

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6614659号
(P6614659)

(45) 発行日 令和1年12月4日(2019.12.4)

(24) 登録日 令和1年11月15日(2019.11.15)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 33/53 D

GO 1 N 37/00 (2006.01)

GO 1 N 37/00 1 O 2

GO 1 N 33/543 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 O 1 A

請求項の数 10 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2015-562880 (P2015-562880)
 (86) (22) 出願日 平成27年2月13日 (2015.2.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2015/054007
 (87) 国際公開番号 W02015/122499
 (87) 国際公開日 平成27年8月20日 (2015.8.20)
 審査請求日 平成30年2月5日 (2018.2.5)
 (31) 優先権主張番号 特願2014-25568 (P2014-25568)
 (32) 優先日 平成26年2月13日 (2014.2.13)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 日本国 (JP)

(出願人による申告) 平成25年度 文部科学省科学技術試験研究委託事業「うつ病の異種性に対応したストレス脆弱性バイオマーカーの同定と分子病態生理の解明」にかかる委託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(73) 特許権者 504145364
 国立大学法人群馬大学
 群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地
 (74) 代理人 100100549
 弁理士 川口 嘉之
 (74) 代理人 100126505
 弁理士 佐貫 伸一
 (72) 発明者 三國 雅彦
 日本国群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地
 国立大学法人群馬大学内
 (72) 発明者 宮田 茂雄
 日本国群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地
 国立大学法人群馬大学内

審査官 高田 亜希

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C I D E C によるうつ病の検査方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被検動物より採取された試料中のCIDE Cの発現量を測定する工程を含み、CIDE Cの発現量を基準値と比較することにより被検動物のうつ病の発症の有無が判定される、該動物におけるうつ病の診断のための検査方法。

【請求項 2】

さらに、BANP、RAB11FIP4、RNASE1、SLC36A1、STYXL1、ARFRP1、BCL11B、FYCO1、NIPAL3、RPL23A、RPS2、SIGIRR及びSLC35F2からなる群より選ばれる1種又は2種以上の発現量を測定する工程を含む、請求項1に記載のうつ病の診断のための検査方法。

【請求項 3】

さらに、BANP、RAB11FIP4、RNASE1、SLC36A1、STYXL1、ARFRP1、BCL11B、FYCO1、NIPAL3、RPL23A、RPS2、SIGIRR及びSLC35F2の発現量を測定する工程を含む、請求項1に記載のうつ病の検査方法。

【請求項 4】

前記試料は、血液である、請求項1から3のいずれか一項に記載のうつ病の診断のための検査方法。

【請求項 5】

前記測定が、マイクロアレイ、リアルタイムPCR、ELISA法、ウエスタンブロット法、FACS解析法、分光光度法、蛍光光度法、質量分析法、及びクロマトグラフィーからなる群より選ばれる1種又は2種以上により行われる、請求項1から4のいずれか一項に記載

のうつ病の診断のための検査方法。

【請求項 6】

被検動物より採取された試料中のCIDEDECの発現量を測定する工程を含み、CIDEDECの発現量が高いほどうつ病の重症度が高いという基準に基づいてうつ病の重症度が判定される、該動物におけるうつ病の重症度評価のための検査方法。

【請求項 7】

うつ病治療薬が投与されたうつ病治療を必要とする非ヒト動物より採取された試料中のCIDEDECの発現量を測定する工程を含む、該非ヒト動物におけるうつ病の治療効果の評価方法。

【請求項 8】

被検体とうつ病治療薬の候補化合物を接触させた後、該被検体中のCIDEDECの発現量を測定する工程を含む、うつ病治療薬のスクリーニング方法。

【請求項 9】

CIDEDECの発現量を測定し得る試薬を含んでなる、うつ病の診断のための検査用、うつ病治療効果評価用、またはうつ病治療薬候補化合物のスクリーニング用キット。

【請求項 10】

被検動物のうつ病の診断の指標とするために、被検動物より採取された試料中のCIDEDECの発現量を測定する工程を含む、CIDEDECの発現量の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、うつ病の診断のための検査方法、うつ病の重症度評価のための検査方法、うつ病の治療効果の評価方法、うつ病治療薬のスクリーニング方法、およびうつ病の診断のための検査用、うつ病治療効果評価用またはうつ病治療薬候補化合物スクリーニング用のキットに関するものである。

【背景技術】

【0002】

うつ病は、精神疾患の中でも障害を有する期間と患者数の積、すなわちWHOが疾病の社会的重要性の指標としている障害調整生命年（DALY）が最も多い疾患であり、その患者数は近年において著しく増加している。うつ病の症状としては、気分が沈む、何事をするのも億劫である、興味関心が低下する、周囲の重荷になることに対する恐怖がある、不安である、イライラする等が挙げられ、いずれも個人の社会生活に重大な影響を与える症状である。また、自殺者の約半数はうつ病が原因であるとされている。そのため、うつ病を的確に診断し、迅速にその治療を行うことが、社会にとっての急務である。

【0003】

しかし、うつ病を的確に診断するには、高度の専門性が必要である。現在、うつ病の診断は、精神科医による患者への問診により行われている。しかし、この問診による診断は、患者の主観的体験を判断するため、医師間で一致しないという問題がある。また、症状が目に見えないため、患者や家族は、どの程度悪いのかという疾患の重症度を判断することができない。そのため、うつ病の診断や重症度評価のための客観的な指標が求められている。

【0004】

うつ病の客観的指標を求めて、PETやNIRSなどによる脳画像診断が補助的に使われ始めている。しかし、それらを利用できる医療施設は限られている上、施設間バイアスがあるため、統一的な評価法の確立には至っていない。

【0005】

また、現在臨床で用いられている抗うつ薬の有効性はおよそ6割程度であるものの、実験動物で評価可能なうつ症状の客観的な指標が存在しないため、新規抗うつ薬の開発は難渋している。従来、被験薬の有効性評価は、実験動物の行動解析に依存しており、慢性的にストレス負荷した実験動物が呈する行動異常で、しかも抗うつ薬によって正常化する行

10

20

30

40

50

動を「うつ病様行動」と称してきた。しかし、客観性と妥当性に乏しいため、医薬品開発のプロセスにおいてボトルネックになっている。よって、うつ病を治療するための医薬品開発においても、臨床で検証されている上、実験動物でも同様に評価可能な客観的な指標が求められている。

【 0 0 0 6 】

うつ病を客観的に評価する方法として、特許文献 1 には、被験者の末梢血由来のメッセンジャーRNAより、アポトーシス関連遺伝子、A T P a s e 関連遺伝子、細胞周期関連遺伝子、サイトカイン関連遺伝子、熱ショックタンパク質関連遺伝子、ポリメラーゼ関連遺伝子、G T P 結合タンパク質関連遺伝子、プロテインキナーゼC 関連遺伝子、及びミトコンドリアチトクロームC オキシダーゼ関連遺伝子から選ばれる少なくとも 1 種類以上の遺伝子の発現量をDNAチップにより解析し、前記解析結果を基に被験者の病状を評価することを特徴とするうつ病の評価方法が、記載されている。

10

また、特許文献 2 には、FASLG、CX3CR1、TBX21、ID2、SLAMF7、PRSS23、YWHAQ、TARDBP、ADRB2、PPP1R8、MMAA、SQLE、PDHA1、HAVCR2、RACGAP1、AHNAK、EDG8、およびDUSP5の 1 8 遺伝子の発現量を測定し、前記測定結果に基づき当該被験者がうつ病に罹患しているか否かを判定することを特徴とする、うつ病の検査方法が、記載されている。

しかし、これらの内で臨床応用されているものは皆無であるので、よりの確な診断が可能であり、さらにうつ病治療薬の治療効果を反映するような分子マーカーが求められている。

【 先行技術文献 】

20

【 特許文献 】

【 0 0 0 7 】

【 特許文献 1 】 特開 2 0 0 4 - 2 0 8 5 4 7 号公報

【 特許文献 2 】 特開 2 0 0 8 - 2 5 3 2 5 8 号公報

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 8 】

本発明は、上記の問題点に鑑み、うつ病患者の血液等の試料を用いて、的確なうつ病の検査を行う方法、及びうつ病治療効果の評価方法を提供することを課題とする。

【 課題を解決するための手段 】

30

【 0 0 0 9 】

本発明者らは、前述の課題を解決すべく鋭意検討した結果、うつ病患者試料中のCIDEDECの発現量が顕著に増加しており、寛解に伴ってその発現量が減少するという知見を得て、CIDEDECの発現量がうつ病の検査及びうつ病治療効果の評価のための有用な指標となることを見出して、本発明を完成するに至った。

【 0 0 1 0 】

即ち、本発明は以下を要旨とする。

[1] 被検動物より採取された試料中のCIDEDECの発現量を測定する工程を含み、CIDEDECの発現量を基準値と比較することにより被検動物のうつ病の発症の有無が判定される、該動物におけるうつ病の診断のための検査方法。

40

[2] さらに、BANP、RAB11FIP4、RNASE1、SLC36A1、STYXL1、ARFRP1、BCL11B、FYC01、NIPAL3、RPL23A、RPS2、SIGIRR及びSLC35F2からなる群より選ばれる 1 種又は 2 種以上の発現量を測定する工程を含む、[1] に記載のうつ病の診断のための検査方法。

[3] さらに、BANP、RAB11FIP4、RNASE1、SLC36A1、STYXL1、ARFRP1、BCL11B、FYC01、NIPAL3、RPL23A、RPS2、SIGIRR及びSLC35F2の発現量を測定する工程を含む、[1] に記載のうつ病の検査方法。

[4] 前記試料は、血液である、[1] から [3] のいずれかに記載のうつ病の検査方法。

[5] 前記測定が、マイクロアレイ、リアルタイムPCR、ELISA法、ウエスタンブロット法、F A C S 解析法、分光光度法、蛍光光度法、質量分析法、及びクロマトグラフィーから

50

なる群より選ばれる１種又は２種以上により行われる、〔１〕から〔４〕のいずれかに記載のうつ病の診断のための検査方法。

〔６〕被検動物より採取された試料中のCIDEDECの発現量を測定する工程を含み、CIDEDECの発現量が高いほどうつ病の重症度が高いという基準に基づいてうつ病の重症度が判定される、該動物におけるうつ病の重症度評価のための検査方法。

〔７〕うつ病治療薬が投与されたうつ病治療を必要とする動物より採取された試料中のCIDEDECの発現量を測定する工程を含む、該動物におけるうつ病の治療効果の評価方法。

〔８〕被検体とうつ病治療薬の候補化合物を接触させた後、該被検体中のCIDEDECの発現量を測定する工程を含む、うつ病治療薬のスクリーニング方法。

〔９〕CIDEDECの発現量を測定し得る試薬を含んでなる、うつ病の診断のための検査用、うつ病治療効果評価用、またはうつ病治療薬候補化合物のスクリーニング用キット。

〔１０〕被検動物のうつ病の診断の指標とするために、被検動物より採取された試料中のCIDEDECの発現量を測定する工程を含む、CIDEDECの発現量の測定方法。

【発明の効果】

【００１１】

本発明によれば、CIDEDECがうつ病検査用分子マーカーとして提供される。また、本発明の方法により、客観的な指標に基づいて、うつ病の診断、重症度評価、及び治療効果の評価をすることが可能となる。また、うつ病治療薬を、客観的な指標に基づいてスクリーニングすることが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【００１２】

【図１】モデル動物を含む、Sham+NS、OVX+NS、Sham+CUMS、及び、OVX+CUMSの４群について、強制水泳試験及びオープンフィールド試験を行った結果を示す。

【図２】ヒト被験者およびマウスから得たRNAによるマイクロアレイ解析結果を示す。

【図３】ヒト被験者から得たRNAによるリアルタイム定量PCRの定量解析結果を示す（CIDEDECおよびSTYXL1）。

【図４】ヒト被験者から得たRNAによるリアルタイム定量PCRの定量解析結果を示す（SLC36A1およびRNASE1）。

【図５】ヒト被験者から得たRNAによるリアルタイム定量PCRの定量解析結果を示す（ARFRP1、BCL11BおよびSLC35F2）。

【図６】CIDEDECのリアルタイム定量PCRにより得られた個々の被験者の ΔCt 値を示すグラフ。

【図７】SIGH-Dと ΔCt 値との相関性解析結果を示すグラフ（CIDEDECおよびSTYXL1）。

【図８】SIGH-Dと ΔCt 値との相関性解析結果を示すグラフ（SLC36A1およびRNASE1）。

【図９】モデル動物へのうつ病治療薬投与前後において強制水泳試験及びオープンフィールド試験を行った結果を示す。

【図１０】モデル動物へのうつ病治療薬投与前後において得られたRNAによるリアルタイム定量PCRの定量解析結果を示す（CIDEDEC、STYXL1、SLC36A1およびRNASE1）。

【図１１】うつ症状有りおよびうつ症状無しの被験者における、14遺伝子の発現レベルに基づく判別得点（a）とCIDEDEC発現レベル（ ΔCt 値）（b）を示すグラフ。

【発明を実施するための形態】

【００１３】

以下、本発明の実施の形態を詳細に説明する。

（１）うつ病の診断のための検査方法

本発明の第１は、被検動物より採取された試料中のCIDEDECの発現量を測定する工程を含む、該動物におけるうつ病の診断のための検査方法である。

【００１４】

本明細書において、「うつ病」とは、WHOのICD-10ないし米国精神医学会の「精神疾患の診断と統計のためのマニュアル、DSM-IV（今後はDSM-V）」の診断基準によるうつ病性障害であり、その重症度はSIGH-D（ハミルトンうつ病評価尺度構造化面接法：Structured

10

20

30

40

50

Interview Guide for the Hamilton Depression Rating Scale)、HAM-D(ハミルトンうつ病評価尺度:Hamilton Rating Scale for Depression)、MADRS(モントゴメリー・アスペルグうつ病評価尺度:Montgomery Asberg Depression Rating Scale)又はBDI(ベックうつ病調査表:Beck Depression Inventory)等の従来の診断方法で判定され得るうつ病であれば、特に限定されない。うつ病と診断されている限り、不安障害、睡眠障害、摂食障害等の他の疾患を併発している場合も含む。

【0015】

本明細書において、CIDECとは、cell death-inducing DFFA-like effector cを意味する。ヒト又はマウス由来の遺伝子配列は、GenBankよりNM_022094(配列番号1)又はNM_178373(配列番号5)のアクセッション番号にて、それぞれ入手可能である。被検動物が異なる場合には、該動物由来のホモログが測定対象となる。CIDECの発現量の測定としては、mRNAを測定しても、タンパク質を測定してもよい。さらに、CIDECには、CIDECと同様の機能を有する断片、誘導体、および変異体も包含される。

10

【0016】

上記検査方法において、「被検動物」は、うつ病を起こす可能性のある動物であれば如何なるものでもよく、具体的には、ヒト、サルその他、マウスやラット等のげっ歯類等、イヌ、ネコ、ブタ、フェレット、鳥類、爬虫類、両生類、魚類等が挙げられる。本発明のうつ病の検査方法は、このうち、うつ病の疑いのあるヒト、あるいはうつ病発症後、うつ病治療中又は治療後等のヒトにおいて特に好ましく行われる。

【0017】

20

また、上記被検動物から採取された「試料」としては、CIDECのmRNAまたはタンパク質を含有し、その濃度を測定できるものであれば特に制限はない。具体的には、血液、血漿、血清、尿、唾液等が挙げられる。これらのうち、血液、血漿、血清が、簡便に採取でき、保存が容易で且つ採取量が多いため、好ましく用いられる。上記血液等は、採取後すぐにヘパリン処置をすることが好ましい。また、血液中の有核細胞(主に白血球)から抽出したmRNAまたはタンパク質を用いることが好ましい。

【0018】

上記CIDECの発現量の測定方法としては、CIDECのmRNA又はタンパク質の含有量が測定できる方法であれば特に制限はないが、例えば、mRNAの測定としては、PCR法、マイクロアレイ法、ノーザンブロット法、分光光度法、蛍光光度法等が挙げられる。特に、PCR法によるリアルタイムPCRは、測定の簡便さと迅速さの点で好ましい。PCRに使用するプライマーは、CIDEC遺伝子配列に基づき公知の方法で設計することができ、例えば、表3に記載されたCIDECのプライマーが利用可能である。

30

【0019】

CIDECタンパク質の測定方法としては、FACS解析法、分光光度法、蛍光光度法、質量分析法、クロマトグラフィーその他、該タンパク質に対する抗体を用いた既存の免疫測定法や、クロマトグラフィー技術と飛行時間型質量分析(TOF-MS)を組み合わせ、クロマト担体(例:カチオン交換体、アニオン交換体、疎水性クロマト担体、金属イオンなど)に一定条件下で捕捉されるすべての成分の質量を一括して測定する方法、二次元ゲル電気泳動法等が用いられる。

40

免疫測定法としては、ウエスタンブロット法、酵素免疫定量法に従い定量検出する方法、蛍光免疫測定法、化学発光免疫測定法等で測定する方法等が好ましい。酵素免疫定量法は、標識イムノアッセイ法のうち、酵素を標識物質として用いる検出方法である。中でも、イムノソルベントを用いる、enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)法を選択するのが、特に好適である。また、ELISAのうちサンドイッチ法は、操作の簡便性、経済上の利便性、とりわけ臨床検査における汎用性を考慮すると、特に好適な測定態様の一つとして挙げられる。これらの測定方法は、例えば、新生化学実験講座(日本生化学会編;東京化学同人)、Molecular Cloning, A Laboratory Manual(T. Maniatis et al., Cold Spring Harbor Laboratory(2001))、Antibodies - A Laboratory Manual(E. Harlow, et al., ColdSpring Harbor Laboratory(1988))等の一般的実験書に記載の方法又はそれに準

50

じて行うことができる。

【0020】

上記測定を行う際に用いられる抗体等（抗体断片を含む）は、対象のCIDEDECタンパク質を抗原として公知の方法によって得ることができる。ただし、対象のCIDEDECタンパク質を抗原として製造されたものである必要はなく、該タンパク質と少なくとも交差反応性を示し、その含有量を測定することができるものであれば何れのものでよい。

【0021】

本発明の方法で使用する試料は、被検動物から採取直後のものを上記測定に用いることが好ましいが、保存したものをを用いてもよい。血液試料の保存方法としては、うつ病検査用分子マーカー量が変化しない条件であれば特に制限は無いが、例えばmRNAの場合は、RNA抽出用の試薬を添加して-80℃又は液体窒素で凍結保存することが好ましい。タンパク質の場合は、0～10℃の凍結しない程度の低温条件、暗所条件および無振動条件下が好ましく、止むをえず凍結する場合には、深凍結などマーカー分子の分解や酸化反応等を避けられる方法が好ましい。

【0022】

本発明の検査方法においては、被検動物から採取された試料中のCIDEDECの発現量を測定して、これを指標として、うつ病の重症度を検査することができる。また、他のうつ病検査用マーカーの試料中発現量を組み合わせてもよい。さらに、臨床症候の観察や、PETやNIRSなどによる脳画像診断の結果を関連付けた複合指標を用いることで、よりの確に検査することが可能である。

【0023】

併用する他のうつ病検査用マーカーとしては、例えば、後述のように、本発明においてうつ病患者及びうつ病モデルマウスにおいて特異的に発現変化することが確認されたBANP（ヒト配列番号17：マウス配列番号21）、RAB11FIP4（ヒト配列番号49：マウス配列番号53）、RNASE1（ヒト配列番号57：マウス配列番号61）、SLC36A1（ヒト配列番号105：マウス配列番号109）、STYXL1（ヒト配列番号113：マウス配列番号117）、ARFRP1（ヒト配列番号9：マウス配列番号13）、BCL11B（ヒト配列番号25：マウス配列番号29）、FYC01（ヒト配列番号33：マウス配列番号37）、NIPAL3（ヒト配列番号41：マウス配列番号45）、RPL23A（ヒト配列番号65：マウス配列番号69）、RPS2（ヒト配列番号73：マウス配列番号77）、SIGIRR（ヒト配列番号89：マウス配列番号93）、SLC35F2（ヒト配列番号97：マウス配列番号101）等を好適に使用できる。なお、括弧内に各マーカーの配列を示したが、これらはあくまで一例であり、個体によって配列に違いが生じることもあるため、これらの配列の物に限定されない。

CIDEDECと上記他のマーカーとを組み合わせると判別分析を行うことにより、より精度の高いうつ病検査ができる。

【0024】

うつ病検査用分子マーカーの試料中での発現量を指標としてうつ病検査を行う場合には、CIDEDECの発現量を基準値と比較することにより被検動物のうつ病の発症の有無が判定される。すなわち、CIDEDECはうつ病を発症している場合に発症していない場合と比べて発現量が高くなるので、CIDEDECの発現量が基準値より高いと被検動物がうつ病を発症していると判定される。ここで基準値としては健常人やうつ病を発症していない対象者におけるCIDEDECの発現量が例示される。

【0025】

また、あらかじめ発現量のカットオフ値を定めておき、カットオフ値に基づいて判定してもよい。カットオフ値とは、ある物質に着目して目的とする疾患群と非疾患群（目的とする疾患以外の群）とを判定する場合に定める値をいう。目的とする疾患と非疾患とを判定する場合に、カットオフ値以下であれば陰性、カットオフ値以上であれば陽性として、またはカットオフ値以下であれば陽性、カットオフ値以上であれば陰性として疾患を判定することができる。

【0026】

カットオフ値を設定する方法としては、たとえば、リアルタイムPCRの場合には、 ΔCt 値（ターゲットRNAのCt値とコントロールRNAのCt値の差）を指標としてグラフ化し、被験者と健常者の境界をカットオフ値として設定する方法等が挙げられる。この場合、 ΔCt 値は発現量が高いほど低い値となるので、 ΔCt 値が基準値より低いとうつ病であると判定することができる。

【0027】

後述するように、CIDEDECは、 ΔCt をカットオフ値としてうつ病患者と健常者を100% 判別することができる優れた分子マーカーである。

【0028】

(2) うつ病の重症度評価のための検査方法

10

本発明のCIDEDECマーカーを用いたうつ病検査方法の具体的方法として、被検者（動物）のうつ病の重症度を評価するための検査方法が挙げられる。うつ病の重症度とは、社会活動や日常生活においてうつ病症状が現れることにより、どの程度支障が生じるかを示す尺度である。たとえば、「軽度」では、仕事や日常生活、他人とのコミュニケーションに生じる障害はわずかで、周囲の人は気づかないこともある。一方「重度」では、仕事や日常生活、他人とのコミュニケーションが明らかに困難となる。「中等度」は、「軽度」と「重度」の間に位置する。

【0029】

うつ病の重症度を評価することにより、その患者に適切な治療を選択することが可能となる。たとえば、軽度であれば、仕事の休養をとりカウンセリングを行って様子を見ることにし、重度であれば、さらに薬物による治療を加えることもできる。また、重症度を客観的に評価できることにより、患者にとっては、施設間でのバラツキなく、どの病院においても適切な治療を受けることができるというメリットがある。

20

【0030】

本発明におけるCIDEDECマーカーは、その発現量が重症度と比例しており、発現量が多いほど重度であることを示す。すなわち、CIDEDECの発現量が高いほどうつ病の重症度が高いという基準に基づいてうつ病の重症度が判定される。発現量の評価としては、たとえば、上述のとおり、リアルタイムPCRの場合における ΔCt 値を指標とする方法等が挙げられる。この場合、 ΔCt 値は発現量が高いほど低い値となるので、 ΔCt 値が低いほど重症度が高いことを示す。

30

【0031】

本発明における重症度評価のための検査方法においては、他の分子マーカー、たとえば上述の、BANP、RAB11FIP4、RNASE1、SLC36A1、STYXL1、ARFRP1、BCL11B、FYCO1、NIPAL3、RPL23A、RPS2、SIGIRR及びSLC35F2等を適宜組み合わせてもよい。それら他の分子マーカーを組み合わせることにより、より正確な評価を行うことが可能となる。

【0032】

かくして、本発明の方法によりうつ病の診断がついた被検者（動物）は、それぞれの疾患に適した治療法を受けることにより、予後の経過や治療効果が非常に良好となる。

【0033】

(3) うつ病測定用キット

40

本発明は、さらに上記うつ病の診断のための検査に用いるためのキット、あるいは下述するうつ病の治療効果の評価、あるいはうつ病治療薬のスクリーニング方法を行うためのキットも含まれる。キットの内容は、機器または試薬の組み合わせにより構成されるが、以下に述べる各構成要素と本質的に同一、またはその一部と本質的に同一な物質が含まれていれば、構成または形態が異なっても、本発明のキットに包含される。

【0034】

試薬としては、例えば、PCR法によりCIDEDECの発現量を測定する場合には、CIDEDECを特異的に増幅することが可能なプライマーを含む。また、必要に応じて、逆転写酵素、Taqポリメラーゼ、反応緩衝液等を含めてもよい。リアルタイムPCRの場合には、蛍光試薬、蛍光光度計、サーマルサイクラー等も含まれる。

50

【 0 0 3 5 】

マイクロアレイによりCIDEDECの発現量を測定する場合には、CIDEDEC遺伝子断片をスポットしたガラス、プラスチック、シリコン又はメンブレン等の支持体を含む。また、必要に応じて、ラベル化試薬、ハイブリダイゼーション用バッファー、フラグメンテーション用バッファー等を含めてもよい。

【 0 0 3 6 】

免疫測定法によりCIDEDEC発現量を測定する場合には、抗CIDEDEC抗体を含む。また、必要に応じ、生体試料の希釈液、抗体固定化固相、反応緩衝液、洗浄液、標識された二次抗体またはその抗体断片、標識体の検出用試薬、標準物質なども含まれる。生体試料の希釈液としては、界面活性剤、緩衝剤などにB S Aやカゼインなどの蛋白質を含む水溶液などが挙げられる。

10

【 0 0 3 7 】

抗体固定化固相としては、各種高分子素材を用途に合うように整形した素材に、抗分子マーカー抗体またはそれらの抗体断片を固相化したものが用いられる。形状としてはチューブ、ビーズ、プレート、ラテックスなどの微粒子、スティック等が、素材としてはポリスチレン、ポリカーボネート、ポリビニルトルエン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ナイロン、ポリメタクリレート、ゼラチン、アガロース、セルロース、ポリエチレンテレフタレート等の高分子素材、ガラス、セラミックスや金属等が挙げられる。抗体の固相化の方法としては物理的方法と化学的方法またはこれらの併用方法等、公知の方法が挙げられる。例えば、ポリスチレン製96ウェルの免疫測定用マイクロタープレートに抗体または抗体断片等を疎水固相化したものが挙げられる。

20

【 0 0 3 8 】

反応緩衝液は、抗体固定化固相の抗体と生体試料中の抗原とが結合反応をする際の溶媒環境を提供するものであればいかなるものでもよいが、界面活性剤、緩衝剤、B S Aやカゼインなどの蛋白質、防腐剤、安定化剤、反応促進剤等を含む反応緩衝液が挙げられる。

【 0 0 3 9 】

標識された二次抗体またはその抗体断片としては、本発明に用いられる抗体または抗体断片に西洋ワサビペルオキシダーゼ(H R P)、ウシ小腸アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼなどの標識用酵素をラベルしたもの、緩衝剤、B S Aやカゼインなどの蛋白質、防腐剤などを混合したものが用いられる。

30

【 0 0 4 0 】

標識体の検出用試薬としては前記の標識用酵素に応じて、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼであれば、テトラメチルベンジジンやオルトフェニレンジアミンなどの吸光測定用基質、ヒドロキシフェニルプロピオン酸やヒドロキシフェニル酢酸などの蛍光基質、ルミノールなどの発光基質が、アルカリホスファターゼであれば、4-ニトロフェニルフォスフェートなどの吸光度測定用基質、4-メチルウンベリフェリルフォスフェートなどの蛍光基質等が挙げられる。

なお、本発明のキットは、他の分子マーカー、BANP、RAB11FIP4、RNASE1、SLC36A1、STYXL1、ARFRP1、BCL11B、FYC01、NIPAL3、RPL23A、RPS2、SIGIRR及びSLC35F2を測定するためのプライマーや抗体などの試薬を含んでもよい。

40

【 0 0 4 1 】

(4) うつ病の治療効果の評価方法

本発明の他の態様は、うつ病の治療薬が投与されたうつ病治療を必要とする動物から採取された試料中のCIDEDECの発現量を測定する工程を含む、該動物におけるうつ病治療効果の評価方法である。

【 0 0 4 2 】

うつ病の治療を必要とする動物とは、具体的には、うつ病の症状を示すヒトあるいは(1)記載の動物(これらを単に「被検者」と称することがある)や、上記(1)の方法によりうつ病と診断された患者、非ヒトうつ病モデル動物等が挙げられる。

【 0 0 4 3 】

50

うつ病治療薬とは、うつ病の治療薬として用いられているものであればいずれのものでよいが、例えば、イミプラミン又はアモキサピン等の三環系抗うつ薬、ミアンセリン又はセチプチリン等の四環系抗うつ薬、エスシタロプラム又はフルボキサミン等の選択的セロトニン再取り込み阻害薬（SSRI）、トレドミン又はデュロキセチン等のセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬（SNRI）等が挙げられる。

【0044】

うつ病治療薬が投与されたうつ病治療を必要とする動物から採取された試料におけるCIDEDECの発現量が、治療薬投与前の発現量に比べて減少するか、あるいは、うつ病を発症していない対照の動物における量に近づいた場合、治療効果があったと判定することができる。

10

【0045】

うつ病治療薬は、薬の効果及び副作用の個人差が大きく、また、効果の発現まで2～4週間という長い時間がかかる。そのため、薬の効果を客観的に評価できない状態では、薬を変更すべきか否かの判断が難しい。しかし、CIDEDECの発現量に基づく客観的評価を行うことにより、治療効果を的確に判断することができるため、適切な治療を施すことが可能となる。

【0046】

(5) うつ病治療薬のスクリーニング方法

本発明の他の態様は、被検体とうつ病治療薬の候補化合物を接触させた後、該被検体の試料中のCIDEDEC発現量を測定する工程を含む、うつ病治療薬のスクリーニング方法である。

20

【0047】

被検体には、CIDEDECの発現量が、うつ病状態と同様の異常を示す非ヒト動物個体、組織、細胞等が用いられる。うつ病症状を有する動物としては、例えば、卵巣摘除後に慢性変動ストレス（chronic ultra-mild stress; CUMS）を負荷したうつ病モデル非ヒト動物等が挙げられる。被検体とともに、対照として、被検体と同種の個体、組織、細胞等でCIDEDECの発現量が健常状態と同様（正常）であるものを用いることも好ましい。

【0048】

うつ病状態の非ヒト動物個体におけるCIDEDECマーカーの発現変動を観察することにより、うつ病の治療薬を開発するための実験系を確立することができる。また、非ヒト動物個体の予後を該マーカーでモニタリングすることにより、ヒトのうつ病の予後に有効な治療薬を開発することが可能となる。

30

【0049】

これらの被検体に接触させるうつ病治療薬候補化合物（以下、「候補化合物」と称することがある）としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、低分子合成化合物などが挙げられ、これらの化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。また、これらの化合物を含む、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などでもよい。

その投与量、投与方法、処理時間等は、用いる被検体に従って適宜選択すればよい。

【0050】

候補化合物と接触させた後に、該被検体中のCIDEDECの発現量を測定する方法としては、各被検体に適した方法により行うことができ、上記（1）で述べたものを適用できる。例えば、被検体が血液の場合には、公知の方法に従って血液中の白血球等からRNAを抽出し、これを試料として用いてもよい。例えば、RNAを試料とする場合には、リアルタイムPCR法等により検出を行うことができる。これらの試料は、検出の結果得られた数値を正確に比較・解析できるように、あらかじめ抽出したRNA量をそろえることが好ましい。

40

【0051】

候補化合物と接触させた被検体におけるCIDEDECの発現量が、接触前の量に比べて減少するか、あるいは、対照の被検体における量に近づいた場合、該候補化合物はうつ病治療効果を有すると判定することができる。

50

【実施例】

【0052】

<被験者のリクルート>

群馬大学病院にて治療中の大うつ病（MDD）患者のうち、初発年齢が50歳以上であり、DSM-IV分類において大うつ病のメランコリー型を呈し、かつ、他の精神疾患の合併を認めない者を対象とした。MDDの重症度はハミルトンうつ病評価尺度構造化面接法（Structured Interview Guide for the Hamilton Depression Rating Scale; SIGH-D）により採点し、8点未満を寛解とした。

対照として年齢と性別を一致させた健常者をリクルートした。リクルートした健常者に、精神疾患罹患歴や家族歴が無いことを確認した。リクルートした被験者に認知機能検査（Mini Mental State Examination; MMSE）を行い、認知機能が正常であることを確認した。

以下表1に、リクルートした被験者を示す。

【表1】

表1

	Age (y)	Age of onset (y)	Sex (F/M)	SIGH-D	MMSE
DP	69.3 ± 4.0	61.0 ± 2.9	6/4	23.4 ± 3.3*	26.5 ± 0.9
RM	73.6 ± 3.4	64.1 ± 2.9	5/5	3.3 ± 0.5	27.8 ± 0.6
HC	62.5 ± 2.7	-	7/5	3.3 ± 0.6	27.8 ± 0.9

DP: 遅発性うつ病患者

RM: 寛解した遅発性うつ病患者

HC: 健常者

SIGH-D: ハミルトンうつ病評価尺度構造化面接法

MMSE: 認知機能検査

遅発性うつ病患者の2名は、MMSEを辞退した。データは、平均値 ± 標準誤差（mean ± SE）で表す。表中の米印（*）は、対応する健常者群に対するp値がp < 0.05であることを示す（ボンフェローニ試験）。

【0053】

<被験者血液からのRNA抽出>

被験者から10mLの血液を採取し、血液中の有核細胞（主に白血球）から、QIAamp RNA Blood Mini Kit（QIAGEN K.K.）によりRNAを抽出した。抽出操作はキットに添付の説明書の記載に多少の修正を加えて行われた。その操作は、要約すると次のとおりである。採取した10mLの血液を、50mLチューブに半分ずつ分け、各々のチューブに25mLのバッファ-ELを加えて、よく転倒混和した。各々のチューブを氷中に20分置いた後、4℃、480 × gで15分遠心し、上清を捨てた。チューブ中のペレットに10mLのバッファ-ELを加えてボルテックスし、再懸濁した。再懸濁したサンプルを、4℃、480 × gで15分遠心し、上清を捨てた。2-メルカプトエタノールを含むバッファ-RLTをペレットに3mL加えて、ボルテックスにより溶解した。前記溶解物はQIAshredder spin columnsで室温にて2分遠心することによりホモジナイズした。ホモジナイズした溶解物に等量の70%エタノールを加えて、ボルテックスによりよく混和した。混和したサンプルをQIAamp spin columnに加えて15秒遠心した。カラムを洗浄後、DNaseI消化した。溶出工程はキットに添付の説明書どおりに行った。溶出したサンプルは標準的なエタノール沈殿法により処理された。RNAペレットはRNaseフリーの水に溶解した。

RNAの量はNanodrop ND-1000 spectrophotometer（Thermo Fisher Scientific Inc.）により測定した。

【0054】

<モデル動物の作製>

メスのC57BL/6Jマウス（8週齢）をCharles River Laboratories Japanより購入し、1週間の馴化後、ペントバルビタール麻酔下にて卵巣の摘除を行った（Ovariectomy; OVX）。

同様にペントバルビタール麻酔を行い、卵巣を露出させたものの摘出せずに縫合したものを対照動物とした (Sham-operation; Sham)。

上記処置の2週間後より、慢性変動ストレス (chronic ultra-mild stress; CUMS) の負荷を開始した。CUMSの方法は既報 (Uchida et al., Neuron, 69, 359-372, 2011) に準じ、6週に亘って負荷を行った。なお、同期間ストレス負荷を行わなかった群 (Nonstress: NS群) を設けた。すなわち、本試験は、Sham+NS (n=9)、Sham+CUMS (n=8)、OVX+NS (n=8)、及び、OVX+CUMS (n=9) の4つの群構成で行われた。

【0055】

上記CUMSの負荷を停止後1日目に、強制水泳試験及びオープンフィールド試験を行った。

10

強制水泳試験は、以下のように行った。アクリルシリンダー (高さ22cm、直径11.5cm) に室温の水を高さ15cmまで注ぎ、その中にマウスを置いた。マウスの行動は、パソコンに接続したCCDカメラにより5分間記録され、ImageJ PS1 (小原医科産業社製) による解析を行った。記録された無動時間をうつ様行動の指標とした。

オープンフィールド試験は、以下のように行った。オープンフィールド装置 (50×50×40cm) を発光ダイオードで照明し (フィールドの中央で30 lux)、フィールドの中央にマウスを置いて、5分間自由に移動させた。中央領域内 (フィールドの36%) で移動した合計距離と、中央領域にて過ごした時間を、指標として採用した。集めたデータは、ImageJ OF4 (小原医科産業社製) を使用して解析した。

【0056】

20

動物の行動解析を行った結果を、図1に示す。OVX+CUMSマウスは、強制水泳試験においてうつ病様行動を呈し、また、オープンフィールド試験において不安様行動を呈した。一方、Sham+CUMSマウスやOVX+NSマウスには、行動変化は認められなかった。これらの行動解析の結果から、OVX+CUMSマウスをうつ病のモデルと定義し、Sham+Nonstressマウスを対照群とした。

【0057】

< マウス血液からのRNA抽出 >

ペントバルビタール麻酔下にてマウスの大静脈から300 µLの血液を採取後、すぐにヘパリン処置し、1000×gにて2分遠心した。得られたペレットは、2-メルカプトエタノールを含む冷却した溶解バッファーに溶解した。当該溶解物から、GeneJet Whole Blood RNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) を使用して、キット添付の説明書に従ってトータルRNAを抽出した。

30

RNAの量はNanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.) により測定した。

【0058】

< マイクロアレイ >

被験者ならびにマウスから得たRNAを、Agilent Low Input Quick Amp Labeling Kit, one-color (Agilent Technologies) を使用して、キットに添付の説明書に従ってCyanine 3でラベルした。ラベル化したRNAを、RNeasy mini spin column (QIAGEN) により精製した。得られたラベル化RNAをフラグメント化し、Agilent SurePrint G3 Human GE 8×60K v2 Microarray (Design ID: 039494) ならびにAgilent SurePrint G3 Mouse GE 8×60K Microarray (Design ID: 028005) と65で17時間ハイブリダイズさせた後、マイクロアレイを洗浄し、Agilent DNA microarray scannerにより測定した。発光強度をAgilent feature extraction software version 10.7.3.1により定量化し、Agilent GeneSpring GX version 11.0.2により標準化した。

40

【0059】

得られたデータをもとに統計解析を行い、うつ病患者病相期に特異的に発現変化する遺伝子3,066種と、うつ病モデルマウスに特異的に発現変化する遺伝子637種を見出した (図2)。

この遺伝子リスト同士を照合した結果、一致する遺伝子14種を見出した (表2)。これ

50

をうつ病およびうつ症状を反映するバイオマーカーの候補とした。

【 0 0 6 0 】

【表 2】

表 2

Up-regulated genes			Fold change	
	Gene symbol	Gene name	Patients	Mice
1	BANP	BTG3 associated nuclear protein	1.30	1.44
2	CIDEC	cell death-inducing DFFA-like effector c	1.22	1.95
3	RAB11FIP4	RAB11 family interacting protein 4 (class II)	1.31	1.44
4	RNASE1	ribonuclease, RNase A family, 1 (pancreatic)	1.59	2.43
5	SLC36A1	solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 1	1.55	2.14
6	STYXL1	serine/threonine/tyrosine interacting-like 1	1.38	1.87

10

Down-regulated genes			Fold change	
	Gene symbol	Gene name	Patients	Mice
1	ARFRP1	ADP-ribosylation factor related protein 1	1.14	1.17
2	BCL11B	B-cell CLL/lymphoma 11B (zinc finger protein)	1.36	1.5
3	FYCO1	FYVE and coiled-coil domain containing 1	1.19	1.38
4	NIPAL3	NIPA-like domain containing 3	1.31	1.33
5	RPL23A	ribosomal protein L23a	1.14	1.23
6	RPS2	ribosomal protein S2	1.24	1.24
7	SIGIRR	single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain	1.32	1.32
8	SLC35F2	solute carrier family 35, member F2	1.39	1.35

【 0 0 6 1 】

< 被験者におけるリアルタイム定量PCRによる定量解析 >

20

被験者から得たRNAをPrimeScript RT reagent Kit (Takara Bio Inc.)により逆転写してcDNAサンプルを得た後、このcDNAサンプルとマイクロアレイの結果から得られたバイオマーカー候補14種に対する特異的なプライマーペア（表 3）ならびにSYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio Inc.)とを混合してリアルタイム定量PCRを行った。リアルタイム定量PCRは、StepOnePlusリアルタイムPCRシステム (Applied Biosystems) により、95℃3秒及び60℃30秒を50サイクルで行った。なお、内標準物質としてRPS29を選択した。ターゲット遺伝子の増幅量は $\Delta\Delta Ct$ 法に従って定量解析を行い、健常者と比較した。

【 0 0 6 2 】

【表 3】

表 3

Gene name	Gene symbol	Primer sequence	Amplicon size (bp)	Species	Accession number
ADP-ribosylation factor related protein 1	ARFRP1	Forward TGCATCGGAGGCTTCAGAG Reverse CCACTCCCAACTCACAGGGG	125	Human	NM_001134758
	Arfp1	Forward GGTTCCATGGGGTGACCCCTT Reverse CAAGCCAGCAAGCTCCACAC	99	Mouse	NM_001165991
BTG3 associated nuclear protein	BANP	Forward CGGGGCCATCCAGATTCACT Reverse GCCTTCAGACGCACTTCAGC	147	Human	NM_017869
	Banp	Forward AACCTGCGAGTGTGCTTTGC Reverse CTAAGAGCACCCGAGCCAT	89	Mouse	NM_016812
B-cell CLL/lymphoma 11B	BCL11B	Forward TGCACCTTTCTCCTTGCCA Reverse GGGGCATCCAAAGGCAACAG	141	Human	NM_138576
	Bcl11b	Forward TGGAACTGCCACTTGCCAT Reverse ATCAAACTCGGACGGGAG	130	Mouse	NM_021399
cell death-inducing DFFA-like effector c	CIDEc	Forward CTGGAACCTGGGGTGGGT Reverse CTGGATGGGCTAAGCTGCCT	91	Human	NM_022094
	Cidec	Forward TTCCTAGCCTGGCCAGTTT Reverse GAGAGGGAGTGGCACGGAAG	124	Mouse	NM_178373
FYVE and coiled-coil domain containing 1	FYCO1	Forward CGGGGCCATCCAGATTCACT Reverse GCCTTCAGACGCACTTCAGC	124	Human	NM_024513
	Fyc1	Forward CCCTCCGTGTCTGAGTGGAC Reverse TCCTTTGCCTGCTCTTGGTCT	87	Mouse	NM_148925
NIPA-like domain containing 3	NIPAL3	Forward CGGTCTCCTTTGAGCAGCC Reverse CCCAGCGTTCAACTCCACAC	123	Human	NM_020448
	Nipal3	Forward GGGCTGCCCTGTTGGTAGAA Reverse TGGTGGGTGATGTCAGAGC	92	Mouse	NM_028995
RAB11 family interacting protein 4 (class II)	RAB11FIP4	Forward GGTGCATTGCCAAGGACTCA Reverse GCCATCTAACAAACCCTTGGGC	129	Human	NM_032932
	Rab11fip4	Forward CACTGGGGGCCAAAGGAGT Reverse TGAAGCCGAGGCAAGGGTA	149	Mouse	NM_175543
ribonuclease, RNase A family, 1 (pancreatic)	RNASE1	Forward AGGCGCCGAATATGACACA Reverse GGACATCTACAGGGGCTCG	73	Human	NM_198232
	Rnase1	Forward CAAGCCACCATGGGTCTGGA Reverse GGAAGGCTGGACCCATCCAA	78	Mouse	NM_011271
ribosomal protein L23a	RPL23A	Forward CGGGGCCATCCAGATTCACT Reverse GCCTTCAGACGCACTTCAGC	76	Human	NM_000984
	Rpl23a	Forward TGGGCCATCCTTTTCAGCCAA Reverse TCTTTTGTGGCTGTGGACGC	134	Mouse	NM_207523
ribosomal protein S2	RPS2	Forward CTCGACCTGTGCCTAAGA Reverse CATCAAAGGTGGCCTTGCGG	113	Human	NM_002952
	Rps2	Forward GAGCATATAAATTGTCCCTCCGC Reverse TCCGCCATTGTGTCTCTCC	70	Mouse	NM_008503
ribosomal protein S29	RPS29	Forward GGCACGGTCTGATCCGGA Reverse GCCCCGGATAATCCTCTGAAGG	122	Human	NM_001032
	Rps29	Forward TCCTCGTTGGCGTCTGAAG Reverse TCAGCCCGTATTGCGGATCA	134	Mouse	NM_009093
single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain	SIGIRR	Forward GGAGAGCCATCAGCTCCACC Reverse GGCCTGTAGTTTCGCGAGC	102	Human	AY358342
	Sigirr	Forward GGGAGAGCCCTCAACCCGAC Reverse GTGGCTCCCCAAAGACAGGT	149	Mouse	NM_023059
solute carrier family 35, member F2	SLC35F2	Forward ACTCATCCAGGTCCCAGAGC Reverse ACTGTGAGCACATAGCCAGT	71	Human	NM_017515
	Slc35f2	Forward CCTAGGCACGTTTGCTCCTG Reverse GCACTGAATGGGAGGATGC	86	Mouse	NM_028060
solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 1	SLC36A1	Forward GTGCATGCAGGCCCATGTTT Reverse GCACGATGGCAACAGAGCAT	74	Human	NM_078483
	Slc36a1	Forward GGAGCCTGGTGTACCCCTGT Reverse ACACGGTACTGTCTGGCTGT	179	Mouse	NM_153139
serine/threonine/tyrosine interacting-like 1	STYXL1	Forward ACTCTGAGCTCCGAAAGGATG Reverse ACTCCCATTTGGAACGGACAT	143	Human	NM_016086
	Stylx1	Forward GCAAAACCAACATGCGTCCG Reverse TGGCTTCCAGGCAAGGTCA	124	Mouse	NM_029659

【 0 0 6 3 】

配列番号 1 及び 2 は、CIDEc のヒト遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 3 (forward) 及び 4 (reverse) に示す。配列番号 5 及び 6 は、CIDEc のマウス遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 7 (forward) 及び 8 (reverse) に示す。

配列番号 9 及び 10 は、ARFRP1 のヒト遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 11 (forward) 及び 12 (reverse) に示す。配列番号 13 及び 14 は、ARFRP1 のマウス遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 15 (forward) 及び 16 (reverse) に示す。

配列番号 17 及び 18 は、BANP のヒト遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それ

10

20

30

40

50

に対するプライマー配列を、配列番号 19 (forward) 及び 20 (reverse) に示す。配列番号 21 及び 22 は、BANP のマウス遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 23 (forward) 及び 24 (reverse) に示す。

配列番号 25 及び 26 は、BCL11B のヒト遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 27 (forward) 及び 28 (reverse) に示す。配列番号 29 及び 30 は、BCL11B のマウス遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 31 (forward) 及び 32 (reverse) に示す。

配列番号 33 及び 34 は、FYC01 のヒト遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 35 (forward) 及び 36 (reverse) に示す。配列番号 37 及び 38 は、FYC01 のマウス遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 39 (forward) 及び 40 (reverse) に示す。

10

配列番号 41 及び 42 は、NIPAL3 のヒト遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 43 (forward) 及び 44 (reverse) に示す。配列番号 45 及び 46 は、NIPAL3 のマウス遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 47 (forward) 及び 48 (reverse) に示す。

配列番号 49 及び 50 は、RAB11FIP4 のヒト遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 51 (forward) 及び 52 (reverse) に示す。配列番号 53 及び 54 は、RAB11FIP4 のマウス遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 55 (forward) 及び 56 (reverse) に示す。

20

配列番号 57 及び 58 は、RNASE1 のヒト遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 59 (forward) 及び 60 (reverse) に示す。配列番号 61 及び 62 は、RNASE1 のマウス遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 63 (forward) 及び 64 (reverse) に示す。

配列番号 65 及び 66 は、RPL23A のヒト遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 67 (forward) 及び 68 (reverse) に示す。配列番号 69 及び 70 は、RPL23A のマウス遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 71 (forward) 及び 72 (reverse) に示す。

配列番号 73 及び 74 は、RPS2 のヒト遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 75 (forward) 及び 76 (reverse) に示す。配列番号 77 及び 78 は、RPS2 のマウス遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 79 (forward) 及び 80 (reverse) に示す。

30

配列番号 81 及び 82 は、RPS29 のヒト遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 83 (forward) 及び 84 (reverse) に示す。配列番号 85 及び 86 は、RPS29 のマウス遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 87 (forward) 及び 88 (reverse) に示す。

配列番号 89 及び 90 は、SIGIRR のヒト遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 91 (forward) 及び 92 (reverse) に示す。配列番号 93 及び 94 は、SIGIRR のマウス遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 95 (forward) 及び 96 (reverse) に示す。

40

配列番号 97 及び 98 は、SLC35F2 のヒト遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 99 (forward) 及び 100 (reverse) に示す。配列番号 101 及び 102 は、SLC35F2 のマウス遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 103 (forward) 及び 104 (reverse) に示す。

配列番号 105 及び 106 は、SLC36A1 のヒト遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 107 (forward) 及び 108 (reverse) に示す。配列番号 109 及び 110 は、SLC36A1 のマウス遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 111 (forward) 及び 112 (reverse) に示す。

50

配列番号 1 1 3 及び 1 1 4 は、STYXL1のヒト遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 1 1 5 (forward) 及び 1 1 6 (reverse) に示す。配列番号 1 1 7 及び 1 1 8 は、STYXL1のマウス遺伝子配列とアミノ酸配列をそれぞれ示し、それに対するプライマー配列を、配列番号 1 1 9 (forward) 及び 1 2 0 (reverse) に示す。

【 0 0 6 4 】

結果を、図 3、4 及び 5 において、健常者 (HC) と比較したターゲット遺伝子増幅量の倍率変化として示す。その結果、マイクロアレイ解析においてうつ病で特異的に発現増加していた遺伝子のうち、CIDEc (図 3 左)、STYXL1 (図 3 右) ならびにSLC36A1 (図 4 左) は、リアルタイム定量PCRにおいてもうつ病群 (DP) において有意な発現増加を示し、寛解 (RM) によって正常化することが明らかとなった。RNASE1 (図 4 右) も同様の傾向があり、特に、寛解 (RM) によって発現が有意に正常化した。

10

また、マイクロアレイ解析においてうつ病で特異的に発現減少していた遺伝子のうち、ARFRP1 (図 5 左上)、BCL11B (図 5 右上) ならびにSLC35F2 (図 5 下) は、リアルタイム定量PCRにおいても、うつ病群 (DP) において有意な発現減少を示した。

【 0 0 6 5 】

次に、被験者個々から得られる ΔCt 値 (ターゲット遺伝子のCt値とRPS29 (コントロール遺伝子) のCt値の差) を指標にしてグラフ化した結果、CIDEcは ΔCt 値9.85を境界としてうつ病群 (DP) と健常者 (HC) を100%判別できた。さらに、1例の例外を除き、RMによって健常者レベルにまで正常化した (図 6) 。

20

【 0 0 6 6 】

次に、うつ症状の重症度の指標であるSIGH-Dと ΔCt 値との相関性解析を行った結果、CIDEc (図 7 左)、RNASE1 (図 7 右)、SLC36A1 (図 8 左) およびSTYXL1 (図 8 右) は統計学的に有意に相関したが、最も相関性が強いのはCIDEcであった。このことから、CIDEcをうつ症状の判定に最重要の測定項目とし、SLC36A1、STYXL1およびRNASE1を補足的な測定項目とした。

【 0 0 6 7 】

< モデル動物におけるリアルタイム定量PCRによる定量解析 >

OVX+CUMSマウスに抗うつ薬であるエスシタロプラムを投与した結果、行動異常の改善が認められた (図 9) 。

30

そこで、Sham+NSに水を投与した群、OVX+CUMSに水を投与した群、及び、OVX+CUMSにエスシタロプラムを投与した群の計3群の血液からRNAを抽出し、PrimeScript RT reagent Kit (Takara Bio Inc.) により逆転写してcDNAサンプルを得た後、このcDNAサンプルとマイクロアレイの結果から得られたバイオマーカー候補14種に対する特異的なプライマーペア (表 3) ならびにSYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio Inc.) とを混合してリアルタイム定量PCRを行った。詳細な手順は上記と同様である。なお、内標準物質としてRps29を選択した。 $\Delta \Delta Ct$ 法に従って定量解析を行い、Sham+Nonstressマウスと比較した。その中から、上記ヒト解析で重要と判断された4種 (Cidec、Rnase1、Slc36a1、Styxl1) をグラフに示した (図 10) 。

その結果、うつ病モデルであるOVX+CUMSマウスにおいて全ての遺伝子で発現が増加し、抗うつ薬の処置により改善する傾向が見られた。特に、Slc36a1は、上記発現増加及び改善において、統計学的な有意差が認められた。

40

【 0 0 6 8 】

表 1 に記載の被験者に対し、表 2 に記載の 1 4 遺伝子の発現量をそれぞれ測定し、それを基に判別関数を算出した。

【数 1】

判別得点 =

$$\{2.8359*[BANP]+(-6.7032)*[CIDEK]+(-2.7478)*[RAB11FIP4]+0.2934*[RNASE1]+2.2595*[SLC36A1]+(-0.9112)*[STYXL1]+1.1682*[ARFRP1]+2.0249*[BCL11B]+(-1.5480)*[FYCO1]+(-4.8488)*[NIPAL3]+1.1280*[RPL23A]+1.9998*[RPS2]+4.5318*[SIGIRR]+0.0654*[SLC35F2]+47.5456\}*(-1)$$

[]内は被験者個人の対象遺伝子の発現レベル(ΔCt値を示す)

【0069】

この関数に被験者個人の14遺伝子の発現レベルを代入し、算出された判別得点を図11aにプロットした。その結果、図11bのCIDEK単独の発現レベルでの判別結果と比較して、うつ症状の有無で境界がより明確になり、複数のマーカーを組み合わせることでより精度の高い判定ができることが分かった。

10

【0070】

以上から、うつ病患者のマイクロアレイの結果から得られた上記バイオマーカー14種を用いて、その発現状況を測定することにより、うつ病の重症度を客観的に把握できることが示された。特に、CIDEKは、リアルタイム定量PCRにおけるΔCt値を指標とすることにより、うつ病と健常者を高い精度で判別できる優れたマーカーであるといえる。

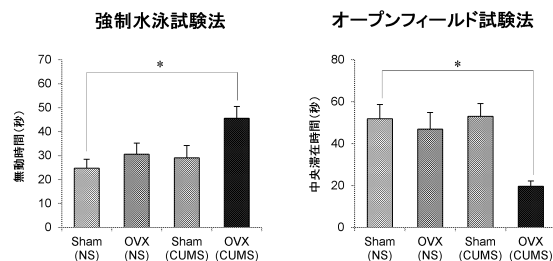
【産業上の利用可能性】

【0071】

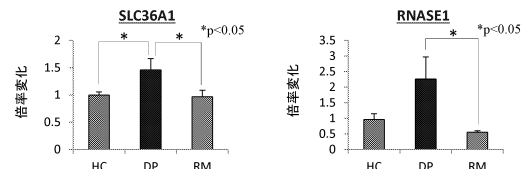
本発明の方法によれば、うつ病の診断や予後予測の検査、治療効果の評価を行うことができ、医療や診断の分野で有用である。また、本発明の方法によれば、うつ病の治療薬をスクリーニングすることができ、医薬分野でも有用である。

20

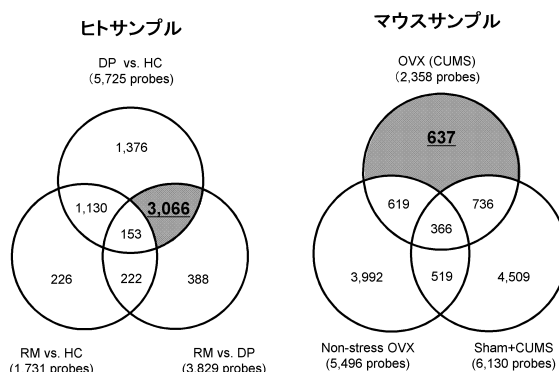
【図 1】



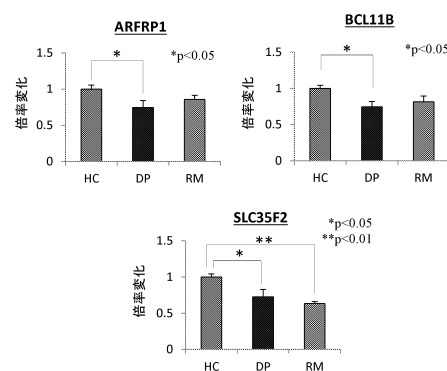
【図 4】



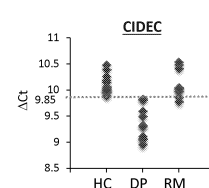
【図 2】



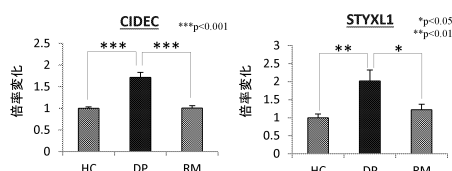
【図 5】



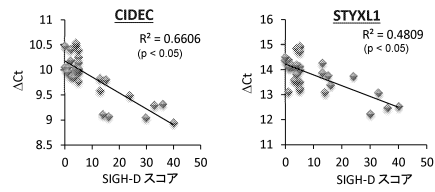
【図 6】



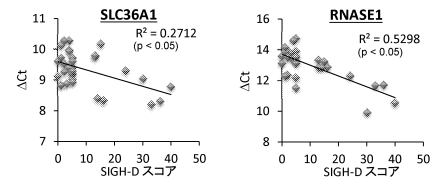
【図 3】



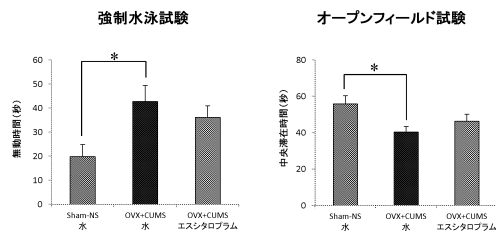
【図 7】



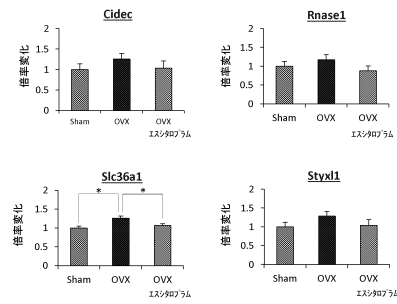
【図 8】



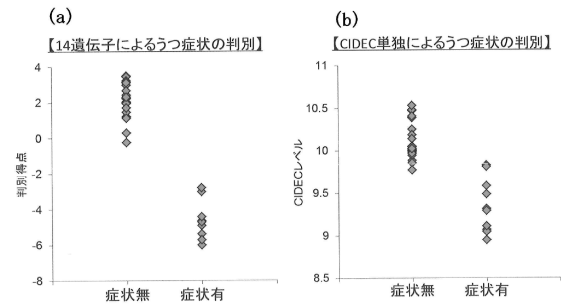
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【配列表】

0006614659000001.app

フロントページの続き

- (56)参考文献 LEE Seung Mi et al. , Molecular basis for homo-dimerization of the CIDE domain revealed by the crystal structure of the C, Biochem Biophys Res Commun , 2 0 1 3 年 , Vol.439 No.4 Page.564-569
Ulrich Danesch et al. , Cloning and Transcriptional Regulation of a Novel Adipocyte-specific Gene, FSP27 , THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY , 1 9 9 2 年 4 月 5 日 , Vol.267, No.10, Page.7185-7193
Vila-Brau Anna et al. , Fsp27/CIDEA is a CREB target gene induced during early fasting in liver and regulated by FA oxidation , J Lipid Res , 2 0 1 3 年 3 月 , Vol. 54, No. 3, pp. 592-601

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

C 1 2 Q 1 / 6 8

C 1 2 N 1 5 / 0 0

G 0 1 N 3 7 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

专利名称(译)	如何用Cidec检查抑郁症		
公开(公告)号	JP6614659B2	公开(公告)日	2019-12-04
申请号	JP2015562880	申请日	2015-02-13
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人群馬大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人群馬大学		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人群馬大学		
[标]发明人	三國雅彦 宮田茂雄		
发明人	三國 雅彦 宮田 茂雄		
IPC分类号	G01N33/53 G01N37/00 G01N33/543		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/112 C12Q2600/136 C12Q2600/158 G01N33/6896 G01N2500/00 G01N2800/304 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.D G01N37/00.102 G01N33/543.501.A		
代理人(译)	川口义行		
优先权	2014025568 2014-02-13 JP		
其他公开文献	JPWO2015122499A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明测量CIDEc的表达水平作为指示抑郁症严重程度的客观标志。此外，本发明测量选自STYXL1，SLC36A1，RNASE1，ARFRP1，BCL11B，SLC35F2，BANP，RAB11FIP4，FYCO1，NIPAL3，RPL23A，RPS2和SIGIRR的一种或多种基因的组表达水平。因此，提供了用于诊断和评估测试动物中抑郁症的严重程度的测试方法，评估抑郁症治疗效果的方法以及筛选用于抑郁症的治疗剂的方法。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特 許 公 報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6614659号 (P6614659)
(45) 発行日 令和1年12月4日 (2019. 12. 4)	(24) 登録日 令和1年11月15日 (2019. 11. 15)	
(51) Int. Cl. G 0 1 N 33/53 (2006.01) G 0 1 N 37/00 (2006.01) G 0 1 N 33/543 (2006.01)	F I G O 1 N 33/53 D G O 1 N 37/00 1 0 2 G O 1 N 33/543 5 0 1 A	
請求項の数 10 (全 18 頁)		
(21) 出願番号 特願2015-562880 (P2015-562880) (86) (22) 出願日 平成27年2月13日 (2015. 2. 13) (86) 国際出願番号 PCT/JP2015/054007 (87) 国際公開番号 W02015/122499 (87) 国際公開日 平成27年8月20日 (2015. 8. 20) 審査請求日 平成30年2月5日 (2018. 2. 5) (31) 優先権主張番号 特願2014-25568 (P2014-25568) (32) 優先日 平成26年2月13日 (2014. 2. 13) (33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国 (JP)	(73) 特許権者 504145364 国立大学法人群馬大学 群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地 (74) 代理人 100100549 弁理士 川口 嘉之 (74) 代理人 100126505 弁理士 佐賀 伸一 (72) 発明者 三國 雅彦 日本国群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地 国立大学法人群馬大学内 宮田 茂雄 日本国群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地 国立大学法人群馬大学内 審査官 高田 亜希	最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 C I D E C によるうつ病の検査方法		