

明 細 書

発明の名称： 遺伝子多型を利用した判定方法

技術分野

[0001] 本発明は、遺伝子多型を利用した判定方法に関する。

背景技術

[0002] 日本における脳卒中の死亡者は年間 11 万人にのぼり、その 7～8 割を占めている脳梗塞は、半身麻痺や認知症などの主要な原因となっている。脳梗塞は、脳細胞へ血液を送る血管が閉塞し、脳細胞が死滅する疾患である。脳梗塞は、脳の比較的太い血管の動脈硬化を主因としたアテローム血栓性脳梗塞、脳の細い血管が閉塞するラクナ梗塞、心房細動などの心臓病により心臓で生じた血栓が心臓から流れ出して脳の大血管を閉塞する心原性脳塞栓などに分類される。

[0003] 特開 2020-092660 号公報（特許文献 1）には、脳梗塞未発症の被験者由来のサンプルにおける RNF213 p. R4810K 遺伝子多型の有無および被験者の性別情報に基づいて、当該被験者の脳梗塞の発症リスクを予測する方法が開示されている。国際公開第 2020/121489 号（特許文献 2）には、脳梗塞未発症の被験者由来のサンプルにおける RNF213 p. R4810K 遺伝子多型を有する場合、当該被験者の脳梗塞の発症時期は通常よりも早いと判断することが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献 1：特開 2020-092660 号公報

特許文献 2：国際公開第 2020/121489 号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 脳梗塞を発症した患者に対して、MRI（Magnetic Resonance Imaging）検査または CT（Computed Tomo

graphy) 検査を行い、脳梗塞の種類および、脳血管の異常が生じている部位が特定される。脳梗塞に対する処置としては、血管内に詰まった血栓を薬物により溶解させる血栓溶解療法／tPA (tissue Plasminogen Activator)、カテーテルと呼ばれる細い管を足の付け根などから血管に入れて脳の病変部の血栓を直接除去する血管内治療が主に行われる。

[0006] 脳梗塞に対する血管内治療を受けた患者は、治療された血管が再閉塞することがある。このため、医師は術後数月にわたり定期的に再閉塞の発症有無を観察する必要がある、患者の往診等の負担も大きい。本発明は、血管内治療後の血管の再閉塞リスクの予測を容易にする方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明の一実施形態は、
被験者から採取されたサンプルを用いて前記被験者がRNF213p. R4810K多型を有するか否かを検出することと、
前記被験者が前記RNF213p. R4810K多型を有するとき、頭蓋内脳血管の閉塞に対する血管内治療後に、前記血管内治療を受けた血管が再閉塞する可能性が高いと判定することと、
を含む、頭蓋内脳血管の再閉塞を予測するための方法に関する。

[0008] 本発明の一実施形態は、
RNF213p. R4810K多型の有無に基づき、頭蓋内脳血管の閉塞に対する血管内治療後に、前記血管内治療を受けた血管が再閉塞する可能性が高いか否かを判定するためのキットであって、
前記RNF213p. R4810K多型に対応する遺伝子変異を含む塩基配列を増幅するPCRプライマー対と、
前記RNF213p. R4810K多型の野生型塩基配列に結合する第1プローブおよび変異型塩基配列に結合する第2プローブと、を備え、
前記第1プローブと前記第2プローブとは、互いに異なる蛍光色素で標識

されるキットに関する。

[0009] 本発明の一実施形態は、

RNF213p. R4810K多型からなる、頭蓋内脳血管の閉塞に対する血管内治療後に、前記血管内治療を受けた血管が再閉塞する可能性が高いか否かを判定するための遺伝子マーカーに関する。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、血管内治療後の血管の再閉塞リスクを予測することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]実施例における症例研究のフローチャートである。

[図2]脳主幹動脈閉塞患者における、多型保有者および非保有者の即時および早期再閉塞の発生率を示すグラフである。

[図3]頭蓋内アテローム性動脈硬化症関連脳主幹動脈閉塞患者における、多型保有者および非保有者の即時および早期再閉塞の発生率を示すグラフである。

[図4]突然の左半身麻痺を発症したRNF213p. R4810K多型を有する59歳の男性（表3のcase 3）の例を示す。（A）拡散強調磁気共鳴（MR）画像により、右中大脳動脈（MCA）の皮質灌流領域内にいくつかの急性虚血性病変が示される。（B）MR血管撮像により、右MCAM1閉塞が示される。（C）右内頸動脈血管造影により、右近位MCAM1閉塞が示される。（D）右内頸動脈血管撮像により、有効再開通したが、機械的血栓除去後に末梢灌流の遅延を伴う重度の狭窄が残ったことが示される。（E）血管形成および頭蓋内ステント後の最終血管撮像図である。（F）術後7日目に早期再閉塞し、突然の左半身麻痺を発症した。

発明を実施するための形態

[0012] [頭蓋内脳血管の再閉塞を予測するための方法]

本発明の一実施形態に係る頭蓋内脳血管の再閉塞を予測するための方法は、

被験者から採取されたサンプルを用いて前記被験者がRNF213 p. R4810K多型を有するか否かを検出するステップと、

前記被験者が前記RNF213 p. R4810K多型を有するとき、頭蓋内脳血管の閉塞に対する血管内治療後に、前記血管内治療を受けた血管が再閉塞する可能性が高いと判定するステップと、を含む。

[0013] 本発明に係る頭蓋内脳血管の再閉塞を予測するための方法によれば、血管内治療後の血管の再閉塞リスクが高いか否かの予測を容易に行うことができる。本発明に係る頭蓋内脳血管の再閉塞を予測するための方法によれば、血管内治療後の再閉塞のリスクが高い患者を識別することができる。これにより、再閉塞のリスクが高い患者には、再閉塞の発症を防止するための治療および／または観察を優先的にまたは高頻度で行うことができる。本方法は、血管の再閉塞リスクの予測を補助する方法ともいえる。本方法は、医師による判断工程を含まず、人間を診断する方法には該当しない。

[0014] Ring finger protein 213遺伝子(RNF213)のp. R4810K多型(c. 14576G>A)は、東アジアにおけるもやもや病(ウィリス動脈輪閉塞症)¹⁾の創始者多型である¹⁻⁴⁾。RNF213 p. R4810K多型は、配列番号2で表される核酸配列における73097 G>Aの一塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP)である。このRNF213 SNPは健康な日本人の2.5%、韓国人の2.7%、中国人の0.9%に見られるが、コーカソイド(欧州人)には見られない^{3, 5, 6)}。46958名の日本人(脳梗塞17752名、対照29206名)を対象にした近年の研究の結果、この多型は非心原性脳卒中患者の5.2%、健康な対照群の2.1%に見られ、RNF213 p. R4810K多型が日本人の虚血性脳卒中(脳梗塞)のリスク因子であることが示されている⁷⁾。

[0015] 配列番号2は、RNF213遺伝子(別名ミステリン遺伝子:moyamoya stenosis-associated AAA+ and RING finger protein)

およびその周辺領域の遺伝子 [FLJ3520、NPTX1、CARD14 および Raptor (KIAA1303)] を含むヒト第17番染色体DNAの部分ヌクレオチド配列であり、NCBIに登録されているContig #NT010783.15の第43560001~43795000番目のヌクレオチドに相当する。なお、「G>A」の表記は、「>」の記号の前にメジャーアレルの塩基（この場合G）を、後にマイナーアレルの塩基（この場合A）を記載している。

[0016] RNF213遺伝子は、dual AAA+ATPaseドメインとE3リガーゼドメインを含むタンパク質をコードし、血管リモデリングおよび血管新生の制御に重要な役割を果たす^{3, 8)}。近年の研究では、RNF213 p. R4810Kの過剰発現によりヒト内皮細胞の血管新生活性および増殖が抑制される一方、野生型RNF213の過剰発現ではこれらが起こらないことが示された^{8, 9)}。さらに、RNF213の基質であるフィラミンAが蓄積することで、血管平滑筋細胞の中膜から内膜への遊走および増殖によって血管リモデリングが促進されることが示されている^{10, 11)}。このような血管系の細胞の変化によってRNF213 p. R4810K多型関連頭蓋内主幹動脈狭窄の特徴である血管のネガティブリモデリングが生じる可能性が示唆されている¹²⁻¹⁴⁾。

[0017] （被験者から採取されたサンプルを用いて、被験者がRNF213 p. R4810K多型を有するか否かを検出するステップ）

RNF213 p. R4810K多型の有無は、ゲノムDNA、RNAまたはタンパク質から検出することができる。検出されるRNF213 p. R4810K多型は、変異型のホモ接合型であってよく、変異型と野生型とのヘテロ接合型（GA型）であってもよい。

[0018] 多型の検出に核酸を使用する場合、RNF213遺伝子の14576番目の塩基が、野生型ではグアニン（G）であるのに対し、変異型ではアデニン（A）となるSNPを検出すればよい。SNPの検出は当該技術分野において周知の方法を用いればよく、例えばPCR-RFLP (r e s t r i c t

ion fragment length polymorphism:制限酵素切断断片長多型)法、PCR-SSCP(single strand conformation polymorphism:一本鎖DNA高次構造多型解析)法、PCR-SSO(specific sequence oligonucleotide:特異的配列オリゴヌクレオチド)法、ASO(AAllele Specific Oligonucleotide)ハイブリダイゼーション法、シーケンス法、次世代シーケンス法、ARMS(Amplification Refracting Mutation System)法、変性濃度勾配ゲル電気泳動(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)法、RNAseA切断法、DOL(Dye-labeled Oligonucleotide Ligation)法、TaqMan PCR法、リアルタイムPCR法、SNaP Shot法、質量分析法、primer extension法、インベダー法、DNAチップ法またはDNAマイクロアレイを用いた方法、一塩基伸長法、サザンブロットハイブリダイゼーション法、ドットハイブリダイゼーション法、Pyrosequencing法、Exonuclease Cycling Assay法などが使用できる。SNPは後述するキットを使用して検出してもよい。

[0019] RNF213p. R4810K多型の有無をタンパク質を用いて検出する場合、RNF213遺伝子がコードするタンパク質(配列番号1)の4810番目のアルギニン(R)がリジン(K)に変わる変異を検出すればよい。アミノ酸変異は、例えば立体構造解析、質量分析、抗原抗体反応、超遠心、電気泳動、吸光度測定またはこれらの組み合わせなどを利用して検出することができる。

[0020] サンプルは、ゲノムDNAまたはタンパク質等を採取可能な任意の組織、細胞または体液由来であってよい。サンプルは、例えば、毛髪、爪、皮膚、粘膜、血液、唾液、涙、尿、糞便、汗、リンパ液、母乳、羊水、体腔液(腹水、胸水、脳脊髄液を含む)などが挙げられる。血液は、全血であってもよ

く、血漿または血清であってもよい。入手の際の低侵襲性の観点から、サンプルは血液または唾液であることが好ましい。サンプルは、生理食塩水、緩衝液などで希釈されていてもよく、組織または細胞の抽出物または破砕物であってもよい。サンプルは凍結保存されてもよい。サンプルの採取は、サンプルの種類に応じて公知の方法で行えばよい。

[0021] 被験者は、ヒトであってよく、脳梗塞未発症の人でもよく、脳梗塞を発症した人であってもよい。ヒトの人種は、特に限定されないが、好ましくは東アジア人（イーストアジアン／モンゴロイド）である。東アジア人は、日本、朝鮮、中国、台湾およびモンゴルの人々のいずれかを起源に持つ人を意味する。東アジア人は、日本人、朝鮮人または中国人であってよい。人種とは、ホモ・サピエンス種の中の、特定のサブグループとして区別可能な集団である。世界の主要な人種としては、遺伝情報等に基づいて例えばアフリカン（ネグロイド）、コーカソイド（白人）、オセアニアン（オーストラロイド）、イーストアジアン（モンゴロイド）およびネイティブアメリカンの5種に分類され得る。

[0022] （被験者がRNF213p. R4810K多型を有するとき、頭蓋内脳血管の閉塞に対する血管内治療後に、血管内治療を受けた血管が再閉塞する可能性が高いと判定するステップ）

本発明においては、患者がRNF213p. R4810K多型を有するとき、血管内治療後の再閉塞が起こりやすいと判定される。血管内治療後の再閉塞の要因としては、血管内治療時には血管内皮細胞を傷つけるおそれがあり、このときに生じた傷害がもとで、血栓形成機転が促進され、再び血栓により閉塞することが考えられる。再閉塞前の頭蓋内脳血管の閉塞（血管内治療を行う要因となった閉塞）は、心原性脳梗塞およびアテローム性動脈硬化性脳梗塞が挙げられる。アテローム性動脈硬化は、脳血管の内腔にコレステロール、脂肪、炎症細胞などが蓄積してプラークが形成されて血管の内腔が狭くなった状態を指し、ここに血栓が付着したり、プラークが破綻すると脳梗塞となり得る。再閉塞前の頭蓋内脳血管の閉塞がアテローム性動脈硬化を

原因とする閉塞であるとき、血管内治療の際により血管が傷つきやすいため、再閉塞がより発生しやすいと考えられる。患者がRNF213p.R4810K多型を有し、かつ脳梗塞の原因がアテローム性動脈硬化であるとき、血管内治療後の血管の再閉塞のリスクはより高いと予測される。また、患者がRNF213p.R4810K多型を有するとき、血管内治療後の再狭窄が起こりやすいことが予測される。本発明は、頭蓋内脳血管の再狭窄を予測するための方法であってもよい。

[0023] 血管内治療としては、カテーテルの先端につけられたステント（金属の網）に血栓をからめて回収する方法、カテーテルに接続された吸引ポンプによって血栓を吸引しながら回収する方法、バルーンによって血管を拡張する方法、血管内にステントを留置する方法などが挙げられる。血管内治療は、発症した脳梗塞の種類、血栓の大きさおよび位置により適切な治療法またはこれらの組み合わせが選択される。血管内治療は、脳血管の狭窄に対しても行われ得る。

[0024] 頭蓋内脳血管の再閉塞を予測するための方法は、血管が再閉塞する可能性に基づいて血管内治療に使用する器具を選択することをさらに含んでもよい。上述のように、血管に負担が生じることで血管の再閉塞が起こりやすくなる可能性がある。血管への負担は、吸引によって血栓を回収する方法やステントによって血栓を回収する方法では小さく、バルーンにより血管を拡張する方法やステントを留置する方法では大きいと予想される。再閉塞が起こる可能性が高いと判定された場合には、より血管への負担が少ない治療法および器具を選択することで、再閉塞のリスクを減少し得る。選択される器具は薬剤溶出性ステント（drug eluting stent: DES）であってもよい。

[0025] 血管が再閉塞する可能性に基づいて、投与する薬剤の用量、用法、投与期間、投与時期などを調整してもよい。薬剤は抗血小板剤、抗トロンビン剤、抗凝固剤、デキストランなどが挙げられる。薬剤は、経口または注射投与される薬剤であってもよい。

[0026] 血管が再閉塞する可能性が高いと判定するステップにおいて、血管内治療後の通常よりも早い期間に、治療を受けた血管が再閉塞する可能性が高いと判定することを含んでもよい。血管内治療後の通常よりも早い期間は、血管内治療により再開通が認められてから血管内治療術中までであってもよく（即時再閉塞）、血管内治療により再開通が認められてから2週間以内であってもよい（早期再閉塞）。

[0027] 血管内治療が行われる頭蓋内脳血管は、脳主幹動脈であってよく、脳主幹動脈としては頭蓋内内頸動脈、中大脳動脈、前大脳動脈、椎骨動脈、脳底動脈などが含まれる。血管内治療後の再閉塞のリスクは特に頭蓋内内頸動脈および中大脳動脈において高い傾向がある。

[0028] [キット]

本発明の一実施形態に係るキットは、

RNF213 p. R4810K多型の有無に基づき、頭蓋内脳血管の閉塞に対する血管内治療後に、前記血管内治療を受けた血管が再閉塞する可能性が高いか否かを判定するためのキットであって、

前記RNF213 p. R4810K多型に対応する遺伝子変異を含む塩基配列を増幅するPCRプライマー対と、

前記RNF213 p. R4810K多型の野生型塩基配列に結合する第1プローブおよび変異型塩基配列に結合する第2プローブと、を備え、

前記第1プローブと前記第2プローブとは、互いに異なる蛍光色素で標識される。

キットは、血管内治療を受けた血管が再狭窄する可能性が高いか否かを判定するためのキットであってもよい。

[0029] 上記プライマー対および第1プローブと第2プローブとのセットを有するキットを使用すれば、被験者から採取されたサンプルから迅速に、かつ高い特異性でRNF213 p. R4810K多型を検出することができる。被験者がRNF213 p. R4810K多型を有するか否かに基づき、血管内治療後の血管の再閉塞または再狭窄のリスクが高いか否かを予測することがで

きる。本キットは、血管内治療後の血管の再閉塞または再狭窄のリスクを予測するための情報を提供することができる。本キットは、被検者から採取されたサンプル中の核酸、好ましくはゲノムDNAのRNF213遺伝子におけるp. R4810K多型(c. 14576G>A)を判別できる。検出されるRNF213 p. R4810K多型は、変異型のホモ接合型または変異型と野生型とのヘテロ接合型であってよい。

[0030] PCRプライマー対は、被検者から採取された検体中のゲノムDNAを鋳型とし、ポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction: PCR)により、分析対象であるRNF213 p. R4810K多型のSNP部位を含む核酸断片を増幅することができる。野生型を検出するための増幅部位と変異型を検出するための増幅部位は同一である。増幅する核酸断片の長さとしては、RNF213 p. R4810K多型のSNP部位を含む80～100塩基が好ましい。このようなPCRプライマー対としては、配列番号7に示す塩基配列からなる領域に対してストリンジェントな条件でハイブリダイズするオリゴヌクレオチド(フォワードプライマーおよびリバースプライマー)が好ましい。ここでのストリンジェントな条件とは、鋳型DNAにプライマーが結合するステップであるPCRにおけるアニリングにおいて、鋳型DNAとプライマーとの結合が特異的である条件をいう。プライマーの T_m は、例えば58～60℃になるように設計されてよい。PCRプライマーの塩基長は15～25塩基であることが好ましい。特異性の観点から、本発明に係るキットは、好ましくは配列番号3に示す塩基配列を有するプライマーおよび配列番号4に示す塩基配列を有するプライマーを含むPCRプライマー対を備える。

5' - TTCCAGAACGTCCAGCAAGT - 3' (forward ; 配列番号3)

5' - ACAGTCCTGGTCCTGTCAGA - 3' (Reverse ; 配列番号4)

[0031] 下記の配列は、RNF213遺伝子においてRNF213 p. R4810

K多型のSNPを含む領域の塩基配列である。SNP部位を含む限りに、下記配列の任意の塩基配列を増幅することができる。

5' -CCCAATAACATTTTTTTAGGTAAATAAAAATT
GTTACTGGGTGGTCTTCCCTTCTCCAGGAAGCAG
AGCTGAGGCTGGTAAAGTTCCTGCCTGAGATTTT
GGCCTTGCAAAGGGATCTAGTGAAGCAGTTCCAG
AACGTCCAGCAAGTTGAATACAGCTCCATCAGAG
GCTTCTCAGCAAGCACAGCTCAGGTGTGGCTCT
GCTCTGACAGGACCAGGACTGTCCCGCATTTGGC
GGTTCGAAAGGATCACTGCATAGGGGAACAGGGT
GGGGCGGAGGGGAGGAGGCGCTGATGGGTGCTCT
ATAGCCTAAGCCCTTACCATGCGGTGAAGGGTGC
TTGAACCCCCAAA-3' (配列番号7)

[0032] プローブは、FRETの原理を利用したリアルタイムPCRに用いられ、当該方法に適合するように、プローブの配列が設計され、レポーター蛍光色素およびクエンチャーが選択される。第1プローブは、RNF213遺伝子の14576番目のSNP部位が野生型塩基（G）である核酸断片に結合する。第2プローブは、RNF213遺伝子の14576番目のSNP部位がG>Aに置き換わった変異型の核酸断片に結合する。第1プローブは、好ましくは、野生型RNF213遺伝子を鋳型としてPCRにより増幅された野生型塩基配列を有する核酸断片に対してストリンジントな条件でハイブリダイズするが、PCRにより増幅されたRNF213 p. R4810K多型のSNP部位を含む核酸断片に対してストリンジントな条件でハイブリダイズしない。一方、第2プローブは、PCRにより増幅されたRNF213 p. R4810K多型のSNP部位を含む核酸断片に対してストリンジントな条件でハイブリダイズするが、野生型RNF213遺伝子を鋳型としてPCRにより増幅された野生型塩基配列を有する核酸断片に対してストリンジントな条件でハイブリダイズしない。ストリンジントな条件とは、P

CRにより増幅された核酸断片とプローブとの間で、アニーリング時に特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドは形成されない条件をいう。プライマー対によって増幅されたPCR産物のほぼ中央を標的とするようにプローブの配列を設計することが好ましい。

- [0033] プローブの塩基長は、好ましくは10～25塩基であり、より好ましくは15～20塩基である。プローブの T_m が例えば68～70℃になるように設計すればよい。特異性の観点から、本発明に係るキットは、好ましくは配列番号5に示す塩基配列を有する第1プローブおよび配列番号6に示す塩基配列を有する第2プローブのセットを含む。

第1プローブ：5' -CTCCATCAGAGGCTTCCT-3' (配列番号5)

第2プローブ：5' -CTCCATCAAAGGCTTCCT-3' (配列番号6)

- [0034] 以上の配列は一例であって、特異的なハイブリダイゼーションを支障なく行える限度において一部の塩基配列に改変が施されたものであってもよい。ここでの「一部の改変」とは、塩基の一部が欠失、置換、挿入および／または付加されていることを意味する。改変にかかる塩基数は例えば1～3個、1～2個、または1個である。

- [0035] プローブとしては、加水分解プローブ、Molecular Beacon、サイクリングプローブなどが挙げられるが、これらに限定されない。加水分解プローブの一例は、5'末端が蛍光色素で、3'末端がクエンチャー物質で修飾されたオリゴヌクレオチドである。加水分解プローブは、PCRのアニーリング時に鋳型DNAに特異的にハイブリダイズするが、プローブ上にクエンチャーが存在するため、励起光を照射しても蛍光の発生は抑制される。PCRの伸長反応ステップで、Taq DNAポリメラーゼが有する5'→3'エキソヌクレアーゼ活性により、鋳型DNAにハイブリダイズした加水分解プローブが分解されると、蛍光色素がプローブから遊離し、クエンチャーによる蛍光の抑制が解除されて蛍光を発する。この蛍光強度を測定

することにより、増幅産物の生成量を測定することができる。蛍光色素としては、FAM (6-carboxyfluorescein)、ROX (6-carboxy-X-rhodamine)、Cy3およびCy5 (Cyanine系色素)、HEX (4, 7, 2', 4', 5', 7'-hexachloro-6-carboxyfluorescein)、VIC、TET (tetrachlorofluorescein)、NED、CAL Fluor Orange 560 (CFO)、CAL Fluor Gold 540、CAL Fluor Red 590、CAL Fluor Red 610、CAL Fluor Red 635、Quasar 570、Quasar 670、Quasar 705、T (JOE) など挙げられるが、これらに限定されない。クエンチャーとしては、TAMRA (tetramethylrhodamine; 登録商標)、BHQ (Black Hole Quencher; 登録商標)-1、BHQ-2、BHQ-3、Pulsar 650、Spacer C3、MGB-Eclipse (登録商標)、DABCYLなどが挙げられるが、これらに限定されない。

[0036] 第1プローブおよび第2プローブは、お互いに異なる蛍光色素で標識される。お互いに異なる蛍光色素の組み合わせは、蛍光特性が異なり、蛍光測定において相互に干渉がなければ特に限定されない。第1プローブの蛍光色素と第2プローブの蛍光色素の組合せとしては、FAMとHEX（いずれが第1プローブの蛍光色素であってもよい。以下の組合せにおいても同様である）、FAMとCFO、FAMとVIC、FAMとTET、HEXとJoe、HEXとTET等を挙げることができる。

[0037] 本発明に係るキットは、界面活性剤およびプロテイナーゼKを含むPCR緩衝液をさらに備えてもよい。界面活性剤は、細胞および生体組織等を溶解できる。界面活性剤としては、陰イオン界面活性剤、陽イオン界面活性剤、両性界面活性剤または非イオン界面活性剤を選択することができる。界面活性剤は好ましくは、陰イオン界面活性剤であり、より好ましくはドデシル硫

酸ナトリウムである。界面活性剤がドデシル硫酸ナトリウムであるとき、その濃度はサンプルとの混合時に0.1～0.5% (w/v) であることが好ましい。プロテイナーゼKは、DNAおよびRNA分解酵素を不活化する作用がある。プロテイナーゼKの濃度は、サンプルとの混合時に100～300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であることが好ましい。PCR緩衝液は、KCl、 MgCl_2 およびdNTPミックス (deoxyribonucleotide 5' - triphosphate; dATP、dGTP、dCTPおよびdTTPからなる混合物) をさらに含んでもよい。PCR緩衝液は、特に限定されないが、好ましくはトリス緩衝液である。dNTP、 MgCl_2 、KClおよび緩衝液について、当業者であれば適切な濃度を設定することができ、例えば MgCl_2 の濃度は1.5 mM、KClの濃度は35 mM、dNTPの濃度はそれぞれ200 μM 、トリス緩衝液の濃度は10 mMである。PCR緩衝液は、DNAポリメラーゼに吸着する生体由来の負電荷物質（例えば、ある種の糖および色素等）およびDNAに吸着する生体由来の正電荷物質（例えば、ある種のタンパク質等）であってPCRを阻害する物質に結合し、前記負電荷物質および正電荷物質のPCR阻害作用を中和する物質を含んでもよい。このようなPCR緩衝液として、遺伝子増幅用試薬AmpdirectまたはAmpdirect Plus（いずれも登録商標；島津製作所）を使用することができる。

[0038] 本発明に係るキットは、臨床現場で簡便かつ迅速に遺伝子検査を行う遺伝子型迅速判定システムにおいて使用することができる。遺伝子型迅速判定システムとしては、例えば島津製作所製「GTS-7000」が挙げられる。

[0039] 本発明の一実施形態は、

RNF213 p. R4810K多型の有無に基づき、頭蓋内脳血管の閉塞に対する血管内治療後に、前記血管内治療を受けた血管が再閉塞または再狭窄する可能性が高いか否かを判定するための上記キットの製造における、

前記RNF213 p. R4810K多型に対応する遺伝子変異を含む塩基配列を増幅するPCRプライマー対と、

前記RNF213 p. R4810K多型の野生型塩基配列に結合する第1プローブおよび変異型塩基配列に結合する第2プローブとの使用である。

[0040] 本キットを使用してRNF213 p. R4810K多型を検出する方法を説明する。RNF213 p. R4810K多型を検出する方法の一例は、

(1) 被験者から採取されたサンプルを、界面活性剤およびプロテイナーゼKを含むPCR緩衝液と混合する工程；

(2) 工程(1)で得られた混合液を、DNAポリメラーゼ、RNF213 p. R4810K多型に対応する遺伝子変異を含む塩基配列を増幅するPCRプライマー対ならびに第1プローブおよび第2プローブと混合して、PCRを行う工程；および

(3) PCR産物を検出する工程；を含む。

[0041] 被験者から採取されたサンプルは、[頭蓋内脳血管の再閉塞を予測するための方法]に記載されたサンプルであってよい。サンプルは好ましくは被験者のゲノムDNAを含む。サンプルの量としては、含有されるゲノムDNA量に依存するが、サンプルが唾液または末梢血であれば、0.1 μ L ~ 10 μ L程度であってよく、0.5 μ L ~ 2 μ Lであってよい。

[0042] (1) 被験者から採取されたサンプルを界面活性剤およびプロテイナーゼKを含むPCR緩衝液と混合することにより、サンプルが溶解して核酸が遊離される。

[0043] (2) サンプルとPCR緩衝液との混合液は、DNAポリメラーゼおよびRNF213 p. R4810K多型に対応する遺伝子変異を含む塩基配列を増幅するPCRプライマー対と混合することによりPCRを開始することができる。DNAポリメラーゼは、特に限定されないが、好熱性細菌由来の耐熱性DNAポリメラーゼであってよく、Taq、Tth、KOD、Pfuおよびこれらの変異体を使用することができる。非特異的増幅を避けるため、ホットスタートDNAポリメラーゼを使用してもよい。ホットスタートDNAポリメラーゼとしては、BIOTAQ（登録商標）ホットスタートDNAポリメラーゼが挙げられる。ホットスタートDNAポリメラーゼには、抗D

N Aポリメラーゼ抗体が結合したDNAポリメラーゼ、酵素活性部位を熱感受性化学修飾したDNAポリメラーゼなどが挙げられる。PCR条件（温度、時間およびサイクル数）は、当業者であれば容易に設定することができる。本キットを使用した方法では、PCR産物の検出はリアルタイム測定（リアルタイムPCR）によって行うことができる。

[0044] （3）PCR産物のリアルタイム測定において、使用する蛍光色素に対応した蛍光フィルターを用いてPCR産物の増幅曲線をモニターする。PCRサイクル数に応じて蛍光強度が増加する場合には、サンプル中における対象のDNAの存在が陽性であると判定され、一方、PCRにおいて蛍光強度が増加しない場合には、対照のDNAの存在が陰性であると判定される。PCR産物を検出する方法において、第1プローブに由来する蛍光強度および第2プローブに由来する蛍光強度の増加を比較することにより、RNF213p. R4810K多型を検出することができる。RNF213p. R4810K多型がホモ接合型である場合、第2プローブに由来する蛍光強度の増加が観察されるが、第1プローブに由来する蛍光強度の増加は観察されない。RNF213p. R4810K多型が変異型と野生型とのヘテロ接合型である場合、第1プローブおよび第2プローブの両方に由来する蛍光強度の増加が観察される。野生型RNF213遺伝子（ホモ接合型）では、第1プローブに由来する蛍光強度の増加のみが観察される。第2プローブに由来する蛍光強度の増加が観察される場合に、RNF213p. R4810K多型が検出されたと判定される。

[0045] 他の検出方法として、PCR産物の増幅曲線が、ある一定の閾値線（Threshold Line）と交差するPCRサイクル数（Cq値）を基に、RNF213p. R4810K多型の存在を判定することができる。通常、Cq値が小さい場合、鋳型DNA量が多く、Cq値が大きい場合、鋳型DNA量が少ないことが示される。第2プローブの使用に対して所定のCq値が与えられる場合、RNF213p. R4810K多型が検出されたと判定される。RNF213p. R4810K多型が変異型と野生型とのヘテロ接

合型である場合、両方の蛍光標識プローブの使用に対して一定のC_q値が与えられるが、両者が同一の値を示すとは限らない。野生型RNF213遺伝子（ホモ接合型）では、第1プローブの使用に対してのみ、一定のC_q値を与える。用いた蛍光標識プローブにおいて、PCR産物の増幅曲線がある一定の閾値線と交差しない場合、すなわちC_q値が与えられない場合は、プローブが結合する塩基配列が存在しないことが示される。

[0046] [マーカー]

本発明の一実施形態は、

RNF213 p. R4810K多型からなる、頭蓋内脳血管の閉塞に対する血管内治療後に、前記血管内治療を受けた血管が再閉塞または再狭窄する可能性が高いか否かを判定するための遺伝子マーカーである。

本遺伝子マーカーを利用すれば、被験者がRNF213 p. R4810K多型を有するとき、頭蓋内脳血管の閉塞に対する血管内治療後に、血管内治療を受けた血管が再閉塞または再狭窄する可能性が高いと判定することができる。本遺伝子マーカーは、血管内治療後の血管の再閉塞のリスクを予測するための情報を提供することができる。

[0047] 本発明の一実施形態は、頭蓋内脳血管の閉塞に対する血管内治療後に、前記血管内治療を受けた血管が再閉塞または再狭窄する可能性が高いか否かを判定するためのRNF213 p. R4810K多型の使用である。

[0048] [予測する方法]

本発明の一実施形態は、

被験者から採取されたサンプルを用いて前記被験者がRNF213 p. R4810K多型を有するか否かを検出することを含む、頭蓋内脳血管の再閉塞または再狭窄を予測する方法である。

被験者がRNF213 p. R4810K多型を有するとき、頭蓋内脳血管の閉塞に対する血管内治療後に、血管内治療を受けた血管が再閉塞または再狭窄する可能性が高いと予測することができる。被験者がRNF213 p. R4810K多型を有するか否かを検出する方法は、上述の「頭蓋内脳血管

の再閉塞を予測するための方法」に記載の方法を使用してよい。

実施例

[0049] 以下、実施例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0050] 機械的血栓除去（MT）は、内頸動脈（internal carotid artery: ICA）および中大脳動脈（middle cerebral artery: MCA）のM1（M1 segment）の閉塞による急性虚血性脳卒中（acute ischemic stroke: AIS）のための標準的な治療である¹⁵⁾。東アジア人においては、MTが行われた脳主幹動脈閉塞（large vessel occlusion: LVO）の約15－25%は頭蓋内アテローム性動脈硬化症（intracranial atherosclerotic disease: ICAD）が原因であったと報告されている^{16, 17)}。最近の研究では、頭蓋内アテローム性動脈硬化症関連脳主幹動脈閉塞（ICAD-related LVO）における血管内治療（endovascular therapy: EVT）後に、再閉塞が起こりやすいことが示唆されている¹⁸⁻²⁰⁾。これは、狭窄部には破綻しやすい不安定プラークが存在し、血栓除去により血管内皮の損傷と血小板の凝集が促進されるためと考えられる^{21, 22)}。RNF213p.R4810K多型は、MTが行われたアジア人患者のICAD関連LVOと関連し得る。RNF213p.R4810K多型を有するICAD患者におけるネガティブリモデリングは、従来のICAD関連LVOと比較してバルーン血管形成術を含むEVT後の再閉塞の頻度が異なり得る。前方循環系頭蓋内LVO患者のうちRNF213p.R4810K多型の保有者と非保有者との間で、EVTの転帰が異なるかは検証されていない。ここでは、前方循環系頭蓋内LVO患者のEVTの臨床転帰におけるRNF213p.R4810K多型の影響を検証する。

[0051] [方法]

本研究の知見をサポートする特定化されたデータは、妥当な要求に基づい

て、関連する倫理委員会の許可が得られた後に発明者から利用可能である。

[0052] (試験集団)

症状発現または最終確認日から7日以内に国立循環器病研究センター (National Cerebral and Cardiovascular Center: NCV C) に入院した全A I S患者はNCVC脳卒中レジストリに登録されている²³⁻²⁵⁾。本研究では、2011年1月から2021年3月までにレジストリに登録され、(1) 頭蓋内内頸動脈または中大脳動脈M1の閉塞がみられ、(2) E V Tを施行し、(3) 本研究およびR N F 2 1 3 p. R 4 8 1 0 K多型のジェノタイピング試験への書面による同意が得られた患者を対象に後ろ向き研究を行った。臨床データおよび放射線データはデータベースより前向きに得られ、後ろ向き分析のために取り出された。本研究は、ヘルシンキ宣言に従って実施され、NCVCの倫理委員会によって承認された。NCVC脳卒中レジストリは、ClinicalTrials.gov (NC T02251665)に登録されている。

[0053] (R N F 2 1 3 ジェノタイピング試験)

R N F 2 1 3 p. R 4 8 1 0 K多型のジェノタイピングは、完全自動化遺伝子解析システム (G T S - 7 0 0 0 ; 株式会社島津製作所またはL i g h t C y c l e r 9 6 ; ロシュ社) によってE V T後に実施された。これらのシステムによれば、リアルタイムP C Rによって1 μ Lの全血からS N Pを直接検出できる²⁶⁾。使用されたプライマー配列は、

5' - T T C C A G A A C G T C C A G C A A G T - 3' (f o r w a r d ; 配列番号3)

5' - A C A G T C C T G G T C C T G T C A G A - 3' (r e v e r s e ; 配列番号4)

であった。プローブセットは、

5' - C T C C A T C A G A G G C T T C C T - 3' (配列番号5) および

5' - C T C C A T C A A A G G C T T C C T - 3' (配列番号6)

であった。

患者のうち22名は、リアルタイムPCRによるジェノタイピングの結果をDNAシーケンスによって確かめた。RNF213 p. R4810K多型解析の結果、p. R4810KのGA多型を多型保有者とし、野生型ホモ接合体GG遺伝子型を多型非保有者とした。

[0054] (EVT)

全ての血管内手術は、米国心臓協会／米国脳卒中協会のガイドライン¹⁵⁾または脳神経血管内機械的血栓除去術のための日本ガイドライン²⁷⁾に従って行われた。全ての患者は局所麻酔下でEVTを行い、必要に応じて意識下鎮静剤を投与した。本研究では、バルーンガイドカテーテルが使用され、可能な限り頭蓋外内頸動脈まで誘導した。EVT施術には、ステントリトリバー血栓回収、接触吸引、頭蓋内バルーン血管形成術、頭蓋内ステントまたはこれらの組み合わせが含まれる。再開通の評価には、modified Thrombolysis In Cerebral Infarction: mTICIを使用した²⁸⁾。下記のようにICAD関連LVOと診断されたとき、抗血小板剤であるアスピリンおよびクロピドグレルが周術期に共投与される。

[0055] (臨床データの収集)

以下の臨床データを収集した；年齢、性別、prestroke modified Rankin Scale (mRS) score、入院時の収縮期血圧、baseline National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) score、現在の喫煙、心房細動、血管リスク因子（高血圧、糖尿病および脂質代謝異常）および過去の病歴（指標の脳卒中前の脳卒中または一過性脳虚血発作）。MCA領域の虚血変化の程度を拡散強調核磁気共鳴（diffusion-weighted magnetic resonance: MR）画像または非造影コンピュータ断層撮影（non-contrast computed tomography: CT）に基づいて、Alberta Stroke Program Early Computed Tomo

graphy Score (ASPECTS) で評価した^{29, 30)}。閉塞箇所は入院時のデジタル差分血管撮像法 (digital subtraction angiography) によって特定された。経静脈的血栓溶解 (intravenous thrombolysis) はアルテプラゼ 0.6 mg/kg (日本における承認用量) を用いて行われた³¹⁾。時間の測定基準は、発症の確認から血栓溶解療法までの時間と発症の確認から鼠径部穿刺までの時間を含んでいた。急性 LVO の原因は、脳卒中学会認定神経医により 3 つのグループ (ICAD 関連、脳塞栓: Embolism および動脈解離: arterial dissection) に分類された。ICAD 関連 LVO の定義は、術後の血管撮像およびフォローアップ血管撮像で検出された EVT 後の標的動脈病変部で 50% 以上の残存狭窄が確認され、明確な脳塞栓の近位発生源が確認されない、急性頭蓋内動脈閉塞とした^{18, 20, 32, 33)}。頭蓋内動脈狭窄は、規格に従って測定した³⁴⁾。脳塞栓による LVO の定義は、明確な脳塞栓の近位発生源が確認され、例えば心房細動または原因不明の脳塞栓性脳卒中を伴う急性頭蓋内動脈閉塞とした³⁵⁾。退院時の抗血栓療法は、抗血小板剤 (アスピリン、クロピドグレルおよびシロスタゾール) および抗凝固剤 (直接経口抗凝固剤 [ダビガトラン、リバロキサバン、アピキサバンおよびエドキサバン] およびワルファリン) を含む。

[0056] (転帰)

術後の転帰は、即時再閉塞、最終 mTICI ≥ 2 b 再開通、および早期再開通であった。即時再閉塞は術中の再閉塞と定義し、早期再開通は術後に有効再開通の確認後 2 週間以内に MR 血管撮像法で検出される再閉塞と定義した^{19, 20)}。臨床転帰は 90 日後の mRS スコアが 0-2、くも膜下出血、脳実質出血および症候性の頭蓋内出血 (intracranial hemorrhage: ICH) であった。ICH は、発現から 36 時間以内に非造影 CT またはグラジエントエコー MR イメージングによって評価した。脳実質出血は、欧州共同急性脳卒中研究 (European Cooperative Acute Stroke Study) に示されるように、脳梗

塞部位の出血であって、占拠性効果を有するものと定義した³⁶⁾。症候性のICHは、NIHSSスコアがベースラインから4ポイント以上増加したICHと定義した³⁷⁾。

[0057] (統計解析)

データは、連続型変数については中央値（四分位範囲 [IQR]）として、カテゴリ変数については頻度およびパーセンテージとしてまとめた。多型保有者と多型非保有者との間の統計的差異はMann-Whitney U検定またはFisherの両側正確検定によって評価した。術後の転帰は、年齢調整された多変量ロジスティック回帰モデルを作成して、RNF213p. R4810K多型との関連が解析され、多型非保有者は対照として使用された³⁸⁾。95%信頼区間 (confidence intervals: CIs) のオッズ比 (Odds ratios: ORs) が算出された。RNF213p. R4810K多型は、ICADによる頭蓋内内頸動脈または中大脳動脈M1の狭窄／閉塞と関連があるため^{8, 38-40)}、臨床データおよび転帰をさらにICAD関連LVOの場合に限定し、多型保有者と多型非保有者との間で比較した（二次分析、図1）。0.05未満のP値を統計的に有意とみなした。すべての解析は、Stata/IC統計パッケージ、バージョン15.1 (Stata Corp LP) を使用して行った。

[0058] [結果]

(患者の特徴)

急性頭蓋内ICA/MCAM1閉塞に対してEVTを受けた341人の患者のうち、64名の患者は、RNF213p. R4810Kジェノタイプピングデータの欠如のために除外された（図1）。RNF213p. R4810Kジェノタイプピングデータを有さない患者と比較した場合、ジェノタイプピングを受けた患者はより若く（76歳対80歳、 $P=0.02$ ）、脂質異常症の頻度が高かった（45.7%対31.2%、 $P=0.04$ ）。分析された277名の患者（128名が女性 [46.2%]；年齢の中央値 76歳 [IQR、69～82歳]；中央値NIHSSスコア 11 [IQR 8-1

7]) のうち、RNF213p、R4810K多型は10人の患者(3.6%)に見出された。多型保有者は、多型非保有者と比較して、より若く(67歳対76歳、 $P < 0.01$)、現在の喫煙者である可能性が高く(80.0%対43.4%、 $P = 0.05$)、心房細動を有する可能性が低く(30.0%対63.4%、 $P = 0.05$)、より高いベースライン収縮期血圧を有していた(172mmHg対151mmHg、 $P = 0.02$) (表1)。多型保有者は、多型非保有者と比較して、ICAD関連LVOである頻度が高く、脳塞栓LVOである頻度が低かった(両方とも $P < 0.01$)。抗血小板剤は、退院時において多型非保有者よりも多型保有者へより頻繁に投与された(アスピリンおよびクロピドグレルの両方に対して $P < 0.01$)。

[0059] (RNF213p、R4810K多型保有者と非保有者)

多型保有者と多型非保有者との間のEVTの詳細および転帰を表2に示す。多型保有者は多型非保有者と比較して、血管形成術がより高頻度を実施され(40.0%対12.0%、 $P < 0.01$)、血管形成術の中央値は2倍であり(4対2、 $P = 0.27$)、頭蓋内ステント手術がより高頻度を実施された(20.0%対2.2%、 $P = 0.03$)。多型保有者は多型非保有者と比較して、鼠径部穿刺から手術終了までの時間が長かった(177分対72分、 $P = 0.08$)。多型保有者は、即時再閉塞率が高かった(40.0%対5.6%、 $P < 0.01$ ；年齢調整されたOR 9.83、95%CI 2.47-39.22) (表2および図2)が、最終mTICI $\geq 2b$ 再開通の割合は、保有者では100.0%であり、非保有者では81.8%であった($P = 0.22$ ；年齢調整されたOR 3.91、95%CI 0.64-23.99)。多型保有者は多型非保有者と比較して、早期再閉塞の頻度が高かった(60.0%対0.4%、 $P < 0.01$ ；年齢調整されたOR 346.4、95%CI 33.21-3612) (表2および図2)。手術終了から早期再閉塞までの日数の中央値(IQR)は、4(2-9)日であった。早期再閉塞に対する繰り返しのEVTは、4名の多型保有者および1名の多型非保有者に行われた。90日後のmRSスコア0-2の頻

度は、多型保有者60.0%および多型非保有者51.7%において見られた($P=0.75$)。くも膜下出血、脳実質出血および症候性ICHの割合は、多型保有者と多型非保有者との間で変わらなかった(表2)。RNF213p. R4810K多型を有する患者の概要を表3に示し、RNF213p. R4810K多型を有する代表的な患者を図4に示す。

[0060] (ICAD関連LVO患者の群内解析)

ICAD関連LVO($n=30$)と診断された患者に限定し、同様の解析を行った(二次分析、図1)。多型保有者($n=7$)は、多型非保有者($n=23$)と比較してより若かった(60歳対73歳、 $P=0.04$)。血管形成の割合、血管形成術手術の総数および頭蓋内ステントにおいて、多型保有者と多型非保有者との間で有意な差は見られなかった。鼠径部穿刺から手術終了までの時間は、多型保有者においてより長かった(190分対142分、 $P=0.09$)。即時再開塞率は、多型保有者(57.1%)と多型非保有者(34.8%)との間で有意差はなかった($P=0.39$; 年齢調整されたOR 2.38、95%CI 0.39–14.47)(表2および図3)。最終mTICI $\geq 2b$ 再開通の割合は、多型保有者(100.0%)と多型非保有者(91.3%)との間で同等であった($P=1.00$)。多型保有者は多型非保有者と比較して、早期再開塞の頻度が高かった(71.4%対4.3%、 $P<0.01$ 調整されたOR 47.6)、95%CI 3.53–674.0)(表2および図3)。手術終了から早期再開塞までの日数の中央値(IQR)は、2(2–6)日であった。臨床転帰に関して有意な群間差異は見られなかった。

[0061] [考察]

EVTを受けた前方循環LVOを有する患者($n=277$)のコホートを分析することによって、RNF213p. R4810K多型保有者は多型非保有者と比較して、EVT中の即時再開塞率が高く(40.0%対5.6%)、EVT後2週間以内の早期再開塞率も高いこと(60.0%対0.4%)が示された。RNF213p. R4810K多型保有者において、ICA

Dは急性LVOの70.0%の原因となった一方、多型非保有者では8.6%であった。早期再閉塞は、多型非保有者より多型保有者で高頻度に見られ、対象をICAD関連LVO患者に限定しても多型保有者でより頻繁に見られた。多型保有者と多型非保有者との間の即時および早期再閉塞の発生率の差異は、特にRNF213p. R4810K多型に起因するICADの血管病態に由来し得る¹²⁻¹⁴⁾。

[0062] 特定の遺伝子多型と関連したEVTの転帰はこれまで報告されておらず、RNF213遺伝子多型は東アジア集団に特有である。本発明者らの研究において、RNF213p. R4810K多型の頻度は3.6%であり、これは、虚血性脳卒中患者に関する研究において報告された4.2%~5.2%の頻度に近似した^{7, 41)}。これに対して、サンプル集団がICAD関連LVO患者に限定された場合、RNF213p. R4810K多型の割合は、23.3%まで明らかに増加しており、ICAD関連LVOが疑われる場合にこの多型を調べる有用性が示唆された。RNF213p. R4810K多型は、血液採取後1時間程度の短時間で特異的プライマーおよびプローブセットを使用して同定することができる。本発明は、多型非保有者と比較して多型保有者において、即時および早期再閉塞がより起こりやすいことを示唆し、遺伝子多型の迅速なジェノタイピングは、EVT手術および術後の患者ケアの選択を補助し得る。さらに、ジェノタイピング結果は、急性前方循環LVO脳卒中患者におけるEVTのリスク評価に利用し得る⁴²⁾。

[0063]

[表1]

Table 1. Data of variant carriers and non-carriers.

	RNF213 p.R4810K (c.14429G>A)		
	多型保有者 (n = 10)	多型非保有者 (n = 267)	P value
Women	2 (20.0)	126 (47.2)	0.11
Age at stroke onset, years	67 (59–74)	76 (69–83)	0.01
Prestroke mRS score	0 (0–0)	0 (0–2)	0.31
Baseline systolic blood pressure, mmHg	172 (162–178)	151 (133–170)	0.02
Baseline NIHSS score	16 (12–19)	19 (12–24)	0.40
ASPECTS*	9 (7–9)	8 (6–9)	0.43
Intracranial internal carotid artery	1 (10.0)	96 (36.0)	0.17
M1 segment of the middle cerebral artery	9 (90.0)	171 (64.0)	0.17
Intravenous alteplase	6 (60.0)	130 (48.7)	0.53
Time from last-known-well to thrombolysis, min	96 (74–136)	105 (81–154)	0.62
Time from last-known-well to groin puncture, min	195 (96–240)	202 (128–381)	0.39
Medical history			
Current smoking	8 (80.0)	116 (43.4)	0.05
Atrial fibrillation	3 (30.0)	168 (63.4)	0.05
Hypertension	9 (90.0)	184 (68.9)	0.29
Diabetes mellitus	1 (10.0)	53 (20.0)	0.69
Dyslipidemia	4 (40.0)	122 (45.9)	0.76
Stroke/TIA prior to index stroke	2 (20.0)	54 (20.3)	1.00
Cause of acute LVO			
ICAD-related	7 (70.0)	23 (8.6)	<0.01
Embolism	3 (30.0)	236 (88.4)	<0.01
Arterial dissection	0	8 (3.0)	1.00
Antithrombotic therapy at discharge			
Aspirin	7 (70.0)	55 (20.6)	<0.01
Clopidogrel	6 (60.0)	33 (12.4)	<0.01
Cilostazol	0	4 (1.5)	1.00
Direct oral anticoagulant	1 (10.0)	111 (41.6)	0.06
Warfarin	3 (30.0)	103 (38.6)	0.75

Data are presented as median (interquartile range) or number (percent).

ASPECTS, Alberta Stroke Program Early Computed Tomography Score;

CT, computed tomography;

DWI, diffusion-weighted imaging;

ICAD, intracranial atherosclerotic disease;

LVO, large vessel occlusion;

mRS, modified Rankin Scale;

NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale;

TIA, transient ischemic attack.

* ASPECTS was measured using non-contrast CT (n = 2) and DWI (n = 275).

[0064]

[表2]

Table 2. Endovascular therapy and outcomes of variant carriers and non-carriers.

	<i>RNF213</i> p.R4810K (c.14429G>A)		
	多型保有者 (<i>n</i> = 10)	多型非保有者 (<i>n</i> = 267)	<i>P</i> value
Endovascular technique			
Stent retriever	4 (40.0)	133 (49.8)	0.75
Contact aspiration	4 (40.0)	113 (42.3)	1.00
Angioplasty	4 (40.0)	32 (12.0)	<0.01
Total number of angioplasty procedures	4 (2–5)	2 (2–2)	0.27
Intracranial stenting	2 (20.0)	6 (2.2)	0.03
Time from groin puncture to the end of the procedure, min	177 (47–212)	72 (43–123)	0.08
Procedural outcome			
Instant re-occlusion	4 (40.0)	15 (5.6)	<0.01
Final mTICI $\geq$ 2b reperfusion	10 (100.0)	218 (81.6)	0.22
Early re-occlusion	6 (60.0)	1 (0.4)	<0.01
Clinical outcome			
mRS score of 0–2 at 90 days	6 (60.0)	138 (51.7)	0.75
Subarachnoid hemorrhage	2 (20.0)	38 (14.2)	0.64
Parenchymal hematoma*	1 (10.0)	13 (7.7)	0.61
Symptomatic ICH†	0	5 (1.9)	1.00

Data are presented as median (interquartile range) or number (percent).

ICH, intracranial hemorrhage;

mRS, modified Rankin Scale;

mTICI, modified Thrombolysis In Cerebral Infarction;

NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale.

*Parenchymal hematoma was defined as blood clots in the infarcted area with space-occupying effects, as described by the European Cooperative Acute Stroke Study.

†Any ICH with an $\geq$ 4-point increase in NIHSS score from baseline.

[0065]

[表3]

Table 3. Summary of LVO patients with the RNF213 p.R4810K variant.

Case	Age	Sex	Baseline NIHSS score	Occluded vessel	First-line EVT technique	IR	Total number of angioplasties	Final mTICI	Stenting	ER	Number of days to ER	Repeated EVT	Cause of acute LVO	mRS score at 90 days
1	69	Female	10	MCA M1	Angioplasty	No	2	2b	No	Yes	9	No	ICAD-related	6
2	81	Female	34	MCA M1	Angioplasty	No	3	2b	No	Yes	10	No	Embolism	5
3	59	Male	19	MCA M1	Stent retriever	Yes	4	2b	No	Yes	6	Yes	ICAD-related	2
4	76	Male	23	MCA M1	Aspiration	No	0	2c	No	No	--	No	Embolism	2
5	59	Male	18	MCA M1	Aspiration	Yes	1	3	No	Yes	2	Yes	ICAD-related	2
6	67	Male	12	MCA M1	Aspiration	Yes	5	2b	Yes	Yes	1	Yes	ICAD-related	4
7	67	Male	18	Intracranial ICA	Stent retriever	No	0	2b	No	No	--	No	Embolism	3
8	74	Male	13	MCA M1	Stent retriever	No	1	2b	No	No	--	No	ICAD-related	3
9	60	Male	12	MCA M1	Aspiration	No	4	3	Yes	No	---	No	ICAD-related	1
10	52	Male	10	MCA M1	Stent retriever	Yes	14	2c	No	Yes	2	Yes	ICAD-related	0

ER, early re-occlusion;
EVT, endovascular therapy;
ICA, internal carotid artery;
ICAD, intracranial atherosclerotic disease;
IR, instant re-occlusion;
LVO, large vessel occlusion;
MCA, middle cerebral artery;
mRS, modified Rankin Scale;
mTICI, modified Thrombolysis In Cerebral Infarction;
NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale.

[0066] [参照文献]

1. Scott RM, Smith ER. Moyamoya disease and moyamoya syndrome. *N Engl J Med*. 2009;360:1226–1237. doi: 10.1056/NEJMra0804622.
2. Kamada F, Aoki Y, Narisawa A, et al. A genome-wide association study identifies RNF213 as the first moyamoya disease gene. *J Hum Genet*. 2011;56:34–40. doi: 10.1038/jhg.2010.132.
3. Liu W, Morito D, Takashima S, et al. Identification of RNF213 as a susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in vascular development. *PLoS One*. 2011;6:e22542. doi: 10.1371/journal.pone.0022542.
4. Bang OY, Ryoo S, Kim SJ, et al. Adult moyamoya disease: a burden of intracranial stenosis in East Asians? *PLoS One*. 2015;30;10:e0130663. doi: 10.1371/journal.pone.0130663.
5. Liu W, Hitomi T, Kobayashi H, Harada KH, Koizumi A. Distribution of moyamoya disease susceptibility polymorphism p.R4810K in RNF213 in East and Southeast Asian populations. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2012;52:299–303. doi: 10.2176/nmc.52.299.
6. Cecchi AC, Guo D, Ren Z, et al. RNF213 rare variants in an ethnically diverse population with moyamoya disease. *Stroke*. 2014;45:3200–3207. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.006244.
7. Okazaki S, Morimoto T, Kamatani Y, et al. Moyamoya disease susceptibility variant RNF213 p.R4810K increases the risk of ischemic stroke attributable to large artery atherosclerosis. *Circulation*. 2019;139:295–298. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.038439.
8. Koizumi A, Kobayashi H, Hitomi T, Harada KH, Habu T,

Youssefian S. A new horizon of moyamoya disease and associated health risks explored through RNF213. *Environ Health Prev Med.* 2016;21:55-70. doi: 10.1007/s12199-015-0498-7.

9. Hitomi T, Habu T, Kobayashi H, et al. Downregulation of Securin by the variant RNF213 R4810K (rs112735431, G>A) reduces angiogenic activity of induced pluripotent stem cell-derived vascular endothelial cells from moyamoya patients. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;438:13-19. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.07.004.

10. Zhu G, Chen H, Zhang W. Phenotype switch of vascular smooth muscle cells after siRNA silencing of filamin. *Cell Biochem Biophys.* 2011;61:47-52. doi: 10.1007/s12013-011-9159-7.

11. Stahlhut M, van Deurs B. Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell.* 2000;11:325-337. doi: 10.1091/mbc.11.1.325.

12. Hongo H, Miyawaki S, Imai H, et al. Smaller outer diameter of atherosclerotic middle cerebral artery associated with RNF213 c.14576G>A variant (rs112735431). *Surg Neurol Int.* 2017;8:104. doi: 10.4103/sni.sni_59_17.

13. Chung JW, Kim DH, Oh MJ, et al. Cav-1 (caveolin-1) and arterial remodeling in adult moyamoya disease. *Stroke.* 2018;49:2597-2604. doi: 10.1161/STROKEAHA.118.021888.

14. Choi EH, Lee H, Chung JW, et al. Ring finger protein 213 variant and plaque characteristics, vascular remodeling, and hemodynamics in patients with intracranial atherosclerotic stroke: a high-resolution magnetic resonance imaging and he

modynamic study. J Am Heart Assoc. 2019;8:e011996. doi: 10.1161/JAHA.119.011996.

15. Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, et al. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: 2019 update to the 2018 guidelines for the early management of acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. Stroke. 2019;50:e344–e418. doi: 10.1161/STR.000000000000211.

16. Yoshimura S, Sakai N, Uchida K, et al. Endovascular therapy in ischemic stroke with acute large-vessel occlusion: recovery by endovascular salvage for cerebral ultra-acute embolism Japan registry 2. J Am Heart Assoc. 2018;7:e008796. doi: 10.1161/JAHA.118.008796.

17. Tong X, Wang Y, Fiehler J, et al. Thrombectomy versus combined thrombolysis and thrombectomy in patients with acute stroke: a matched-control study. Stroke. 2021;52:1589–1600. doi: 10.1161/STROKEAHA.120.031599.

18. Kim BJ, Kim JS. Ischemic stroke subtype classification: an Asian viewpoint. J Stroke. 2014;16:8–17. doi: 10.5853/jos.2014.16.1.8.

19. Hwang YH, Kim YW, Kang DH, Kim YS, Liebeskind DS. Impact of target arterial residual stenosis on outcome after endovascular revascularization. Stroke. 2016;47:1850–1857. doi:10.1161/STROKEAHA.

20. Baek BH, Yoon W, Lee YY, Kim SK, Kim JT, Park MS. Intravenous tirofiban infusion after angioplasty and stenting in intracranial atherosclerotic stenosis-related stroke. Stroke.

2021;52:1601–1608. doi: 10.1161/STROKEAHA.120.033551.

21. Kang DH, Yoon W. Current opinion on endovascular therapy for emergent large vessel occlusion due to underlying intracranial atherosclerotic stenosis. *Korean J Radiol.* 2019;20:739–748. doi: 10.3348/kjr.2018.0809.

22. Kim GE, Yoon W, Kim SK, et al. Incidence and clinical significance of acute reocclusion after emergent angioplasty or stenting for underlying intracranial stenosis in patients with acute stroke. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2016;37:1690–1695. doi: 10.3174/ajnr.A4770.

23. Sato S, Uehara T, Ohara T, Suzuki R, Toyoda K, Minematsu K. Factors associated with unfavorable outcome in minor ischemic stroke. *Neurology.* 2014;83:174–181. doi: 10.1212/WNL.0000000000000572.

24. Fujita K, Tanaka K, Yamagami H, et al. Detrimental effect of chronic hypertension on leptomeningeal collateral flow in acute ischemic stroke. *Stroke.* 2019;50:1751–1757. doi: 10.1161/STROKEAHA.119.025142.

25. Yoshimoto T, Inoue M, Tanaka K, et al. Identifying large ischemic core volume ranges in acute stroke that can benefit from mechanical thrombectomy. *J Neurointerv Surg.* 2020;neurintsurg-2020-016934. doi: 10.1136/neurintsurg-2020-016934.

26. Saito S, Shinmyozu K, Kawakami D, et al. Conversion from cilostazol to OPC-13015 linked to mitigation of cognitive impairment. *Alzheimers Dement (N Y).* 2021;27:e12182. doi: 10.1002/trc2.12182.

27. Yamagami H, Hayakawa M, Inoue M, et al. Guidelines for Mechanical Thrombectomy in Japan, the fourth edition, March

2020: a guideline from the Japan Stroke Society, the Japan Neurological Society, and the Japanese Society for Neuroendovascular Therapy. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2021;61:163-192. doi: 10.2176/nmc.nmc.st.2020-0357.

28. Zaidat OO, Yoo AJ, Khatri P, et al. Recommendations on angiographic revascularization grading standards for acute ischemic stroke: a consensus statement. *Stroke*. 2013;44:2650-2663. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.001972.

29. Pexman JH, Barber PA, Hill MD, et al. Use of the Alberta stroke program early CT score (ASPECTS) for assessing CT scans in patients with acute stroke. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2001;22:1534-1542.

30. Hirai T, Sasaki M, Maeda M, et al. Diffusion-weighted imaging in ischemic stroke: effect of display method on observers' diagnostic performance. *Acad Radiol*. 2009;16:305-312. doi: 10.1016/j.acra.2008.09.012.

31. Toyoda K, Koga M, Iguchi Y, et al. Guidelines for Intravenous Thrombolysis (Recombinant Tissue-Type Plasminogen Activator), the third edition, March 2019: A guideline from the Japan Stroke Society. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2019;59:449-491. doi: 10.2176/nmc.st.2019-0177.

32. Kang DH, Yoon W, Kim SK, et al. Endovascular treatment for emergent large vessel occlusion due to severe intracranial atherosclerotic stenosis. *J Neurosurg*. 2019;130:1949-1956. doi: 10.3171/2018.1.JNS172350.

33. Kang DH, Yoon W, Baek BH, et al. Front-line thrombectomy for acute large-vessel occlusion with underlying severe intracranial stenosis: stent retriever versus contact aspiration

- . J Neurosurg. 2020;132:1202-1208. doi: 10.3171/2019.1.JNS182905.
34. Schumacher HC, Meyers PM, Higashida RT, et al. Reporting standards for angioplasty and stent-assisted angioplasty for intracranial atherosclerosis. *Stroke*. 2009;40:e348-e365. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.527580.
35. Hart RG, Diener HC, Coutts SB, et al. Embolic strokes of undetermined source: the case for a new clinical construct. *Lancet Neurol*. 2014;13:429-438. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70310-7.
36. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, et al. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA*. 1995;274:1017-1102.
37. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, et al. Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). Second European-Australasian Acute Stroke Study Investigators. *Lancet*. 1998;352:1245-1251. doi: 10.1016/s0140-6736(98)08020-9.
38. Kamimura T, Okazaki S, Morimoto T, et al. Prevalence of RNF213 p.R4810K variant in early-onset stroke with intracranial arterial stenosis. *Stroke*. 2019;50:1561-1563. doi: 10.1161/STROKEAHA.118.024712.
39. Miyawaki S, Imai H, Takayanagi S, Mukasa A, Nakatomi H, Saito N. Identification of a genetic variant common to moyamoya disease and intracranial major artery stenosis/occlusion. *Stroke*. 2012;43:3371-3374. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.663864.
40. Kim HJ, Choi EH, Chung JW, et al. Role of the RNF21

3 variant in vascular outcomes in patients with intracranial atherosclerosis. J Am Heart Assoc. 2021;10:e017660. doi: 10.1161/JAHA.120.017660.

41. Park YS, Park HW, Park HS, et al. Association of genetic variants of RNF213 with ischemic stroke risk in Koreans. Genes Genomics. 2021;43:389-397. doi: 10.1007/s13258-020-01022-7.

42. Xiong Y, Wang H, Zhang M, et al. Risk stratification for endovascular treatment in acute anterior circulation occlusive stroke. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2019;28:104442. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2019.104442.

[0067] [態様]

上述した複数の例示的な実施形態および実施例は、以下の態様の具体例であることが当業者により理解される。本明細書で使用される用語は、特に具体的な定めのない限り、医学、解剖学、薬学、分子生物学、有機化学等の分野における当業者に一般に理解される通りの意味を有する。本明細書において定義された用語は、一般的に理解されるのと同じ意味を有していない場合、本明細書の記載内容が優先する。

[0068] (第1項)

一態様に係る頭蓋内脳血管の再閉塞を予測するための方法は、
被験者から採取されたサンプルを用いて前記被験者がRNF213 p. R4810K多型を有するか否かを検出することと、
前記被験者が前記RNF213 p. R4810K多型を有するとき、頭蓋内脳血管の閉塞に対する血管内治療後に、前記血管内治療を受けた血管が再閉塞する可能性が高いと判定することと、を含む。

[0069] 第1項に記載の方法によれば、血管内治療後の血管の再閉塞リスクを予測することが容易になる。

[0070] (第2項)

第1項に記載の方法において、前記頭蓋内脳血管が再閉塞する可能性に基づいて前記血管内治療に使用する器具を選択することをさらに含む。

[0071] 第2項に記載の方法によれば、再閉塞のリスクを減少することができる。

[0072] (第3項)

第1項または第2項に記載の方法において、前記判定することは、前記血管内治療後の通常よりも早い期間に、治療を受けた血管が再閉塞する可能性が高いと判定することを含む。

[0073] (第4項)

第3項に記載の方法において、前記血管内治療後の通常よりも早い期間は、前記血管内治療により再開通が認められてから前記血管内治療術中までである。

[0074] (第5項)

第3項に記載の方法において、前記血管内治療後の通常よりも早い期間は、前記血管内治療により再開通が認められてから2週間以内である。

[0075] 第3項～第5項に記載の方法によれば、即時または早期再閉塞のリスクが高い患者が判定される。

[0076] (第6項)

第1項～第5項のいずれかに記載の方法において、前記RNF213p.R4810K多型は、変異型と野生型のヘテロ接合型である。

[0077] (第7項)

第1項～第6項のいずれかに記載の方法において、前記サンプルは、血液または唾液である。

[0078] 第7項に記載の方法によれば、低侵襲でサンプルを得ることができる。

[0079] (第8項)

第1項～第7項のいずれかに記載の方法において、前記頭蓋内脳血管は、頭蓋内内頸動脈または中大脳動脈である。

[0080] (第9項)

第1項～第8項のいずれかに記載の方法において、前記頭蓋内脳血管の閉

塞は、アテローム性動脈硬化による血管の閉塞である。

[0081] 頭蓋内脳血管の閉塞がアテローム性動脈硬化であるとき、RNF213p、R4810K多型を有する患者の血管の再閉塞のリスクはより高いと判断することができる。

[0082] (第10項)

一態様に係るキットは、

RNF213p、R4810K多型の有無に基づき、頭蓋内脳血管の閉塞に対する血管内治療後に、前記血管内治療を受けた血管が再閉塞する可能性が高いか否かを判定するためのキットであって、

前記RNF213p、R4810K多型に対応する遺伝子変異を含む塩基配列を増幅するPCRプライマー対と、

前記RNF213p、R4810K多型の野生型塩基配列に結合する第1プローブおよび変異型塩基配列に結合する第2プローブと、を備え、

前記第1プローブと前記第2プローブとは、互いに異なる蛍光色素で標識されるキットである。

[0083] 第10項に記載のキットによれば、被験者の血管内治療後の血管の再閉塞のリスクが高いか否かを予測することができる。

[0084] (第11項)

第10項に記載のキットにおいて、前記PCRプライマー対は、配列番号3で示される塩基配列を有するプライマーおよび配列番号4で示される塩基配列を有するプライマーを含む。

[0085] 第11項に記載のキットによれば、非特異的な増幅が少なくPCRを行うことができる。

[0086] (第12項)

第10項または第11項に記載のキットにおいて、前記第1プローブは配列番号5で示される塩基配列を有し、前記第2プローブは配列番号6で示される塩基配列を有する。

[0087] 第12項に記載のキットによれば、PCR産物の非特異的な検出を少なく

することができる。

[0088] (第13項)

第10項～第12項に記載のキットにおいて、界面活性剤およびプロテイナーゼKを含むPCR緩衝液をさらに備える。

[0089] 第13項に記載のキットによれば、ゲノムDNAを鋳型とするPCRを簡便にかつ迅速に行うことができる。

[0090] (第14項)

一態様に係る発明は、RNF213 p. R4810K多型からなる、頭蓋内脳血管の閉塞に対する血管内治療後に、前記血管内治療を受けた血管が再閉塞する可能性が高いか否かを判定するための遺伝子マーカーである。

[0091] 第14項に記載の発明によれば、血管内治療後の血管の再閉塞のリスクを予測するための情報を提供することができる。

[0092] (第15項)

一態様に係る頭蓋内脳血管の再狭窄を予測するための方法は、
被験者から採取されたサンプルを用いて前記被験者がRNF213 p. R4810K多型を有するか否かを検出することと、
前記被験者が前記RNF213 p. R4810K多型を有するとき、頭蓋内脳血管の閉塞に対する血管内治療後に、前記血管内治療を受けた血管が再狭窄する可能性が高いと判定することと、を含む。

[0093] 患者がRNF213 p. R4810K多型を有するとき、血管内治療後の再狭窄が起こりやすいことが予測される。再狭窄のリスクが高いとき、再閉塞のリスクも高くなると考えられる。

[0094] (第16項)

一態様に係るキットは、
RNF213 p. R4810K多型の有無に基づき、頭蓋内脳血管の閉塞に対する血管内治療後に、前記血管内治療を受けた血管が再狭窄する可能性が高いか否かを判定するためのキットであって、
前記RNF213 p. R4810K多型に対応する遺伝子変異を含む塩基

配列を増幅するPCRプライマー対と、

前記RNF213p. R4810K多型の野生型塩基配列に結合する第1
プローブおよび変異型塩基配列に結合する第2プローブと、を備え、

前記第1プローブと前記第2プローブとは、互いに異なる蛍光色素で標識
されるキットである。

[0095] (第17項)

一態様に係る発明は、RNF213p. R4810K多型からなる、頭蓋
内脳血管の閉塞に対する血管内治療後に、前記血管内治療を受けた血管が再
狭窄する可能性が高いか否かを判定するための遺伝子マーカーである。

請求の範囲

- [請求項1] 被験者から採取されたサンプルを用いて前記被験者がRNF213 p. R4810K多型を有するか否かを検出することと、
前記被験者が前記RNF213 p. R4810K多型を有するとき、
頭蓋内脳血管の閉塞に対する血管内治療後に、前記血管内治療を受けた血管が再閉塞する可能性が高いと判定することと、
を含む、頭蓋内脳血管の再閉塞を予測するための方法。
- [請求項2] 前記頭蓋内脳血管が再閉塞する可能性に基づいて前記血管内治療に使用する器具を選択することをさらに含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記判定することは、前記血管内治療後の通常よりも早い期間に、治療を受けた血管が再閉塞する可能性が高いと判定することを含む、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 前記血管内治療後の通常よりも早い期間は、前記血管内治療により再開通が認められてから前記血管内治療術中までである、請求項3に記載の方法。
- [請求項5] 前記血管内治療後の通常よりも早い期間は、前記血管内治療により再開通が認められてから2週間以内である、請求項3に記載の方法。
- [請求項6] 前記RNF213 p. R4810K多型は、変異型と野生型のヘテロ接合型である、請求項1に記載の方法。
- [請求項7] 前記サンプルは、血液または唾液である、請求項1に記載の方法。
- [請求項8] 前記頭蓋内脳血管は、頭蓋内内頸動脈または中大脳動脈である、請求項1に記載の方法。
- [請求項9] 前記頭蓋内脳血管の閉塞は、アテローム性動脈硬化による血管の閉塞である、請求項1に記載の方法。
- [請求項10] RNF213 p. R4810K多型の有無に基づき、頭蓋内脳血管の閉塞に対する血管内治療後に、前記血管内治療を受けた血管が再閉塞する可能性が高いか否かを判定するためのキットであって、
前記RNF213 p. R4810K多型に対応する遺伝子変異を含

む塩基配列を増幅するPCRプライマー対と、

前記RNF213p. R4810K多型の野生型塩基配列に結合する第1プローブおよび変異型塩基配列に結合する第2プローブと、を備え、

前記第1プローブと前記第2プローブとは、互いに異なる蛍光色素で標識されるキット。

[請求項11] 前記PCRプライマー対は、配列番号3で示される塩基配列を有するプライマーおよび配列番号4で示される塩基配列を有するプライマーを含む、請求項10に記載のキット。

[請求項12] 前記第1プローブは配列番号5で示される塩基配列を有し、前記第2プローブは配列番号6で示される塩基配列を有する、請求項10または11に記載のキット。

[請求項13] 界面活性剤およびプロテイナーゼKを含むPCR緩衝液をさらに備える、請求項10に記載のキット。

[請求項14] RNF213p. R4810K多型からなる、頭蓋内脳血管の閉塞に対する血管内治療後に、前記血管内治療を受けた血管が再閉塞する可能性が高いか否かを判定するための遺伝子マーカー。