoholic, alcohol abusive or have an alcohol-related disease.

1 11. The device of claim 8 wherein portions of the sample bind specifically to one
2 or more human nucleic acid target elements.

WO 03/040414

PCT/US02/35902

1 12. The device of claim 8 wherein the binding is detected by a light source,
2 capacitor, ion or plasma beam, including light microscopy, radiography, chemiluminescence,
3 fluorescence microscopy, confocal microscopy, interferometry, surface plasma resonance,
4 mass spectroscopy, atomic force microscopy, scanning tunneling microscopy.

1 13. The device of claim 8 wherein the alcoholism-specific nucleic acid and the
2 sample come in contact under selective binding conditions.

1 14. The device of claim 13 wherein the selective binding conditions provide
2 information that can be collected as a detectable change in signal intensity.

1 15. The device of claim 14 wherein the information is recorded by a computer.

1 16. The device of claim 15 wherein the computer records the information, stores
2 the information in a database, and or displays the information.

1 17. The device of claim 14 wherein the information includes the location and
2 magnitude of the detectable change at each human nucleic acid target element.

1 18. The device of claim 15 wherein an information ratio is determined between
2 the sample information and a control information.

1 19. The device of claim 15 wherein the control information is obtained from a
2 sample collected from a person who is not an alcoholic or alcohol abusive, and or from a
3 person who does not have an alcohol-related disease, under like conditions to that of the
4 sample.

1 20. The device of claim 18 wherein the information yields gene expression
2 information and diagnostic and or prognostic medical information about the person.

1 21. A method for identifying alcoholism-specific genes, comprising the steps of:
2 contacting a sample obtained from a person considered to be alcoholic or alcohol
3 abusive or has an alcohol-related disease with a substrate comprising one or more genes
4 associated with alcoholism; and

WO 03/040414

PCT/US02/35902

5 comparing the level of expression of the sample with that of a non-alcoholic control
6 sample, wherein changes in expression level are correlated with alcoholism.

1 22. The method of claim 21 wherein the sample comprises macromolecules, in
2 whole or in part, including blood plasma, urine, semen, saliva, lymph fluid, meningeal fluid,
3 amniotic fluid, glandular fluid, and cerebrospinal fluid, cells, or any other fluid, cell or body
4 tissue preparation.

1 23. The method of claim 21 wherein the substrate comprises a microfabricated
2 solid surface to which molecules may be attached through either covalent or non-covalent
3 bonds.

1 24. The method of claim 21 wherein the substrate further comprises Langmuir-
2 Bodgett films, glass, functionalized glass, germanium, silicon, PTFE, polystyrene, gallium
3 arsenide, gold, silver, or materials comprising amino, carboxyl, thiol or hydroxyl functional
4 groups incorporated on a planar or spherical surface.

1 25. The method of claim 21 wherein human nucleic acid target elements are
2 attached to the substrate.

1 26. The method of claim 25 wherein the human nucleic acid target elements
2 comprise genomic DNA, cDNA, oligonucleotides, RNA, single-stranded or double-stranded
3 and any chemical modifications thereof.

1 27. The method of claim 25 wherein the human nucleic acid target elements
2 further comprise determinable sequences from alcoholism-related genes.

1 28. The method of claim 25 wherein each human nucleic acid target elements
2 contains at least one peptide at a different location on the substrate at a density of 100 to
3 10,000 target elements per square centimeter.

1 29. The method of claim 25 wherein the human nucleic acid target elements are
2 portions of structural, metabolic, transcriptional or other genes, including ones that code for
3 proteases, receptors, channels, synaptic proteins, cell-cell or cell-matrix interactions, immune

WO 03/040414

PCT/US02/35902

- 4 or inflammatory responses, cell signaling, molecular chaperones or other carrier proteins,
5 molecular synthesis, cell cycle regulation, cell growth, cell proliferation, or cell death.
- 1 30. The method of claim 21 wherein the substrate is a microarray.
- 1 31. The method of claim 21 wherein the binding includes binding of portions of
2 the sample specifically to one or more human nucleic acid target elements.
- 1 32. The method of claim 21 wherein the binding occurs under selective binding
2 conditions.
- 1 33. The method of claim 21 wherein the binding is detected by a light sources,
2 capacitor, ion or plasma beam, including light microscopy, radiography, chemiluminescence,
3 fluorescence microscopy, confocal microscopy, interferometry, surface plasma resonance,
4 mass spectroscopy, atomic force microscopy, scanning tunneling microscopy.
- 1 34. The method of claim 21 wherein the binding provides information that can be
2 collected as a detectable change in signal intensity.
- 1 35. The method of claim 34 wherein the information is recorded by a computer.
- 1 36. The method of claim 35 wherein the computer records the information, stores
2 the information in a database, and or displays the information.
- 1 37. The method of claim 34 wherein the information includes the location and
2 magnitude of the detectable change at each human nucleic acid target element.
- 1 38. The method of claim 34 wherein an information ratio is determined between
2 the sample information and a control information.
- 1 39. The method of claim 38 wherein the control information is obtained from a
2 sample collected from a person who is not an alcoholic or alcohol abusive, and or from a
3 person who does not have an alcohol-related disease, under like conditions to that of the
4 sample.

WO 03/040414

PCT/US02/35902

- 1 40. The method of claim 38 wherein the information yields gene expression
2 information and diagnostic and or prognostic medical information about the person.
- 1 41. A device for detecting the presence of genes related to alcoholism from a
2 blood sample comprising a substrate comprising one or more alcoholism-specific nucleic
3 acids and one or more control nucleic acids, wherein the expression of one or more
4 alcoholism-specific nucleic acids is detected from the nucleic acids collected from a sample
5 of blood.
- 1 42. The device of claim 41, wherein the human nucleic acid target elements
2 comprise genomic DNA, cDNA, oligonucleotides, RNA, single-stranded or double-stranded
3 or any chemical modifications thereof.
- 1 43. The device of claim 41, wherein the nucleic acid of the blood sample
2 comprise a portion of alcoholism-specific genes selected from the group consisting of
3 apolipoprotein; aquaporin; CD44 antigen; dopamine receptor D2; histamine receptor H1;
4 Homo sapiens beta-1 adrenergic receptor mRNA, 3' UTR; myelin associated glycoprotein;
5 myelin basic protein; myelin gene expression factor 2; myelin oligodendrocyte glycoprotein;
6 myelin protein zero-like 1; myelin transcription factor 1-like; myelin-associated
7 oligodendrocyte basic protein; neuronal pentraxin I; neuronal pentraxin II; neuronal pentraxin
8 receptor; neuronal potassium channel alpha subunit; neuronal protein; neuronal protein 17.3;
9 neuronal Shc; neuronal Shc adaptor homolog; neuronal specific transcription factor DAT1;
10 neuronatin; neuron-specific protein; neuronal pentraxin receptor; neuropeptide Y receptor
11 Y1; neurotensin receptor 2; neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2; peripheral myelin
12 protein 2; peripheral myelin protein 22; phospholipase A2 receptors; proteolipid protein 2;
13 sodium channel, voltage gated, type VIII, alpha polypeptide; sodium channel, voltage-gated,
14 type II, beta polypeptide; and syntaxin, and combinations thereof.
- 1 44. A method for screening for one or more alcoholism-specific genes,
2 comprising the steps of:
3 contacting nucleic acids obtained from a blood sample with a substrate comprising
4 one or more genes associated with alcoholism; and

WO 03/040414

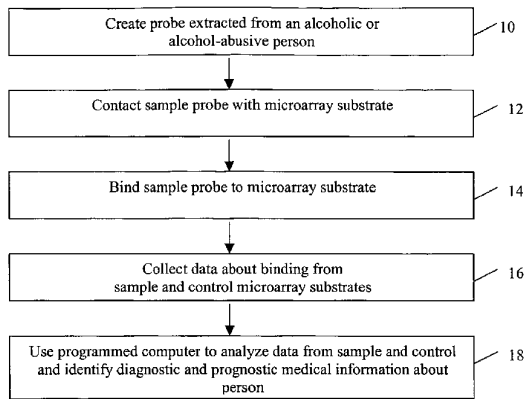
PCT/US02/35902

5 comparing the level of expression of the sample with that of a non-alcoholic control
6 sample, wherein changes in expression level are correlated with alcoholism.

1 45. The method of claim 44, wherein the human nucleic acid target elements
2 comprise genomic DNA, cDNA, oligonucleotides, RNA, single-stranded or double-stranded
3 or any chemical modifications thereof.

1 46. The device of claim 44, wherein the nucleic acid of the blood sample
2 comprise a portion of alcoholism-specific genes selected from the group consisting of
3 apolipoprotein; aquaporin; CD44 antigen; dopamine receptor D2; histamine receptor H1;
4 Homo sapiens beta-1 adrenergic receptor mRNA, 3' UTR; myelin associated glycoprotein;
5 myelin basic protein; myelin gene expression factor 2; myelin oligodendrocyte glycoprotein;
6 myelin protein zero-like 1; myelin transcription factor 1-like; myelin-associated
7 oligodendrocyte basic protein; neuronal pentraxin I; neuronal pentraxin II; neuronal pentraxin
8 receptor; neuronal potassium channel alpha subunit; neuronal protein; neuronal protein 17.3;
9 neuronal Shc; neuronal Shc adaptor homolog; neuronal specific transcription factor DAT1;
10 neuronatin; neuron-specific protein; neuronal pentraxin receptor; neuropeptide Y receptor
11 Y1; neurotensin receptor 2; neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2; peripheral myelin
12 protein 2; peripheral myelin protein 22; phospholipase A2 receptors; proteolipid protein 2;
13 sodium channel, voltage gated, type VIII, alpha polypeptide; sodium channel, voltage-gated,
14 type II, beta polypeptide; and syntaxin, and combinations thereof.

Figure 1



WO 03/040414

PCT/US02/35902

Figure 2

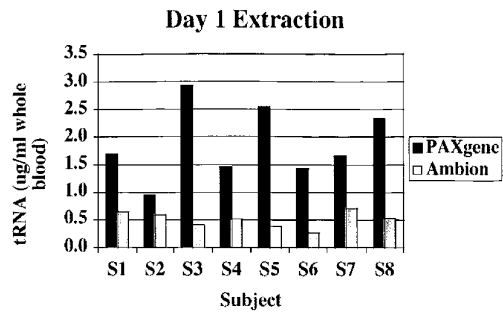
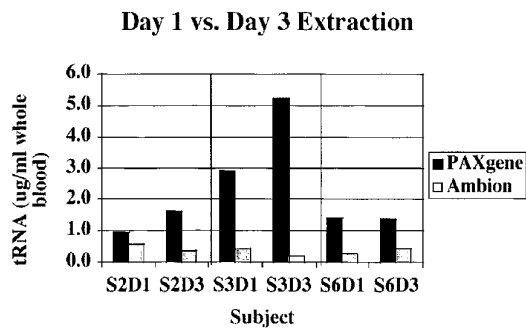


Figure 3



WO 03/040414

PCT/US02/35902

Figure 4

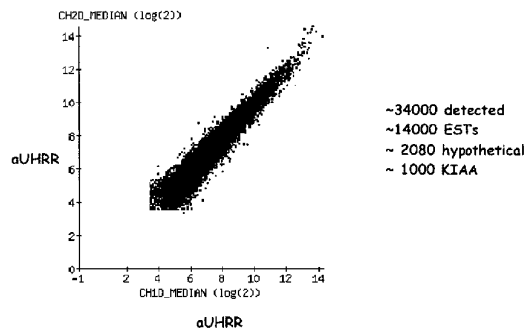
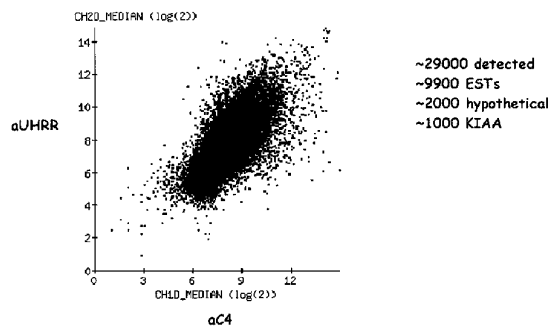


Figure 5



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/35902
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/68; A61K 31/44 US CL : 435/6; 514/288 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) U.S. : 435/6; 514/288 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6,001,848 A (NOBLE) 14 December 1999 (14.12.1999), see entire document.	1-46
X	US 5,736,325 A (MANOWITZ et al) 07 April 1998 (07.04.1998), see entire document.	1-46
X	US 5,550,021 A (BLUM et al) 27 August 1996 (27.08.1996), see entire document.	1-46
Y	US 6,146,828 A (LAPIDUS et al) 14 November 2000 (14.11.2000), see entire document.	1-46
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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	*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	
B earlier application or patent published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or obvious because it involves an inventive step when the document is taken alone	
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)	*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	
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*A* document member of the same patent family	
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 25 February 2003 (25.02.2003)	Date of mailing of the international search report 14 MAR 2003	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Melinda D. Roberts for Gary Benizon Telephone No. 703-308-0196	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/35902

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
WEST, STN. MEDLINE, BIOSIS, CAPLUS, EMBASE
search terms: alcoholism, gene, detect, device

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷ F I テーマコード(参考)
 G 0 1 N 33/566 G 0 1 N 33/566
 C 1 2 N 15/00 A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ハリス, エイドラン
 アメリカ合衆国テキサス州 7 8 7 4 6、オースティン、レイク・クリフ・コート 3 3 0 9 番
 (72) 発明者 メイフィールド, デイン, アール
 アメリカ合衆国テキサス州 7 8 7 4 6、オースティン、トリプル・クリーク・ドライブ 1 2 3 2 番
 (72) 発明者 レウォール, ジョウ
 オーストラリア国クウィーンズランド、ウエスト・エンド 4 1 0 4、ブラックウッド・ロード 2 7 番
 (72) 発明者 ダド, ピータ, アール
 オーストラリア国クウィーンズランド、ウエスト・エンド 4 1 0 4、モンタギュー・ロード 4 5 9 番

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA19 CA04 CA05 CA06 CA09 CA10 CA11 HA08 HA14
 HA19
 4B029 AA07 AA21 AA23 BB15 BB20 CC03 CC11 CC13 FA12
 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR42 QR55
 QR66 QR82 QS10 QS12 QS25 QS34 QS39 QX02 QX04

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2005508199A5	公开(公告)日	2006-01-05
申请号	JP2003542659	申请日	2002-11-08
申请(专利权)人(译)	董事会, AV, 摄政, 罗卡, 余泥弗农萨蒂, AV, Tekusasu, Shisutimu		
[标]发明人	ハリスエイドラン メイフィールドデインアール レウォールジョウ ダドピータアール		
发明人	ハリス,エイドラン メイフィールド,デイン,アール レウォール,ジョウ ダド,ピータ,アール		
IPC分类号	C12Q1/68 C12M1/00 C12M1/34 G01N33/53 G01N33/566 C12N15/09		
CPC分类号	C12Q1/6837 C12Q1/6883 C12Q2600/158		
FI分类号	C12Q1/68.A C12M1/00.A C12M1/34.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA19 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/CA10 4B024/CA11 4B024/HA08 4B024/HA14 4B024/HA19 4B029/AA07 4B029/AA21 4B029/AA23 4B029/BB15 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/CC11 4B029/CC13 4B029/FA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR66 4B063/QR82 4B063/QS10 4B063/QS12 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX02 4B063/QX04		
优先权	60/338270 2001-11-08 US		
其他公开文献	JP2005508199A		

摘要(译)

公开了一种用于检测, 诊断和/或监测酒精中毒和相关疾病状态的装置和方法。该装置包括基质和附着于基质的一种或多种酒精中毒特异性核酸。通过从酒精中毒或酒精滥用或酒精相关疾病状态的人收集的样品接触基质, 其中在预先选择的结合条件下发生接触, 所述结合条件提供可由计算机收集和记录的信息。