

(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2011-502537

(P2011-502537A)

(43) 公表日 平成23年1月27日(2011.1.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4B063
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02 ZNA	
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 M	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁)

(21) 出願番号 特願2010-534182 (P2010-534182)
 (86) (22) 出願日 平成20年11月13日 (2008.11.13)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年6月25日 (2010.6.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/083424
 (87) 国際公開番号 WO2009/064901
 (87) 国際公開日 平成21年5月22日 (2009.5.22)
 (31) 優先権主張番号 60/987,540
 (32) 優先日 平成19年11月13日 (2007.11.13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 505060347
 ベリデックス・エルエルシー
 Veridex, LLC
 アメリカ合衆国、08869 ニュージャ
 ージー州、ラリタン、ユーエス・ハイウエ
 イ・202・ノース 1001
 33 Technology Drive
 , Warren, NJ 07059, U.
 S. A.
 (74) 代理人 100088605
 弁理士 加藤 公延
 (74) 代理人 100130384
 弁理士 大島 孝文
 (74) 代理人 100157288
 弁理士 藤田 千恵

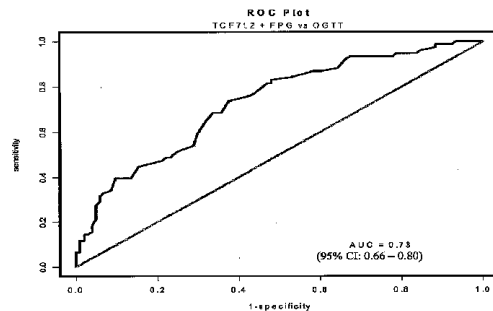
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖尿病の診断バイオマーカー

(57) 【要約】

糖尿病前症状態及び顕性 I I 型糖尿病であると診断された患者の P B M C において示差的に発現される遺伝子セットの同定のための方法が開示される。患者における糖尿病状態を正確に予測するために、3つの遺伝子及び10個の遺伝子サインを示す。本出願はまた、ポイントオブケア施設における糖尿病状態の迅速な診断のためのキットも記載する。

FIGURE 2B:



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

患者の糖尿病に対する感受性を査定するためのキットであって、前記査定は試験装置により行われる、キットにおいて、

a. 患者から試験試料を回収するための試薬と、

b. 患者の試験試料における TCF7L2 及び CLC 遺伝子又はこれらの変異型を含む遺伝子サインの発現プロファイルを測定するための試薬と、これらのためのパッケージングと、を含む、キット。

【請求項 2】

試験試料を回収するための前記試薬が、血液試料を回収するための試薬である、請求項 1 に記載のキット。 10

【請求項 3】

遺伝子サインの前記発現プロファイルを測定するための前記試薬が、リアルタイム PCR 又は免疫化学的アッセイ又は特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションのための試薬である、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 4】

患者の糖尿病に対する感受性を査定するためのキットであって、前記査定は試験装置により行われる、キットにおいて、

a. 患者から試験試料を回収するための試薬と、

b. 患者の試験試料における TOP1、CD24 及び STAP1 遺伝子を含む遺伝子サインの遺伝子発現プロファイルを測定するための試薬と、これらのためのパッケージングと、を含む、キット。 20

【請求項 5】

試験試料を回収するための前記試薬が、血液試料を回収するための試薬である、請求項 4 に記載のキット。

【請求項 6】

遺伝子サインの前記発現プロファイルを測定するための前記試薬が、リアルタイム PCR 又は免疫化学的アッセイ又は特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションのための試薬である、請求項 4 に記載のキット。

【請求項 7】

患者の糖尿病に対する感受性を査定するためのキットであって、前記査定は試験装置により行われる、キットにおいて、

a. 患者から試験試料を回収するための試薬と、

b. 患者の試験試料における TULP4、AA741300、ESCO1、EIF5B、ACTR2、WNK1、COCH、SON、TPR 及び NOG 遺伝子を含む遺伝子サインの遺伝子発現プロファイルを測定するための試薬と、これらのためのパッケージングと、を含む、キット。 30

【請求項 8】

試験試料を回収するための前記試薬が、血液試料を回収するための試薬である、請求項 7 に記載のキット。 40

【請求項 9】

遺伝子サインの前記発現プロファイルを測定するための前記試薬が、リアルタイム PCR 又は免疫化学的アッセイ又は特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションのための試薬である、請求項 7 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】**【開示の内容】****【0001】****〔出願の分野〕**

本出願は、医療診断の分野に関し、患者における糖尿病状態のポイントオブケア診断のための方法及びキットを記述する。 50

【 0 0 0 2 】

〔 関連出願の相互参照 〕

本出願は、米国特許仮出願第 6 0 / 9 8 7 , 5 4 0 号 (2 0 0 7 年 1 1 月 1 3 日出願) からの特許優先権を主張し、これにより本出願にその全体が組み込まれる。

【 0 0 0 3 】

〔 発明の背景 〕

糖尿病は、インスリン産生、インスリン活性、又はその両方における欠陥の結果による高濃度の血中グルコースによって特徴付けられる一群の病気である。未処置のまま放置されると、低血糖症、ケトアシドーシス又は非ケトン性高浸透圧性昏睡の症状を含む多くの重篤な短期合併症を生じる恐れがある。長期では、糖尿病は、動脈硬化症、慢性腎不全、網膜障害 (失明など) 、神経損傷及び微小血管損傷の危険性の増加を引き起こすことが知られている。

10

【 0 0 0 4 】

発展しつつある世界における糖尿病の流行的広がり、米国におけるヘルスケアシステムに重大な影響を及ぼすと予想される。米国疾病管理予防センター (the Center for Disease Control and Prevention) による近年の研究は、米国において過去 1 0 年間でほぼ 2 倍の新規糖尿病症例が発生していることを示している。2 0 0 7 年時点で、米国内で少なくとも 5 7 0 0 万人が糖尿病前症を有する。既に糖尿病にかかっているほぼ 2 4 0 0 万人と合わせると、これは、米国人口の 2 5 % 超をこの病気からの更なる合併症に対する危険性にさらすことになる。米国糖尿病学会によれば、2 0 0 7 年における米国内の糖尿病の推定コストは、1 7 4 0 億ドルにのぼり、直接医療コストはほぼ 1 1 6 0 億ドルである。

20

【 0 0 0 5 】

糖尿病の原因は、本来は多因子であると思われるが、増えつつある実験的証拠は、肥満、特に腹部肥満の発症が免疫及び代謝ホメオスタシスを乱し、最終的に広範な炎症反応に導くことを示唆している。TNF - などの、脂肪組織における炎症性サイトカインの産生は、その後、免疫反応、及び、細胞のインスリンに対して反応する能力を調節解除する。それゆえに、単球及びマクロファージなどの循環している免疫細胞の転写プロファイルの変化の検出は、グルコース不耐性の更に顕著な兆候が明らかになる前に、疾患を診断し、その進行をモニターするための便利な手段を提供する。

30

【 0 0 0 6 】

このような理由から、糖尿病の進行の危険性にさらされている患者の診断及びモニタリングのための迅速かつ正確な診断アッセイに対して、未達成の必要性が存在する。特に、早期発症型糖尿病に関する患者のルーチンスクリーニングのためのポイントオブケア施設において容易に使用できるキットフォーマットでの診断アッセイに対して、未達成の必要性が存在する。

【 0 0 0 7 】

〔 出願の概要 〕

糖尿病前症及び糖尿病状態の特徴である遺伝子サイン発現プロファイルの判定のための方法が記載される。本開示は、更に、患者の血液試料における遺伝子サイン発現プロファイルの迅速な測定のための試薬を含む診断キットに関する。このキットフォーマットは、費用対効果に優れ、ポイントオブケア施設での使用に便利である。

40

【 0 0 0 8 】

1 つの実施形態では、患者における真性糖尿病の診断のための方法が記載され、この方法は、(a) 患者から採取された試験試料を提供する工程、(b) TOP 1、CD 2 4 及び STAP 1 遺伝子の群から選択される遺伝子を含む遺伝子サインの遺伝子発現プロファイル測定する工程、(c) 遺伝子発現プロファイルと診断用遺伝子発現プロファイルと比較する工程、(d) 遺伝子発現プロファイルと診断用遺伝子発現プロファイルとの間の実質的な一致に少なくとも部分的に基づいて患者における糖尿病状態を判定する工程と、(e) 判定を医療専門家に表示する工程と、を含む。

50

【0009】

判定工程は、遺伝子発現シグナルの線形結合、線形回帰モデル、ロジスティック回帰モデル、線形判別分析(LDA)モデル、最近接モデル及びマイクロアレイの予測分析(PAM)の群から選択される1つ以上のアルゴリズムを実行するコンピュータシステムにより、遂行することができる。判定工程はまた、患者の代謝病プロファイルの分析を更に含むことができる。

【0010】

遺伝子サインは、TOP1、CD24及びSTAP1遺伝子の群から選択される任意の2つの遺伝子又は3つ全ての遺伝子を含むことができる。1つの実施形態では、遺伝子サインは、TOP1、CD24及びSTAP1遺伝子の群から選択される1つ以上の遺伝子と、表1又は6に列挙される遺伝子から選択される1つ以上の遺伝子と、を含むことができる。

10

【0011】

患者は、正常なBMIを有し得る。糖尿病状態は、糖尿病前症状態又は2型糖尿病状態であり得る。

【0012】

試験試料は、血液試料、又は、PBMC若しくはCD11c⁺若しくはCD11b⁺若しくはEmr⁺若しくは[CD11b⁺CD11c⁺]若しくは[Emr⁺CD11b⁺]若しくは[Emr⁺CD11c⁺]若しくは[Emr⁺CD11b⁺CD11c⁺]細胞若しくはCD14⁺単球を含有する試験試料であり得る。

20

【0013】

測定工程は、リアルタイムPCR、免疫化学的アッセイ又は特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションを伴うことができる。

【0014】

別の実施形態では、患者における真性糖尿病の診断のための方法が記載され、この方法は、(a)患者から採取された試験試料を提供する工程、(b)TULP4、AA741300、ESCO1、EIF5B、ACTR2、WNK1、COCH、SON、TPR及びNOG遺伝子の群から選択される遺伝子を含む遺伝子サインの遺伝子発現プロファイルを測定する工程、(c)遺伝子発現プロファイルを遺伝子サインの診断用遺伝子発現プロファイルと比較する工程、(d)遺伝子発現プロファイルと診断用遺伝子発現プロファイルとの間の実質的な一致に少なくとも部分的に基づいて患者における糖尿病状態を判定する工程と、(e)判定を医療専門家に表示する工程と、を含む。

30

【0015】

判定工程は、遺伝子発現シグナルの線形結合、線形回帰モデル、ロジスティック回帰モデル、線形判別分析(LDA)モデル、最近接モデル及びマイクロアレイの予測分析(PAM)の群から選択される1つ以上のアルゴリズムを実行するコンピュータシステムにより、遂行することができる。判定工程はまた、患者の代謝病プロファイルの分析を更に含むことができる。

【0016】

遺伝子サインは、TULP4、AA741300、ESCO1、EIF5B、ACTR2、WNK1、COCH、SON、TPR及びNOG遺伝子の群から選択される任意の2つの遺伝子又は任意の3つの遺伝子を含むことができる。1つの態様では、遺伝子サインは、TULP4、AA741300、ESCO1、EIF5B、ACTR2、WNK1、COCH、SON、TPR及びNOG遺伝子を含む。1つの態様では、遺伝子サインは、TULP4、AA741300、ESCO1、EIF5B、ACTR2、WNK1、COCH、SON、TPR及びNOG遺伝子の群から選択される少なくとも1つの遺伝子に加えて、TOP1、CD24及びSTAP1遺伝子を含む。別の態様では、遺伝子サインは、TULP4、AA741300、ESCO1、EIF5B、ACTR2、WNK1、COCH、SON、TPR及びNOG遺伝子の群から選択される1つ以上の遺伝子と、表1又は6に列挙される遺伝子から選択される1つ以上の遺伝子と、を含む。

40

50

【0017】

患者は、正常なBMIを有し得る。糖尿病状態は、糖尿病前状態又は2型糖尿病状態であり得る。

【0018】

試験試料は、血液試料、又は、PBMC若しくはCD11c⁺若しくはCD11b⁺若しくはEmr⁺若しくは[CD11b⁺CD11c⁺]若しくは[Emr⁺CD11b⁺]若しくは[Emr⁺CD11c⁺]若しくは[Emr⁺CD11b⁺CD11c⁺]細胞若しくはCD14⁺単球を含有する試験試料であり得る。

【0019】

測定工程は、リアルタイムPCR、免疫化学的アッセイ又は特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションを伴うことができる。

10

【0020】

1つの実施形態では、患者における真性糖尿病の診断のための方法が記載され、この方法は、(a)患者から採取された試験試料を提供する工程、(b)TCF7L2及びCLC遺伝子を含む遺伝子サインの遺伝子発現プロファイルを測定する工程、(c)遺伝子発現プロファイルを遺伝子サインの診断用遺伝子発現プロファイルと比較する工程、(d)遺伝子発現プロファイルと診断用遺伝子発現プロファイルとの間の実質的な一致に少なくとも部分的に基づいて患者における糖尿病状態を判定する工程と、(e)判定を医療専門家に表示する工程と、を含む。

【0021】

20

判定工程は、遺伝子発現シグナルの線形結合、線形回帰モデル、ロジスティック回帰モデル、線形判別分析(LDA)モデル、最近接モデル及びマイクロアレイの予測分析(PAM)の群から選択される1つ以上のアルゴリズムを実行するコンピュータシステムにより、遂行することができる。判定工程はまた、患者の代謝病プロファイルの分析も含むことができる。

【0022】

遺伝子サインは、TCF7L2又はCLCのいずれかの遺伝子を含むことができる。1つの態様では、遺伝子サインは、TCF7L2又はCLC遺伝子の1つ以上の変異型を含む。1つの態様では、遺伝子サインは、TCF7L2又はCLCのいずれかの遺伝子と、表1又は6に列挙される遺伝子から選択される1つ以上の遺伝子と、を含む。

30

【0023】

患者は、正常なBMIを有し得る。糖尿病状態は、糖尿病前状態又は2型糖尿病状態であり得る。

【0024】

試験試料は、血液試料、又は、PBMC若しくはCD11c⁺若しくはCD11b⁺若しくはEmr⁺若しくは[CD11b⁺CD11c⁺]若しくは[Emr⁺CD11b⁺]若しくは[Emr⁺CD11c⁺]若しくは[Emr⁺CD11b⁺CD11c⁺]細胞若しくはCD14⁺単球を含有する試験試料であり得る。

【0025】

測定工程は、リアルタイムPCR、免疫化学的アッセイ又は特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションを伴うことができる。

40

【0026】

1つの実施形態では、(a)第一時点で患者から採取された第一試験試料を準備する工程、(b)第一試験試料におけるTOP1、CD24及びSTAP1遺伝子の群から選択される遺伝子を含む遺伝子サインの第一発現プロファイルを測定する工程、(c)第二時点で患者から採取された第二試験試料を提供する工程、(d)第二試験試料における遺伝子サインの第二発現プロファイルを測定する工程、(e)第一発現プロファイルと第二発現プロファイルと比較する工程、(f)第一遺伝子発現プロファイルと第二遺伝子発現プロファイルとの間の実質的な差異に少なくとも部分的に基づいて患者における糖尿病状態の変化を判定する工程と、(g)判定を医療専門家に表示する工程と、を含む、患者の糖

50

尿病状態における変化を診断するための方法が記載される。

【0027】

1つの態様では、判定工程は、遺伝子発現シグナルの線形結合、線形回帰モデル、ロジスティック回帰モデル、線形判別分析(LDA)モデル、最近接モデル及びマイクロアレイの予測分析(PAM)の群から選択される1つ以上のアルゴリズムを実行するコンピュータシステムにより、遂行される。別の態様では、判定工程はまた、患者の代謝病プロファイルの分析も含む。

【0028】

遺伝子サインは、TOP1、CD24及びSTAP1遺伝子の群から選択される任意の2つの遺伝子を含むことができる。1つの態様では、遺伝子サインは、TOP1、CD24及びSTAP1遺伝子を含む。別の態様では、遺伝子サインは、TOP1、CD24及びSTAP1遺伝子の群から選択される1つの遺伝子と、表1又は6に列挙される遺伝子から選択される1つ以上の遺伝子と、を含む。

10

【0029】

1つの態様では、第一時点と第二時点との間の期間は、0~2年又は1/4~2年又は1/2~2年又は2~5年又は5~10年若しくはそれ以上である。

【0030】

糖尿病状態における変化は、糖尿病前症状態又はII型糖尿病状態への進行を示すことができる。1つの態様では、第一時点の患者は、正常なBMIを有する。

【0031】

第一及び第二試験試料は、血液試料であり得る。1つの態様では、第一及び第二試験試料は、PBMC若しくはCD11c⁺若しくはCD11b⁺若しくはEmr⁺若しくは[CD11b⁺CD11c⁺]若しくは[Emr⁺CD11b⁺]若しくは[Emr⁺CD11c⁺]若しくは[Emr⁺CD11b⁺CD11c⁺]細胞若しくはCD14⁺単球を含有する試験試料であり得る。

20

【0032】

測定工程は、リアルタイムPCR、免疫化学的アッセイ又は特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションを伴うことができる。

【0033】

1つの実施形態では、(a)第一時点で患者から採取された第一試験試料を提供する工程、(b)第一試験試料におけるTULP4、AA741300、ESCO1、EIF5B、ACTR2、WNK1、COCH、SON、TPR及びNOG遺伝子の群から選択される遺伝子を含む遺伝子サインの第一発現プロファイルを測定する工程、(c)第二時点で患者から採取された第二試験試料を準備する工程、(d)第二試験試料における遺伝子サインの第二発現プロファイルを測定する工程、(e)第一発現プロファイルと第二発現プロファイルと比較する工程、(f)第一遺伝子発現プロファイルと第二遺伝子発現プロファイルとの間の実質的な差異に少なくとも部分的に基づいて患者における糖尿病状態の変化を判定する工程と、(g)判定を医療専門家に表示する工程と、を含む、患者の糖尿病状態における変化を診断するための方法が記載される。

30

【0034】

1つの態様では、判定工程は、遺伝子発現シグナルの線形結合、線形回帰モデル、ロジスティック回帰モデル、線形判別分析(LDA)モデル、最近接モデル及びマイクロアレイの予測分析(PAM)の群から選択される1つ以上のアルゴリズムを実行するコンピュータシステムにより、遂行される。別の態様では、判定工程はまた、患者の代謝病プロファイルの分析を更に含む。

40

【0035】

遺伝子サインは、TULP4、AA741300、ESCO1、EIF5B、ACTR2、WNK1、COCH、SON、TPR及びNOG遺伝子の群から選択される任意の2つの遺伝子を含むことができる。別の態様では、遺伝子サインは、TULP4、AA741300、ESCO1、EIF5B、ACTR2、WNK1、COCH、SON、TPR

50

及びNOG遺伝子の群から選択される任意の3つの遺伝子を含む。1つの態様では、遺伝子サインは、TULP4、AA741300、ESCO1、EIF5B、ACTR2、WNK1、COCH、SON、TPR及びNOG遺伝子を含む。別の態様では、遺伝子サインは、TULP4、AA741300、ESCO1、EIF5B、ACTR2、WNK1、COCH、SON、TPR及びNOG遺伝子の群から選択される1つ以上の遺伝子と、表1又は6に列挙される遺伝子から選択される1つ以上の遺伝子と、を含む。

【0036】

1つの態様では、第一時点と第二時点との間の期間は、0～2年又は1/4～2年又は1/2～2年又は2～5年又は5～10年又はそれ以上である。

【0037】

糖尿病状態における変化は、糖尿病前状態又はII型糖尿病状態への進行を示すことができる。1つの態様では、第一時点の患者は、正常なBMIを有する。

【0038】

第一及び第二試験試料は、血液試料であり得る。1つの態様では、第一及び第二試験試料は、PBMC若しくはCD11c⁺若しくはCD11b⁺若しくはEmr⁺若しくは[CD11b⁺CD11c⁺]若しくは[Emr⁺CD11b⁺]若しくは[Emr⁺CD11c⁺]若しくは[Emr⁺CD11b⁺CD11c⁺]細胞若しくはCD14⁺単球を含有する試験試料であり得る。

【0039】

測定工程は、リアルタイムPCR、免疫化学的アッセイ又は特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションを伴うことができる。

【0040】

別の実施形態では、患者の糖尿病に対する感受性を査定するためのキットが記載され、この査定は、試験装置により行われる。このキットは、(a)患者から試験試料を回収するための試薬と、(b)患者の試験試料におけるTCF7L2及びCLC遺伝子又はこれらの変異型を含む遺伝子サインの発現プロファイルを測定するための試薬と、を含む。

【0041】

工程(a)及び(b)の試薬は、複数回の試験に十分である。患者から試験試料を回収するための試薬は、滅菌容器の内にパッケージ化することができる。

【0042】

遺伝子サインは、TCF7L2及びCLC遺伝子の群から選択される1つ以上の遺伝子と、表1又は6の列挙から選択される1つ以上の遺伝子と、を含むことができる。

【0043】

試験試料は、血液試料であり得る。

【0044】

キットはまた、PBMCの単離のための試薬、又は、CD11c⁺若しくはCD11b⁺若しくはEmr⁺若しくは[CD11b⁺CD11c⁺]若しくは[Emr⁺CD11b⁺]若しくは[Emr⁺CD11c⁺]若しくは[Emr⁺CD11b⁺CD11c⁺]細胞の単離のための試薬、又は、CD14⁺単球の単離のための試薬、を含むことができる。遺伝子サインの発現プロファイルを測定するための試薬は、リアルタイムPCR試薬、免疫化学的アッセイ試薬又は特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション用であり得る。

【0045】

別の実施形態では、患者の糖尿病に対する感受性を査定するためのキットが記載され、この査定は、試験装置により行われる。このキットは、(a)患者から試験試料を回収するための試薬と、(b)患者の試験試料におけるTOP1、CD24及びSTAP1遺伝子又はこれらの変異型を含む遺伝子サインの発現プロファイルを測定するための試薬と、を含む。

【0046】

遺伝子サインは、TOP1、CD24及びSTAP1遺伝子の群から選択される任意の

10

20

30

40

50

2つの遺伝子を含むことができる。別の態様では、遺伝子サインは、TOP1、CD24及びSTAP1遺伝子の群から選択される1つ以上の遺伝子を含む。別の態様では、遺伝子サインは、TOP1、CD24及びSTAP1遺伝子の群から選択される1つ以上の遺伝子と、表1又は6の遺伝子の列挙から選択される1つ以上の遺伝子と、を含む。

【0047】

工程(a)及び(b)の試薬は、複数回の試験に十分である。患者から試験試料を回収するための試薬は、滅菌容器の内にパッケージ化することができる。

【0048】

試験試料は、血液試料であり得る。

【0049】

キットはまた、PBMCの単離のための試薬、又は、CD11c⁺若しくはCD11b⁺若しくはEmr⁺若しくは[CD11b⁺CD11c⁺]若しくは[Emr⁺CD11b⁺]若しくは[Emr⁺CD11c⁺]若しくは[Emr⁺CD11b⁺CD11c⁺]細胞の単離のための試薬、又は、CD14⁺単球の単離のための試薬、を含むことができる。遺伝子サインの発現プロファイルを測定するための試薬は、リアルタイムPCR試薬、免疫化学的アッセイ試薬又は特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション用であり得る。

【0050】

別の実施形態では、患者の糖尿病に対する感受性を査定するためのキットが記載され、この査定は、試験装置により行われる。このキットは、(a)患者から試験試料を回収するための試薬と、(b)患者の試験試料におけるTULP4、AA741300、ESCO1、EIF5B、ACTR2、WNK1、COCH、SON、TPR及びNOG遺伝子の群から選択される遺伝子又はこれらの変異型の遺伝子サインの発現プロファイルを測定するための試薬と、を含む。

【0051】

1つの態様では、遺伝子サインは、TULP4、AA741300、ESCO1、EIF5B、ACTR2、WNK1、COCH、SON、TPR及びNOG遺伝子の群から選択される1つ以上の遺伝子を含む。1つの態様では、遺伝子サインは、TULP4、AA741300、ESCO1、EIF5B、ACTR2、WNK1、COCH、SON、TPR及びNOG遺伝子の群から選択される2つ以上の遺伝子を含む。1つの態様では、遺伝子サインは、TULP4、AA741300、ESCO1、EIF5B、ACTR2、WNK1、COCH、SON、TPR及びNOG遺伝子の群から選択される3つ以上の遺伝子を含む。

【0052】

工程(a)及び(b)の試薬は、複数回の試験に十分である。患者から試験試料を回収するための試薬は、滅菌容器の内にパッケージ化することができる。

【0053】

遺伝子サインはまた、TULP4、AA741300、ESCO1、EIF5B、ACTR2、WNK1、COCH、SON、TPR及びNOG遺伝子の群から選択される1つ以上の遺伝子と、表1又は6の遺伝子の列挙から選択される1つ以上の遺伝子と、を含むことができる。

【0054】

試験試料は、血液試料であり得る。

【0055】

キットはまた、PBMCの単離のための試薬、又は、CD11c⁺若しくはCD11b⁺若しくはEmr⁺若しくは[CD11b⁺CD11c⁺]若しくは[Emr⁺CD11b⁺]若しくは[Emr⁺CD11c⁺]若しくは[Emr⁺CD11b⁺CD11c⁺]細胞の単離のための試薬、又は、CD14⁺単球の単離のための試薬、を含むことができる。遺伝子サインの発現プロファイルを測定するための試薬は、リアルタイムPCR試薬、免疫化学的アッセイ試薬又は特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション用で

10

20

30

40

50

あり得る。

【0056】

本出願は、この概要に開示される実施形態に限定されず、この分野における当業者の範囲内にある修正形態及び変形形態並びに「特許請求の範囲」により定義されるものを有効範囲とするという意図が、理解されるべきである。

【0057】

糖尿病前症状の早期診断のため及び糖尿病の進行の危険性にさらされている患者又は既に糖尿病にかかっている患者のモニタリングのための新規遺伝子サインなどの、前述した実施形態は、多くの利点を有する。本開示はまた、ポイントオブケア施設での医療関係者による血液試料の費用対効果に優れかつ迅速な試験のための試薬及び使用説明書を有するキットも記載する。

10

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1】第一の実施形態による、OGTTと比較したCLC遺伝子のROC曲線解析。

【図2A】第二の実施形態による、OGTTと比較したTCF7L2のセット1のROC曲線解析。

【図2B】第三の実施形態による、FPGに対する、OGTT vs. FPGと比較したTCF7L2のセット1のROC曲線解析。

【図3】第四の実施形態による、CDKN1C遺伝子のROC曲線解析。

【図4A】第五の実施形態による、OGTTと比較した3つの遺伝子サインのROC曲線解析。

20

【図4B】第六の実施形態による、FPG vs. OGTTと比較した3つの遺伝子サインのROC曲線解析。

【図4C】第七の実施形態による、3つの遺伝子サインの平均発現の棒グラフ。

【図5A】第八の実施形態による、OGTTと比較した10個の遺伝子サインのROC曲線解析。

【図5B】第九の実施形態による、FPG vs. OGTTと比較した10個の遺伝子サインのROC曲線解析。

【図5C】第十の実施形態による、10個の遺伝子サインの平均発現の棒グラフ。

【0059】

30

〔詳細な説明〕

別段の規定がない限り、本明細書及び特許請求の範囲で使用される全ての技術及び科学用語は、当業者によって一般的に理解されている意味と同一の意味を有する。以下の定義は、本開示及び本出願の特許請求の範囲を解釈するのに助けるために提供される。このセクションでの定義と他所での定義とが一致しない場合には、このセクションに記載の定義が制御する。

【0060】

更には、本発明の実践は、特に指示がない限り、当該技術分野の範囲内で、従来の分子生物学的及び免疫学的技術を採用する。このような技術は、当業者に周知であり、文献で詳細に説明されている。例えば、コリガン (Coligan)、ダン (Dunn)、プロー (Ploegh)、スパイヘル (Speicher) 及びウィングフィールド (Wingfield) 「タンパク質科学の最新プロトコル (Current protocols in Protein Science)」 (1999 ~ 2008年、第I及びII巻、全ての補足も含む、ジョン・ワイリー & サンズ社 (John Wiley & Sons Inc.))、並びに、ベイリー, J. E. (Bailey, J. E.) 及びオリス, D. F. (Ollis, D. F.) 「生物化学工学の基礎 (Biochemical Engineering Fundamentals)」 (マグローヒル・ブック社 (McGraw-Hill Book Company)、ニューヨーク、1986年)、アウスベル (Ausubel) ら編「分子生物学における最新プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)」 (ジョン・ワイリー & サンズ社、ニューヨーク州ニューヨーク、1987 ~ 2008年、全ての補足も含む)、サムブルック (Sambrook) ら編「分子クローニング: 実験室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」 (第二版、コー

40

50

ルド・スプリング・ハーバー (Cold Spring Harbor)、ニューヨーク、1989年)、並びに、ハーロウ (Harlow) 及びレイン (Lane) 「抗体、実験室マニュアル (Antibodies, a Laboratory Manual)」(コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク、1989年)を参照されたい。ROC解析は、トム・フォーセット (Tom Fawcett) による「ROC解析総論 (An Introduction to ROC Analysis)」(パターン・レコグニション・レターズ (Pattern Recognition Letters) 27巻、2006年、861~874頁)にレビューされている。

【0061】

本明細書で使用するとき、「真性糖尿病」とは、高濃度の血中グルコース (高血糖症) により特徴付けられるあらゆる病気を指す。真性糖尿病は、以下のいずれか1つを実証することにより、診断される。126 mg/dL (7.0 mmol/L) 以上の空腹時血漿グルコース濃度、又は、グルコース負荷試験若しくは高血糖症の症状などで75gの経口グルコース負荷の2時間後における200 mg/dL (11.1 mmol/L) 以上の血漿グルコース、並びに、200 mg/dL (11.1 mmol/L) 以上の随時血漿グルコース。

10

【0062】

本明細書で使用するとき、糖尿病とは、小児期発症型糖尿病、若年型糖尿病及びインスリン依存型糖尿病 (IDDM) としても知られる「1型糖尿病」、又は、成人型糖尿病、肥満関連糖尿病及びインスリン非依存型糖尿病 (NIDDM) としても知られる「2型糖尿病」、又は、妊娠糖尿病、インスリン抵抗性1型糖尿病 (すなわち「二重糖尿病」)、成人性潜伏型自己免疫性糖尿病 (すなわち、LADA)、及び、30歳前に2型糖尿病として存在する強い家族歴を有する一群のいくつかの1つの遺伝子の (一遺伝子性) 障害である若年発症成人型糖尿病 (MODY) が挙げられる他の形態の糖尿病を指す。

20

【0063】

本明細書で使用するとき、「糖尿病状態」とは、糖尿病前症状、糖尿病前症状よりも進行した病気の段階により特徴付けられる糖尿病中間状態、及び、I型又はII型糖尿病などの本明細書に定義されるような顕性糖尿病を特徴付ける病気状態を指す。

【0064】

本明細書で使用するとき、「糖尿病前症状」は、患者が空腹時グルコース濃度異常及びグルコース耐性異常を有するものである。空腹時グルコース異常は、100~125 mg/dL (6.1及び7.0 mmol/L) の血中グルコース濃度として定義される、すなわち空腹時グルコース異常である。75gの経口グルコース負荷の2時間後に、140 mg/dL すなわち7.8 mmol/L 以上であるが、200を超えない血漿グルコースを有する患者は、グルコース耐性異常を有すると考えられる。

30

【0065】

本明細書で使用するとき、「医療専門家」は、内科医又は訓練された医療技術者又はポイントオブケア施設における看護師である。

【0066】

「ポイントオブケア」施設は、病院内などの入院患者のいる所 (inpatient location)、又は、診療所若しくは立ち入り型クリニックなどの外来患者のいる所 (outpatient location) であり得る。1つの実施形態では、診断アッセイは、血液試料における遺伝子サイン発現プロファイルの分析のための器具と共に、消費者に対して商業的なキットとして、流通させてもよい。別の実施形態では、商業的なキットは、血中グルコース濃度のモニタリングのための器具及び試薬と組み合わせてもよい。

40

【0067】

用語「血中グルコース濃度」とは、血中のグルコースの濃度を指す。正常血中グルコース濃度 (正常血糖) は、およそ120 mg/dL である。この値は、糖尿病でない場合には、最大30 mg/dL で変動する。

【0068】

「高血糖症」 (高血糖) の状況は、血中グルコース濃度が高過ぎる状況である。典型的

50

には、高血糖症は、血中グルコース濃度が上昇して180mg/dlを超えるときに生じる。

【0069】

本明細書で使用するとき、「試験試料」は、糖尿病状態に反応して遺伝子を示差的に発現する細胞を含有する患者からの任意の生体試料である。この生体試料は、ヒトなどのアトピー性又は非アトピー性哺乳動物から単離される任意の生体材料であり得、血液、骨髓、血漿、血清、リンパ、脳脊髄液、又は、涙液、唾液若しくは乳液などの他の分泌液、組織若しくは器官の生検試料、又は培養細胞、の細胞構成成分が挙げられる。好ましくは、生体試料は、最小限の処置で患者から回収できる細胞試料である。好ましい実施形態では、試験試料は、血液試料、又は、PBM C（末梢血単核球細胞）若しくはCD14+単球若しくはCD11b+若しくはCD11c+若しくはEmr+細胞の調製物である。

10

【0070】

哺乳動物はヒトであってもよく、あるいは、家畜、コンパニオンアニマル又は動物園動物であってもよい。本明細書に記載される診断ツールは、ヒトの医療処置での使用に好適であることが特に想到されるが、これらはまた、イヌ及びネコなどのコンパニオンアニマル、ウマ、ウシ及びヒツジなどの家畜、又は、非ヒト霊長類、ネコ科動物、イヌ科動物、ウシ科動物及び有蹄動物などの動物園動物、の獣医学的処置にも適用可能である。

【0071】

本明細書に記載するとき、用語「遺伝子発現」とは、遺伝子にコード化されている遺伝子情報を遺伝子の「転写」を通じて（例えば、RNAポリメラーゼの酵素反応を介して）RNA（例えば、mRNA、rRNA、tRNA又はsnRNA）に、タンパク質に関してはコード化遺伝子をmRNAの「翻訳」を通じてタンパク質に、変換するプロセスを指す。

20

【0072】

「遺伝子発現プロファイル」とは、生体試料において発現した少なくとも1つのヌクレオチド又はタンパク質の同定された発現レベルを指す。

【0073】

本明細書で使用するとき、用語「プライマー」とは、自然に発生する（例えば、制限断片として）か又は合成的に産生されたかのいずれかのオリゴヌクレオチドを指し、これは、ヌクレオチドと、DNA依存性及びRNA依存性ポリメラーゼなどの、核酸重合のための作用剤とが存在する中で好適な条件下（例えば、緩衝液、塩、温度及びpH）に置かれたときに、核酸ストランド（鋳型又は標的配列）に相補的であるプライマー伸長生成物の合成開始点として作用することができる。プライマーは、重合のための作用剤の存在する中で、伸長生成物の合成を準備刺激するのに十分に長くなければならない。典型的なプライマーは、標的配列に対して実質的に相補的な又は相同の配列の少なくとも約10ヌクレオチドの長さを含むが、いくらかより長いプライマーが好ましい。通常のプライマーは、約15~26ヌクレオチドを含む。

30

【0074】

本明細書で使用するとき、「遺伝子サイン」とは、生体試料の一意的な識別子を提供する選択された遺伝子セットの遺伝子発現のパターンを指す。遺伝子サインは、選択された遺伝子セットの遺伝子発現のパターンが、糖尿病状態を有する患者から採取された参照試料における遺伝子サインに対する実質的な一致であるならば、糖尿病状態の特徴である。この出願の目的に関して、「遺伝子サイン」は、（遺伝子がタンパク質をコードする遺伝子であるならば）核酸又はポリペプチド配列の所定の組み合わせであり得る。遺伝子サインは、未知の機能を有する遺伝子、又は、rRNA、UsnRNA、microRNA又はtRNAが挙げられるが、これらに限定されないオープンリーディングフレームを有さない遺伝子を含み得る。

40

【0075】

本明細書で使用するとき、「診断用遺伝子発現プロファイル」とは、特定の病気状態と診断された患者から採取された生体試料における遺伝子サインの遺伝子発現プロファイル

50

を指す。病気状態は、糖尿病状態又は非糖尿病状態であり得る。患者からの試験遺伝子発現プロファイルと糖尿病状態を特徴付ける診断用遺伝子発現プロファイルとの間の「実質的な一致」は、患者が糖尿病状態を有することを示す。あるいは、患者からの試験遺伝子発現プロファイルと非糖尿病状態を特徴付ける診断用遺伝子発現プロファイルとの間の「実質的な一致」は、患者が糖尿病状態を有さないことを示す。

【0076】

本明細書で使用する時、遺伝子の「変異型」とは、これらのDNA配列が一般的な野生型遺伝子の核酸配列と比較されるときに、その遺伝子に少なくとも約75%同一、より好ましくは、少なくとも約85%同一、最も好ましくは、少なくとも約90%同一、更に好ましくは少なくとも約95~99%同一、である遺伝子配列を意味する。1つの実施形態では、遺伝子の変異型は、点変異若しくは単一ヌクレオチド多型、欠損、挿入、再構成、スプライス供与若しくは受容部位変異、及び偽遺伝子の特徴を示す遺伝子変異が挙げられるが、これらに限定されない遺伝子のDNA配列における1つ以上の変異を有する遺伝子である。本出願を通して、遺伝子は、暗黙的に、本明細書に記載されているように遺伝子の野生型及び変異型形態の両方を含む。

10

【0077】

本明細書で使用する時、「実質的な一致」とは、定義された病気状態を有する患者から採取された参照試料における遺伝子サインの遺伝子発現プロファイルとの、試験試料における遺伝子サインの遺伝子発現プロファイルの比較を指す。発現プロファイルは、試験試料及び参照試料における遺伝子サインの発現が実質的に同一のレベルである、すなわち、試料の正規化後に試料間に統計的有意差が存在しない、ならば、「実質的に一致する」。1つの実施形態では、実質的に一致している発現プロファイルの信頼区間は、少なくとも約50%、又は約50%~約75%、又は約75%~約80%、又は約80%~約85%、又は約85%~約90%、又は約90%~約95%である。好ましい実施形態では、実質的に一致している発現プロファイルの信頼区間は、約95%~約100%である。別の好ましい実施形態では、実質的に一致している発現プロファイルの信頼区間は、約95%~約100%の間の任意の数である。別の好ましい実施形態では、実質的に一致している発現プロファイルの信頼区間は、約95%又は約96%又は約97%又は約98%又は約99%又は約99.9%である。

20

【0078】

本明細書で使用する時、「実質的な差異」とは、ある時点での遺伝子の遺伝子発現プロファイルと第二時点での同一の遺伝子サインの遺伝子発現プロファイルにおける差異を指す。発現プロファイルは、第一及び第二時点での遺伝子サインの発現が異なるレベルにある、すなわち、試料の正規化後に試料間に統計的有意差が存在する、ならば、「実質的に異なる」。1つの実施形態では、発現プロファイルは、第一及び第二時点での遺伝子サインの発現が計算された信頼区間の外側にあるならば、「実質的に異なる」。1つの実施形態では、実質的に異なる発現プロファイルの信頼区間は、約50%未満、又は約75%未満、又は約80%未満、又は約85%未満、又は約90%未満、又は約95%未満である。

30

【0079】

95%信頼区間CIは、 $AUC + 1.96 \times AUC$ の標準誤差に等しい(式中、AUCは、ROC曲線の下面積である)。

40

【0080】

本明細書で使用する時、「ROC」とは、受信者動作特性、又は単にROC曲線を指し、これは、識別閾値が変動するような二元識別系のための、(1-特異度)に対する感度のグラフ表示である。

【0081】

本明細書で使用する時、用語「診断」又は「診断する」とは、1つの糖尿病状態を別の糖尿病状態から区別する、又は、糖尿病状態が「正常」若しくは「非糖尿病」(非アトピー性)状態と比較して患者(アトピー性)に存在するかどうかを判定する、及び/又は

50

、糖尿病状態の性質を判定する方法を指す。

【0082】

本明細書で使用するとき、「糖尿病状態を判定する」とは、糖尿病状態若しくは状況で患者を診断するのに、及び/又は、病気を分類するのに、有用である情報全ての統合を指す。この情報には、家族歴、ヒト遺伝子データ、BMI、身体活動性、代謝病プロファイル、及び、患者から採取された試験試料における1つ以上の遺伝子サインの発現プロファイルの統計分析の結果が挙げられるが、これらに限定されない。ポイントオブケア環境において、この情報は、適切なデータ解析ソフトウェアを有するコンピュータシステムにより解析され、表示される。臨床データの統合は、主治医に、患者が糖尿病状況を有するかどうかを判定するのに必要な情報、糖尿病の性質又は分類に関連する情報、並びに、予後

10

【0083】

本明細書で使用するとき、「代謝病プロファイル」とは、任意の数の標準的な代謝測定値、及び、空腹時血漿グルコース、インスリン、プロインスリン、c-ペプチド、インタクトインスリン、BMI、胴囲、GLP-1、アディポネクチン、PAI-1、ヘモグロビンA1c、HDL、LDL、VLDL、トリグリセリド、遊離脂肪酸が挙げられるがこれらに限定されない糖尿病状態の特徴であり得る他の危険因子を指す。代謝病プロファイルを使用して、2時間OGTTについての分類等価性に関する優れたモデルを作ることができる。

20

【0084】

グルコース負荷試験は、どれだけ迅速にグルコースが血液から一掃されるかを判定するための、グルコースの投与である。この試験は、通常、糖尿病、インスリン耐性について、及び時に反応性低血糖症についての試験に使用される。グルコースは、ほとんどの場合、経口で与えられ、それゆえに、一般的な試験は技術的に、経口グルコース負荷試験(OGTT)である。

【0085】

空腹時血漿グルコース試験(FPG)は、絶食後に血漿又は血中グルコース濃度を測定する炭水化物代謝試験である。絶食の刺激により、グルカゴンというホルモンが放出され、これは、今度は血漿グルコース濃度を上昇させる。糖尿病にかかっていない人々の場合、体は、インスリンを産生及び処理して、グルコース濃度の上昇を相殺する。糖尿病にかかっている人々の場合、これが生じず、試験されたグルコース濃度は高いままである。

30

【0086】

本明細書で使用するとき、ボディマス指数(BMI)又はケトラー指数は、ヒトの体重と身長とを比較する統計的測定値である。その測定及び計算の容易さに起因して、これは肥満度を同定するのに最も広く使用されている診断ツールである。

【0087】

本明細書で使用するとき、NGTとはグルコース耐性正常を意味し、IGTとはグルコース耐性異常を意味し、T2Dとは2型糖尿病を意味する。

40

【0088】

本明細書で使用するとき、CD11c⁺、CD11b⁺及びEmr⁺は、ヒト単球/マクロファージ及び骨髄細胞及びこれらの前駆体の細胞表面マーカーである。マウスで最も一般的に使用される単球/マクロファージ及び骨髄細胞表面マーカーは、F4/80及びCD11bであるが、F4/80及びCD11b抗体は、それぞれ、好酸球並びに樹状細胞並びにNK及び他のT及びB細胞亜型と反応することが報告されている(グエン(Nguyen)ら(2007)ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J Biol Chem) 282巻、35279~35292頁、パチョーリ(Patsouris)ら(2008)セル・メタボリズム(Cell Metab.) 8巻、301~309頁)。マウスにおけるF4/80遺伝子は、ヒトEmr1遺伝子についてのオルソログである。マウスCD11c遺伝子につ

50

いてのヒトオルソログは、ITGAXであり、また、インテグリン、X（補体成分3受容体4サブユニット）、SLEB6、OTTHUMP00000163299；leuM5、サブユニット；白血球表面抗原p150、95、サブユニット；骨髄膜抗原、サブユニット；p150 95インテグリン鎖（染色体：16；位置：16p11.2アノテーション：染色体16、NC_000016.8（31274010...31301819）MIM：151510、遺伝子ID：3687）とも呼ばれる。マウスCD11b遺伝子についてのヒトオルソログは、ITGAM又はインテグリン、M（補体成分3受容体3サブユニット）であり、また、CD11B、CR3A、MAC-1、MAC1A、MGC117044、MO1A、SLEB6、マクロファージ抗原ポリペプチド；好中球接着因子受容体-Mサブユニット（染色体：16；位置：16p11.2染色体16、NC_000016.8（31178789...31251714）、MIM：120980、遺伝子ID：3684）とも呼ばれる。CD11c⁺、CD11b⁺及びEmr⁺並びにCD14⁺細胞を、適切なヒト血液細胞単離キット（ステムセル・テクノロジー（StemCell Technologies））を使用するポジティブセレクションにより、PBMCから純化することができる。次に、単離された細胞集団の純度（>85%）は、適切な細胞表面マーカーに対する、蛍光剤を結合させた抗体（バイオレジェンド（BioLegend））でのフローサイトメトリー染色により確認される。

10

【0089】

本明細書で使用する時、「リアルタイムPCR」とは、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応を指し、また、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（Q-PCR/qPCR）又は速度論的ポリメラーゼ連鎖反応とも呼ばれる。リアルタイムPCRは、ポリメラーゼ連鎖反応に基づく実験技術であり、これは、標的DNA分子を増幅し、同時に定量するために使用される。これにより、DNA試料内の特定の配列の検出及び定量（インプットされたDNAに対して正規化される時又は遺伝子の追加的な正規化の際に、コピー又は相対量の絶対数として）の両方を可能にする。

20

【0090】

本明細書で使用する時、免疫化学的アッセイは、抗体の、その抗原に対する反応を使用して、細胞抽出物中の物質の濃度を測定する生化学的試験である。本開示では、抗原は、遺伝子サインを含む、タンパク質をコードする遺伝子のいずれかにより発現されるタンパク質である。好ましい実施形態では、免疫化学的アッセイは、酵素結合免疫吸着法（ELISA）である。

30

【0091】

本明細書で使用する時、「特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション」とは、チップなどの固体担体上のプローブ配列と患者の試験試料内の転写産物から生じたcDNA配列との間でのハイブリダイゼーションを指す。この2つの核酸配列が実質的に相補的であれば、ハイブリダイゼーションは生じ、これは試験試料中のcDNA配列の量に正比例する。次に、ハイブリダイゼーションの検出が、当該技術分野において周知の技術を使用して達成される。数多くの要因が、2つの核酸のハイブリダイゼーションの効率性及び選択性、例えば、標的核酸配列に対してのアレイ上の核酸メンバーに影響する。これらの要因には、核酸メンバーの長さ、ヌクレオチド配列及び/又は組成、ハイブリダイゼーション温度、緩衝組成物、並びに、核酸メンバーがハイブリッド化に必要とされる領域での立体障害についての可能性が挙げられる。正の相関関係が、核酸メンバーの長さ、核酸メンバーが標的配列をアニーリングする効率性及び選択性の両方との間に存在する。特に、より長い配列は、より短いものよりも高い融解温度（TM）を有し、所与の標的配列内で繰り返されにくく、これにより乱交雑ハイブリダイゼーションを最小化する。ハイブリダイゼーション温度は、核酸メンバーアニーリング効率性に反比例して変動し、ハイブリダイゼーション混合物中に含まれ得る有機溶媒、例えば、ホルムアミドの濃度も同様であるが、一方で塩濃度における増加は、結合を促進する。厳密なハイブリダイゼーション条件下でより長い核酸は、より短いものよりも効率的にハイブリッド化し、これはより許容的な条件下でも十分である。

40

50

【 0 0 9 2 】

本明細書で使用するとき、用語「抗体」は、ポリクローナル及びモノクローナル抗体の両方を含み、インタクトな分子、これらの断片（Fv、Fd、Fab、Fab'及びF(ab)'₂断片など）、あるいは、インタクトな分子及び/又は断片の多量体又は凝集体であり得、例えば、免疫付与、合成又は遺伝子工学により、事実上生じ得るか又は産生される。

【 0 0 9 3 】

本明細書で使用するとき、表1、7、8、9、10A及び10Bにおけるプローブについての全ての参照は、ジェネチップ・ヒトゲノムU133プラス2.0アレイ（the Gene Chip Human Genome U133 Plus 2.0 Array）に提示されているプローブセットを指す。

10

【 0 0 9 4 】

以下の説明は、本出願の特定の実施形態、及び、患者における糖尿病を診断するための特定の方法に関する。特に、本出願は、糖尿病状態に關与すると従来は考えられていなかったいくつかを含む、多数の遺伝子が、糖尿病状態を有さない患者と比較して、糖尿病又は糖尿病前症状態を有する患者からの末梢血単核球細胞（PMBC）において示差的に発現されることを開示する。

【 0 0 9 5 】

1つの実施形態では、NGT及びT2DのPMBCにおいて示差的に発現される遺伝子は、マイクロアレイ分析を使用して同定される。NGT及びT2D患者（本実施例では、107人の患者のコホート）のPMBCからの転写産物は、アフィメトリクス・ヒトゲノムHG-U133プラス2チップ（the Affymetrix Human Genome HG-U133Plus2 chip）を製造者の教示に従って使用して、最初にスクリーニングされる。およそ200の示差的に発現される遺伝子が選択され、これはマイクロアレイの有意性分析（SAM）プログラムを使用して、NGTとT2Dとの間で、フォールス・ディスカバリー・レート（False Discovery Rate）、FDR < 20%、倍率変化 > 1.7を有した（表1を参照されたい）。

20

【 0 0 9 6 】

ここで、糖尿病分類の方法は、最初のマイクロアレイスクリーンで同定された糖尿病感受性遺伝子の異なる組み合わせの示差的な発現を判定することにより、記述される（表12Aを参照されたい）。表12Aはまた、選択された遺伝子のそれぞれのジェンバンクアクセス番号（Genbank Accession Number）も含む。

30

【 0 0 9 7 】

糖尿病感受性遺伝子の遺伝子発現は、多数の異なる技術を使用して生体試料において測定され得る。例えば、種々のmRNAの混合物内での糖尿病関連遺伝子からのmRNAの同定は、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）及び検出可能部分で標識されたオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブの使用により都合よく達成される。

【 0 0 9 8 】

まず、試験試料が患者から回収される。良質なRNAを得るためには、細胞溶解中に遊離するRNAアーゼの活性を最小化することが必要である。これは、通常、組織を破壊し、同時にRNAアーゼを不活性化又は抑制する単離法により達成される。内因性リボヌクレアーゼが少ない試料に対して、単離プロトコルは、一般に、膜を可溶化するための洗浄剤と、胎盤リボヌクレアーゼ抑制剤又はパナジル・リボヌクレオシド複合体などのRNAアーゼの抑制剤とを含有する抽出緩衝液を使用する。内因性リボヌクレアーゼに富むインタクトな組織又は細胞などのより困難な試料からのRNA単離は、より積極的なアプローチを必要とする。これらの場合、組織又は細胞は、強力なタンパク質変性剤（通常、グアニジンイソチオシアネート）の中で迅速にホモジナイズされて、ヌクレアーゼを不可逆的に不活性化し、細胞膜を可溶化する。組織試料を直ちにホモジナイズすることができないならば、液体窒素中での浸漬により迅速に凍結させ、-80で保存しなければならない。このやり方で凍結させた試料は、RNA単離に先立って決して解凍させてはならず、そうでないと、このRNAは、凍結時に生じる細胞溶解中に遊離したRNAアーゼにより迅速に分解

40

50

される。この組織は、液体窒素のプール内に浸漬され、乳鉢及び乳棒を使用して微細な粉末に粉碎されなければならない。いったん粉末化されたら、依然として凍結している組織は、RNA抽出緩衝液中でホモジナイズされる。RNA単離用の多数のキットが、現在、市販されている（アンピオン（Ambion）、キアゲン（Quiagen））。

【0099】

当該技術分野において周知であるように、cDNAは、まず、RNA依存性DNAポリメラーゼ及びプライマーを使用して、鋳型mRNAからcDNAの第一ストランドを第一に逆転写することにより生じる。本出願による有用な逆転写酵素には、HIV、HTLV-1、HTLV-II、FELV、FIV、SIV、AMV、MMTV、MoMuLV及び他のレトロウイルスからの逆転写酵素が挙げられるが、これらに限定されない（レビューに関しては、例えば、レビン（Levin）、1997年、セル（Cell）88巻：5～8頁、バーマ（Verma）、1977年、バイオケミカ・エ・バイオフィジカ・アクタ（Biochim. Biophys. Acta）473巻：1～38頁、ウー（Wu）ら、1975年、CRCクリティカル・レビューズ・イン・バイオケミストリー（CRC Crit. Rev. Biochem.）3巻：289～347頁を参照されたい）。より最近では、多数のキットが、熱安定性逆転写酵素を使用するRT-PCR反応のために現在、市販され、例えば、ジェンアンプ（GeneAmp）（登録商標）熱安定性rTth逆転写酵素RNA PCRキット（Thermostable rTth Reverse Transcriptase RNA PCR Kit）（アプライド・バイオシステムズ（Applied Biosystems））が挙げられる。

【0100】

本明細書で使用されるとき、「ポリメラーゼ連鎖反応」又は「PCR」とは、米国特許第4,683,202号、同第4,683,195号、同第4,800,159号及び同第4,965,188号（その内容は、それらの全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるようなインビトロでの所望のヌクレオチド配列の増幅のための方法を通常指す。PCR反応は、繰り返される一連の温度サイクルを伴い、典型的には、10～100μLの体積で行われる。反応混合物は、dNTP（4つのデオキシヌクレオチド、dATP、dCTP、dGTP及びdTTPのそれぞれ）、プライマー、緩衝液、DNAポリメラーゼ及び核酸鋳型を含む。PCR反応は、第一プライマーが核酸鋳型配列の1つのストランド内のある領域に相補的な配列を含有して相補的なDNAストランドの合成を準備刺激し、第二プライマーが標的核酸配列の第二ストランド内のある領域に相補的な配列を含有して相補的なDNAストランドの合成を準備刺激するポリヌクレオチドプライマーのセットを準備することと、(i)鋳型配列内に含有される標的核酸配列に対しての増幅に必要とされるプライマーのアニーリング工程、(ii)核酸ポリメラーゼがプライマー伸長産物を合成するプライマーを伸長する工程の、PCRサイクル工程に対して許容的である条件下で、鋳型依存性重合剤として核酸ポリメラーゼを採用する核酸鋳型配列を増幅することと、を含む。

【0101】

増幅の他の方法には、リガーゼ連鎖反応（LCR）、ポリヌクレオチドに特異的に基づく増幅（NSBA）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0102】

プライマーは、核酸関心領域に関わる当業者により、容易に設計及び合成することができる。本出願に使用するのに好適なプライマーは、任意の好適な方法を使用して設計することが理解される。PCRのためのプライマー選択は、例えば、米国特許第6,898,531号（2005年5月24日発行、表題「プライマー対の選択のためのアルゴリズム（Algorithms for Selection of Primer Pairs）」）及び米国特許出願第10/236,480号（2002年9月5日出願）に記載されており、短範囲PCR（short-range PCR）については、米国特許出願第10/341,832号（2003年1月14日出願）がプライマー選択に関してのガイダンスを提供している。また、「オリゴ（Oligo）」、レーザージーン（LASERGENE）（登録商標）、プライマー・プレミア（primer premier）5（プレミア・バイオソフト（Premier Biosoft）社のウェブサイトにおいて入手可能

）及びプライマー（primer）3（ホワイトヘッド・インスティテュート・フォー・バイオメディカル・リサーチ（Whitehead Institute for Biomedical Research）（米国マサチューセッツ州ケンブリッジ（Cambridge））のウェブサイトにおいて入手可能）などの公に入手可能なプログラムが存在する。プライマー設計は、使用されるハイブリダイゼーション条件に最適な融解温度（ T_m ）及びオリゴヌクレオチドプローブの所望の長さなどの多数のパラメータに基づく。更に、オリゴヌクレオチド設計は、ヘアピン構造及びプローブ間のダイマーなどの、分子が含有し得る潜在的な第二の構造を最小化するように試行し、目標は、ハイブリダイゼーションのために得られるプローブの入手可能性を最大化することである。好ましい実施形態では、PCR法で使用されるプライマーは、cDNA鋳型内のヌクレオチド配列に相補的であり、好ましくはエクソン-イントロン境界領域を横断する。

10

【0103】

1つの実施形態では、PCR反応は、ネステッドPCRプライマーを使用することができる。

【0104】

1つの実施形態では、検出可能な標識が、増幅反応に含まれ得る。好適な標識には、蛍光色素、例えば、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ローダミン、テキサスレッド（Texas Red）、フィリコエリトリン、アロフィコシアニン、6-カルボキシカルボキシフルオセイン（6-FAM）、2', 7'-ジメトキシ-4', 5'-ジクロロ-6-カルボキシフルオレスセイン（JOE）、6-カルボキシ-X-ローダミン（ROX）、6-カルボキシ-2', 4', 7', 4, 7-ヘキサクロロフルオレセイン（HEX）、5-カルボキシフルオレスセイン（5-FAM）又はN, N, N', N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン（TAMRA）、放射能活性標識、例えば、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 3H 、並びに、他のものが挙げられる。標識は、二段階システムであってもよく、このシステムでは、増幅されたDNAが、例えば、アビジン、特定の抗体などの高親和性結合パートナーを有するビオチン、ヘプテン、又は同類のものに結合され、この結合パートナーは検出可能な標識に結合される。標識は、プライマーの一方又は両方に結合され得る。あるいは、増幅に使用されるヌクレオチドのプールが、標識を増幅産物に組み込むために標識される。

20

【0105】

特に好ましい実施形態では、本出願は、米国特許第6,140,054号及び同第6,174,670号（これらも参照により全体が本明細書に組み込まれる）に開示されているようなFRETプローブの使用などのアッセイシステムを利用するために、PCRとハイブリダイゼーションプローブを組み合わせたシステムを利用する。その最も単純な構成の1つでは、FRET、すなわち「蛍光共鳴エネルギー移動」アプローチは、増幅される核酸の同一のストランド上で近接部位を結合する2つのオリゴヌクレオチドを採用する。一方のオリゴヌクレオチドは、第一波長の光を吸収し、それに応じて光を放出するドナー蛍光色素分子で標識され、第二のものは、第一のドナーの発光に応じて蛍光発光できる（しかしながら、実質的には第一のドナーを励起する光源によるのではなく、また、その放出は第一蛍光色素分子のものとは識別することができる）アクセプター蛍光色素分子で標識される。この構成では、第二すなわちアクセプター蛍光色素分子は、2つのオリゴヌクレオチドが、これらが増幅される核酸上の近接部位に対してハイブリッド化する場合、例えば、PCRのアニーリング局面において、ごく近接するようになる際に生じるような、それが第一すなわちドナー蛍光色素分子にごく近接しているときに、蛍光発生複合体を形成して、蛍光発光の実質的な増加を示す。より多くの増幅される核酸が累積するにつれて、それだけ多くの蛍光発生複合体が形成され得、アクセプタープローブからの蛍光発光の増加が見られ、これは測定することができる。したがって、この方法により、形成される際の産物の量の検出が可能になる。

30

40

【0106】

増幅の検出が当該技術分野における多数の手段を使用して、例えば、PCR反応でタッ

50

クマン (TaqMan) (商標) ハイブリダイゼーションプローブを、いったん十分な増幅が生じたら標的拡散に特異的な蛍光発光の測定を使用して実施できることが、当業者により理解される。タックマン・リアルタイムPCRは、従来のPCRでのような終点でよりも、むしろ指数関数的段階の間に、蛍光色素分子を介して産物の累積を測定する。産物の指数関数的増大を使用して、閾値サイクル、CT、すなわち、PCRサイクルの数を測定し、この数で蛍光発光の有意な指数関数的増大が検出され、この数は、反応において存在するDNA鋳型のコピーの数に直接相互に関連付けられる。

【0107】

しかしながら、タックマンのアプローチに基づくもの(米国特許第5,538,848号及び同第5,691,146号(これらの全体が参照により本明細書に組み込まれる)を参照されたい)、蛍光偏光アッセイ(例えば、ギブソン(Gibson)ら、1997年、クリニカル・ケミストリー(Clin Chem.)43巻:1336~1341頁)及びインベーターアッセイ(例えば、アガーワル(Agarwal)ら、ダイアグノスティック・モルキュラー・パソロジー(Diagnostic)、2000年9月、9巻(3号):158~164頁、ライアン,D(Ryan D)ら、モルキュラー・ダイアグノシス(Mol Diagn)、1999年6月、4巻(2号):135~144頁)などの他の同様な定量的「リアルタイム」及び均一核酸増幅/検出システムが存在することに当業者であれば気付くであろう。このようなシステムもまた、この記載されている出願での使用に適応可能であり、核酸増幅のリアルタイムモニタリングを可能にする。

【0108】

本出願の別の実施形態では、マトリックス又はマイクロチップは、それぞれが既知の配列のオリゴヌクレオチドを含有する遺伝子座のアレイを含有するように作製される。本開示では、各遺伝子座は、糖尿病感受性遺伝子の所望の部分に対して相補的な配列を含有するように合成されたモル過剰の選択された固定化合成オリゴマーを含有する。PBM C中に存在する糖尿病感受性遺伝子の転写産物は、本明細書に記載されているように、RT-PCRにより増幅され、標識される。次に、マイクロチップ上のオリゴマーは、標識されたRT-PCR増幅糖尿病感受性遺伝子核酸でハイブリッド化される。ハイブリダイゼーションは、マイクロチップ中に埋め込まれた配列と標的配列との間の完全な又はほぼ完全な一致がハイブリダイゼーション中に生じることを確実にするための厳密な条件下で生じる。各遺伝子座で得られる蛍光発光は、PBM C中の1つ以上の糖尿病感受性遺伝子の発現レベルに比例する。

【0109】

本出願の他の実施形態では、タンパク質をコードする遺伝子の遺伝子サイン発現プロファイルは、例えば、ELISA若しくは放射免疫アッセイなどの抗体に基づく結合アッセイ、又は、本明細書で定義されているような予め定められたサインの中の遺伝子のタンパク質産物を目的とするタンパク質アレイ含有抗体が挙げられる免疫化学の当該技術分野において周知の技術を使用して、測定される。

【0110】

1つの実施形態では、TCF7L2及びCLC遺伝子の発現プロファイルが、グルコース耐性正常と2型糖尿病の患者からの末梢血単核球細胞において分析された。

【0111】

ヒトシャルコー・ライデン結晶タンパク質遺伝子は、主に好酸球において発現される。CLCは、NGTのPBM C中、IGTのPBM C中、T2DのPBM C中の順に、下方制御される。107人の患者のコホートにおけるその発現の平均シグナル強度は、下記の表2に列挙されている。受信者動作特性(ROC)解析は、CLC遺伝子発現レベルがIGT/T2DからNGTを分離するために使用できることを示した。

10

20

30

40

【表 1】

表2：NGT、IGT及びT2Dから単離されたPBMCにおけるCLC遺伝子発現

NGT	IGT	T2D
1504	900	410

【0112】

臨床状態の予測におけるCLC遺伝子の機能は、受信者動作特性（ROC）解析を使用して、更に調査された。ROC曲線は、感度と特異度との間の関係を示す。すなわち、感度の増加は、特異度の減少を伴う。曲線が左の軸に、それゆえにROC空き領域の上端に、より近接して沿うにつれて、試験はより正確になる。逆に、曲線がROCグラフの45°対角線に、より近接するようになるにつれて、試験はより不正確になる。ROCの下の面積は、試験の正確性の尺度である。試験の正確性は、その試験が、試験される集団を問題の病気を有するものと有さないものと、どれだけよく分類するかに依存する。曲線の下の面積（「AUC」と呼ぶ）= 1は完璧な試験を示し、一方で、面積 = 0.5はより有用でない試験を示す。それゆえに、本出願の好ましい遺伝子及び診断方法は、0.50を超えるAUCを有し、より好ましい試験は0.60を超えるAUCを有し、更に好ましい試験は0.70を超えるAUCを有する。

【0113】

曲線の下の面積（AUC）は、患者の状態の予測において、CLC遺伝子の機能の尺度として計算された。CLC遺伝子状態の受信者動作特性（ROC）解析は、CLC遺伝子発現レベルがIGT/T2DからNGTを分離するために使用できることを示した（図1を参照されたい）。

【0114】

転写因子7様2（TCF7L2）をコード化する遺伝的変異型は、2型糖尿病及び細胞インスリン機能異常の進行の危険性に強く関連している（米国特許出願公開第2006/0286588号（その内容はこれにより本明細書にその全体が組み込まれる）を参照されたい）。ゲノムワイド関連研究は、TCF7L2内のSNPが、CDKAL1、CDKN2A/2B、FTO、IGF2BP2及びSLC30A8などの他のマーカー遺伝子中のSNP（リスクスコアの範囲は1.12～1.20）に比較して、2型糖尿病進行の予測に関する最高の生涯リスクスコアを与えることを示唆する。TCF7L2は広く発現し、この転写因子は、Wntファミリーのタンパク質のメンバーからの発生シグナルに反応することが知られている。機能的及び遺伝学的研究は、腸の発達及び腸内分泌細胞中のプログルカゴン遺伝子発現においてTCF7L2が果たす決定的な役割を指摘する。

【0115】

TCF7L2及びCLC遺伝子が、単独で若しくは組み合わせてのいずれかで糖尿病の診断マーカーとなるかどうかを確かめるために、インスティテュート・フォー・クリニカル・リサーチ&ディプロップメント（Clinical Research & Development）（IKFE）（ドイツ、マインツ（Mainz））の協力でドイツ人の母集団から180人の被験者を募集した。患者試料回収に先立って、適切なIRB承認を得た。採用基準は、糖尿病の診断歴を有さない18～75歳及びボディマス指数（BMI）30の患者、法的能力、並びに臨床研究及び必要とされる手順の性質と範囲とを理解する能力からなった。除外基準は、最近30日以内の献血、インスリン依存型真性糖尿病、授乳期若しくは妊娠中の女性、研究の途中で妊娠する予定のある女性、避妊を行っていない性的に活発な女性、重度/複合アレルギーの病歴、ドラッグ若しくはアルコールの濫用、研究要件遵守の欠落からなった。75g経口グルコース負荷試験結果（OGTT）を含む全ての臨床測定値を、標準的な手順を使用して得た。

【0116】

血液試料を、静脈穿刺によりCPTチューブ（BDバイオサイエンス（BD Biosciences））の中に吸引した。PBMCを、製造者のプロトコルに従って単離し、最終的な細胞沈殿物を1mLのトリゾール（Trizol）（インビトロジェン（Invitrogen））中に再懸濁し

、 - 80 で保存した。続いて、全RNAを、製造者のプロトコルに従って純化し、DEPC処理したddH₂O中に再懸濁した。RNAの定量及び品質を、ND-1000分光光度計 (Spectrophotometer) (ナノドロップ (NanoDrop)) を使用して行い、リボグリーン (RiboGreen) キット (モルキュラー・プローブス (Molecular Probes)) での分光光度的定量化により再確認した。RNA鑄型の品質を、バイオアナライザー (Bioanalyzer) 2100 (アジレント・テクノロジー (Agilent Technologies)) を使用することにより、測定した。

【0117】

第一ストランドcDNA合成を、高性能cDNA逆転写キット (High Capacity cDNA Reverse Transcription kit) (アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems)) を用い、各患者PBM C試料からの全RNA 200 ngを使用して、行った。その後、反応混合物をddH₂Oで10倍に希釈し、4 μLを、ABIプリズム7900HT (ABI Prism 7900HT) 配列検出システム上で10 μLのタックマン (Taqman) PCR反応中で鑄型として使用した。反応成分は、2XタックマンPCRマスターミックス (アプライド・バイオシステムズ)、0.9 μMの各プライマー、及び0.25 μMの蛍光標識されたプローブ (バイオサーチ・テクノロジーズ (Biosearch Technologies)) からなった。RT-PCRタックマンアッセイにおいて使用されるプライマー/プローブセットについての配列は、表3に示される。

【0118】

逆転写工程のためのサイクル条件は以下の通りである：

【表2】

	工程1	工程2	工程3	工程4
温度(°C)	25	37	85	4
時間	10分	120分	5秒	∞

【表3】

表3. TCF7L2、CLC及びアクチン用にタックマンアッセイで使用されるプローブ及びプライマー配列

マーカーセット#	5' > 3' -配列	配列名	注釈
TCF7L2 セット1	ACCTGAGCGCTCCTAAGAAATG	TCF7L2_DL_F1	分岐(junction)を超えない
	AGGGCCGACACCAAGTTATTC	TCF7L2_DL_R1	分岐(junction)を超えない
	FAM-AGCGCGCTTTGGCCTTGATCAAC-BHQ1	TCF7L2_DL_Pro1	分岐(junction)を超えない
TCF7L2 セット2	CGTCGACTTCTTGGTTACATTCC	TCF7L2_DL_F2	分岐(junction)を超えない
	CACGACGCTAAAGCTATTCTAAAGAC	TCF7L2_DL_R2	分岐(junction)を超えない
	FAM-CAGCGGCTGTGCTGCTGTCACC-BHQ1	TCF7L2_DL_Pro2	分岐(junction)を超えない
TCF7L2 セット3	GAAAGCGCGGCCATCAAC	TCF7L2_1564_U18	分岐を超える
	CAGCTCGTAGTATTTGCTTGCT	TCF7L2_1644_L23	分岐を超える
	FAM-TCCTTGGGCGGAGGTGGCATG-BHQ1	TCF7L2_1586_P21	分岐を超える
CLC セット1	GCTACCCGTGCATACACAGA	CLC_85_U21	分岐を超える
	GCAGATATGGTTCATTCAAGAAACA	CLC_185_L25	分岐を超える
	FAM-TTCTACTGTGACAATCAAAGGGCGACCA-BHQ1	CLC_127_P28	分岐を超える
アクチン	CCTGGCACCCAGCACAAT	β-アクチン-1F	内部コントロール
	GCCGATCCACCGGAGTACTT	β-アクチン-1R	
	FAM-ATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGC-BHQ1	β-アクチン-1P	

【0119】

TCF7L2に特異的な2つの異なるプライマー/プローブの組み合わせ及びCLCのための1つのプライム/プローブを使用するタックマンアッセイによる定量的リアルタイムRT-PCRを、それぞれの患者からのPBM Cから単離したRNAについて行った。PCR工程についての熱サイクルプロファイルは、以下のように、95 を10分、続いて、95 (15秒) 及び60 (1分) を40サイクルであった。Ct値を、0.2~0.3の閾値設定でSDSバージョン2.1ソフトウェア (アプライド・バイオシステムズ) を使用して、生データから計算した。ピアソン相関によるRun-to-runの再現性は、上記マーカーについて、R² = 0.96~0.98であった。Ct (サイクル閾値) の値を、目的のマーカーのCtからハウスキーピング - アクチン遺伝子のCtを

減ずること、例えば、TCF7L2の場合は、Ct TCF7L2 - Ctアクチン、により計算した。[$2^{-\left(\frac{Ct}{Ct_{actin}}\right)} \times 1000$]の値を使用して、 β -アクチンに対するTCF7L2の発現を表した。OGTTの結果を、真の臨床状態として使用した。スチューデントのt検定を、正規化されたCt値を使用して遺伝子マーカーの発現レベル間の統計的有意性を決定するために使用した。

【0120】

2時間OGTT測定及び現行のADAガイドラインに基づいて、研究に参加した180人の患者のうち、104人の患者をNGT（グルコース耐性正常）として、49人の患者をIGT（グルコース耐性異常）として、分類し、27人の患者はT2D（2型糖尿病）と考えられた。このT2D被験者は本研究で初めて糖尿病と診断されたので、各患者の病気の持続時間、及び、どれだけの期間PBMCが高血糖微小環境に維持されていたかは、分からなかった。

【0121】

各患者に関し、 β -アクチンに対して正規化されたTCF7L2及びCLCの発現レベルについてのt検定解析を、プライマー/プローブセットの値に基づき、グルコース耐性により分類して、表4に記す。NGT及びIGTにT2Dを加えた患者集団は、スチューデントのt検定による発現レベル間に統計的有意差を有し、それぞれp値 = 0.004（TCF7L2セット1）、0.021（TCF7L2セット3）及び0.022（CLC）であった。これらの結果は、NGTに対する、糖尿病前症（IGT）患者の、又は、糖尿病前症及びT2D患者を一緒にした組み合わせの、PBMCにおけるTCF7L2及びCLC遺伝子の示差的発現を示す。

【表4】

表4：スチューデントのt検定によるTCF7L2及びCLCの発現レベルにおける統計的差異

試料n	T試験	β -アクチン Ct	正規化 TCF7L2_1	正規化 TCF7L2_2	正規化 TCF7L2_3	正規化 CLC
104/49	NGT/IGT	0.451	0.005	0.075	0.008	0.013
104/76	NGT/(IGT+T2D)	0.277	0.004	0.093	0.021	0.022

統計的有意差

【0122】

次に、正常又は糖尿病前症/糖尿病として患者を分類するための診断ツールとしてTCF7L2及びCLCタックマンアッセイの機能を、2時間OGTTと比較して、評価した。各TCF7L2及びCLCプライマー/プローブセットの正規化Ct値について、受信者動作特性（ROC）曲線を作製した（表5、図2A及び2B）。TCF7L2セット1及びCLCのPCRアッセイについてのAUC値はそれぞれ0.63及び0.61であった。2時間OGTT分類と比較して、PBMCからのTCF7L2セット1の発現は、正常であるか又は糖尿病前症/糖尿病であるかに患者を正しく分類することができ、FPG試験と共に使用したとき、AUC = 0.73であった（図2A及び2B）。CLCは、TCF7L2セット1に添加値を有さず、診断アルゴリズムとして考えられなかった。更に、FPG 126 mg/dL （糖尿病とも考えられる）を有する14人の患者を除外しても、アッセイの機能に変化は生じなかった。

【表 5】

表5：各マーカープロブプライマーセットについての、及び、FPGとの組み合わせについての、ROC曲線AUC値

マーカーセット#	ROC AUC値	
	マーカーvs. OGTT	マーカー+FPG vs. OGTT
TCF7L2セット1	0.63	0.73
TCF7L2セット2	0.59	ND
TCF7L2セット3	0.61	0.72
CLCセット1	0.60	0.69

10

【0123】

1つの実施形態では、マイクロアレイ分析で選択された各遺伝子（表1を参照されたい）は、2時間OGTTの結果とより近接して一致するように、TCF7L2セット1の機能と組み合わせられてもよい。

【0124】

別の実施形態では、2型糖尿病の危険性と強く関連する遺伝子（表6を参照されたい）もまた、2時間OGTTの結果とより近接して一致するように、TCF7L2セット1の機能と組み合わせられてもよい。別の実施形態では、表1の1つ以上の遺伝子と組み合わせた表6の遺伝子を、糖尿病状態の診断に関する遺伝子サインについて本明細書に記載しているように試験することができる。

20

【表 6】

表6：

遺伝子記号			
NOTCH2	IGF2BP2	LGR5	CDKN2A-2B
THADA	WFS1	FTO	HHEX-IDE
PPARG	KCNJ11	JAZF1	CDC123
ADAMTS9	TSPAN8	SLC30A8	CAMK1D

30

【0125】

別の実施形態では、CDKN1C、CIP/KIPファミリーのメンバー、の発現もまた、NGT及びT2DからPBMICにおいて示差的に発現された。

【0126】

CIP/KIPファミリーは、3つのメンバー、CDKN2A、CDKN2B及びCDKN1C、からなる。3つのメンバーの全ては、哺乳類細胞周期の制御において中心的な役割を果たすCDK4の活性を抑制することができる。膵島細胞の複製は、細胞の量的ホメオスタシスの維持において本質的な役割を果たす。CDK4が体重及び膵臓細胞増殖の制御において重要な役割を有することが知られている。マウスでは、CDK4遺伝子の欠損は細胞量の減少に起因してインスリン欠乏性糖尿病を生じたが、一方で、CDK4の活性化は、膵島細胞の過形成を引き起こした。最近、2型糖尿病のゲノムワイド関連研究が、CDKN2A及びCDKN2B遺伝子近傍のヌクレオチド変異が2型糖尿病の危険性に関連することを明らかにした。更に、CDKN2Aの過剰発現は、老齢マウスにおいて膵島増殖の減少を導き、CDKN2Bの過剰発現は、マウスモデルにおける膵島過形成及び糖尿病に関連する。CDKN1Cは、染色体11p15.5上に位置する母系発現遺伝子であり、ベックウィズ-ヴィードマン症候群（BWS）、新生児高インスリン性低血糖症、並びに、出生前及び後の過成長に特徴付けられる疾患の病理発生に関わる。最近の研究はまた、CDKN1Cはインスリンにより下方制御され、CDKN1Cの変異型は2型糖尿病患者の出生時体重の増加に関連し得ることを示した。細胞周期の制御に加えて、CIP/KIPファミリーは、アポトーシス、転写制御、分化及び細胞移動などの他

40

50

の生物学的プロセスにおいて重要な役割を果たす。107人の患者コホートにおけるこの3つの遺伝子の発現を分析した。CDKN1Cのみが、NGT、IGT及びT2Dの間で示差的な発現を表した(表7を参照されたい)。HG-U133Plus2 ジーンチップ(HG-U133Plus2 GeneChip)上でCDKN1CをPBMCにおいて発現する5つのプローブが存在する。これらのそれぞれが、NGTとIGT/T2Dとの間で示差的な発現を表した(表7)。ROC解析は、5つのプローブの発現レベルを使用して、T2DからNGTを分類できることを示した(図3)。

【表7】

表7: NGT、IGT及びT2Dから単離されたPBMCにおけるCDKN1C

遺伝子発現

遺伝子	プローブ	PBMCにおける発現	平均値_NGT	平均値_IGT	平均値_T2D
CDKN1C	213182_x_at	あり	935	1178	1784
	213183_s_at	あり	531	712	624
	213348_at	あり	2648	3246	3957
	216894_x_at	あり	797	1030	1439
	219534_x_at	あり	1092	1356	1973

【0127】

当業者であれば、記載されている実施形態が糖尿病の診断ツールとして遺伝子サインを調査するという前提を与えていることを認識するであろう。正常な被験者と、糖尿病前症及び糖尿病の患者との間の根底にある生物学的プロセスを調査するために、経路解析を実施した。すなわち、HG-U133Plus2チップ上のプローブを、ユー(Yu)ら、BMC Cancer (BMC Cancer) 7巻: 182ページ(2007年)に記載されているような遺伝子オントロジー生物学的プロセス(Gene Ontology Biological Process)(GOBP)にマッピングした。非常に低い発現を有する遺伝子は、より高い変異を有する傾向があるので、データセットにおいて平均強度が200未満である遺伝子を経路解析から除外した。結果として、21247個のプローブを確保した。糖尿病前症又は糖尿病の進行と有意な関連を有する経路を同定するために、大域的検定プログラム(global test program)を、NGT vs. IGT、NGT vs. T2D、又はNGT vs. IGT+T2Dを比較することにより、行った。少なくとも10個のプローブ及び有意なp値($p < 0.05$)を有する経路を各比較について同定した。3つの比較を通して患者の結果について一貫した相関を有する3つの経路が存在した。これらは、B細胞活性化(GO0042113)、体液性免疫反応(GO0006959)、及び複製時のDNAの巻き戻し(GO0006268)である。3つの経路の中で、B細胞活性化及び体液性免疫反応は、主に、糖尿病との負の相関を有し(IGT/T2Dにおいてより低い発現)、一方で、複製時のDNAの巻き戻しは、糖尿病との正の相関を有した(IGT/T2Dにおいてより高い発現)。

【0128】

3つの鍵となる経路から経路に基づく遺伝子サインを構築するために、 $p < 0.05$ である遺伝子をプールし、これらの統計的有意性(大域的検定からのzスコア)に基づいて分類した。遺伝子がリスト内の1つを超えるプローブを有し、これらの挙動が一致するならば、最高の有意性を有するものが確保された。遺伝子がリスト内の1つを超えるプローブを有し、これらの挙動が反対であるならば、この遺伝子の全てのプローブは除去された。結果として、14個の特異的な遺伝子を得た(以下の表8を参照されたい)。

【表 8】

表 8：経路有意性遺伝子

PSID	遺伝子記号	遺伝子タイトル	
208900_s_at	TOP1	トポイソメラーゼ(DNA)I	
216379_x_at	CD24	CD24抗原(小細胞肺癌クラスター4抗原)	
222430_s_at	YTHDF2	YTHドメインファミリー、メンバー2	
1554343_a_at	BRDG1	BCR下流シグナリング1	
228592_at	MS4A1	膜-貫通4ドメイン、サブファミリーA、メンバー1(membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1)	
216894_x_at	CDKN1C	サイクリン依存性キナーゼ阻害物質1C(p57, Kip2)	10
1558662_s_at	BANK1	アンキリン反復を有するB細胞スカフォールドタンパク質1(B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1)	
205267_at	POU2AF1	POUドメイン、クラス2、関連因子1(POU domain, class 2, associating factor 1)	
205859_at	LY86	リンパ球抗原86	
221969_at	PAX5	ペアードボックス(Paired box)遺伝子5(B細胞系統特異的活性因子)	
207655_s_at	BLNK	B細胞リンカー	
206126_at	BLR1	パーキットリンパ腫レセプター1、GTP結合タンパク質(ケモカイン(C-X-Cモチーフ)レセプター5)	
206983_at	CCR6	ケモカイン(C-Cモチーフ)受容体6	20
204946_s_at	TOP3A	トポイソメラーゼ(DNA)III α	
214252_s_at	CLN5	神経セロイドリポフスチノーシス5	

【0129】

比較的高い変異を有する遺伝子を使用するサインを構築するために、 $CV > 0.25$ である10個の遺伝子を確保した。サインに最適な数の遺伝子を決定するために、上位2~10遺伝子の組み合わせをデータセット内で調査した。結果は、上位3遺伝子が患者の結果の予測に最良の機能を与えることを示した。この3つの遺伝子、TOP1、CD24及びSTAP1は以下の表9にある。

【表 9】

表 9：NGT、IGT及びT2Dから単離されたPBMCにおける3つの遺伝子発現経路解析からの上位3遺伝子

プローブ	遺伝子記号	遺伝子タイトル
208900_s_at	TOP1	トポイソメラーゼ(DNA)I
216379_x_at	CD24	CD24抗原(小細胞肺癌クラスター4抗原)
1554343_a_at	STAP1	シグナル変換アダプターファミリーメンバー1

【表 10】

サブグループにおける上位3遺伝子の平均発現

プローブ	遺伝子	平均値__NGT	平均値__IGT	平均値__T2D
208900_s_at	TOP1	868	1145	1418
216379_x_at	CD24	1767	1274	1194
1554343_a_at	STAP1	373	283	265

【0130】

107人の患者のコホートにおける3つの遺伝子サインのROC分析(図4A及び4B)は、このサインがIGT/T2DからNGTを分類できることを表す。遺伝子の平均発現を表すヒストグラムを図4Cに示す。

【0131】

非情報提供性遺伝子を除去し、コホート内で10以上のプレゼンスコール(presence c

10

20

30

40

50

all) を有する遺伝子のみを確保した。次に、107人の患者のコホートを54人のトレーニングセットと53人の試験セットとに分けた。OGTT分類に基づいて、トレーニングセットには28人のNGT、17人のIGT及び9人のT2Dが存在するが、一方で、試験セットには29人のNGT、16人のIGT及び8人のT2Dが存在する。NGTと、IGT+T2D患者との間で示差的な発現を有する遺伝子を同定するために、マイクロアレイの有意性分析(SAM)プログラムを行った。フォールス・ディスカバリー・レート(FDR)が20%未満であれば、遺伝子を選択した。結果として、235個の遺伝子を選択した。更に遺伝子リストを絞るために、2つの集団間で1.5よりも大きな倍率変化を有し、データセットの平均強度が200よりも大きい遺伝子を確保した。結果として、17個のプローブを確保した。これらの中で、4つは、ヘモグロビン遺伝子を発現するプローブであった。ヘモグロビンが赤血球においてきわめて高い発現を有することを考慮して、生じ得る混入を排除するためにこの4つのプローブを除外した。サインとしての遺伝子の最適な数を決定するために、上位の遺伝子の組み合わせの機能をトレーニングセットの2~13で調査した。結果は、上位10遺伝子が曲線の下面積(AUC)に基づいて最良の機能を与えることを示した(表10を参照されたい)。

10

【表11】

表10A: NGT、IGT及びT2Dから単離されたPBMCにおける10個の

遺伝子発現

プローブ	記号	名称
239742_at	TULP4	タビー(Tubby)様タンパク質4
244450_at	AA741300	ALU8__ヒトALUサブファミリーSX配列に弱類似性
235216_at	ESCO1	接着1ホモログ1の確立(establishment of cohesion 1 homolog 1)
201026_at	EIF5B	真核生物翻訳開始因子5B
200727_s_at	ACTR2	ARP2アクチン関連タンパク質2ホモログ
211993_at	WNK1	WNKリシン欠乏性タンパク質キナーゼ1
205229_s_at	COCH	凝固因子Cホモログ、コクリン
201085_s_at	SON	SON DNA結合タンパク質
1557227_s_at	TPR	転移促進領域(活性化MET発癌遺伝子に対して)
231798_at	NOG	ノギン

20

30

【表12】

表10B: サブグループにおける上位10遺伝子の平均発現

プローブ	遺伝子	平均値__NGT	平均値__IGT	平均値__T2D
239742_at	TULP4	514	659	702
244450_at	AA741300	674	461	482
235216_at	ESCO1	199	262	351
201026_at	EIF5B	330	440	500
200727_s_at	ACTR2	2153	2751	3590
211993_at	WNK1	397	505	625
205229_s_at	COCH	330	231	250
201085_s_at	SON	3300	4103	4900
1557227_s_at	TPR	378	445	616
231798_at	NOG	515	430	302

40

【0132】

遺伝子サインを更に評価するために、試験セットにおける患者の結果を判定した。空腹時血漿グルコース(FPG)レベルを使用する糖尿病前症及び糖尿病の予測もまた調査した。遺伝子サインとFPGレベルとの間の相補的な効果を調査するために、これら2つの

50

予測因子の組み合わせを使用して患者の結果を予測した。試験セットでF P G又は10個の遺伝子サイン、あるいはF P Gと10個の遺伝子サインとの組み合わせを使用する中でR O C解析の比較を図5に示す。これは、10個の遺伝子サインがI G T / T 2 DからN T Gを独立に分けることができ、F P G及び10個の遺伝子サインがより良好な予測のために相補的であることを表す(図5 A及び5 Bを参照されたい)。107人の患者のコホートにおける10個の遺伝子の平均発現シグナルを図5 Cの一覧表及び棒グラフに示す。

【0133】

臨床データの統計分析は、N G TとT 2 Dとで示差的に発現される3個の遺伝子及び10個のサインを同定した。

10

【0134】

別の実施形態では、診断アッセイは、糖尿病前症/糖尿病に対する正常のポイントオブケア分類について、又は、定義された期間、例えば、1/2~2年、若しくは2~5年、若しくは5~10年、若しくはそれ以上、にわたっての糖尿病前症/糖尿病の進行の予測について記載される。

【0135】

あるいは、遺伝子発現プロファイルは、例えば、E L I S A又はプロテオミクスアレイ(proteomic array)を使用して、m R N Aによりコード化されたタンパク質の検出によって、決定される。これらの方法のすべては、当該技術分野において周知である。

20

【0136】

本明細書の開示はまた、患者における糖尿病状態の診断のための1つ以上の試薬を有するパッケージユニットを含むキットフォーマットも提供する。このキットは、以下の品目のうち1つ以上を含有し得る：緩衝液、使用説明書、及び、正又は負の対照。キットは、本明細書に記載されている方法を行うのに好適な比率で一緒に混合された試薬の容器を含み得る。試薬容器は好ましくは、本方法を行うときに計量工程を不要にする単位量で試薬を含有する。

【0137】

キットは、滅菌針、及び、患者の血液を回収するためのチューブ/容器を含み得る。回収チューブは典型的には、血液凝固を抑制するために、特定の添加剤、例えば、ヘパリン、を含有する。

30

【0138】

キットはまた、患者の試料における遺伝子サイン発現プロファイルの測定のための試薬を含有し得る。本明細書で開示されているように、遺伝子サイン発現プロファイルは、R T - P C Rアッセイ、マイクロチップを使用するオリゴヌクレオチドアッセイ、又は、E L I S Aアッセイなどのタンパク質に基づくアッセイを当該技術分野において既知の種々の方法によって測定され得る。

【0139】

好ましい実施形態では、遺伝子サイン発現プロファイルは、リアルタイムR T - P C Rにより測定される。

【0140】

増幅の1つの実施形態では、キットは、患者の血液試料における遺伝子サイン発現の増幅及び検出のプライマーを含む。プライマーは、T O P 1、C D 2 4、S T A P 1、T U L P 4、A A 7 4 1 3 0 0、E S C O 1、E I F 5 B、A C T R 2、W N K 1、C O C H、S O N、T P R、N O G遺伝子などの本明細書に記載されているような糖尿病感受性遺伝子のいずれか、又は表1若しくは6に列挙されている遺伝子のいずれかに相補的である配列を有する。

40

【0141】

糖尿病感受性遺伝子のリアルタイムR T - P C Rのために使用されるプライマー配列の例は、表1 2及び1 2 Cに開示される。

【0142】

50

好ましい実施形態では、キット試薬は、FDAのインビトロ診断オフィス(FDA's Office of In Vitro Diagnostics)(FDA-OIVD)により是認されたPCRに基づく技術であるアプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)による7500ファストDxリアルタイムPCRインストルメント(7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument)で機能するように設計される。

【0143】

更に別の実施形態では、キットは、3つの遺伝子(TOP1、CD24及びSTAP1)又は10個の遺伝子(TULP4、AA741300、ESCO1、EIF5B、ACTR2、WNK1、COCH、SON、TPR及びNOG)サインのハイブリダイゼーションプローブのアレイを含むマイクロチップを含む。別の態様では、マイクロチップは更に、表1又は6に列挙されている1つ以上の遺伝子のための1つ以上のハイブリダイゼーションプローブのアレイを含み得る。

10

【0144】

好ましい実施形態では、マイクロチップは、1~55,000超のmRNAの遺伝子発現を平行して測定できるアフィメトリックス・ジーンチップDx(Affymetrix GeneChipDx)技術で機能するように設計される。FDA-OIVD、これはロシュ・モルキュラー・ダイアグノスティック(Roche Molecular Diagnostics)からのアンプリチップ(AmpliChip)P450製品及び経路診断組織起源試験(Pathwork Diagnostics Tissue of Origin test)での使用に関するプラットフォーム。

20

【表13-1】

表1
プローブ

プローブ	遺伝子記号	遺伝子タイトル
218659_at	ASXL2	追加的性節様2(additional sex combs like 2)(ドロソフィラ)
230528_s_at	MGC2752	仮説的タンパク質MGC2752(hypothetical protein)
211921_x_at	PTMA	プロサイモシンα(遺伝子配列28) // ノプロサイモシンα(遺伝子配列28)
209102_s_at	HBP1	HMG-ボックス転写因子
239946_at	KIAA0922	KIAA0922タンパク質
226741_at	TMEM85	膜貫通型タンパク質85
239742_at	TULP4	タビー(Tubby)様タンパク質4
202844_s_at	RALBP1	ralAタンパク質
237768_x_at	TAF15	TAF15RNAポリメラーゼII、TATAボックス結合タンパク質(TBP)関連因子、68kDa
202373_s_at	RAB3GAP2	RAB3 GTPアーゼ活性タンパク質サブユニット2(非触媒性)
223413_s_at	LYAR	仮説的タンパク質FLJ20425(hypothetical protein)
222371_at	PIAS1	活性化STATタンパク質阻害物質1
244450_at	MAK	雄生殖細胞関連キナーゼ
201024_x_at	EIF5B	真核生物翻訳開始因子5B
202615_at	GNAQ	Guaninヌクレオチド結合タンパク質(Gタンパク質)、qポリペプチド
222621_at	DNAJC1	DnaJ(Hsp40)ホモログ、サブファミリーC、メンバー1
212774_at	ZNF238	亜鉛フィンガータンパク質238
238883_at	THRAP2	甲状腺ホルモンレセプター関連タンパク質2
223130_s_at	MYLIP	ミオシン制御軽鎖相互作用タンパク質
225445_at	----	転写遺伝子座
235601_at	MAP2K5	マイトジェン活性化タンパク質キナーゼキナーゼ5
209258_s_at	CSPG6	コンドロイチン硫酸プロテオグリカン6(バマカン(bamacan))
1557238_s_at	SETD5	STARTドメイン含有5
202927_at	PIN1	タンパク質(ペプチジル-プロリルシス/トランスイソメラーゼ)NIMA-相互作用1
1568618_a_at	GALNT1	UDP-N-アセチル-α-D-ガラクトサミン:ポリペプチドN-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ1(GalNAc-T1)
222417_s_at	SNX5	ソーティングネキシン5
208836_at	ATP1B3	ATPアーゼ、Na+/K+輸送、β3ポリペプチド
202738_s_at	PHK8	ホスホリラーゼキナーゼβ
224872_at	KIAA1463	KIAA1463タンパク質
235200_at	ZNF561	亜鉛フィンガータンパク質561
235216_at	ESCO1	接着1ホモログ1の確立(S.セレピシエ)
201026_at	EIF5B	真核生物翻訳開始因子5B

30

40

【表 1 3 - 2】

(表 1 の続き)

プローブ	遺伝子記号	遺伝子タイトル	
208095_s_at	SRP72	シグナル認識粒子72kDa	
244457_at	ITPR2	配列類似性20を有するファミリー、メンバーC(family with sequence similarity 20, member C)	
216563_at	ANKRD12	アンキリン反復ドメイン12	
211983_x_at	ACTG1	アクチン γ 1	
227854_at	FANCL	ファンconi貧血相補群L	
1552343_s_at	PDE7A	ホスホジエステラーゼ7A	
221548_s_at	ILKAP	インテグリン結合キナーゼ関連セリン/スレオニンホスファターゼ2C	
215772_x_at	SUCLG2	コハク酸塩-CoAリガーゼ、GDP-形成 β サブユニット	
229010_at	CBL	Cas-Br-M(マウス)狭宿主性レトロウイルス変形配列	
226879_at	MGC15619	仮説的タンパク質MGC15619(hypothetical protein)	
1556451_at	BACH2	BTB及びCNCホモロジー1、塩基性ロイシンジッパー転写因子2	10
225490_at	ARID2	ATリッチ相互作用性ドメイン2(ARID、RFX様)	
214055_x_at	BAT2D1	BAT2ドメイン含有1	
32069_at	N4BP1	Nedd4結合タンパク質1	
235457_at	MAML2	マスターマインド(mastermind)様2(ドロソフィラ)	
217985_s_at	BAZ1A	亜鉛フィンガードメインに近接するプロモドメイン1A	
229399_at	C10orf118	染色体10の開いたリーディング・フレーム118(chromosome 10 open reading frame 118)	
208994_s_at	PPIG	ペプチジル-プロリルイソメラーゼG(サイクロフィリンG)	
202656_s_at	SERTAD2	SERTADドメイン含有2	
241917_at	FCHSD2	FCH及び二重(double)SH3ドメイン2	
238807_at	ANKRD46	アンキリン反復ドメイン46	
204415_at	G1P3	インターフェロン、 α -誘導性タンパク質(クローンIFI-6-16)	
240176_at	LOC391426	ENSANGP00000004103に類似	
233284_at	---	---	
232583_at	---	---	
200772_x_at	PTMA	プロサイモシン α (遺伝子配列28)	
239721_at	UBE2H	ユビキチン結合酵素E2H(UBC8ホモログ、酵母菌)	20
218607_s_at	SDAD1	SDA1ドメイン含有1	
204160_s_at	ENPP4	エクトヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼ4(推定機能)	
243303_at	ECHDC1	エノイルコエンザイムAヒドラーゼドメイン含有1	
225266_at	ZNF652	亜鉛フィンガータンパク質652	
220072_at	CSPP1	中心体及び紡錘体極関連タンパク質1	

【表 1 3 - 3】

(表 1 の続き)

プローブ	遺伝子記号	遺伝子タイトル	
234196_at	TMCC3	膜貫通及びコイルドコイルドメインファミリー3	
222616_s_at	USP16	ユビキチン特異性ペプチダーゼ16	
201274_at	PSMA5	プロテアソーム(プロソーム、マクロペイン)サブユニット α タイプ5	
238714_at	RAB12	RAB12、メンバー-RAS癌遺伝子ファミリー	30
204563_at	SELL	セレクチンL(リンパ球接着分子1)	
1557239_at	BBX	ポピーソックスホモログ(ドロソフィラ)	
232510_s_at	DPP3	ジペプチジルペプチダーゼ3	
235653_s_at	THAP6	THAPドメイン含有6(THAP domain containing 6)	
200727_s_at	ACTR2	ARP2アクチン関連タンパク質2ホモログ(酵母菌)	
221564_at	HRMT1L1	HMT1 hnRNPメチルトランスフェラーゼ様1(S. セレビスエ)	
211993_at	WNK1	WNKリシン欠乏性タンパク質キナーゼ1//WNKリシン欠乏性タンパク質キナーゼ1	
201114_x_at	PSMA7	プロテアソーム(プロソーム、マクロペイン)サブユニット α タイプ7	
233089_at	QRSL1	グルタミル-tRNAシターゼ(グルタミン加水分解)様1	
212991_at	FBXO9	F-ボックスタンパク質9	
227770_at	VPS4A	液胞タンパク質選別4A(酵母菌)	
222111_at	FAM63B	配列類似性63を有するファミリー、メンバーB	
1558604_a_at	---	MRNA:クローンCD43T7	
205229_s_at	COCH	凝音因子Cホモログ、コクリン(リムルス・ポリフェムス)	
219130_at	FLJ10287	仮説的タンパク質FLJ10287(hypothetical protein)	
241262_at	---	---	
202412_s_at	USP1	ユビキチン特異性ペプチダーゼ1	40
225092_at	RABEP1	ラバプチン、RAB GTPアーゼ結合エフェクタータンパク質1	
200905_x_at	HLA-E	主要組織適合複合体、クラスI、E	
201010_s_at	TXNIP	チオレドキシシン相互作用タンパク質	
221607_x_at	ACTG1	アクチン γ 1	
201085_s_at	SON	SON DNA結合タンパク質	
214723_x_at	KIAA1641	KIAA1641	
201565_s_at	ID2	DNA結合の阻害因子2、主に負のヘリックス・ループ・ヘリックスタンパク質	
201861_s_at	LRRFIP1	ロイシンリッチ反復(FLN)における相互作用タンパク質1	
207785_s_at	RBPSUH	無毛の再結合結合タンパク質(recombining binding protein suppressor of hairless)(ドロソフィラ)	
230415_at	---	---	
236620_at	RIF1	RAP1相互作用因子ホモログ(酵母菌)	

【表 1 3 - 4】

(表 1 の続き)

プローブ	遺伝子記号	遺伝子タイトル
206363_at	MAF	v-maf筋肉腫腫性線維肉腫癌遺伝子ホモログ(maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog)(ニワトリ)
1558748_at	NAPE-PLD	N-アンルーホスファチジルエタノールアミン加水分解ホスホリパーゼD
223101_s_at	ARPC5L	アクチン関連タンパク質2/3複合体、サブユニット5様
236370_at	SMURF1	SMAD特異性E3ユビキチンタンパク質リガーゼ1
200702_s_at	DDX24	DEAD(Asp-Glu-Ala-Asp)ボックスポリペプチド24
1557227_s_at	TPR	転移促進領域(活性化MET発癌遺伝子に対して)
220934_s_at	MGC3196	仮説的タンパク質MGC3196(hypothetical protein)
233333_x_at	AVIL	アドビリン
231798_at	NOG	ノギン
228986_at	OSBPL8	オキシステロール結合タンパク質様8
241786_at	PPP3R1	タンパク質ホスファターゼ3(以前は2B)、制御サブユニットB、19kDa、αイソ型(カルシニューリンB、I型)
212227_x_at	EIF1	真核生物翻訳開始因子1
222471_s_at	KCMF1	カリウムチャネル調節因子1
203580_s_at	SLC7A6	溶質キャリアファミリー7(カチオン性アミノ酸輸送体、y+システム)、メンバー6
208900_s_at	TOP1	トポイソメラーゼ(DNA)I
240070_at	FLJ39873	仮説的タンパク質FLJ39873(hypothetical protein)
213305_s_at	PPP2R5C	タンパク質ホスファターゼ2、制御サブユニットB(B56)γイソ型
229470_at	----	CDNA FLJ27196fs、クローンSYNO2831
204048_s_at	PHACTR2	ホスファターゼ及びアクチン制御因子2
1561690_at	----	CDNAクローンIMAGE:5303966
1556728_at	----	CDNA FLJ43665fs、クローンSYNOV4006327
212027_at	RBM25	RNA結合モチーフタンパク質25
210218_s_at	SP100	核抗原Sp100
232356_at	----	CDNA FLJ13539fs、クローンPLACE1006640
241891_at	DOCK8	サイトキネシスのデディケイター8
235925_at	LOC440282	仮説的タンパク質LOC145783(Hypothetical protein)
211745_x_at	HBA1	ヘモグロビンα1//ヘモグロビンα1
240452_at	GSPT1	G1からのS相転移1
212669_at	CAMK2G	カルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼ(CaMキナーゼ)IIγ
209791_at	PADI2	プテチルアルギニンデヒミナーゼ、II型
221952_x_at	TRMT5	TRM5 tRNAメチルトランスフェラーゼ5ホモログ(S. セレピシエ)
226942_at	PHF20L1	PHDフィンガータンパク質20様1

10

20

【表 1 3 - 5】

(表 1 の続き)

プローブ	遺伝子記号	遺伝子タイトル
203939_at	NT5E	5'-ヌクレオチダーゼ、エクト(CD73)
208705_s_at	EIF5	真核生物翻訳開始因子5
1557718_at	PPP2R5C	タンパク質ホスファターゼ2、制御サブユニットB(B56)γイソ型
212251_at	MTDH	メタドヘリン
226384_at	PPAPDC1B	ホスファチジン酸ホスファターゼ2型ドメイン含有1B
212487_at	KIAA0553	KIAA0553タンパク質
227402_s_at	C8orf53	染色体1が開いたリーディング・フレーム8(chromosome 8 open reading frame 53)
221875_x_at	HLA-F	主要組織適合複合体、クラスI、F
225506_at	KIAA1468	KIAA1468
201730_s_at	TPR	転移促進領域(活性化MET発癌遺伝子に対して)
235645_at	ESCO1	接着1ホモログ1の確立(S. セレピシエ)
208993_s_at	PPIG	ペプチジル-プロリルイソメラーゼG(サイクロフィリンG)
233690_at	C21orf96	染色体1が開いたリーディング・フレーム21(Chromosome 21 open reading frame 96)
221798_x_at	RPS2	リボソームタンパク質S2
1569898_a_at	----	CDNA FLJ32047fs、クローンNTONG2001137
202368_s_at	TRAM2	転移関連膜タンパク質2
215128_at	----	----
230761_at	USP7	未知のタンパク質
243_g_at	MAP4	微小管関連タンパク質4
223081_at	PHF23	PHDフィンガータンパク質23
224736_at	CCAR1	細胞分裂サイクル及びアポトーシス制御因子1
236962_at	PTBP2	ポリピリミジンラクト結合タンパク質2
225893_at	----	MRNA: cDNA DKFZp686D04119(クローンDKFZp686D04119から)
244414_at	MAML2	マスターマインド様2(ドロソフィラ)
221234_s_at	BACH2	BTB及びCNCホモロジー1、塩基性ロイシンジッパー転写因子2//BTB及びCNCホモロジー1、塩基性ロイシンジッパー転写因子2
218135_at	PTX1	PTX1タンパク質
229353_s_at	NUCKS1	核カゼインキナーゼ及びサイクリン依存性キナーゼ基質1
228408_s_at	SDAD1	SDA1ドメイン含有1
234723_x_at	----	----
212130_x_at	EIF1	真核生物翻訳開始因子1
232565_at	RAB6IP2	RAB6相互作用タンパク質2

30

40

【表 1 3 - 6】

(表 1 の続き)

プローブ	遺伝子記号	遺伝子タイトル
210479_s_at	RORA	RAR関連オーファンレセプターA
226320_at	THOC4	THO複合体4
208859_s_at	ATRX	αサラセミア/X連鎖精神遅滞症候群(RAD54ホモログ、S. セレピシエ)
238645_at	VIL2	ピリン2(エズリン)
243578_at	---	転写遺伝子座
202868_s_at	POP4	前駆体4、リボヌクレアーゼP/MRPサブユニットのプロセッシング(S. セレピシエ)
224585_x_at	ACTG1	アクチンγ1
221768_at	SFPQ	スプライシング因子プロリン/グルタミンリッチ(ポリピリミジントラクト結合タンパク質関連)
1557450_at	SNF1LK2	SNF1様キナーゼ2
225583_at	UXS1	UDP-グルククロネートデカルボキシラーゼ1
225125_at	TMEM32	膜貫通型タンパク質32
202408_s_at	PRPF31	PRP31プレmRNAプロセッシング因子31ホモログ(酵母菌)
236355_s_at	LOC439993	LOC439993
209458_x_at	HBA1//HBA2	ヘモグロビンα1//ヘモグロビンα1//ヘモグロビンα2//ヘモグロビンα2
211948_x_at	BAT2D1	BAT2ドメイン含有1
203682_s_at	IVD	イソバレルリルコエンザイムAデヒドロゲナーゼ
203184_at	FBN2	フィブリン2(先天性拘縮性蜘蛛状指)
1560082_at	NOL10	核小体タンパク質10
212794_s_at	KIAA1033	KIAA1033
226159_at	LOC285636	仮説的タンパク質LOC285636(hypothetical protein)
225276_at	GSPT1	G1からのS相転移1
205859_at	LY86	リンパ球抗原86
200977_s_at	TAX1BP1	Tax1(ヒトT細胞白血病ウイルスI型)結合タンパク質1
239418_x_at	ENTPD1	エクトヌクレオシド三リン酸ジホスホヒドロラーゼ1
208638_at	PDIA6	タンパク質ジスルフィドイソメラーゼファミリーA、メンバー6
203228_at	PAFAH1B3	血小板活性化因子アセチルヒドラーゼ、イソ型Ibγサブユニット29kDa
208812_x_at	HLA-C	主要組織適合複合体、クラスI、C
220924_s_at	SLC38A2	溶質キャリアファミリー38、メンバー2
235705_at	---	---
208974_x_at	KPNB1	カリオフェリン(インボーチン)β1
201854_s_at	ASCZ1	ATM/ATR-基質Chk2-相互作用Zn2+-フィンガータンパク質
209116_x_at	HBB	ヘモグロビンβ//ヘモグロビンβ

10

20

【表 1 3 - 7】

(表 1 の続き)

プローブ	遺伝子記号	遺伝子タイトル
218150_at	ARL5	ADPリボシル化因子様5
208042_at	AGGF1	Gパッチ及びFTADドメイン1を有する血管由来因子(angioenic factor with G patch and FHA domains 1)
226718_at	AMIGO1	Ig様ドメイン1を有する接着分子
235328_at	CODC41	コイルドコイルドメイン接触41
225609_at	GSR	グルタチオン還元酵素
242972_at	---	---
239811_at	MLL5	CDNA FLJ46556fis、クローンTHYMU3039807
201027_s_at	EIF5B	骨髄性/リンパ性又は混合系白血病5(トリソリックホモログ、ドロソフィラ)
233742_at	MGC2654	真核生物翻訳開始因子5B
1556323_at	CUGBP2	LP8272
202926_at	NAG	CUG三塩基反復、RNA結合タンパク質2
220966_x_at	ARPC5L	神経芽細胞腫増幅タンパク質
1552302_at	MGC20235	アクチン関連遺伝子2/3複合体、サブユニット5様//アクチン関連遺伝子2/3複合体、サブユニット5様
238787_at	---	仮説的タンパク質MGC20235(hypothetical protein)
213505_s_at	SFRS14	転写遺伝子座
1555920_at	CBX3	スプライシング因子、アルギニン/セリンリッチ14
207186_s_at	FALZ	クロモボックスホモログ3(HP1γホモログ、ドロソフィラ)
210426_x_at	RORA	先天性(fetal)アルツハイマー抗原
1559993_at	---	RAR関連オーファンレセプターA
201602_s_at	PPP1R12A	---
216088_s_at	PSMA7	タンパク質ホスファターゼ1、制御(阻害因子)サブユニット12A13B
236254_at	VPS13B	プロテアソーム(プロソーム、マクロペイン)サブユニットαタイプ7
204731_at	TGFBR3	液胞タンパク質選別13B(酵母菌)
202269_x_at	GBP1	トランスホーミング増殖因子βレセプターIII(ペタグリカン、300kDa)
216981_x_at	SPN	グアニレート結合タンパク質1、インターフェロン誘導型、67kDa//グアニレート結合タンパク質1、インターフェロン誘導型、67kDa
212007_at	UBXD2	シアロホリン(gpL115、ロイコシアリン、CD43)
217755_at	HN1	UBXDドメイン含有2
213940_s_at	FNBP1	血液学的及び神経学的発現1
201831_s_at	VDP	フォルミン結合タンパク質1
225041_at	HSMPP8	小胞ドッキングタンパク質α115
1552584_at	IL12RB1	M期リンタンパク質、mpp8
		インターロイキン12レセプターβ1

30

40

【表 1 3 - 8】

(表 1 の続き)

プローブ	遺伝子記号	遺伝子タイトル
206133_at	BIRC4BP	XIAP関連因子-1
229625_at	GBP5	グアニレート結合タンパク質5
206500_s_at	C14orf106	染色体1が開いたリーディング・フレーム14(chromosome 14 open reading frame 106)
201881_s_at	ARIH1	アリアドネホモログ、ユビキチン結合酵素E2結合タンパク質、1(ドロソフィラ)
202323_s_at	ACBD3	アシルーコエンザイムA結合ドメイン含有3
204021_s_at	PURA	プリンリッチエレメント結合タンパク質A
215313_x_at	HLA-A	主要組織適合複合体、クラスI、A
207966_s_at	GLG1	ゴルジ体タンパク質1
235461_at	FLJ20032	仮説的タンパク質FLJ20032(hypothetical protein)
223983_s_at	C19orf12	染色体19が開いたリーディング・フレーム12(chromosome 19 open reading frame 12)
202021_x_at	EIF1	真核生物翻訳開始因子1
231577_s_at	GBP1	グアニレート結合タンパク質1、インターフェロン誘導性、67kDa
218927_s_at	CHST12	炭水化物(コンドロイチン4)スルホトランスフェラーゼ12

10

【表 1 4】

表 1 1 選択された遺伝子

遺伝子	説明(機能、ドメイン)
TCF7L2	TCL7L2遺伝子産物は、血液グルコースホメオスタシスに關する高移動度群(HMG)ボックス含有転写因子である。高移動度群(HMG又はHMGB)タンパク質は、クロマチンの中で、比較的低分子量の非ヒストン成分のファミリーである。HMG1(魚類ではHMG-Tとも呼ばれる)及びHMG2は、一本鎖DNAと優先的に結合し、二本鎖DNAを巻き戻す2つの非常に關連するタンパク質である。これらh配列特異性は有さないが、これらは屈曲した、又はねじれたDNAに対して高親和性を有し、直鎖DNAを屈曲させる。HMG1及びHMG2は、構造的及び機能的差異を示し、アスパラギン酸及びグルタミン酸残基に富む長い産生C-末端ドメインを有する2つのDNA結合HMG-ボックスドメイン(A及びB)を含有する。酸性尾部は、種々のDNA標的に対して、HMG1及び2中のタンデムHMGボックスの親和性を調節する。HMG1及びHMG2は、種々の生物学的プロセスにおいて、例えば、V(D)J再構成、転写開始及びDNA修復といった、核タンパク質複合体の集合体での重要な構築的役割を果たすように見える。

20

CLC	この遺伝子によりコード化されるタンパク質は、好酸球及び好塩基球において発現されるリゾソホリパーゼである。これは、リゾソファチジルコリンをグリセロホスホコリンと遊離脂肪酸に加水分解する。このタンパク質は、炭水化物又はIgE-結合活性を保有し得る。これは、ガレクチンファミリーのβ-ガラクトシド結合タンパク質に構造及び機能の両方で關連する。これは、炎症及び一部の骨髄性白血病に關連し得る。ガレクチン(従来のS-レクチン)は、ラクトースのようなβ-ガラクトシドと特異的に結合する。これらは活性のために金属イオンを必要としない。ガレクチンは、主に哺乳類に見られるが、しかし哺乳類のみに見られるものではない。これらのキノは不明瞭である。これらは、発生過程において制御され、分化、細胞制御及び組織構築に關与し得る。
-----	---

CDKN1C	この遺伝子によりコード化されるタンパク質は、いくつかのG1サイクリン/Cdk複合体に緊密に結合する強力な阻害因子、及び細胞増殖の負の制御因子である。この遺伝子における突然変異は、散在性癌及びベックウィズ-ウィードマン症候群に關与し、この遺伝子が主要抑制剤の候補であることを示唆する。異なるイソ型をコード化する3つの転写変異型が、この遺伝子に關して、発見されている。
--------	--

【表 1 5】

表 1 1 3 個の遺伝子サイン

遺伝子	説明(機能、ドメイン)
TOPI	この遺伝子は、DNAトポイソメラーゼをコード化し、これは転写中にDNAの位相幾何学的状態を制御及び変更する酵素である。DNAトポイソメラーゼは、過渡的な一本又は二本鎖の切断を触媒し、互いにストランドを交差させ、次いで再び切断部を再接合することにより、2つのDNAストランドの位相幾何学的な結合の数を制御(すなわち、高次螺旋旋回の数を変更)する。これらの酵素は、いくつかの酵素は、いくつかの機能を有する:転写時及びDNA複製時のDNA超螺旋の除去、再構成時のストランド切断、染色体凝縮、並びに、細胞分裂時に、絡み合ったDNAのもつれをほぐすこと。DNAトポイソメラーゼは、2つの部類に分けられる:I型酵素は一本鎖DNAを切断し、II型酵素は二本鎖DNAを切断する。 I型トポイソメラーゼは、ATP依存性酵素(逆ジャイレースを除く)であり、これらの構造及び反応機構により細分類することができる。IA型(細菌及び古細菌DNAトポイソメラーゼI、トポイソメラーゼIII並びに逆ジャイレース)及びII型(真核細胞トポイソメラーゼI及びトポイソメラーゼII)。これらの酵素は、主に、超螺旋DNAを正に及び/又は負に弛緩する役割を果たすが、逆ジャイレースは例外で、これは正の超螺旋をDNA中に導入することができる。 22対のDNA二本鎖を有する共有結合及び非共有結合複合体中のコア及びカルボキシル末端ドメインを含むトポイソメラーゼIIの結晶構造は、本質的にはB型のDNAの周りを「締め付ける」酵素を露呈する。酵素のコアドメインとカルボキシル末端ドメインの最初の8つの残基は、活性部位末核チロシン723を含み、有意な構造的類似性をDNAインテグラーゼのバクテリオファージファミリーを共有する。抗がん剤カンプトテシンのための結合モードは、トポイソメラーゼI-DNA複合体の三次元構造と組み合わせ化学及び生化学情報に基づいて提示されている。
CD24	この遺伝子は、成熟した顆粒球上及び多くのB細胞の中で発現するシアロ糖タンパク質をコード化する。コード化されたタンパク質は、細胞表面にグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)結合を介して、固定される。
STAP1	この遺伝子によりコード化されるタンパク質は、B細胞抗原レセプターシグナリングにおいてTecチロシンキナーゼの下流で活性化するドッキングタンパク質として機能する。このタンパク質は、インビトロでTecにより直接リン酸化され、そこで、これは正のフィードバックループに關与し、Tec活性を増加させる。

30

【表 1 6 - 1】

表 1 1 1 0 個の遺伝子サイン

遺伝子	説明(機能、ドメイン)
TULP4	タビー様タンパク質4は、WD40及びeSocSドメインを含有する。WD-40反復(WD又はβ-トランスデューション反復としても知られる)は、短いおよそ40のアミノ酸モチーフであり、多くの場合、Trp-Asp(W-D)ジペプチドで終止する。WD-含有タンパク質は、4~16反復ユニットを有し、その全ては、環状化されたβ-プロペラ構造を形成すると考えられる。WD-反復タンパク質は、全ての真核生物で見られる大きなファミリーであり、シグナル伝達及び転写制御から細胞周期制御及びアポトーシスまでにわたる種々の機能に關与する。全てのWD-反復タンパク質の根底にある共通の機能は、多タンパク質複合体の集合体を連係させることであり、反復ユニットは、タンパク質相互作用のための堅固なスcaffoldingとして働く。タンパク質の特異性は、反復それ自体の外側の配列により決定される。このような複合体の例は、Gタンパク質(βサブユニットがβ-プロペラである)、TAFII転写因子、及びE3ユビキチンリガーゼである。 SocSボックスは、まず、サイトカインシグナリングの抑制因子(SocS)のSH2ドメイン含有タンパク質の中で同定されたが、後になっても、WSB(SocSボックスを有するWD-40反復含有タンパク質)ファミリー、SSB(SocSボックスを有するSPRYドメイン含有タンパク質)ファミリー、ASB(SocSボックスを有するアキリン反復含有タンパク質)ファミリー、並びに、ras及びras様GTPアーゼの中でも発見された。 これらのタンパク質の中で見られたSocSボックスは、2~10の保存されていない残基により分離される2ブロックのよく保存された残基から構成される約50アミノ酸カルボキシル末端ドメインである。C末端が保存された領域は、未知の機能のL/Pリッチ配列であり、一方で、N-末端が保存された領域は、コンセンサスBCボックスであり、これはエロンギンBC複合体に結合する。この結合が、結合されたタンパク質をユビキチン化又はプロテアソーム区画にカップリングできることが提示されている。
AA741300	未知のタンパク質(新たなタンパク質)
ESCO1	ホモログ1の確立(ESCO1)は、姉妹染色分体接着に關与するアセチルトランスフェラーゼの保存されたファミリーに屬する。 真核生物における翻訳の正確な開始は複雑であり、多くの要因を必要とし、その一部は、複数のサブユニットから構成される。このプロセスは、3つの開始因子(IF1、IF2、IF3)のみしか有さない原核生物では、より単純である。これらの因子のうち2つが真核生物にも保存されている。IF1のホモログはeIF1Aであり、IF2のホモログはeIF5Bである。この遺伝子は、eIF5Bをコード化する。因子eIF1A及びeIF5Bは、他の開始因子及びGTPと共にリボソーム上で相互作用して、mRNAの開始コドン上に開始メチオン(tRNA)に配置し、その結果翻訳が正確に開始する。

40

【表 16 - 2】

(表 11 の続き)

遺伝子	説明(機能、ドメイン)
ACTR2	<p>ARP2/3アクトン関連タンパク質2ホモログ(ACTR2)は、ARP2/3複合体の主要な成分であることが知られている。この複合体は、細胞表面に位置し、細胞の形状、並びに、線状仮足アクトン集合体及び突出を介する運動性に本質的である。異なるイソ型をコード化する2つの転写変異型が、この遺伝子に関して、発見されている。</p>
WNK1	<p>WNK1遺伝子は、遺伝子発現において発現される細胞質セリン/トレオニンキナーゼをコード化する。タンパク質キナーゼは、ヌクレオチド三リン酸(多くの場合、ATP)からタンパク質基質側鎖中の1つ以上のアミノ酸残基にγホスフェートを転移して、配座変化を生じさせて酵素反応に影響を与える触媒サブユニットを所持する一群の酵素である。酵素は、2つに大きく分類され、基質特異性に関して特徴付けられる:セリン/トレオニン特異性及びチロシン特異性。タンパク質キナーゼ機能は、大腸菌から霊長類まで進化的に保存されてきている。タンパク質キナーゼは、分裂、増殖、アポトーシス及び分化などの多数の細胞プロセスにおいて役割を果たす。リン酸化反応は、通常、酵素活性、細胞位置又は他のタンパク質との結合を変えることにより、標的タンパク質の機能的変化を生じる。タンパク質キナーゼの触媒サブユニットは非常によく保存され、いくつかの構造は解明されており、多くの病気の治療のためにキナーゼ特性阻害因子を展開するべく大スクリーンに導く。真核生物タンパク質キナーゼは、他のセリン/トレオニンとチロシンタンパク質キナーゼとの両方と、共通の保存された触媒コアを共有するタンパク質の中でも広範なファミリーに属する酵素である。タンパク質キナーゼの触媒ドメイン内には、多くの保存された領域が存在する。触媒ドメインのN-末端領域には、リン残基の付近の残基のグリシンリッチ伸長部が存在し、これはATP結合に関与することが示されている。触媒ドメインの中心部分には、酵素の触媒活性に重要な保存されたアスパラギン酸残基が存在する。</p>
COCH	<p>この遺伝子によりコード化されるタンパク質は、ヒト、マウス及びニワトリで非常によく保存され、マウス配列に対しての、及びニワトリ配列に対しての、ヒト配列のアミノ酸同一性は、それぞれ94%と79%を示す。この遺伝子についてのハイブリダイゼーションは、聴覚神経節と感覚上皮との間で神経繊維に沿って位置する紡錘体状細胞において検出された。これらの細胞は、蝸牛神経孔で神経突起に随伴し、この開口部を通して、神経突起は神経感応有毛細胞に向かって延びる。これ及びニワトリ内耳におけるこの遺伝子の発現のパターンは、好酸球の沈着の歴史的発見に匹敵し、DFNA9(常染色体優性非症候群感覚神経性難聴9)患者からの側頭骨中のムコ多糖細胞間質に一致している。DFNA9を引き起こす突然変異は、この遺伝子において報告されている。代替的なスプライシングは、同一のタンパク質をコード化する多数の転写変異型を生じる。異なるイソ型をコード化する異なるスプライス変異型が記載されているが、これらの生物学的有効性は示されていない。このタンパク質は、金属イオン依存性接着部位(MIDAS)を介して細胞外真核生物タンパク質介在接着で、VWFAドメインを含有する。原核生物における細胞内VWAドメイン及びホモログは最近同定された。インテグリンβサブユニットにおいて提示されたVWFAドメインは、最近、配列に基づく方法を使用して、実証された。</p>

10

【表 16 - 3】

(表 11 の続き)

遺伝子	説明(機能、ドメイン)
SON	<p>この遺伝子によりコード化されるタンパク質は、ヒトB型肝炎ウイルス(HBV)のコアプロモーター及び第2のエンハンサーの上流制御配列の特異的DNA配列の上流に結合する。この結合を介して、これはHBVコアプロモーター活性、HBV遺伝子の転写、及びHBVウイルス粒子の産生を抑制する。このタンパク質は、ガリンなどの他のDNA結合構造タンパク質、MYCファミリーの癌タンパク質、及び癌タンパク質MOSと配列類似性を示す。これはまた、アポトーシスからの保護及びプレmRNAスプライシングに関与し得る。異なるイソ型をコード化するいくつかの転写変異型がこの遺伝子に関して記載されているが、これらのうちの2つのみが全長の性質を決定されている。このファミリーのメンバーは、コラーゲンスーパーファミリーに属する。コラーゲンIは一般に、結合組織構造の形成に関与する細胞外構造タンパク質である。この配列は主に、G-X-Yの反復であり、ポリペプチドは三重螺旋を形成する。反復の第一位置はグリシンであり、第二及び第三位置は任意の残基であることができるが、しばしばプロリン及びヒドロキシプロリンである。コラーゲンは、翻訳後にプロリンヒドロキシラーゼにより変性されてヒドロキシプロリン残基を形成する。ヒドロキシ化不良は、鎌血病の原因である。コラーゲンスーパーファミリーのいくつかのメンバーは、結合組織構造に関与しないが、同一の三重螺旋構造を共有する。</p>
TPR	<p>この遺伝子は、核孔複合体(NPC)の内側表面に結合した核内フィラメントを形成する大きなコイルドコイルタンパク質をコード化する。このタンパク質は、NPCのいくつかの成分と直接相互作用する。これがmRNA及びいくつかのタンパク質の核外移行に必要とされる。いくつかの異なるキナーゼ遺伝子でのこの遺伝子の5'末端の発癌性融合がいくつかの腫瘍形成で生じる。中間体フィラメント(IF)は、細胞骨格及び核エンベロップの基本成分であるタンパク質である。これらは一般に、8~14nm幅の繊維状構造を形成する。IFタンパク質は非常に大きな多重遺伝子ファミリーのメンバーのタンパク質であり、これは5つの主なサブグループに細分類されている。I型:酸性サイトケラチン。II型:塩基性サイトケラチン。型:ビメンチン、デスミン、グリア繊維酸性タンパク質(GFAP)、ペリフェリン及びプラスチン。IV型:神経フィラメントI、H及びM。α-インテグリン及びβ-インテグリン。V型:核ラミンA、B1、B2及びC。全てIFタンパク質は、これらが、コイルドコイルα-螺旋に調整され、少なくとも2つの特徴的な阻害を有する大抵300~350残基を含む中心ロッドドメインと、可変的長さのN-末端非螺旋ドメイン(頭)と、非螺旋でもあり、異なるIFタンパク質間で極度の長さの変動を示すC-末端ドメイン(尾)とから構成されるという点で、構造的に類似している。IFタンパク質は、進化的及び構造的に相関している一方で、これらはロッドドメインのいくつかの領域内を除いて、限定された配列ホモロジーを有する。このエントリー(ENTRY)は、IFタンパク質に見られる中心ロッドドメインを現す。</p>

20

【表 16 - 4】

(表 11 の続き)

遺伝子	説明(機能、ドメイン)
NOG	<p>この遺伝子によりコード化される分泌されたポリペプチドは、骨形成タンパク質-4(BMP4)トランスホーミング増殖因子-β(TGF-β)スーパーファミリータンパク質のメンバーを結合及び不活性化させる。細胞外マトリックスを介してTGF-βスーパーファミリーのメンバーよりも効率的に拡散することにより、このタンパク質は、形態形成勾配の作製において主要な役割を有し得る。このタンパク質は、発生の初期及び後期の両方で多面発現性効果を持有するよう見える。これは初めに、UV照射により人工的に腹側化させておいた胎児の垂直な背-腹体軸を回復する能力に基づいて、ゼノバースから単離された。オルソログをノックアウトされたマウスの結果は、このオルソログが、神経管融合及び接合形成などの多数の発生プロセスに関与することを示す。最近、近位指節癒着症(SYM1)及び多骨産産症候群(SYNS1)と無関係のファミリーにおけるいくつかの支配的なヒトNOG突然変異が同定された。SYM1及びSYNS1の両方が、これらの主要な特徴として多関節癒着を有し、この遺伝子として同一の領域(17q22)をマップ表示する。これらの突然変異の全てが、進化的に保存されたアミノ酸残基を変更した。このヒト遺伝子のアミノ酸配列はゼノバース、ラット及びマウスのものと高い相関性を有する。このファミリーは、真核生物ノギンタンパク質から構成される。ノギンは、骨形成タンパク質(BMP)を選択的に結合する糖タンパク質であり、骨芽細胞に添加されると、BMPの効果妨害する。ノギンは、間質性細胞の分化を停止させ、細胞成熟を妨げることが分かっている。</p>

30

【表 19】

表 12C

10種の遺伝子サイン			
遺伝子記号	上方プライマー配列	プローブ配列	下方プライマー配列
TULP4	GAAGAGTGTGTCTATGTGCATTTAAA	CAAGTTGCTCCATCTGATTCTTAAATT	CACATTCACACGGGAAGACAGGCTCA
AA741300	データなし		
ESCO1	CTAAACGGCAGCAGAAAAGGA	CATGTCTTATGGCTAACACGTTTCTT	TGCAAACCAACAGACTCAGCAAACAAGG
EIF5B	CAGCCAAGGCATCAAGATCA	GAGCGCCATTGACAAGCAAT	TCATCCTTGGTGTCTCTCGCTCTTGT
ACTR2	CATTCAACTCCAGGACATGGAA	TCGCCAAGACACCAGAATAAAACT	AGGCCTCTCTCGCCCTTGACTGGA
WNK1	GCATGCTTGAGATGGCTACATC	TGGTCACGCGACGGTAGAT	TCCTTACTCGGAGTGCCAAAATGCTGC
COCH	CCATTTAGGCAAATAAGCACTCCTT	GCCTCAGCAGTGTTTTAAACAAAG	AAGCCGCTGCCTTCTGGTTACAATTTACA
SON	GCTCTGCTCAGCCCTAAAGAAA	TCCTCAATATTGGCAGAAAATCCT	CCTCCCCCTCCTAAAGAGACACTGCCTG
TPR	CTGCCCAAGTCTGTCCAGAAC	CCTGACTGTGGGACAACCTCTT	ATCAGCAATCCGAGATCGATGGCCT
NOG	CACCCGGACACTTGATCGAT	GTTTATTGAAAACCTCGCTAGA	ACCGCTCCAACCGAGTTCCACCAC

遺伝子記号	プライマー配列	遺伝子記号	プライマー配列
TULP4-F1	GAAGAGTGTGTCTATGTGCATTTAAA	COCH-F1	CCATTTAGGCAAATAAGCACTCCTT
TULP4-R1	CAAGTTGCTCCATCTGATTCTTAAATT	COCH-R1	GCCTCAGCAGTGTTTTAAACAAAG
TULP4-Pro1	CACATTCACACGGGAAGACAGGCTCA	COCH-Pro1	AAGCCGCTGCCTTCTGGTTACAATTTACA
ESCO1-F1	CTAAACGGCAGCAGAAAAGGA	SON-F1	GCTCTGCTCAGCCCTAAAGAAA
ESCO1-R1	CATGTCTTATGGCTAACACGTTTCTT	SON-R1	TCCTCAATATTGGCAGAAAATCCT
ESCO1-Pro2	TGCAAACCAACAGACTCAGCAAACAAGG	SON-Pro1	CCTCCCCCTCCTAAAGAGACACTGCCTG
NOG-F1	CACCCGGACACTTGATCGAT	EIF5B-F1	CAGCCAAGGCATCAAGATCA
NOG-R1	GTTTATTGAAAACCTCGCTAGA	EIF5B-R1	GAGCGCCATTGACAAGCAAT
NOG-Pro1	ACCGCTCCAACCGAGTTCCACCAC	EIF5B-Pro1	TCATCCTTGGTGTCTCTCGCTCTTGT
WNK1-F1	GCATGCTTGAGATGGCTACATC	ACTR2-F1	CATTCAACTCCAGGACATGGAA
WNK1-R1	TGGTCACGCGACGGTAGAT	ACTR2-R1	TCCCAAGACACCAGAATAAAACT
WNK1-Pro1	TCCTTACTCGGAGTGCCAAAATGCTGC	ACTR2-Pro1	AGGCCTCTCTCGCCCTTGACTGGA
		TPR-F1	CTGCCCAAGTCTGTCCAGAAC
		TPR-R1	CCTGACTGTGGGACAACCTCTT
		TPR-Pro1	ATCAGCAATCCGAGATCGATGGCCT

10

20

【 0 1 4 5 】

〔 実施の態様 〕

- (1) 患者における真性糖尿病を診断する方法において、
 - a . 患者から採取された試験試料を提供する工程と、
 - b . T O P 1、C D 2 4 及び S T A P 1 遺伝子からなる群から選択される 2 つ以上の遺伝子を含む遺伝子サインの遺伝子発現プロファイルを測定する工程と、
 - c . 前記遺伝子発現プロファイルを前記遺伝子サインの診断用遺伝子発現プロファイルと比較する工程と、
 - d . 前記遺伝子発現プロファイルと前記診断用遺伝子発現プロファイルとの間の実質的な一致に少なくとも部分的に基づいて前記患者における糖尿病状態を判定する工程と、
 - e . 前記判定を医療専門家に表示する工程と、を含む、方法。
- (2) 前記判定工程がコンピュータシステムにより遂行され、前記コンピュータシステムが、遺伝子発現シグナルの線形結合、線形回帰モデル、ロジスティック回帰モデル、線形判別分析 (L D A) モデル、最近接モデル及びマイクロアレイの予測分析 (P A M) からなる群から選択される 1 つ以上のアルゴリズムを実行する、実施態様 1 に記載の方法。
- (3) 前記判定工程が、患者の代謝病プロファイルの分析を更に含む、実施態様 2 に記載の方法。
- (4) 前記遺伝子サインが、表 1 又は 6 に列挙される遺伝子から選択される 1 つ以上の遺伝子を更に含む、実施態様 1 に記載の方法。
- (5) 前記糖尿病状態が、糖尿病前状態又は 2 型糖尿病状態である、実施態様 1 に記載の方法。
- (6) 前記試験試料が、血液試料である、実施態様 1 に記載の方法。
- (7) 前記試験試料が、P B M C 又は C D 1 1 c + 若しくは C D 1 1 b + 若しくは E m r + 若しくは [C D 1 1 b + C D 1 1 c +] 若しくは [E m r + C D 1 1 b +] 若しくは [E m r + C D 1 1 c +] 若しくは [E m r + C D 1 1 b + C D 1 1 c +] 細胞若しくは C D 1 4 + 単球を含む、実施態様 1 に記載の方法。
- (8) 前記測定工程が、リアルタイム P C R 又は免疫化学的アッセイ若しくは特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションを伴う、実施態様 1 に記載の方法。

30

40

50

- (9) 患者における真性糖尿病を診断する方法において、
- a. 患者から採取された試験試料を提供する工程と、
 - b. 前記試験試料において、TULP4、AA741300、ESCO1、EIF5B、ACTR2、WNK1、COCH、SON、TPR及びNOG遺伝子からなる群から選択される2つ以上の遺伝子を含む遺伝子サインの遺伝子発現プロファイルを測定する工程と、
 - c. 前記遺伝子発現プロファイルを前記遺伝子サインの診断用遺伝子発現プロファイルと比較する工程と、
 - d. 前記遺伝子発現プロファイルと前記診断用遺伝子発現プロファイルとの間の実質的な一致に少なくとも部分的に基づいて前記患者における糖尿病状態を判定する工程と、
 - e. 前記判定を医療専門家に表示する工程と、を含む、方法。

10

(10) 遺伝子サインの前記遺伝子発現プロファイルが、TULP4、AA741300、ESCO1、EIF5B、ACTR2、WNK1、COCH、SON、TPR及びNOG遺伝子を含む、実施態様9に記載の方法。

【0146】

(11) 前記判定工程がコンピュータシステムにより遂行され、前記コンピュータシステムが、遺伝子発現シグナルの線形結合、線形回帰モデル、ロジスティック回帰モデル、線形判別分析(LDA)モデル、最近接モデル及びマイクロアレイの予測分析(PAM)からなる群から選択される1つ以上のアルゴリズムを実行する、実施態様10に記載の方法。

20

(12) 前記判定工程が、患者の代謝病プロファイルの分析を更に含む、実施態様9に記載の方法。

(13) 前記糖尿病状態が、糖尿病前状態又は2型糖尿病状態である、実施態様9に記載の方法。

(14) 前記試験試料が血液試料である、実施態様9に記載の方法。

(15) 前記試験試料が、PBMC又はCD11c⁺若しくはCD11b⁺若しくはEmr⁺若しくは[CD11b⁺CD11c⁺]若しくは[Emr⁺CD11b⁺]若しくは[Emr⁺CD11c⁺]若しくは[Emr⁺CD11b⁺CD11c⁺]細胞若しくはCD14⁺単球を含む、実施態様9に記載の方法。

(16) 前記測定工程が、リアルタイムPCR、免疫化学的アッセイ又は特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションを伴う、実施態様9に記載の方法。

30

- (17) 患者における真性糖尿病を診断する方法において、
- a. 患者から採取された試験試料を提供する工程と、
 - b. 前記試験試料において、TCF7L2及びCLC遺伝子を含む遺伝子サインの遺伝子発現プロファイルを測定する工程と、
 - c. 前記遺伝子発現プロファイルを前記遺伝子サインの診断用遺伝子発現プロファイルと比較する工程と、
 - d. 前記遺伝子発現プロファイルと前記診断用遺伝子発現プロファイルとの間の実質的な一致に少なくとも部分的に基づいて前記患者における糖尿病状態を判定する工程と、
 - e. 前記判定を医療専門家に表示する工程と、を含む、方法。

40

(18) 前記判定工程がコンピュータシステムにより遂行され、前記コンピュータシステムが、遺伝子発現シグナルの線形結合、線形回帰モデル、ロジスティック回帰モデル、線形判別分析(LDA)モデル、最近接モデル及びマイクロアレイの予測分析(PAM)からなる群から選択される1つ以上のアルゴリズムを実行する、実施態様17に記載の方法。

(19) 前記判定工程が、患者の代謝病プロファイルの分析を更に含む、実施態様18に記載の方法。

(20) 前記遺伝子サインが、表1又は6に列挙される遺伝子から選択される1つ以上の遺伝子を更に含む、実施態様17に記載の方法。

【0147】

50

(21) 前記糖尿病状態が、糖尿病前症状態又は2型糖尿病状態である、実施態様17に記載の方法。

(22) 前記試験試料が、血液試料である、実施態様17に記載の方法。

(23) 前記試験試料が、P B M C又はC D 1 1 c +若しくはC D 1 1 b +若しくはE m r +若しくは[C D 1 1 b + C D 1 1 c +]若しくは[E m r + C D 1 1 b +]若しくは[E m r + C D 1 1 c +]若しくは[E m r + C D 1 1 b + C D 1 1 c +]細胞若しくはC D 1 4 +単球を含む、実施態様17に記載の方法。

(24) 前記測定工程が、リアルタイムPCR、免疫化学的アッセイ又は特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションを伴う、実施態様17に記載の方法。

(25) 患者の糖尿病状態における変化を診断する方法において、

a. 第一時点で患者から採取された第一試験試料を提供する工程と、

b. 前記第一試験試料における遺伝子サインの第一発現プロファイルを測定する工程であって、前記遺伝子サインが、T O P 1、C D 2 4及びS T A P 1遺伝子を含む遺伝子の第一の群から、又は、T U L P 4、A A 7 4 1 3 0 0、E S C O 1、E I F 5 B、A C T R 2、W N K 1、C O C H、S O N、T P R及びN O G遺伝子を含む遺伝子の第二の群から選択される、測定する工程と、

c. 第二時点で前記患者から採取された第二試験試料を提供する工程と、

d. 前記第二試験試料における前記遺伝子サインの第二発現プロファイルを測定する工程と、

e. 前記第一発現プロファイルを前記第二発現プロファイルと比較する工程と、

f. 前記第一遺伝子発現プロファイルと前記第二遺伝子発現プロファイルとの間の実質的な差異に少なくとも部分的に基づいて前記患者における糖尿病状態の変化を判定する工程と、

g. 前記判定を医療専門家に表示する工程と、を含む、方法。

(26) 前記判定工程がコンピュータシステムにより遂行され、前記コンピュータシステムが、遺伝子発現シグナルの線形結合、線形回帰モデル、ロジスティック回帰モデル、線形判別分析(L D A)モデル、最近接モデル及びマイクロアレイの予測分析(P A M)からなる群から選択される1つ以上のアルゴリズムを実行する、実施態様25に記載の方法。

(27) 前記判定工程が、患者の代謝病プロファイルの分析を更に含む、実施態様25に記載の方法。

(28) 前記第一時点と前記第二時点との間の期間が、0~2年又は1/4~2年又は1/2~2年又は2~5年又は5~10年又は若しくはそれ以上である、実施態様25に記載の方法。

(29) 前記糖尿病状態が糖尿病前症状態又は2型糖尿病状態である、実施態様25に記載の方法。

(30) 前記第一及び第二試験試料が血液試料である、実施態様25に記載の方法。

【0148】

(31) 前記測定工程が、リアルタイムPCR、免疫化学的アッセイ又は特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションを伴う、実施態様25に記載の方法。

(32) 患者の糖尿病に対する感受性を査定するためのキットであって、前記査定は試験装置により行われる、キットにおいて、

a. 患者から試験試料を回収するための試薬と、

b. 患者の試験試料におけるT C F 7 L 2及びC L C遺伝子又はこれらの変異型を含む遺伝子サインの発現プロファイルを測定するための試薬と、これらのためのパッケージングと、を含む、キット。

(33) 試験試料を回収するための前記試薬が、血液試料を回収するための試薬である、実施態様32に記載のキット。

(34) 遺伝子サインの前記発現プロファイルを測定するための前記試薬が、リアルタイムPCR又は免疫化学的アッセイ又は特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーショ

10

20

30

40

50

ンのための試薬である、実施態様 3 2 に記載のキット。

(3 5) 患者の糖尿病に対する感受性を査定するためのキットであって、前記査定は試験装置により行われる、キットにおいて、

a . 患者から試験試料を回収するための試薬と、

b . 患者の試験試料における T O P 1、C D 2 4 及び S T A P 1 遺伝子を含む遺伝子サインの遺伝子発現プロファイルを測定するための試薬と、これらのためのパッケージングと、を含む、キット。

(3 6) 試験試料を回収するための前記試薬が、血液試料を回収するための試薬である、実施態様 3 5 に記載のキット。

(3 7) 遺伝子サインの前記発現プロファイルを測定するための前記試薬が、リアルタイム P C R 又は免疫化学的アッセイ又は特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションのための試薬である、実施態様 3 5 に記載のキット。

(3 8) 患者の糖尿病に対する感受性を査定するためのキットであって、前記査定は試験装置により行われる、キットにおいて、

a . 患者から試験試料を回収するための試薬と、

b . 患者の試験試料における T U L P 4、A A 7 4 1 3 0 0、E S C O 1、E I F 5 B、A C T R 2、W N K 1、C O C H、S O N、T P R 及び N O G 遺伝子を含む遺伝子サインの遺伝子発現プロファイルを測定するための試薬と、これらのためのパッケージングと、を含む、キット。

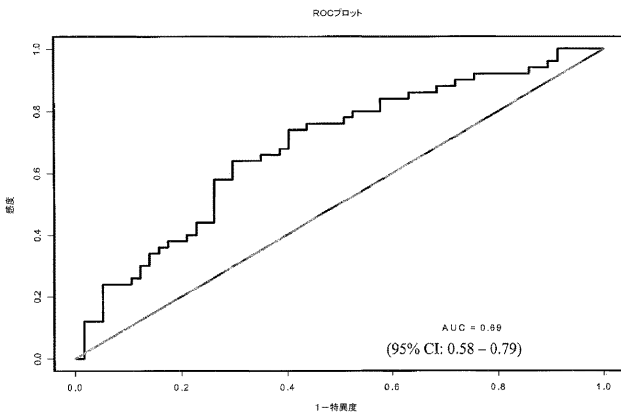
(3 9) 試験試料を回収するための前記試薬が、血液試料を回収するための試薬である、実施態様 3 8 に記載のキット。

(4 0) 遺伝子サインの前記発現プロファイルを測定するための前記試薬が、リアルタイム P C R 又は免疫化学的アッセイ又は特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションのための試薬である、実施態様 3 8 に記載のキット。

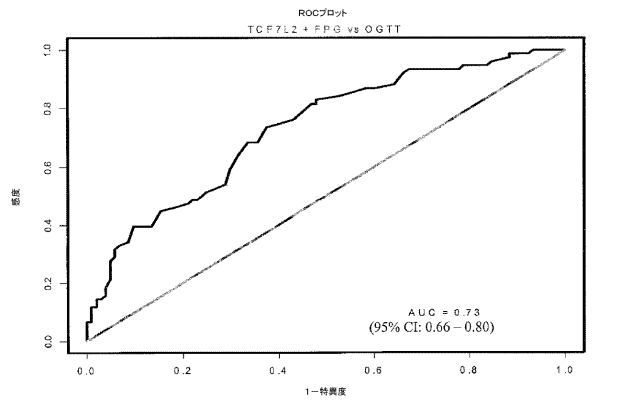
10

20

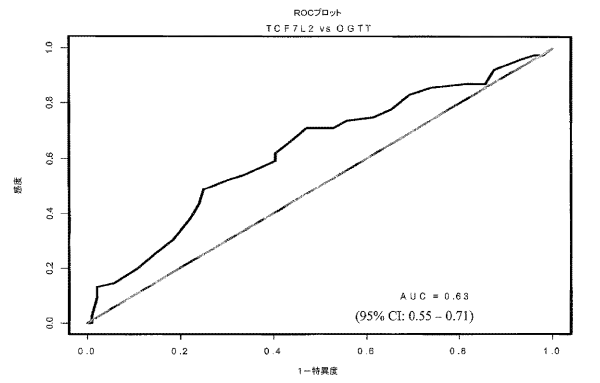
【 図 1 】



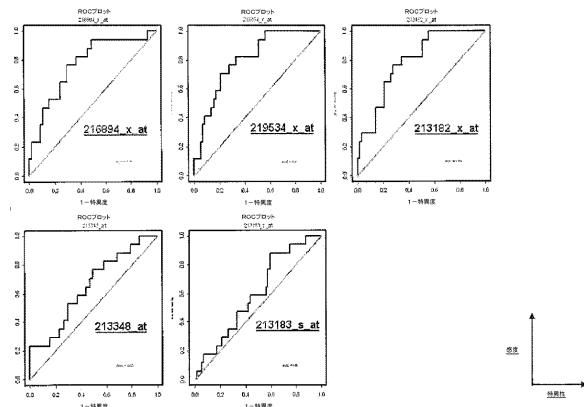
【 図 2 B 】



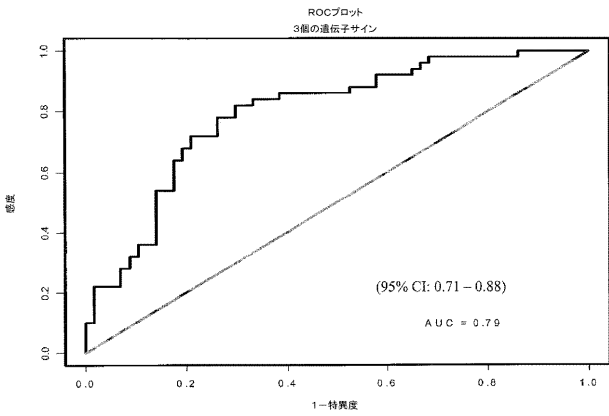
【 図 2 A 】



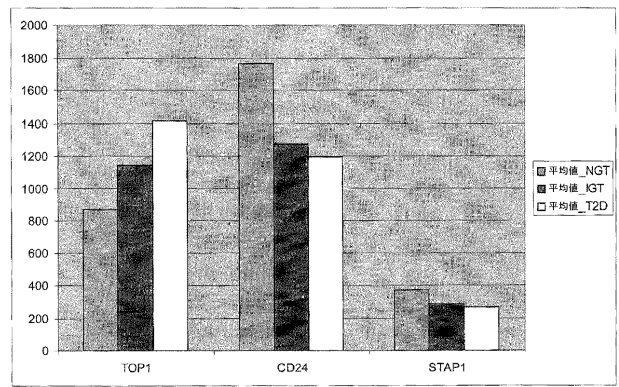
【 図 3 】



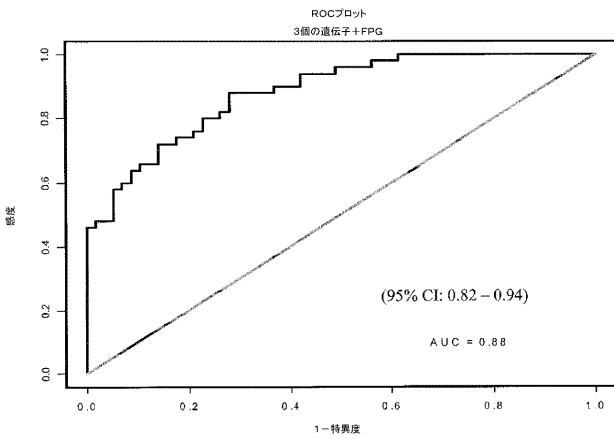
【 図 4 A 】



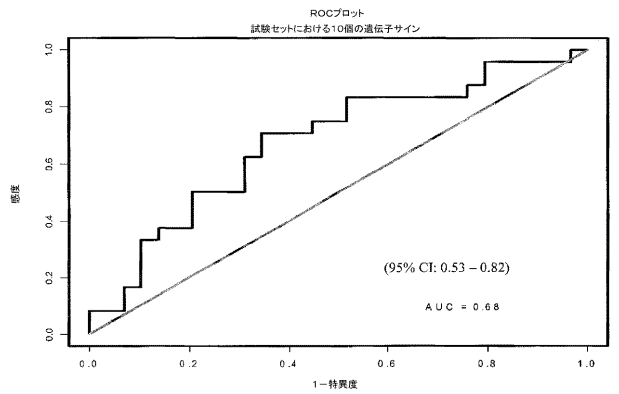
【 図 4 C 】



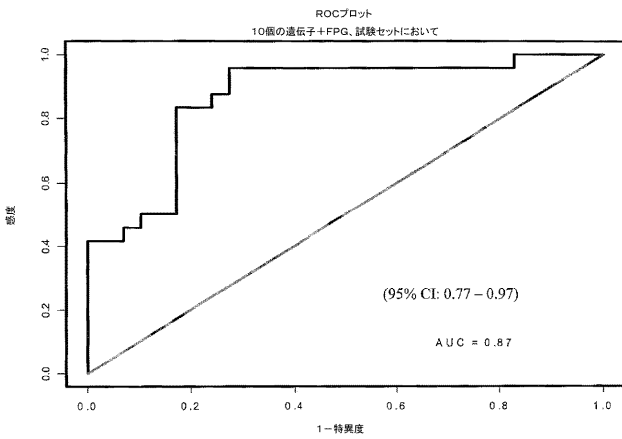
【 図 4 B 】



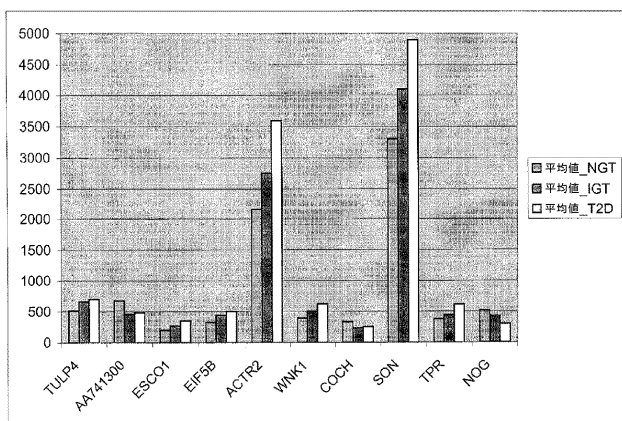
【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



【 図 5 C 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/083424

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68		
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) C12Q		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, Sequence Search, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/22886 A (WISCONSIN ALUMNI RES FOUND [US]) 21 March 2002 (2002-03-21) abstract	
A	EP 1 538 219 A (UNIV. ERASMUS MEDICAL CT [NL]) 8 June 2005 (2005-06-08) abstract	
P, X	FR 2 910 025 A (BIOMERIEUX SA [FR]; HOSPICES CIVILS DE LYON [FR]) 20 June 2008 (2008-06-20) sequence 65	1-8, 35-37
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
14 April 2009	24/08/2009	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Cornelis, Karen	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2008/083424

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>MA ET AL: "Identifying leukocyte gene expression patterns associated with plasma lipid levels in human subjects" ATHEROSCLEROSIS, ELSEVIER IRELAND LTD, IE, vol. 191, no. 1, 13 February 2007 (2007-02-13), pages 63-72, XP005886383 ISSN: 0021-9150 table 2</p>	35-37
A	<p>GLASGOW S C ET AL: "Unfavourable expression of pharmacologic markers in mucinous colorectal cancer" BRITISH JOURNAL OF CANCER, vol. 92, no. 2, 31 January 2005 (2005-01-31), pages 259-264, XP002523552 ISSN: 0007-0920 the whole document</p>	
A	<p>KAIZER ELLEN C ET AL: "Gene expression in peripheral blood mononuclear cells from children with diabetes." THE JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM SEP 2007, vol. 92, no. 9, September 2007 (2007-09), pages 3705-3711, XP002523553 ISSN: 0021-972X the whole document</p>	
A	<p>SU MIN-CHENG ET AL: "CD24 expression is a prognostic factor in intrahepatic cholangiocarcinoma." CANCER LETTERS 8 APR 2006, vol. 235, no. 1, 8 April 2006 (2006-04-08), pages 34-39, XP002523554 ISSN: 0304-3835 the whole document</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2008/083424

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- a sequence listing
- table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- on paper
- in electronic form
- c. time of filing/furnishing
- contained in the international application as filed
- filed together with the international application in electronic form
- furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/083424

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
see additional sheet	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. <input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. <input checked="" type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
see annex	
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
	<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2008/083424

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-8, 35-37 (completely) and 25-31 (partially)

A method of diagnosing diabetes by measuring the gene expression profile of at least 2 or more genes selected from TOP1, CD24 and STAP1, and a kit with reagents for measuring the expression of these 3 genes.

2. claims: 9-16, 38-40 (completely) and claims 25-31 (partially)

A method of diagnosing diabetes by measuring the gene expression profile of TULP4, AA741300, ESCO1, EIF5B, ACTR2, WNK1, COCH, SON, TRP, and NOG, and a kit with reagents for measuring the expression of these 10 genes.

3. claims: 17-24, 32-34 (completely)

A method of diagnosing diabetes by measuring the gene expression profile of TCF7L2 and CLC, and a kit with reagents for measuring the expression of these genes.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2008/083424

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0222886	A	21-03-2002	AU	9105901 A	26-03-2002
EP 1538219	A	08-06-2005	WO	2005054512 A2	16-06-2005
FR 2910025	A	20-06-2008	WO	2008074963 A2	26-06-2008

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

- (72)発明者 パルマ・ジョン・エフ
アメリカ合衆国、 9 2 0 0 9 カリフォルニア州、カールズバッド、シティオ・リマ 7 3 9 3
- (72)発明者 バッカス・ジョン・ダブリュ
アメリカ合衆国、 1 4 5 1 9 ニューヨーク州、オンタリオ、オーチャード・クリーク・ドライブ
2 1 8 8
- (72)発明者 ツァン・イー
アメリカ合衆国、 9 2 1 2 7 カリフォルニア州、サン・ディエゴ、カイエン・クリーク・コート
1 5 2 4 1
- (72)発明者 ワン・イーシン
アメリカ合衆国、 0 7 9 2 0 ニュージャージー州、バスキング・リッジ、ジョンストン・コート
1
- (72)発明者 ユー・ジャック・エックス
アメリカ合衆国、 9 2 1 2 8 カリフォルニア州、サン・ディエゴ、アルタ・カーメル・コート
1 2 0 4 3、ナンバー 1 1 8
- (72)発明者 ベナー・タティアナ
アメリカ合衆国、 0 7 9 8 0 ニュージャージー州、スターリング、マーサー・ストリート 2 8
5
- (72)発明者 デレーチョ・カルロ
アメリカ合衆国、 0 8 7 3 3 ニュージャージー州、レイクハースト、パイン・ストリート 3 1
1
- (72)発明者 リー・ドン・ユー
アメリカ合衆国、 9 2 1 3 0 カリフォルニア州、サン・ディエゴ、カミニート・エル・リンコン
3 5 8 6

Fターム(参考) 4B063 QA19 QQ08 QQ43 QQ53 QQ79 QR32 QR36 QR48 QR55 QS33
QS34 QX01

专利名称(译)	糖尿病的诊断生物标志物		
公开(公告)号	JP2011502537A	公开(公告)日	2011-01-27
申请号	JP2010534182	申请日	2008-11-13
[标]申请(专利权)人(译)	维里德克斯有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	贝里指数有限责任公司		
[标]发明人	パルマジョンエフ バッカスジョンダブリュ ツアンイー ワンイーシン ユージャックエックス ベナータティアナ デレーチョカルロ リードンユー		
发明人	パルマ・ジョン・エフ バッカス・ジョン・ダブリュ ツアン・イー ワン・イーシン ユー・ジャック・エックス ベナー・タティアナ デレーチョ・カルロ リー・ドン・ユー		
IPC分类号	C12Q1/68 C12Q1/02 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/112 C12Q2600/156 C12Q2600/158 G01N33/53 G01N33/6893 G16B25/00 G16B40/00 G16H50/20 Y02A90/26		
FI分类号	C12Q1/68.A C12Q1/02.ZNA G01N33/53.M		
F-TERM分类号	4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01		
代理人(译)	藤田千绘		
优先权	60/987540 2007-11-13 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了用于鉴定在诊断患有糖尿病前期疾病状态和明显II型糖尿病的患者的PBMC中差异表达的基因组的方法，显示3基因和10个基因标记以准确预测患者的糖尿病疾病状态。该申请还描述了用于在5点护理机构中快速诊断患者的糖尿病状态的试剂盒。

FIGURE 2B:

