

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6021021号
(P6021021)

(45) 発行日 平成28年11月2日 (2016. 11. 2)

(24) 登録日 平成28年10月14日 (2016. 10. 14)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)
 G O 1 N 33/15 (2006. 01)
 G O 1 N 33/68 (2006. 01)
 G O 1 N 33/50 (2006. 01)
 A 6 1 K 31/7105 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/68 Z N A A
 G O 1 N 33/15 Z
 G O 1 N 33/68
 G O 1 N 33/50 Z
 G O 1 N 33/50 P

請求項の数 4 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-537286 (P2013-537286)
 (86) (22) 出願日 平成23年11月7日 (2011. 11. 7)
 (65) 公表番号 特表2013-544089 (P2013-544089A)
 (43) 公表日 平成25年12月12日 (2013. 12. 12)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2011/006203
 (87) 国際公開番号 W02012/060109
 (87) 国際公開日 平成24年5月10日 (2012. 5. 10)
 審査請求日 平成26年11月6日 (2014. 11. 6)
 (31) 優先権主張番号 61/530, 269
 (32) 優先日 平成23年9月1日 (2011. 9. 1)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/410, 757
 (32) 優先日 平成22年11月5日 (2010. 11. 5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 504132272
 国立大学法人京都大学
 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (72) 発明者 長船 健二
 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1
 国立大学法人京都大学内
 (72) 発明者 豊田 太郎
 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1
 国立大学法人京都大学内

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多発性嚢胞腎の検査方法および治療剤のスクリーニング方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

多発性嚢胞腎を有する被験者が合併症として脳動脈瘤を発症しているまたは発症するリスクを有しているか否かを in vitro で検査支援する方法であって、以下の工程：

(a) 多発性嚢胞腎を有する被験者から単離された試料において、MMP1、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1 および SIAE から成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子の発現量を測定する工程；
 および

(b) MMP1、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1 および SIAE から成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子の前記発現量が、非合併患者由来の対照試料における発現量より高い場合、該被験者が多発性嚢胞腎の合併症として脳動脈瘤を発症している、または発症するリスクを有している、と決定する工程、
 を含む方法。

【請求項 2】

前記試料が、血液、血清、血漿、血管内皮細胞、血管周皮細胞、及びこれらの細胞を含む組織からなる群より選択される少なくとも1種である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

10

20

前記遺伝子の発現量を測定する工程が、前記遺伝子のmRNA、cRNAもしくはcDNA量または前記遺伝子によってコードされるタンパク質の量を測定する工程である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

MMP1、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子のオープンリーディングフレームの塩基配列において連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチドおよび/またはそれに相補的なポリヌクレオチド、ならびに/あるいは、MMP1、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子によってコードされるタンパク質を認識する抗体もしくはそのフラグメント、を含む、多発性嚢胞腎を有する被験者においてその合併症として脳動脈瘤を発症しているまたは発症するリスクを有しているか否かを検査するためのキット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、多発性嚢胞腎の検査のための方法および疾患マーカー、並びに、該疾患の治療剤のスクリーニング方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

多発性嚢胞腎疾患は、常染色体優性多発性嚢胞腎(Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD))と常染色体劣性多発性嚢胞腎(Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease (ARPKD))に分類され、ADPKDは、日本国において約4,000人に1人の頻度で発症し、推定2万人から5万人の患者数であると言われており、糖尿病性腎症、原発性糸球体腎炎、および高血圧性腎硬化症に続く4番目に高頻度な透析導入に至る末期慢性腎不全の原因疾患である。

【0003】

本疾患は、PKD1またはPKD2の遺伝子変異を原因とする常染色体優性疾患である（特許文献1（特表2001-520502）、特許文献2（特表2004-504038）、特許文献3（特開2009-065988））。また、多発性嚢胞腎では、GLIS3遺伝子の発現が減少するため、この事象を該疾患の診断に使用するという報告もある（特許文献4（特開2006-288265））。

30

【0004】

本疾患の腎臓における主な病態として、嚢胞の多発が認められる。腎外の病態として、肝臓、膵臓、脾臓、生殖器、クモ膜などでの嚢胞形成、脳動脈瘤および大動脈瘤、心弁膜症、大腸憩室、ヘルニア等が確認されている。典型的な発症年齢は中年であるが、年齢層は新生児から80歳まで幅広い。

多発性嚢胞腎の原因遺伝子は特定されているにも関わらず、現在、有効な治療法は確立されていない。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】 特表2001-520502号公報

【特許文献2】 特表2004-504038号公報

【特許文献3】 特開2009-065988号公報

【特許文献4】 特開2006-288265号公報

【発明の概要】

【0006】

本発明は、被験者の試料において疾患マーカーを比較して、多発性嚢胞腎もしくは多発

50

性嚢胞腎に併発する合併症を検査（あるいは、検出または診断）する方法、および該疾患の疾患マーカーを提供することを目的とする。

【0007】

本発明はさらに、該疾患マーカーを利用することによって、多発性嚢胞腎もしくは多発性嚢胞腎に併発する合併症を予防または治療するのに有用な薬物をスクリーニングする方法、ならびに該疾患の治療に有用な薬物もしくは医薬を提供することを目的とする。

【0008】

本明細書で使用する「多発性嚢胞腎」は、常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)及び常染色体劣性多発性嚢胞腎(ARPKD)を含み、好ましくはそれはADPKDである。

【0009】

本発明は以下の特徴を有する。

[1] 被験者が多発性嚢胞腎を発症しているまたは発症するリスクを有しているか否かを検査する方法であって、以下の工程：

(a) 被験者由来の試料において、NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、ACAT2、INSIG1、SCD、HSD3B1、KRT7、USP40およびSULT1E1から成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子の発現量を測定する工程；および

(b) NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、HSD3B1、KRT7、USP40およびSULT1E1から成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子の前記発現量が、対照試料における発現量より低い場合、該被験者が多発性嚢胞腎を発症している、または発症するリスクを有している、と決定する工程、あるいは、ACAT2、INSIG1、SCDもしくはそれら3つの遺伝子の前記発現量が、該対照試料における発現量より高い場合、被験者が多発性嚢胞腎を発症している、または発症するリスクを有している、と決定する工程、を含む方法。

[2] 前記試料が血液、血清、血漿、細胞抽出液、尿、リンパ液、組織液、腹水、髄液、およびその他の体液、あるいは組織または細胞からなる群より選択される少なくとも1種である、[1]に記載の方法。

[3] 前記試料が、被験者の単離された体細胞由来のiPS細胞から分化誘導した血管内皮細胞であり、工程(a)における遺伝子がNTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、ACAT2、INSIG1およびSCDから成る群より選択される遺伝子である、[1]に記載の方法。

[4] 前記試料が、被験者の単離された体細胞由来のiPS細胞から分化誘導した血管周皮細胞であり、工程(a)における遺伝子がHSD3B1、KRT7、USP40およびSULT1E1から成る群より選択される遺伝子である、[1]に記載の方法。

[5] 前記遺伝子の発現量を測定する工程が、前記試料中の前記遺伝子のmRNA、cRNAもしくはcDNA量または前記遺伝子によってコードされるタンパク質の量を測定する工程である、[1]～[4]のいずれかに記載の方法。

[6] 被験者が多発性嚢胞腎の合併症を発症しているまたは発症するリスクを有しているか否かを検査する方法であって、以下の工程：

(a) 多発性嚢胞腎である被験者由来の試料から、NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、ACAT2、INSIG1、SCD、HSD3B1、KRT7、USP40、SULT1E1、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子の発現量を測定する工程；および

(b) NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、HSD3B1、KRT7、USP40およびSULT1E1から成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子の前記発現量が、対照試料における発現量より低い場合、当該被験者が多発性嚢胞腎の合併症を発症している、または発症するリスクを有している、と決定する工程、あるいは、ACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子の前記発現量が、該対照試料における発現量より高い場合、被験者が多発性嚢胞腎の合併症を発症している、または発

10

20

30

40

50

症するリスクを有している、と決定する工程、を含む方法。

[7] 前記合併症が脳動脈瘤である、[6]に記載の方法。

[8] 前記試料が、血液、血清、血漿、細胞抽出液、尿、リンパ液、組織液、腹水、髄液、およびその他の体液、あるいは組織または細胞からなる群より選択される少なくとも1種である、[6]または[7]に記載の方法。

[9] 前記試料が、被験者の単離された体細胞由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管内皮細胞であり、工程(a)における遺伝子がNTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、ACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1およびTFPI2から成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子である、[6] または[7]に記載の方法。

10

[10] 前記試料が、被験者の単離された体細胞由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管周皮細胞であり、工程(a)における遺伝子がHSD3B1、KRT7、USP40、SULT1E1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子である、[6] または[7]に記載の方法。

[11] 前記遺伝子の発現量を測定する工程が、前記遺伝子のmRNA、cRNAもしくはcDNA量または前記遺伝子によってコードされるタンパク質の量を測定する工程である、[6]～[10]のいずれかに記載の方法。

[12] NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、ACAT2、INSIG1、SCD、HSD3B1、KRT7、USP40、SULT1E1、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子の塩基配列において連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチドおよび/またはそれに相補的なポリヌクレオチド、ならびに/あるいは、NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、ACAT2、INSIG1、SCD、HSD3B1、KRT7、USP40、SULT1E1、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子によってコードされるタンパク質を認識する(1もしくは複数の)抗体もしくはそのフラグメント、を含む、多発性嚢胞腎または多発性嚢胞腎の合併症を検査するための疾患マーカー。

20

30

[13] 前記合併症が脳動脈瘤である、[12]に記載の疾患マーカー。

[14] BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子の塩基配列において連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチドおよび/またはそれに相補的なポリヌクレオチド、ならびに/あるいは、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択される1もしくは2以上から全部の遺伝子によってコードされるタンパク質を認識する(1もしくは複数の)抗体もしくはそのフラグメント、を含む、[13]に記載の疾患マーカー。

40

[15] NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、ACAT2、INSIG1、SCD、HSD3B1、KRT7、USP40、SULT1E1、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子の塩基配列において連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチドおよび/またはそれに相補的なポリヌクレオチド、ならびに/あるいは、NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、ACAT2、INSIG1、SCD、HSD3B1、KRT7、USP40、SULT1E1、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEか

50

ら成る群より選択される1もしくは2以上から全部の遺伝子によってコードされるタンパク質を認識する（1もしくは複数の）抗体もしくはそのフラグメント、を含む、多発性嚢胞腎または多発性嚢胞腎の合併症の検査用キット。

[16] 前記合併症が脳動脈瘤である、[15]に記載のキット。

[17] BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子の塩基配列において連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチドおよび/またはそれに相補的なポリヌクレオチド、ならびに/あるいは、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択される1もしくは2以上から全部の遺伝子によってコードされるタンパク質を認識する（1もしくは複数の）抗体もしくはそのフラグメント、を含む、[16]に記載のキット。

10

[18] 以下の工程：

（a）候補物質を、多発性嚢胞腎患者の単離された体細胞由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管内皮細胞と接触させる工程、

（b）NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、ACAT2、INSIG1およびSCDから成る群より選択された1以上もしくは全部の遺伝子の発現量もしくは転写活性を測定する工程、および

（c）候補物質と接触させなかった場合と比較して、NTNG1、POSTN、TNC、KAL1およびBST1から成る群より選択された1以上もしくは全部の遺伝子の前記発現量もしくは転写活性が増加した場合、前記候補物質を、多発性嚢胞腎の治療剤または予防剤として選別する工程、あるいは、ACAT2、INSIG1、SCDから成る群より選択された1以上もしくは全部の遺伝子の前記発現量もしくは転写活性が減少した場合、前記候補物質を、多発性嚢胞腎の治療剤または予防剤として選別する工程、を含む、多発性嚢胞腎の治療剤または予防剤のスクリーニング方法。

20

[19] 以下の工程：

（a）候補物質を、多発性嚢胞腎患者の単離された体細胞由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管周皮細胞と接触させる工程、

（b）HSD3B1、KRT7、USP40およびSULT1E1から成る群より選択された1以上もしくは全部の遺伝子の発現量もしくは転写活性を測定する工程、および

（c）候補物質と接触させなかった場合と比較して、前記発現量もしくは転写活性が増加した場合、前記候補物質を、多発性嚢胞腎の治療剤または予防剤として選別する工程、を含む、多発性嚢胞腎の治療剤または予防剤のスクリーニング方法。

30

[20] 前記遺伝子の発現量を測定する工程が、遺伝子のmRNA、cRNAもしくはcDNA量を測定する工程である、[18]および[19]に記載のスクリーニング方法。

[21] 以下の工程：

（a）候補物質を、多発性嚢胞腎合併症患者の単離された体細胞由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管内皮細胞と接触させる工程、

（b）NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、ACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1およびTFPI2から成る群より選択された1以上もしくは全部の遺伝子の発現量もしくは転写活性を測定する工程、および

40

（c）候補物質と接触させなかった場合と比較して、NTNG1、POSTN、TNC、KAL1およびBST1から成る群より選択された1以上もしくは全部の遺伝子の前記発現量もしくは転写活性が増加した場合、前記候補物質を、多発性嚢胞腎合併症の治療剤または予防剤として選別する工程、あるいは、ACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1およびTFPI2から成る群より選択された1以上もしくは全部の遺伝子の前記発現量もしくは転写活性が減少した場合、前記候補物質を、多発性嚢胞腎合併症の治療剤または予防剤として

50

選別する工程、

を含む、多発性嚢胞腎の合併症の治療剤または予防剤のスクリーニング方法。

[22] 以下の工程：

(a) 候補物質を、多発性嚢胞腎合併症患者の単離された体細胞由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管周皮細胞と接触させる工程、

(b) HSD3B1、KRT7、USP40、SULT1E1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択された1以上もしくは全部の遺伝子の発現量または転写活性を測定する工程、および

(c) 候補物質と接触させなかった場合と比較して、HSD3B1、KRT7、USP40およびSULT1E1から成る群より選択された1以上もしくは全部の遺伝子の前記発現量もしくは転写活性が増加した場合、前記候補物質を、多発性嚢胞腎合併症の治療剤または予防剤として選別する工程、あるいは、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択された1以上もしくは全部の遺伝子の前記発現量もしくは転写活性が減少した場合、前記候補物質を、多発性嚢胞腎合併症の治療剤または予防剤として選別する工程、

を含む、多発性嚢胞腎の合併症の治療剤または予防剤のスクリーニング方法。

[23] 前記合併症が脳動脈瘤である、[21]および[22]に記載のスクリーニング方法。

[24] 前記遺伝子の発現量を測定する工程が、遺伝子のmRNA、cRNAもしくはcDNA量を測定する工程である、[21]および[22]に記載のスクリーニング方法。

[25] ACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAE遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つの核酸またはその転写産物に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAもしくはshRNAの薬学的有効量を含む、多発性嚢胞腎または多発性嚢胞腎の合併症の治療または予防のための組成物。

[26] 前記合併症が脳動脈瘤である、[25]に記載の組成物。

[27] BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAE遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つの核酸またはその転写産物に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAもしくはshRNAの薬学的有効量を含む、[26]に記載の組成物。

[28] 健常者の単離された体細胞由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管内皮細胞と比較して、NTNG1、POSTN、TNC、KAL1およびBST1の発現量が低く、かつ、ACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1およびTFPI2の発現量が高い、ならびに、多発性嚢胞腎患者のうち脳動脈瘤併発患者の単離された体細胞由来のiPS細胞から分化誘導により得られたものであることを特徴とする血管内皮細胞。

[29] BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1およびTFPI2の発現量が高い、ならびに、多発性嚢胞腎患者のうち脳動脈瘤併発患者の単離された体細胞由来のiPS細胞から分化誘導により得られたものであることを特徴とする血管内皮細胞。

[30] 健常者の単離された体細胞由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管周皮細胞と比較して、HSD3B1、KRT7、USP40およびSULT1E1の発現が低く、かつ、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEの発現量が高い、ならびに、多発性嚢胞腎患者のうち脳動脈瘤併発患者の単離された体細胞由来のiPS細胞から分化誘導により得られたものであることを特徴とする血管周皮細胞。

[31] MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEの発現量が高い、ならびに、多発性嚢胞腎患者のうち脳動脈瘤併発患者の単離された体細胞由来のiPS細胞から分化誘導により得られたものであることを特徴とする血管周皮細胞。

【0010】

本発明の方法により、多発性嚢胞腎、または多発性嚢胞腎に併発する合併症（以下、単に「多発性嚢胞腎の合併症」もしくは「多発性嚢胞腎合併症」と称する。）、を検査すること、および該疾患の疾患マーカーを作製すること、該疾患の予防もしくは治療に有用な薬物をスクリーニングすること、および当該疾患の治療に有用な薬物を作製することができる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】この図は、多発性嚢胞腎を発症していない日本人（nonPK）および脳動脈瘤合併の常染色体優性多発性嚢胞腎（PK）患者からのiPS細胞から分化誘導により得られた血管内皮細胞における、図に示した各遺伝子（図1A：SCD, NTNG1, POSTN, TNC, KAL1、図1B：INSIG1(V1および2)、BST1）のRT-PCRの結果を示す。

10

【図2】この図は、nonPK人およびPK患者の線維芽細胞由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管周皮細胞における、図に示した各遺伝子（すなわち、HSD3B1, KRT7, USP40, SULT1E1）のRT-PCRの結果を示す。

【図3】この図は、脳動脈瘤合併の常染色体優性多発性嚢胞腎患者の線維芽細胞から直接的もしくは間接的に作製されたiPS細胞（PK-ane-iPS1）または脳動脈瘤合併のない常染色体優性多発性嚢胞腎患者の線維芽細胞から直接的もしくは間接的に作製されたiPS細胞（PK-free-iPS3）、あるいは該iPS細胞由来の血管内皮細胞または該iPS細胞由来の血管周皮細胞における、図に示した各遺伝子（すなわち、A: CD274、B: CTGF、C: MMP10、D: NRCAM、E: MMP1）のPCR（すなわち、発現量）の結果を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0012】

<疾患マーカーとしてのポリヌクレオチド>

本発明は、対照試料と比較して、表1に記載の少なくとも1種の遺伝子の発現上昇（増加）および/または下降（減少）の有無やその程度を測定（定性および/または定量的測定）することによって多発性嚢胞腎または多発性嚢胞腎の合併症を発症していることまたは発症するリスクを有していることを特異的に検出することができ、これによって該疾患の検査を正確に行うことができるという知見に基づく。

【0013】

すなわち、本発明は、被験者における上記遺伝子の発現上昇および/または下降の有無またはその程度を測定することによって、被験者について多発性嚢胞腎または多発性嚢胞腎の合併症の罹患の有無またはその程度を検査することのできるツールとして有用な疾患マーカーを提供する。

30

【0014】

本明細書で使用する「多発性嚢胞腎」なる用語は、特に断らないかぎり、常染色体優性多発性嚢胞腎および常染色体劣性多発性嚢胞腎の両方を含むことを意味する。

【0015】

本明細書で使用する「被験者」なる用語は、以下のものに限定されないが、霊長類、げっ歯類、有蹄類などの哺乳動物を指し、好ましくはヒトである。被験者は、別の用語である「患者」と互換的に使用することができる。

40

【0016】

本発明において、多発性嚢胞腎の合併症には、大動脈瘤、脳動脈瘤またはクモ膜下出血などの血管病変、心弁膜症、大腸憩室、ヘルニア、総胆管拡張症などの胆管病変、ならびに肝臓、膵臓、脾臓および生殖器における嚢胞形成のいずれかの症状が挙げられる。特に好ましく検出すべき合併症として脳動脈瘤が例示される。

【0017】

【表 1】

遺伝子名	GenBank 登録番号	配列番号	
		遺伝子	タンパク質
NTNG1	NM_001113226	1	2
POSTN	NM_001135934	3	4
TNC	NM_002160	5	6
KAL1	NM_000216	7	8
BST1	NM_004334	9	10
INSIG1	NM_005542	11	12
SCD	NM_005063	13	14
HSD3B1	NM_000862	15	16
KRT7	NM_005556	17	18
USP40	NM_018218	19	20
SULT1E1	NM_005420	21	22
ACAT2	NM_005891	45	46
BMP6	NM_001718	47	48
CD274	NM_014143	49	50
CTGF	NM_001901	51	52
E2F7	NM_203394	53	54
EDN1	NM_001955	55	56
FAM43A	NM_153690	57	58
FRMD3	NM_174938	59	60
MMP10	NM_002425	61	62
MYEOV	NM_138768	63	64
NR2F1	NM_005654	65	66
NRCAM	NM_001037132	67	68
PCSK1	NM_000439	69	70
PLXNA2	NM_025179	71	72
SLC30A3	NM_003459	73	74
SNAI1	NM_005985	75	76
SPOCD1	NM_144569	77	78
MMP1	NM_001145938	79	80
TFPI2	NM_006528	81	82
HMGA2	NM_001145938	83	84
KRTAP4-7	NM_033061	85	86
KRTAP4-8	NM_031960	87	88
KRTAP4-9	NM_001146041	89	90
MYPN	NM_032578	91	92
RPPH1	NR_002312	93	—
SIAE	NM_001199922	94	95

【0018】

本発明の疾患マーカーは、表1に記載の遺伝子の塩基配列のオープンリーディングフレーム（ORF）配列中の連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチドおよび/またはそれに相補的なポリヌクレオチドからなることを特徴とする。ここで、特に限定されないが、転写変異体もしくはスプライシング変異体として当業者により、表1のNTNG1には、Accession NO. NM_001113228またはNM_014917に記載の配列、POSTNには、Accession NO. NM_001135935、NM_001135936またはNM_006475に記載の配列、INSIG1には、Accession NO. NM_198336またはNM_198337に記載の配列、EDN1には、Accession NO. NM_001168319に記載

10

20

30

40

50

の配列、NRCAMには、Accession NO. NM_001193582、NM_001193583、NM_001193584またはNM_005010に記載の配列、PCSK1には、Accession NO. NM_001177875またはNM_001177876に記載の配列、MMP1には、Accession NO. NM_002421に記載の配列、HMGA2には、Accession NO. NM_002421に記載の配列、SIAEには、Accession NO. NM_170601に記載の配列が含まれるものと容易に理解される。

【0019】

ここで相補的なポリヌクレオチド（相補鎖もしくは逆鎖）とは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93または94に示される塩基配列のORF配列、または該ORF配列において連続した少なくとも15塩基長の塩基配列を有する配列（部分配列）（ここでは便宜上、これらORF配列及び部分配列を「正鎖」ともいう）に対して、A:TおよびG:Cといった塩基対関係に基づいて、塩基的に相補的な関係にあるポリヌクレオチドを意味するものである。ただし、このような相補鎖は、対象とする正鎖の塩基配列に対して完全な相補配列である場合に限らず、対象とする正鎖とストリンジェントな条件でハイブリダイズすることができる程度の相補関係を有するものであってもよい。なお、ここでストリンジェントな条件は、BergerおよびKimmel(1987, Guide to Molecular Cloning Techniques Methods in Enzymology, Vol.152, Academic Press, San Diego CA)に教示されるように、複合体或いはプローブを結合する核酸の融解温度(Tm)に基づいて決定することができる。例えばハイブリダイズ後の洗浄条件として、通常「1×SSC、0.1%SDS、37℃」程度の条件を挙げることができる。相補鎖はかかる条件で洗浄しても対象とする正鎖とハイブリダイズ状態を維持するものであることが好ましい。特に制限されないが、より厳しいハイブリダイズ条件として「0.5×SSC、0.1%SDS、42℃」程度の洗浄条件、さらに厳しくは「0.1×SSC、0.1%SDS、65℃」程度の洗浄条件で洗浄しても正鎖と相補鎖とがハイブリダイズ状態を維持する条件を挙げることができる。具体的には、このような相補鎖として、対象の正鎖の塩基配列と完全に相補的な関係にある塩基配列からなる鎖、並びに該鎖と少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する塩基配列からなる鎖を例示することができる。

【0020】

また、正鎖側のポリヌクレオチドには、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93または94に記載の塩基配列のORF配列またはその部分配列を有するものだけでなく、上記相補鎖の塩基配列に対してさらに相補的な関係にある塩基配列からなる鎖を含めることができる。

【0021】

さらに上記正鎖のポリヌクレオチド及び相補鎖（逆鎖）のポリヌクレオチドは、各々一本鎖の形態で疾患マーカーとして使用されてもよいし、また二本鎖の形態で疾患マーカーとして使用されてもよい。

【0022】

以上より、本発明の多発性嚢胞腎または多発性嚢胞腎合併症の疾患マーカーは、表1に記載された遺伝子もしくは該遺伝子に由来するポリヌクレオチドを選択的に（もしくは、特異的に）認識するものであれば、上記ORF配列またはその相補配列の各々部分配列からなるポリヌクレオチドであってもよい。この場合、上記ORF配列またはその相補配列の塩基配列から任意に選択される少なくとも15個、少なくとも18個、少なくとも19個、少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも40個、少なくとも50個、少なくとも60個、少なくとも70個、または少なくとも100個の連続した塩基長を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。

【0023】

なお、ここで「選択的に（もしくは、特異的に）認識する」とは、例えばノーザンブロット法またはサザンブロット法を用いる場合には、表1に記載の遺伝子またはこれらに由来するポリヌクレオチドが特異的に検出できること、またRT-PCR法を用いる場合には表1

10

20

30

40

50

に記載の遺伝子またはこれらに由来するポリヌクレオチドが特異的に増幅、生成されることを意味するが、これらに限定されることなく、当業者が上記ノーザンブロット法またはサザンブロット法における検出物または上記RT-PCR法における生成物が、表1に記載の遺伝子またはこれに由来するポリヌクレオチドに由来すると判断できるものであればよい。

【0024】

そのような本発明の疾患マーカーは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93または94で示される遺伝子の塩基配列をもとに、例えばprimer 3 (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>) あるいはベクターNTI (Infomax社製) を利用して設計することができる。

10

【0025】

具体的には、表1に記載の遺伝子の塩基配列をprimer3またはベクターNTIのソフトウェアにかけて得られる、プライマーまたはプローブの候補配列、若しくは少なくとも該配列を一部に含む配列をプライマーまたはプローブとして使用することができる。

【0026】

本発明で用いられる疾患マーカーは、上述するように連続する少なくとも15塩基、少なくとも18塩基、少なくとも19塩基、少なくとも20塩基、少なくとも30塩基、少なくとも40塩基、または少なくとも50塩基、少なくとも60塩基、少なくとも70塩基、または少なくとも100塩基の長さを有するものであればよいが、具体的にはマーカーの用途に応じて、長さを適宜選択し設定することができる。

20

【0027】

本発明の疾患マーカーは、上記遺伝子の発現・転写によって生じたRNAまたはそれに由来するポリヌクレオチド（例えば、cDNA）を特異的に認識し増幅するためのプライマーとして、または該RNAまたはそれに由来するポリヌクレオチド（例えば、cDNA）を特異的に検出するためのプローブとして利用することができる。上記疾患マーカーを、多発性嚢胞腎または多発性嚢胞腎合併症の検査もしくは検出においてプライマーとして用いる場合には、通常15bpから100bp、好ましくは15bpから50bp、より好ましくは20bpから35bpの範囲の塩基長を有するものが例示できる。また検出プローブとして用いる場合には、通常15bpから全配列の塩基数、好ましくは15bpから1kb、より好ましくは50bpから500bpの範囲の塩基長を有するものが例示できる。

30

本発明の疾患マーカーをプライマーとして用いる場合、好ましいプライマーセットを表2に例示する。

【0028】

【表 2】

プライマー名 [*]	配列	配列番号
NTNG1-primer-F	CCCCTGAGCTGATGTTTGAT	23
NTNG1-primer-R	GACGCCCAGATTCAAAGGTA	24
POSTN-primer-F	GCAGACACACCTGTTGAAA	25
POSTN-primer-R	GTCACGGGGATTCTTTGAA	26
TNC-primer-F	GTCACCGTGTCAACCTGATG	27
TNC-primer-R	GCCTGCCTTCAAGATTCTG	28
KAL1-primer-F	GGCTGAGGTCACCTACGGAAA	29
KAL1-primer-R	GGTCTCAGATTGGGCACTGT	30
BST1-primer-F	GTGCTGCCCTCAGACTATGACC	31
BST1-primer-R	CTGCCATACAGAACATCGCTCAG	32
INSIG1-primer-F	GGTGGACATTTGATCGTTCC	33
INSIG1-primer-R	TGACGCCTCCTGAGAAAAAT	34
SCD-primer-F	TGGTTCACTTGGAGCTGTG	35
SCD-primer-R	GCCATGCAATCAATGAAGAA	36
HSD3B1-primer-F	AGGACGTCTCGGTCATCATC	37
HSD3B1-primer-R	CTGGCACACTAGCTTGACA	38
KRT7-primer-F	CAGGAACTCATGAGCGTGAA	39
KRT7-primer-R	GATATTCACGGCTCCCACTC	40
USP40-primer-F	GGGGCACCGTATTACTTGAA	41
USP40-primer-R	GGCTTCTTGGCTTTTCCTTC	42
SULT1E1-primer-F	CAGAAATTGTCGCCCTTCAT	43
SULT1E1-primer-R	GATTCCTTCATTGCTGCTCA	44
ACAT2-primer-F	AAAAGCAGGTTGGTCACTGG	96
ACAT2-primer-R	CGACTTCTGCCCATCTCTC	97
CD274-primer-F	GCCACCAGCTGTCATCACTA	98
CD274-primer-R	CCAACACCACAAGGAGGAGT	99
CTGF -primer-F	ACTGTCCCGGAGACAATGAC	100
CTGF -primer-R	TGCTCCTAAAGCCACACCTT	101
MMP10-primer-F	CCAGTCTGCTCTGCCTATCC	102
MMP10-primer-R	AACGTCAGGAACTCCACACC	103
NRCAM -primer-F	CCAGTCCATTCTGGGTCCTA	104
NRCAM -primer-R	TGGCATGCTGTTGTATGCTT	105
MMP1-primer-F	CTGGGAGCAAACACATCTGA	106
MMP1-primer-R	AGTTCATGAGCTGCAACACG	107

^{*} F は正方向プライマーを示す。R は逆方向プライマーを示す。

【0029】

本発明の疾患マーカーをプローブとして使用するときには、プローブは、放射性同位元素（³²P、³³Pなど）、蛍光物質（フルオレサミン、ローダミン、テキサスレッド、ダンシル、それらの誘導体など）、化学発光物質、または酵素などで標識されていてもよく、かかる標識疾患マーカーはプローブ（検出マーカー）として好適に利用することができる。

【0030】

本発明の疾患マーカーは、ノーザンブロット法、サザンブロット法、RT-PCR法、in situハイブリダーゼーション法などといった、特定の遺伝子、mRNAおよびcDNAを特異的に認識し、また検出する公知の方法において、常法に従ってプライマーまたはプローブとして利用することができる。

【0031】

本発明において多発性嚢胞腎または多発性嚢胞腎合併症の検査（「検出」もしくは「診断」と称してもよい。）は、被験者の血液、血清、血漿、細胞抽出液、尿、リンパ液、組織液、腹水、髄液、及びその他の体液、あるいは組織または細胞（例えば、腎組織または腎細胞、iPS細胞から分化誘導により得られた体細胞など）からなる群より選択される少なくとも1種より得られる試料における表1の遺伝子の発現上昇または下降の有無またはそ

10

20

30

40

50

のレベル（発現上昇程度もしくは下降程度）を測定し、得られた結果を評価することによって行なうことができる。

【0032】

本発明の態様において、本発明は、被験者が多発性嚢胞腎または多発性嚢胞腎の合併症を発症しているまたは発症するリスクを有しているか否かを検査する方法を提供し、該方法は、以下の工程：

（a）被験者由来の試料から、NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、ACAT2、INSIG1、SCD、HSD3B1、KRT7、USP40、SULT1E1、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子の発現量を測定する工程；および

（b）NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、HSD3B1、KRT7、USP40およびSULT1E1から成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子の前記発現量が、対照試料における発現量より低い場合、該被験者が多発性嚢胞腎を発症している、または発症するリスクを有している、と決定する工程、あるいは、ACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子の前記発現量が、該対照試料における発現量より高い場合、被験者が多発性嚢胞腎を発症している、または発症するリスクを有している、と決定する工程、を含む。

【0033】

本発明の実施態様において、本発明に係る多発性嚢胞腎または多発性嚢胞腎合併症を検査（検出もしくは診断）する方法は、被験者の体細胞由来のiPS細胞からin vitroで分化誘導により得られた血管内皮細胞を試料として用いてもよく、この場合、表1中のNTNG1、POSTN、TNC、KAL1およびBST1から成る群より選択される1もしくは2以上から全部の遺伝子の発現下降の有無またはそのレベル（発現下降程度）を測定し、得られた結果を評価することによって行われ、ならびに/あるいは、表1中のACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1およびTFPI2から成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子の発現の上昇の有無またはそのレベル（発現上昇程度）を測定し、得られた結果を評価することによって行うことができる。

【0034】

具体的には、該方法は、被験者の体細胞からiPS細胞を誘導し、該iPS細胞から血管内皮細胞を分化誘導する工程、該血管内皮細胞におけるNTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、ACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1およびTFPI2から成る群より選択された1以上もしくは全部の遺伝子の発現量もしくは転写活性を測定する工程、および、対照試料（すなわち、健常者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導した血管内皮細胞）と比較して、NTNG1、POSTN、TNC、KAL1およびBST1から成る群より選択された1以上もしくは全部の遺伝子の前記発現量もしくは転写活性が下降（もしくは、減少）した場合、該被験者が多発性嚢胞腎または多発性嚢胞腎の合併症を発症している、または発症するリスクを有している、と決定する、あるいは、ACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1およびTFPI2から成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子の前記発現量もしくは転写活性が上昇（もしくは、増加）した場合、該被験者が多発性嚢胞腎または多発性嚢胞腎の合併症を発症している、または発症するリスクを有している、と決定する工程を含む。

【0035】

さらなる実施態様として、本発明に係る多発性嚢胞腎または多発性嚢胞腎合併症の検査

(検出または診断)は、被験者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導した血管周皮細胞を試料として用いてもよく、この場合、表1中のHSD3B1、KRT7、USP40およびSULT1E1から成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子の発現下降の有無またはそのレベル(発現下降程度)を測定し、得られた結果を評価することによって行うことができる、ならびに/あるいは、表1中のMMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子の発現上昇の有無またはそのレベル(発現上昇程度)を測定し、得られた結果を評価することによって行うことができる。

【0036】

具体的には、該方法は、被験者の体細胞からiPS細胞を誘導し、該iPS細胞から血管周皮細胞を分化誘導する工程、該血管周皮細胞におけるHSD3B1、KRT7、USP40およびSULT1E1から成る群より選択された1以上もしくは全部の遺伝子の発現量もしくは転写活性を測定する工程、および、対照試料(すなわち、健常者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導した血管周皮細胞)と比較して、HSD3B1、KRT7、USP40およびSULT1E1から成る群より選択された1以上もしくは全部の遺伝子の前記発現量もしくは転写活性が下降(もしくは、減少)した場合、該被験者が多発性嚢胞腎または多発性嚢胞腎合併症を発症している、または発症するリスクを有している、と決定する、あるいは、ACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1およびTFPI2から成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子の前記発現量もしくは転写活性が上昇(もしくは、増加)した場合、該被験者が多発性嚢胞腎または多発性嚢胞腎合併症を発症している、または発症するリスクを有している、工程を含む。

【0037】

<疾患マーカーとしての抗体>

本発明はまた、多発性嚢胞腎または多発性嚢胞腎の合併症の疾患マーカーとして表1に記載の遺伝子の発現産物(タンパク質)を特異的に認識することのできる抗体を提供する。

【0038】

表1に記載の遺伝子がコードするタンパク質としては配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93または94に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を挙げることができ、好ましい実施態様として、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92または95で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を例示することができる。

【0039】

本発明の抗体は、その形態に特に制限はなく、表1に記載のタンパク質を免疫抗原とするポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であってもよいし、あるいは、キメラ抗体(例えば、ヒト/マウスキメラ抗体)、ヒト化抗体、ヒト抗体などであってもよいし、あるいは、これらの抗体のフラグメント(例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fc、Fv、scFvなど)であってもよい。本発明の抗体はまた、該タンパク質のアミノ酸配列のうち、連続する少なくとも8アミノ酸(たとえば10~20アミノ酸)からなるポリペプチドに対して抗原結合性を有する抗体も包含する。

【0040】

前記抗体の製造方法は、すでに周知であり、本発明の抗体もこれらの常法に従って製造することができる(Current protocols in Molecular Biology edit.Ausubel et al.(1987) Publish.John Wiley and Sons.Section 11.12-11.13)。

【0041】

具体的には、本発明の抗体がポリクローナル抗体の場合には、常法に従って大腸菌等で発現し精製した表1に記載の遺伝子がコードするタンパク質、あるいは部分アミノ酸配列

を有するオリゴペプチドを合成して、家兎等の非ヒト動物に免疫し、該免疫動物の血清から常法に従って得ることが可能である。

【0042】

一方、モノクローナル抗体の場合には、上述の免疫された非ヒト動物から得られた脾臓細胞と骨髓腫細胞とを細胞融合させて調製したハイブリドーマ細胞の中から例えばHAT選択と標的ポリペプチドとの親和性アッセイによって得ることができる (Current protocols in Molecular Biology edit.Ausubel et al.(1987) Publish.John Wiley and Sons.Section 11.4-11.11)。

【0043】

また、抗体の作製に使用されるタンパク質は、本発明により提供される遺伝子の配列情報に基づいて、DNAクローニング、各プラスミドの構築、宿主へのトランスフェクション、形質転換体の培養および培養物からのタンパク質の回収の操作により得ることができる。これらの操作は、当業者に既知の方法、あるいは文献記載の方法 (Molecular Cloning, T.Maniatis et al., CSH Laboratory(1983), DNA Cloning, DM.Glover, IRL PRESS(1985))などに準じて行うことができる。具体的には遺伝子が所望の宿主細胞中で発現できる組み換えDNA (発現ベクター) を作成し、これを宿主細胞に導入して形質転換し、該形質転換体を培養して得られる培養物から、目的タンパク質を回収することによって実施することができる。また、別の手法として、本発明により提供されるアミノ酸配列の情報に従って、一般的な化学合成法 (ペプチド合成) によって製造することもできる。

【0044】

なお、本発明の表1に記載の遺伝子をコードするタンパク質には、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92または95に示すアミノ酸配列を有するタンパク質のみならず、その相同物も包含される。該相同物としては、上記配列番号で示される各アミノ酸配列において、1もしくは複数、好ましくは1もしくは数個、のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなるか、あるいは、上記配列番号で示される各アミノ酸配列と少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、96%もしくは97%、さらに好ましくは少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、同等の生物学的機能を有するか、および/または免疫学的活性において同等の活性を有するタンパク質を挙げることができる。このような相同物は、人種間の多型、突然変異、スプライス変異などの変異に基づいた変異体を包含する。

【0045】

なお、ここで配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92または95で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質の公知の機能と同等の生物学的機能を有するタンパク質としては、生化学的または薬理学的機能において同等の機能を有するタンパク質を挙げることができる。また、上記タンパク質と免疫学的活性において同等の活性を有するタンパク質としては、上記タンパク質に対する抗体と特異的に結合する能力を有するタンパク質を挙げることができる。

【0046】

本明細書において使用される「配列同一性」なる用語は、2つのアミノ酸配列もしくは2つの塩基配列を、それぞれ、アミノ酸もしくは塩基 (ヌクレオチド) の同一性が最大になるように、ギャップを導入してかもしくはギャップを導入しないで、整列 (アラインメント) させたとき、アミノ酸残基の総数もしくは塩基の総数 (いずれもギャップ数を含む) に対する同一アミノ酸残基数もしくは同一塩基数の百分率 (%) として定義しうる。配列同一性は、例えばNCBIサーバ、ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/において見出され得るBLAST (Altschul SF, et al, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-402または (1990) J Mol Biol. 215(3):403-10) を用いて実行され得る。

【0047】

さらにまた、タンパク質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、その生物学的機能及

10

20

30

40

50

び/または免疫学的活性が保持される限り制限はない。生物学的機能や免疫学的活性を喪失することなくアミノ酸残基が、どのように、何個置換、挿入あるいは欠失されればよいかを決定する指標は、当業者に周知のコンピュータプログラム、例えばDNA Star softwareを用いて見出すことができる。例えば変異数は、典型的には、全アミノ酸のうち10%以内であり、好ましくは全アミノ酸のうち5%以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸のうち1%以内である。また置換されるアミノ酸は、当該アミノ酸で置換した後に得られるタンパク質が同等の生物学的機能および/または免疫学的活性を保持している限り、特に制限されない。好ましくは、タンパク質の構造保持の観点から、残基の極性、電荷、可溶性、疎水性、親水性ならびに両親媒性など、置換前のアミノ酸と類似した電気的性質、構造的性質などの性質を有するアミノ酸である。例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe及びTrpは互いに非極性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn及びGlnは互いに非荷電性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、Asp及びGluは互いに酸性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、またLys、Arg及びHisは互いに塩基性アミノ酸に分類されるアミノ酸である。ゆえに、これらのアミノ酸の性質を指標として同群に属するアミノ酸の中から適宜選択することができる。

10

【0048】

また本発明の抗体は、表1（上記）に記載の遺伝子をコードするタンパク質の部分アミノ酸配列を有するポリペプチド（オリゴペプチドを含む意図である。）を用いて調製されるものであってよい。かかる抗体の誘導のために用いられるポリペプチドは、機能的な生物活性を有することは要しないが、該タンパク質と同様な免疫原特性を有するものであることが望ましい。好ましくはかかる免疫原特性を有し、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92または95のアミノ酸配列において連続する少なくとも8つのアミノ酸残基、たとえば10〜20アミノ酸残基からなるポリペプチドを例示することができる。

20

【0049】

かかるポリペプチドに対する抗体の生成は、宿主動物に応じて種々のアジュバントを用いて免疫学的反応を高めることによって行うことができる。限定はされないが、そのようなアジュバントには、フロイントアジュバント；水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル；並びにリゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシアニン及びジニトロフェノールのような表面活性物質；BCG（カルメットーゲラン桿菌）やコリネバクテリウムパーヴムなどのヒトアジュバントなどがある。

30

【0050】

本発明の抗体は表1に記載の遺伝子をコードするタンパク質に特異的に結合する性質を有することから、該抗体を利用することによって、被験者由来の試料中に含まれる上記タンパク質を特異的に検出し、また定量することができる。すなわち、多発性嚢胞腎または多発性嚢胞腎合併症を検査（検出または診断）するために有用である。

【0051】

<多発性嚢胞腎または多発性嚢胞腎の合併症の検査方法>

40

本発明は、多発性嚢胞腎の検査方法として、次の（a-1）および（b-1）の工程を含む方法を提供する：

（a-1）被験者由来の試料から、NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、ACAT2、INSIG1、SCD、HSD3B1、KRT7、USP40およびSULT1E1から成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子または該遺伝子によってコードされるタンパク質の発現量を測定する工程、および

（b-1）NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、HSD3B1、KRT7、USP40およびSULT1E1から成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子またはそれによってコードされるタンパク質の前記発現量が、健常者由来の対照試料における発現量より低い場合、該被験者が多発性嚢胞腎を発症している、または発症するリスクを有していると決定する工程、あるいは、ACAT2、INSIG1、SCDから成る群より選択される1以上もしくは全部の前記発現量が、健

50

常者由来の対照試料における発現量より高い場合、被験者が多発性嚢胞腎を発症している、または発症するリスクを有していると決定する工程。

【0052】

同様に、多発性嚢胞腎の合併症の検査方法として、次の（a-2）および（b-2）の工程を含む方法を提供する：

（a-2）多発性嚢胞腎である被験者由来の試料において、NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、ACAT2、INSIG1、SCD、HSD3B1、KRT7、USP40、SULT1E1、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択される1もしくは2以上から全部の遺伝子の発現量を測定する工程、および

10

（b-2）NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、HSD3B1、KRT7、USP40およびSULT1E1から成る群より選択される1以上もしくは全部の前記発現量が、健常者由来の対照試料における発現量より低い場合、該被験者が多発性嚢胞腎の合併症を発症している、または発症するリスクを有していると決定する工程、あるいは、ACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択される1以上もしくは全部の前記発現量が、健常者由来の対照試料における発現量より高い場合、被験者が合併症を発症している、または発症するリスクを有していると決定する工程。

20

【0053】

同様に、脳動脈瘤の合併症の検査方法として、次の（a-3）および（b-3）の工程を含む方法を提供する：

（a-3）多発性嚢胞腎である被験者由来の試料において、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子の発現量を測定する工程、および

（b-3）BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択される1以上もしくは全部の前記発現量が、健常者由来の対照試料における発現量より高い場合、被験者が脳動脈瘤を発症している、または発症するリスクを有していると決定する工程。

30

【0054】

ここで、被験者由来の試料もしくは健常者由来の対照試料として、血液、血清、血漿、細胞抽出液、尿、リンパ液、組織液、腹水、髄液、またはその他の体液、あるいは組織または細胞（例えば、腎組織または腎細胞、iPS細胞から分化誘導された体細胞など）を用いることができる。前記iPS細胞から分化誘導された体細胞として、被験者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導された体細胞、例えば尿細管細胞、集合管細胞、胆管細胞、肝細胞、膵管細胞、膵細胞、腸管細胞、生殖細胞、血管内皮細胞または血管周皮細胞、好ましくは血管内皮細胞または血管周皮細胞、を用いることができる。このときの対照試料は、健常者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導された対応の体細胞であり、iPS細胞を誘導するための該健常者の体細胞は、被験者の体細胞と同じ種類の細胞でもよいし、異なってもよく、そのような体細胞の例は、後述の「iPS細胞の製造方法」の項に記載されている。また、これに関連して、「対応の体細胞」とは、健常者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導された体細胞が、被験者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導された体細胞と同じ種類の細胞であることを意味する。

40

【0055】

被験者由来の試料として、被験者の単離された体細胞由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管内皮細胞を用いた場合、本発明はさらに、多発性嚢胞腎の検査方法として、次の（a-4）および（b-4）の工程を含む方法を提供する：

50

(a-4) 被験者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管内皮細胞において、NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、ACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1およびTFPI2から成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子の発現量または該遺伝子によってコードされるタンパク質の発現量を測定する工程、および

(b-4) NTNG1、POSTN、TNC、KAL1およびBST1から成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子またはそれによってコードされるタンパク質の前記発現量が、健常人由来の対照試料における発現量より低い場合、該被験者が多発性嚢胞腎を発症している、または発症するリスクを有していると決定する工程、あるいは、ACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1およびTFPI2から成る群より選択される1以上もしくは全部の前記発現量が、健常人由来の対照試料における発現量より高い場合、被験者が多発性嚢胞腎を発症している、または発症するリスクを有していると決定する工程。

【0056】

他の態様において、本発明はさらに、被験者由来の試料として、被験者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導した血管周皮細胞を用いた場合、多発性嚢胞腎の検査方法として、次の(a-5)および(b-5)の工程を含む方法を提供する：

(a-5) 被験者の単離された体細胞由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管周皮細胞において、HSD3B1、KRT7、USP40、SULT1E1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子の発現量または該遺伝子によってコードされるタンパク質の発現量を測定する工程、および

(b-5) HSD3B1、KRT7、USP40およびSULT1E1から成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子またはそれによってコードされるタンパク質の前記発現量が、健常者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管周皮細胞（対照試料）における発現量より低い場合、該被験者が多発性嚢胞腎を発症している、または発症するリスクを有していると決定する工程、あるいは、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択される1以上もしくは全部の前記発現量が、健常人由来の対照試料における発現量より高い場合、被験者が多発性嚢胞腎を発症している、または発症するリスクを有していると決定する工程。

【0057】

他の態様において、本発明はさらに、被験者由来の試料として、被験者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導した血管内皮細胞を用いた場合、多発性嚢胞腎の合併症の検査方法として、次の(a-6)および(b-6)の工程を含む方法を提供する：

(a-6) 多発性嚢胞腎である被験者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管内皮細胞において、NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、ACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1およびTFPI2から成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子の発現量または該遺伝子によってコードされるタンパク質の発現量を測定する工程、および

(b-6) NTNG1、POSTN、TNC、KAL1およびBST1から成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子またはそれによってコードされるタンパク質の前記発現量が、健常者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管内皮細胞（対照試料）における発現量より低い場合、該被験者が多発性嚢胞腎の合併症を発症している、または発症するリスクを有していると決定する工程、もしくは、ACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1およびTFPI2から成る群より選択される1以上もしくは全部の前記発現量が、該対照試料における発現量より高い場合、被験者が多発性嚢胞腎の合併症を発症している、または発症するリスクを有していると決定する工程。

【0058】

多発性嚢胞腎である被験者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管内皮細胞を用いた場合、脳動脈瘤の合併症の検査方法として、次の（a-7）および（b-7）の工程を含む方法を提供する：

（a-7）多発性嚢胞腎を発症する被験者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管内皮細胞において、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1およびTFPI2から成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子の発現量または該遺伝子によってコードされるタンパク質の発現量を測定する工程、および

（b-7）BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1およびTFPI2から成る群より選択される1以上もしくは全部の前記発現量が、該対照試料における発現量より高い場合、被験者が脳動脈瘤を発症している、または発症するリスクを有していると決定する工程。

10

【0059】

他の態様において、本発明はさらに、被験者由来の試料として、被験者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管周皮細胞を用いた場合、多発性嚢胞腎の合併症の検査方法として、次の（a-8）および（b-8）の工程を含む方法を提供する：

（a-8）多発性嚢胞腎である被験者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管周皮細胞において、HSD3B1、KRT7、USP40、SULT1E1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子の発現量または該遺伝子によってコードされるタンパク質の発現量を測定する工程、および

20

（b-8）HSD3B1、KRT7、USP40およびSULT1E1から成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子またはそれによってコードされるタンパク質の前記発現量が、健常者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管周皮細胞（対照試料）における発現量より低い場合、該被験者が多発性嚢胞腎の合併症を発症していると決定する工程、あるいは、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択される1以上もしくは全部の前記発現量が、該対照試料における発現量より高い場合、被験者が多発性嚢胞腎の合併症を発症している、または発症するリスクを有していると決定する工程。

【0060】

30

多発性嚢胞腎である被験者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導した血管周皮細胞を用いた場合、脳動脈瘤の合併症のより好ましい検査方法として、次の（a-9）および（b-9）の工程を含む方法を提供する：

（a-9）多発性嚢胞腎である被験者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管周皮細胞において、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択される1以上もしくは全部の遺伝子の発現量または該遺伝子によってコードされるタンパク質の発現量を測定する工程、および

（b-9）MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択される1以上もしくは全部の前記発現量が、該対照試料における発現量より高い場合、被験者が脳動脈瘤を発症している、または発症するリスクを有していると決定する工程。

40

【0061】

本明細書で使用される「対照」なる用語は、特に断らない限り、多発性嚢胞腎を罹患していない健常者から上記と同様の工程で得られる測定結果であることが好ましい。

【0062】

ここで、血液、血清、血漿、細胞抽出液、尿、リンパ液、組織液、腹水、髄液、その他の体液、あるいは、被験者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導された体細胞（例えば尿細管細胞、集合管細胞、胆管細胞、肝細胞、膵管細胞、膵臓細胞、腸管細胞、生殖細胞、血管内皮細胞、血管周皮細胞など）はそのまま用いてもよく、より好ましくは被験者の血液、血清、血漿、細胞抽出液、尿、リンパ液、組織液、腹水、髄液、またはその他の体液

50

、あるいは、被験者由来のiPS細胞から分化誘導された前記細胞から常法を用いて調製されたmRNAまたはそれからさらに調製されるポリヌクレオチド（例えば、cDNA、cRNAなど）、タンパク質、またはタンパク質含有画分を含む抽出物などである。ここで、iPS細胞から尿細管細胞、集合管細胞、胆管細胞、肝細胞、膵管細胞、膵臓細胞、腸管細胞、生殖細胞、血管内皮細胞または血管周皮細胞の製造方法は、特に限定されないが、胚様体もしくは形成したテラトーマから適宜抽出することで得ることができる（例えば、特開2006-239169）。肝細胞は、特に限定されないが、W02006/082890、特開2010-75631またはHay DC, et al, Proc Natl Acad Sci U S A, 105, 12301-6 2008に記載の方法で作製することができる。同様に、膵臓細胞は、W02007/103282に記載の方法を用いて作製することができる。iPS細胞ならびに血管内皮細胞または血管周皮細胞は、後述の方法により製造することができる。

10

【0063】

本発明の検査方法は、測定対象として用いる生体試料の種類に応じて、具体的には下記のようにして実施される。

測定対象物としてmRNAまたはそれから調製されるポリヌクレオチド（例えば、cDNA、cRNAなど）を利用する場合、上記工程（i）および（ii）として下記の工程を用いることができる。

（i）被験者の試料から調製されたmRNAまたは該mRNAから転写された相補的ポリヌクレオチドと前述の疾患マーカーとを結合させる工程、

（ii）該疾患マーカーに結合した生体試料由来のRNAまたは該RNAから転写された相補的ポリヌクレオチド（cDNA）を、上記疾患マーカーの存在量を指標として測定する工程。

20

【0064】

検出に用いる試料としてmRNAまたはそれから調製されるポリヌクレオチド（例えば、cDNA、cRNAなど）（以下、「mRNA等」という）を利用する場合は、本発明の検査方法は該mRNA等中の表1に記載の遺伝子の発現量を検出し、またその程度（レベル）を測定することによって実施される。具体的には、該測定は、前述する本発明のポリヌクレオチドからなる疾患マーカーをプライマーまたはプローブとして用いて、上記mRNA等を対象にしてノーザンブロット法、サザンブロット法、RT-PCR法、定量PCR法、DNAチップ解析法、in situ ハイブリダイゼーション解析法などの公知の方法を行うことにより実施できる。

【0065】

30

ノーザンブロット法またはサザンブロット法を利用する場合は、本発明の前述の疾患マーカーをプローブとして用いることによって、mRNA等中の標的遺伝子の発現量を検出または測定することができる。具体的には、本発明の疾患マーカー（RNAに対しては相補鎖）を放射性同位元素（RI；例えば ^{32}P 、 ^{33}P など）や蛍光物質などで標識し、それを、常法に従ってナイロンメンブレン等にトランスファーした被験者の生体組織由来のmRNA等とハイブリダイズさせた後、形成された疾患マーカーとmRNA等との二重鎖を、疾患マーカーの標識物（RIもしくは蛍光物質等）に由来するシグナルを放射線検出器（Typhoon FLA 9000、GEヘルスケア社製等）または蛍光検出器等で検出または測定する方法を例示することができる。あるいは、AlkPhos Direct Labeling and Detection System（Amersham Pharmacia Biotech社製）を用いて、該Systemに添付のプロトコールに従って疾患マーカーを標識し、被験者の生体組織由来のmRNA等とハイブリダイズさせた後、疾患マーカーの標識物に由来するシグナルをマルチバイオイメージャーSTORM860（Amersham Pharmacia Biotech社製）で検出または測定する方法を使用することもできる。

40

【0066】

RT-PCR法を利用する場合は、本発明の上記疾患マーカーをプライマーとして用いることによって、RNA等中の表1に記載の遺伝子の発現量を検出または測定することができる。具体的には、被験者の生体組織由来のRNAから常法に従ってcDNAを調製して、これを鋳型として標的の遺伝子領域が増幅できるように、本発明の疾患マーカーをプライマーとして用い、常法に従ってPCR法を行い、得られた増幅二本鎖DNAを検出する方法を例示することができる。

50

【0067】

PCR法は、変性、アニーリングおよび伸長の各段階を1サイクルとしてこれを例えば20～40サイクル実施することを含む。変性は、2本鎖DNAを1本鎖に分離する段階であり、通常、94～98℃で約10秒～2分の処理を行う。アニーリングは、1本鎖の鋳型DNAに、センスプライマーまたはアンチセンスプライマーを結合する段階であり、通常、約50～68℃で約10秒～1分の処理を行う。伸長は、鋳型DNAに沿ってプライマーを伸長する段階であり、通常、72℃で約20秒～10分の処理を行う。上記サイクルの開始前に、2本鎖DNAを変性条件と同様の条件で前処理してもよく、また、上記サイクルの完了後に、伸長条件と同様の条件で後処理してもよい。PCRでは、PCRバッファーと耐熱性DNAポリメラーゼが使用され、増幅産物は例えば電気泳動によって確認されうる。PCRは、サーマルサイクラーなどの市販のPCR装置を用いて行うことができる。

10

【0068】

さらにまた、DNAチップ解析を利用する場合は、本発明の上記疾患マーカーをDNAプローブ（1本鎖または2本鎖ポリヌクレオチド）として貼り付けたDNAチップを用意し、これに被験者の生体組織由来のRNAから常法によって調製されたcRNAとハイブリダイズさせて、形成されたDNAとcRNAとの二本鎖に、別途RIや蛍光物質等で標識してなる本発明の疾患マーカーを標識プローブとして結合させて検出する方法を挙げることができる。このように遺伝子の発現量を検出または測定することができるDNAチップとしては、Gene Chip（Affymetrix社）を挙げることができる。

20

【0069】

測定対象物としてタンパク質を用いる場合は、本発明の疾患マーカーに対する抗体と接触させて、該抗体に結合したタンパク質またはその部分ペプチドを、ウエスタンブロット法、ELISA法など公知の検出方法で、本発明の疾患マーカーを指標として検出し、また定量する方法を挙げることができる。

【0070】

ウエスタンブロット法は、一次抗体として本発明の上記疾患マーカーに対する抗体を用いた後、二次抗体として上記一次抗体に結合性を有する¹²⁵Iなどの放射性同位元素、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）などの酵素または蛍光物質で標識してなる抗体を用いて、タンパク質またはその部分ペプチドと疾患マーカー（一次抗体）との複合体を標識し、次いで該放射性同位元素もしくは蛍光物質由来のシグナルを放射線測定器（Typhoon FLA 9000、GEヘルスケア社製）もしくは蛍光検出器で検出して測定することによって実施できる。あるいは、一次抗体として本発明の上記疾患マーカーに対する抗体を用いた後、ECL Plus Western Blotting Detection System（Amersham Pharmacia Biotech社製）を用いて、該Systemに添付のプロトコールに従って検出し、マルチバイオイメージャーSTORM860（Amersham Pharmacia Biotech社製）で測定することもできる。

30

【0071】

被験者由来の、上記例示の、血液、血清、血漿、細胞抽出液、尿、リンパ液、組織液、腹水、髄液、またはその他の体液、あるいは組織又は細胞を試料として用いる場合、免疫学的測定法を行うことができる。例えば、ラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ、発光イムノアッセイ、免疫沈降法、免疫比濁法、ウエスタンブロット、免疫拡散法などを挙げることができるが、好ましくはエンザイムイムノアッセイであり、特に好ましいのは酵素結合免疫吸着定量法（enzyme-linked immunosorbent assay：ELISA）（例えば、サンドイッチELISA）である。ELISAなどの上述した免疫学的方法は当業者に公知の方法により行うことが可能である。具体的には、ELISAは、本発明の疾患マーカーに対する抗体を含む溶液を一次抗体としてプレートなどの支持体に加え、該抗体を固定する。プレートを洗浄後、タンパク質の非特異的な結合を防ぐため、例えばBSAなどでブロッキングする。再び洗浄し、試料をプレートに加える。インキュベーションの後、洗浄し、例えばビオチン標識抗体などの標識抗体を二次抗体として加える。適度なインキュベーションの後、プレートを洗浄し、例えばアルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼなどの酵素と結合したアビジンを加える。インキュベーション後、プレートを洗浄し

40

50

、アビジンに結合している酵素に対応した基質を加え、基質の酵素的変化などを指標に所望のタンパク質量を検出する。

【0072】

常染色体優性多発性嚢胞腎または多発性嚢胞腎合併症の検査（検出もしくは診断）は、好適には、上記の如くして測定される本発明の疾患マーカーであるポリヌクレオチドと検査用プローブとの結合量、あるいは本発明の疾患マーカーであるタンパク質もしくはその部分ペプチドと検査用抗体もしくはそのフラグメントとの結合量に反映される、被験者由来の試料中における表1（上記）に記載の遺伝子または該遺伝子によってコードされるタンパク質の発現量を、同様にして測定される対照である多発性嚢胞腎を罹患していない健康者由来の試料中における該遺伝子または該タンパク質の発現量と対比して、両者の違いに基づいて行うことができる。この場合、被験者の標的遺伝子またはタンパク質の発現量が健康者のそれよりも、1.5倍以上、2倍以上、3倍以上、好ましくは5倍以上、さらに好ましくは10倍以上、低いまたは高いのであれば、より高い信頼性をもって、該被験者について疾患の罹患を認定することができる。

10

【0073】

なお、被験者の試料と健康者の対照試料との標的遺伝子またはタンパク質の発現量の比較は、測定を並行して行うことで実施できる。並行して行わない場合は、複数（少なくとも2つ、好ましくは3つ以上、より好ましくは5つ以上）の対照を用いて実質的に同一の測定条件で測定して得られた発現量の平均値または統計的中間値を基準量として、比較に用いることができる。

20

【0074】

＜i>IPS細胞の製造方法＞

本発明で用いる*IPS*細胞は、ある特定の核初期化物質（「リプログラミング物質」ともいう。）を、DNAまたはタンパク質の形態で体細胞に導入することまたは薬剤によって当該核初期化物質の内在性のmRNAおよびタンパク質の発現を上昇させることによって作製することができる（K. Takahashi and S. Yamanaka (2006) *Cell*, 126: 663-676、K. Takahashi et al. (2007) *Cell*, 131: 861-872、J. Yu et al. (2007) *Science*, 318: 1917-1920、M. Nakagawa et al. (2008) *Nat. Biotechnol.*, 26: 101-106、国際公開WO 2007/069666、国際公開WO 2010/068955など）。核初期化物質は、ES細胞に特異的に発現している遺伝子またはES細胞の未分化維持に重要な役割を果たす遺伝子もしくはその遺伝子産物であればよく、特に限定されないが、例えば、Oct3/4, Klf4, Klf1, Klf2, Klf5, Sox2, Sox1, Sox3, Sox15, Sox17, Sox18, c-Myc, L-Myc, N-Myc, TERT, SV40 Large T antigen, HPV16 E6, HPV16 E7, Bmi1, Lin28, Lin28b, Nanog, Esrrb, EsrrgまたはGlis1が例示される。これらの初期化物質は、*iPS*細胞樹立の際には、組み合わされて使用されてもよい。例えば、上記初期化物質を、少なくとも1つ、2つもしくは3つ含む組み合わせであり、好ましくは3つもしくは4つを含む組み合わせである。

30

【0075】

上記の各核初期化物質のマウスおよびヒトcDNAのヌクレオチド配列ならびに該cDNAにコードされるタンパク質のアミノ酸配列情報は、WO 2007/069666に記載のNCBI accession numbersを参照すること、またL-Myc、Lin28、Lin28b、Esrrb、EsrrgおよびGlis1のマウスおよびヒトのcDNA配列およびアミノ酸配列情報については、それぞれ下記NCBI accession numbersを参照することにより取得できる。当業者は、当該cDNA配列またはアミノ酸配列情報に基づいて、常法により所望の核初期化物質を調製することができる。

40

遺伝子名	マウス	ヒト
L-Myc	NM_008506	NM_001033081
Lin28	NM_145833	NM_024674
Lin28b	NM_001031772	NM_001004317
Esrrb	NM_011934	NM_004452
Esrrg	NM_011935	NM_001438
Glisl	NM_147221	NM_147193

【0076】

これらの核初期化物質は、タンパク質の形態で、例えばリポフェクション、細胞膜透過性ペプチドとの結合、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入してもよいし、あるいは、DNAの形態で、ベクター（例えば、ウイルス、プラスミド、もしくは人工染色体）、リポフェクション、リポソーム、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入することができる。

10

【0077】

ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター（以上、Cell, 126, pp.663-676, 2006; Cell, 131, pp.861-872, 2007; Science, 318, pp.1917-1920, 2007）、アデノウイルスベクター（Science, 322, 945-949, 2008）、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクター（Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 85, 348-62, 2009）などが例示される。

20

【0078】

また、人工染色体ベクターとしては、例えばヒト人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BACおよびPAC)などが含まれる。

プラスミドとしては、哺乳動物細胞用プラスミドを使用しうる(Science, 322:949-953, 2008)。

【0079】

上記ベクターには、核初期化物質が発現可能なように、プロモーター、エンハンサー、リボゾーム結合配列、ターミネーター、ポリアデニル化サイトなどの制御配列を含むことができる。使用されるプロモーターとしては、例えばEF1 α プロモーター、CAGプロモーター、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、MoMuLV（モロニーマウス白血病ウイルス）LTR、HSV-TK（単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ）プロモーターなどが用いられる。なかでも、EF1 α プロモーター、CAGプロモーター、MoMuLV LTR、CMVプロモーター、SR α プロモーターなどが挙げられる。さらに、必要に応じて、薬剤耐性遺伝子（例えばカナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子など）、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子などの選択マーカー配列、緑色蛍光タンパク質(GFP)、 β グルクロニダーゼ(GUS)、FLAGなどのレポーター遺伝子配列などを含むことができる。

30

【0080】

また、上記ベクターには、体細胞への導入後、核初期化物質をコードする遺伝子もしくはプロモーターとそれに結合する核初期化物質をコードする遺伝子を共に切除するために、それらの前後にLoxP配列を有してもよい。別の好ましい一実施態様においては、トランスポゾンを用いて染色体に導入遺伝子を組み込んだ後に、プラスミドベクターもしくはアデノウイルスベクターを用いて細胞に転移酵素を作用させ、導入遺伝子を完全に染色体から除去する方法が用いられ得る。好ましいトランスポゾンとしては、例えば、鱗翅目昆虫由来のトランスポゾンであるpiggyBac等が挙げられる（Kaji, K. et al., (2009), Nature, 458: 771-775、Woltjen et al., (2009), Nature, 458: 766-770、WO 2010/012077）。

40

【0081】

さらに、ベクターには、染色体への組み込みがなくとも複製されて、エピソーマルに存

50

在するように、リンパ指向性ヘルペスウイルス (lymphotrophic herpes virus)、BKウイルスおよび牛乳頭腫 (Bovine papillomavirus) の起点とその複製に係る配列を含んでもよい。例えば、EBNA-1およびoriPもしくはLarge TおよびSV40ori配列を含むことが挙げられる (WO 2009/115295、WO 2009/157201およびWO 2009/149233)。

【0082】

さらにまた、複数の核初期化物質を同時に導入するために、ポリシストロニックに発現させる発現ベクターを用いてもよい。ポリシストロニックに発現させるためには、遺伝子をコードする配列の間は、IRESまたは口蹄病ウイルス (FMDV) 2Aコード領域により結合されていてもよい (Science, 322:949-953, 2008およびWO 2009/092042 2009/152529)。

【0083】

核初期化に際して、iPS細胞の誘導効率を高めるために、上記の因子の他に、例えば、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤 [例えば、バルプロ酸 (VPA) (Nat. Biotechnol., 26(7): 795-797 (2008))、トリコスタチンA、酪酸ナトリウム、MC 1293、M344等の低分子阻害剤、HDACに対するsiRNAおよびshRNA (例、HDAC1 siRNA Smartpool(登録商標) (Millipore)、HuSH 29mer shRNA Constructs against HDAC1 (OriGene)等) 等の核酸性発現阻害剤など]、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば5'-azacytidine) (Nat. Biotechnol., 26(7): 795-797 (2008))、G9aヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤 [例えば、BIX-01294 (Cell Stem Cell, 2: 525-528 (2008))等の低分子阻害剤、G9aに対するsiRNAおよびshRNA (例、G9a siRNA(human) (Santa Cruz Biotechnology)等) 等の核酸性発現阻害剤など]、L-channel calcium agonist (例えばBayk8644) (Cell Stem Cell, 3, 5 68-574 (2008))、p53阻害剤 (例えばp53に対するsiRNAおよびshRNA) (Cell Stem Cell, 3, 475-479 (2008))、Wnt Signaling activator (例えばsoluble Wnt3a) (Cell Stem Cell, 3, 132-135 (2008))、LIFまたはbFGFなどの増殖因子、ALK5阻害剤 (例えば、SB431542) (Nat. Methods, 6: 805-8 (2009))、mitogen-activated protein kinase signaling 阻害剤、glycogen synthase kinase-3阻害剤 (PloS Biology, 6(10), 2237-2247 (2008))、miR-291-3p、miR-294、miR-295などのmiRNA (R.L. Judson et al., Nat. Biotechnol., 27:459-461 (2009))、等を使用することができる。

【0084】

薬剤によって核初期化物質の内在性のタンパク質の発現を上昇させる方法における薬剤としては、6-ブromoインジルビン-3'-オキシム、インジルビン-5-ニトロ-3'-オキシム、バルプロ酸 (valproic acid)、2-(3-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-4-イル)-1,5-ナフチリジン、1-(4-メチルフェニル)-2-(4,5,6,7-テトラヒドロ-2-イミノ-3(2H)-ベンゾチアゾリル)エタノンHBr(pifithrin-alpha)、プロスタグランジンJ2およびプロスタグランジンE2等が例示される (WO 2010/068955)。

【0085】

iPS細胞誘導のための培養培地としては、例えば(1) 10~15%FBSを含有するDMEM、DMEM/F12またはDME培地 (これらの培地にはさらに、LIF、penicillin/streptomycin、puromycin、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、β-メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。)、(2) bFGFまたはSCFを含有するES細胞培養用培地、例えばマウスES細胞培養用培地 (例えばTX-WES培地、トロンボX社) または霊長類ES細胞培養用培地 (例えば霊長類 (ヒト&サル) ES細胞用培地 (リプロセル、京都、日本)、mTeSR-1)、などが含まれる。

【0086】

培養法の例としては、たとえば、37℃、5%CO₂存在下にて、10%FBS含有DMEMまたはDME/F12培地中で体細胞と核初期化物質 (DNAまたはタンパク質) を接触させ約4~7日間培養し、その後、細胞をフィーダー細胞 (たとえば、マイトマイシンC処理STO細胞、SNL細胞等) 上にまきなおし、体細胞と核初期化物質の接触から約10日後からbFGF含有霊長類ES細胞培養用培地で培養し、該接触から約30~約45日またはそれ以上ののちにES細胞様コロニーを生じさせることができる。また、iPS細胞の誘導効率を高めるために、5-10%と低い酸素濃度の条件下で培養してもよい。

【0087】

あるいは、その代替培養法として、フィーダー細胞（たとえば、マイトマイシンC処理STO細胞、SNL細胞等）上で10%FBS含有DMEM培地（これにはさらに、LIF、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）で培養し、約25～約30日またはそれ以上のうちにES様コロニーを生じさせることができる。

【0088】

上記培養の間には、培養開始2日目以降から毎日1回新鮮な培地と培地交換を行う。また、核初期化に使用する体細胞の細胞数は、限定されないが、培養ディッシュ100cm²あたり約 5×10^3 ～約 5×10^6 細胞の範囲である。

10

【0089】

マーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子を用いた場合は、対応する薬剤を含む培地（選択培地）で培養を行うことによりマーカー遺伝子発現細胞を選択することができる。またマーカー遺伝子が蛍光タンパク質遺伝子の場合は蛍光顕微鏡で観察することによって、発光酵素遺伝子の場合は発光基質を加えることによって、また発色酵素遺伝子の場合は発色基質を加えることによって、マーカー遺伝子発現細胞を検出することができる。

【0090】

本明細書中で使用する、iPS細胞誘導のための「体細胞」は、以下のものに限定されないが、例えば、角質化する上皮細胞（例、角質化表皮細胞）、粘膜上皮細胞（例、舌表層の上皮細胞）、外分泌腺上皮細胞（例、乳腺細胞）、ホルモン分泌細胞（例、副腎髄質細胞）、代謝・貯蔵用の細胞（例、肝細胞）、境界面を構成する内腔上皮細胞（例、I型肺胞細胞）、内鎖管の内腔上皮細胞（例、血管内皮細胞）、運搬能をもつ繊毛のある細胞（例、気道上皮細胞）、細胞外マトリックス分泌用細胞（例、線維芽細胞）、収縮性細胞（例、平滑筋細胞）、血液と免疫系の細胞（例、Tリンパ球）、感覚に関する細胞（例、桿細胞）、自律神経系ニューロン（例、コリン作動性ニューロン）、感覚器と末梢ニューロンの支持細胞（例、随伴細胞）、中枢神経系の神経細胞とグリア細胞（例、星状グリア細胞）、色素細胞（例、網膜色素上皮細胞）、およびそれらの前駆細胞（組織前駆細胞）が例示される。また、体細胞は、細胞の分化の程度に特に制限はなく、未分化な前駆細胞（体性幹細胞も含む）であっても、最終分化した成熟細胞であっても、同様に本発明における体細胞の起源として使用することができる。ここで未分化な前駆細胞としては、たとえば神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）が挙げられる。

20

30

【0091】

<血管内皮細胞の分化誘導方法>

前述のようにして得られたiPS細胞から、血管内皮細胞を製造するため、次の工程：

(1) コーティング処理された培養皿上で霊長類ES/iPS細胞用培地を用いて接着培養する工程、

(2) 培地へ各種添加剤を加えて培養する工程、

(3) 無血清培地へ増殖因子を加えて培養する工程、

40

(4) VEGFR2陽性、TRA1陰性およびVE-cadherin陽性の細胞を分離する工程、および

(5) コーティング処理された培養皿上で血管内皮細胞用増殖培地を用いて接着培養する工程、

を含む分化誘導方法を用いることができる。

【0092】

本発明における血管内皮細胞は、好ましくは、VE-cadherin、CD31、CD34、eNOSなどの血管内皮細胞マーカーを発現し敷石状の外観を持つ細胞である。

【0093】

上記工程(1)の前に、iPS細胞は任意の方法で解離させることができる。ここで、解離の方法としては、力学的、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する解離溶液（例えば

50

、Accutase™ (Invitrogen) またはAccumax™ (Accumax) が挙げられる) またはコラゲナーゼ活性のみを有する分離液を用いてもよい。

【0094】

また、工程(1) および工程(5) におけるコーティング剤としては、例えば、マトリゲル(BD)、I型コラーゲン、IV型コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、またはエンタクチン、およびこれらの組み合わせが挙げられる。好ましくは、工程(1) ではI型コラーゲンであり、工程(5) では、IV型コラーゲンである。

【0095】

血管内皮細胞を製造するための培地は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えば、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)培地、 α MEM培地、Doulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、およびこれらの混合培地などが包含される。さらに、培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無血清でもよい。必要に応じて、例えば、アルブミン、トランスフェリン、Knockout Serum Replacement (KSR) (ES細胞培養時のFBSの代替物)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、Glutamax (Invitrogen)、非必須アミノ酸、ビタミン、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、N2サプリメント (Invitrogen)、B27サプリメント (Invitrogen)、GSK-3 α/β 阻害剤、およびVEGFなどの増殖因子等の物質を1つ以上含有しうる。これらの添加剤を予め含有した培地として、霊長類ES/iPS細胞用培地 (ReproCELL)、Stem Pro™ (Invitrogen)、血管内皮細胞用増殖培地 (Lonza) などが例示される。本発明の好ましい培地として、工程(1) では、霊長類ES/iPS細胞用培地、工程(2) では、N2サプリメント、B27サプリメントおよびGSK-3 α/β 阻害剤が添加された霊長類ES/iPS細胞用培地、工程(3) では、VEGFを含有したStem Pro™、および工程(5) では、血管内皮細胞用増殖培地が例示される。

【0096】

ここで、GSK-3 α/β 阻害剤として、SB216763、SB415286、FRAT1/FRAT2、Lithium、Kempallone、Alsterpaullone、Indiubin-3'-oxime、BIO、TDZD-8およびRo31-8220が例示される。

【0097】

培養温度は、以下に限定されないが、約30~40℃、好ましくは約37℃であり、CO₂含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO₂濃度は、好ましくは約2~5%である。培養時間は、特に限定されないが、例えば工程(1) は、1日から2日間であり、より好ましくは1日間であり、工程(2) は、2日から5日であり、より好ましくは3日間であり、工程(3) は、3日間から7日間であり、より好ましくは5日間であり、工程(5) は、3日以上である。

【0098】

VEGFR2陽性、TRA1陰性およびVE-cadherin陽性の細胞は、VEGFR2、TRA1およびVE-cadherinの抗体により染色した細胞からフローサイトメーター等を用いて、当業者に周知の方法により分離することができる。

【0099】

ここで、多発性嚢胞腎患者のうち脳動脈瘤併発者由来のiPS細胞から上述のように作製された血管内皮細胞は、多発性嚢胞腎を罹患していない健常者由来のiPS細胞から作製された血管内皮細胞と比較して、NTNG1、POSTN、TNC、KAL1およびBST1の発現量が低く、さらにACAT2、INSIG1およびSCDの発現量が高い。

【0100】

さらに、脳動脈瘤併発した多発性嚢胞腎患者由来のiPS細胞から上述のように作製された血管内皮細胞は、脳動脈瘤を併発していない多発性嚢胞腎患者由来のiPS細胞から作製された血管内皮細胞と比較して、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1およびTFPI2の

10

20

30

40

50

発現量が高い。

【0101】

＜血管周皮細胞の分化誘導方法＞

血管周皮細胞を製造するため、上述の血管内皮細胞の作製工程（1）から（3）と同様の工程およびその後の（4'）および（5'）の工程：

（1）コーティング処理された培養皿上で霊長類ES/iPS細胞用培地を用いて接着培養する工程、

（2）培地へ各種添加剤を加えて培養する工程、

（3）無血清培地へ増殖因子を加えて培養する工程、

（4'）VEGFR2陽性、TRA1陰性およびVE-cadherin陰性の細胞を分離する工程、および

（5'）コーティング処理された培養皿上で増殖因子を含有する培地を用いて接着培養する工程、

を含む分化誘導方法を用いることができる。

【0102】

本発明における血管周皮細胞は、周皮細胞または平滑筋細胞に関連する。本発明における血管周皮細胞は、好ましくは、 α 平滑筋アクチン、カルポニンなどの血管周皮細胞マーカーを発現し紡錘形を呈する細胞である。

【0103】

工程（5'）における培地は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えば、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEMまたはMEM)培地、 α MEM培地、Doulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、およびこれらの混合培地などが包含される。さらに、培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無血清でもよい。必要に応じて、例えば、アルブミン、トランスフェリン、Knockout Serum Replacement (KSR) (ES細胞培養時のFBSの代替物)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、Glutamax (Invitrogen)、非必須アミノ酸、ビタミン、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、N2サプリメント (Invitrogen)、B27サプリメント (Invitrogen)、GSK-3 α / β 阻害剤、およびPDGF-BBなどの増殖因子等の物質を1つ以上含有しうる。好ましい培地として、2% FCSおよびPDGF-BBを含有するMEMが例示される。

【0104】

培養温度は、以下に限定されないが、約30～40℃、好ましくは約37℃であり、CO₂含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO₂濃度は、好ましくは約2～5%である。培養時間は、特に限定されないが、例えば工程（5'）は、3日以上である。

【0105】

VEGFR2陽性、TRA1陰性およびVE-cadherin陰性細胞は、VEGFR2、TRA1およびVE-cadherinの抗体により染色した細胞からフローサイトメーター等を用いて、当業者に周知の方法により分離することができる。

【0106】

ここで、多発性嚢胞腎患者のうち脳動脈瘤併発者由来のiPS細胞から上述のように製造された血管周皮細胞は、多発性嚢胞腎を罹患していない健常者由来のiPS細胞と比較して、HSD3B1、KRT7、USP40およびSULT1E1の発現が低い。

【0107】

さらに、脳動脈瘤併発した多発性嚢胞腎患者由来のiPS細胞から上述のように作製された血管周皮細胞は、脳動脈瘤を併発していない多発性嚢胞腎患者由来のiPS細胞から作成された血管周皮細胞と比較して、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEの発現量が高い。

【0108】

＜スクリーニング方法＞

本発明は、多発性嚢胞腎または多発性嚢胞腎合併症の治療または予防に有用な薬剤である候補薬剤のスクリーニング方法を提供する。表1に記載の遺伝子の発現量を指標として用いるスクリーニング方法を通じて該治療剤または予防剤が同定され得る。表1（上記）に記載の遺伝子の発現量は、上述の疾患マーカーを利用して測定することが可能である。

【0109】

本発明において、多発性嚢胞腎の治療剤または予防剤のスクリーニング方法として、以下の工程を含み得る：

（A-1）候補物質を、多発性嚢胞腎患者由来のiPS細胞から分化誘導した体細胞と接触させる工程、

（B-1）NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、ACAT2、INSIG1、SCD、HSD3B1、KRT7、USP40、SULT1E1、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択された1以上もしくは全部の遺伝子の発現量もしくは転写活性を測定する工程、および

（C-1）候補物質と接触させなかった場合と比較して、NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、HSD3B1、KRT7、USP40およびSULT1E1から成る群より選択された1以上もしくは全部の前記発現量もしくは転写活性が増加した場合、前記候補物質を、多発性嚢胞腎の治療剤または予防剤として選別する工程、あるいは、ACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択された1以上もしくは全部の前記発現量もしくは転写活性が減少した場合、前記候補物質を、多発性嚢胞腎の治療剤または予防剤として選別する工程。

ここで、iPS細胞から分化誘導により得られる体細胞として、尿細管細胞、集合管細胞、胆管細胞、肝細胞、膵管細胞、膵臓細胞、腸管細胞、生殖細胞、血管内皮細胞または血管周皮細胞が例示され、好ましくは、血管内皮細胞または血管周皮細胞である。iPS細胞からの、尿細管細胞、集合管細胞、胆管細胞、肝細胞、膵管細胞、膵臓細胞、腸管細胞、生殖細胞、血管内皮細胞または血管周皮細胞の製造方法は、特に限定されないが、胚様体もしくは形成したテラトーマから適宜抽出することで得ることができる（例えば、特開2006-239169）。肝細胞は、特に限定されないが、WO2006/082890、特開2010-75631またはHay DC, et al, Proc Natl Acad Sci U S A, 105, 12301-6 2008に記載の方法で作製することができる。同様に、膵臓細胞は、WO2007/103282に記載の方法を用いて作製することができる。iPS細胞ならびに血管内皮細胞または血管周皮細胞は、前述の方法により製造することができる。

【0110】

好ましくは、多発性嚢胞腎の治療剤または予防剤のスクリーニング方法として、血管内皮細胞を用いる方法であり、以下の工程を含み得る：

（A-2）候補物質を、多発性嚢胞腎患者由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管内皮細胞と接触させる工程、

（B-2）NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、ACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1およびTFPI2から成る群より選択された遺伝子の発現量もしくは転写活性を測定する工程、および

（C-2）候補物質と接触させなかった場合と比較して、NTNG1、POSTN、TNC、KAL1およびBST1から成る群より選択された1以上もしくは全部の前記発現量もしくは転写活性が増加した場合、前記候補物質を、多発性嚢胞腎の治療剤または予防剤として選別する工程、あるいは、ACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1およびTFPI2から成る群より選択された1以上もしくは全部の前記発現量もしくは転写活性が減少した場合、前記候補物質を、多発性嚢胞腎の治療剤または予防剤として選別する工程。

【0111】

あるいは、血管周皮細胞を用いる方法として、以下の工程を含み得る：

(A-3) 候補物質を、多発性嚢胞腎患者由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管周皮細胞と接触させる工程、

(B-3) HSD3B1、KRT7、USP40、SULT1E1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択された1以上もしくは全部の遺伝子の発現量もしくは転写活性を測定する工程、および

(C-3) 候補物質と接触させなかった場合と比較して、HSD3B1、KRT7、USP40およびSULT1E1から成る群より選択された1以上もしくは全部の前記発現量もしくは転写活性が増加した場合、前記候補物質を、多発性嚢胞腎の治療剤または予防剤として選別する工程、あるいは、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択された1以上もしくは全部の前記発現量もしくは転写活性が減少した場合、前記候補物質を、多発性嚢胞腎の治療剤または予防剤として選別する工程。

10

【0112】

他の態様として、多発性嚢胞腎の合併症の治療剤または予防剤のスクリーニング方法として、以下の工程を含み得る：

(A-4) 候補物質を、多発性嚢胞腎の合併症患者由来のiPS細胞から分化誘導により得られた体細胞と接触させる工程、

(B-4) NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、ACAT2、INSIG1、SCD、HSD3B1、KRT7、USP40、SULT1E1、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択された1以上もしくは全部の遺伝子の発現量もしくは転写活性を測定する工程、および

20

(C-4) 候補物質と接触させなかった場合と比較して、NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、HSD3B1、KRT7、USP40およびSULT1E1から成る群より選択された1以上もしくは全部の前記発現量もしくは転写活性が増加した場合、前記候補物質を、多発性嚢胞腎の合併症の治療剤または予防剤と決定して選別する工程、あるいは、ACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択された1以上もしくは全部の前記発現量もしくは転写活性が減少した場合、前記候補物質を、多発性嚢胞腎の合併症の治療剤または予防剤として選別する工程。

30

【0113】

本発明において、多発性嚢胞腎の合併症として、例えば大動脈瘤、脳動脈瘤またはクモ膜下出血などの血管病変、心弁膜症、大腸憩室、ヘルニア、総胆管拡張症などの胆管病変、ならびに肝臓、膵臓、脾臓および生殖器における嚢胞形成が挙げられる。特に検出すべき合併症として脳動脈瘤が例示される。

【0114】

好ましくは、多発性嚢胞腎の合併症の治療剤または予防剤のスクリーニング方法として、血管内皮細胞を用いる方法であり、以下の工程を含み得る：

(A-5) 候補物質を、多発性嚢胞腎の合併症患者由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管内皮細胞と接触させる工程、

40

(B-5) NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、ACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1およびTFPI2から成る群より選択された1以上もしくは全部の遺伝子の発現量もしくは転写活性を測定する工程、および

(C-5) 候補物質と接触させなかった場合と比較して、NTNG1、POSTN、TNC、KAL1およびBST1から成る群より選択された1以上もしくは全部の前記発現量もしくは転写活性が増加した場合、前記候補物質を、多発性嚢胞腎に併発する合併症の治療剤または予防剤と決定して選別する工程、あるいは、ACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、M

50

MP1およびTFPI2から成る群より選択された1以上もしくは全部の前記発現量もしくは転写活性が減少した場合、前記候補物質を、多発性嚢胞腎に併発する合併症の治療剤または予防剤として選別する工程。

【0115】

より好ましくは、多発性嚢胞腎に併発する脳動脈瘤の治療剤または予防剤のスクリーニング方法として、血管内皮細胞を用いる方法であり、以下の工程を含み得る：

(A-6) 候補物質を、多発性嚢胞腎の合併症患者由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管内皮細胞と接触させる工程、

(B-6) BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1およびTFPI2から成る群より選択された1以上もしくは全部の遺伝子の発現量もしくは転写活性を測定する工程、および

(C-6) 候補物質と接触させなかった場合と比較して、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1およびTFPI2から成る群より選択された1以上もしくは全部の前記発現量もしくは転写活性が減少した場合、前記候補物質を、多発性嚢胞腎に併発する脳動脈瘤の治療剤または予防剤として選別する工程。

【0116】

あるいは、血管周皮細胞を用いる方法であり、以下の工程を含み得る：

(A-7) 候補物質を、多発性嚢胞腎の合併症患者由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管周皮細胞と接触させる工程；

(B-7) HSD3B1、KRT7、USP40、SULT1E1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択された1以上もしくは全部の遺伝子の発現量もしくは転写活性を測定する工程、および

(C-7) 候補物質と接触させなかった場合と比較して、HSD3B1、KRT7、USP40およびSULT1E1から成る群より選択された1以上もしくは全部の前記発現量もしくは転写活性が増加した場合、前記候補物質を、多発性嚢胞腎に併発する合併症の治療剤または予防剤として選別する工程、あるいは、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択された1以上もしくは全部の前記発現量もしくは転写活性が減少した場合、前記候補物質を、多発性嚢胞腎に併発する合併症の治療剤または予防剤として選別する工程。

【0117】

好ましくは、多発性嚢胞腎に併発する脳動脈瘤の治療剤または予防剤のスクリーニング方法として、血管周皮細胞を用いる方法であり、以下の工程を含み得る：

(A-8) 候補物質を、多発性嚢胞腎の合併症患者由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管周皮細胞と接触させる工程、

(B-8) MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択された1以上もしくは全部の遺伝子の発現量もしくは転写活性を測定する工程、および

(C-8) 候補物質と接触させなかった場合と比較して、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEから成る群より選択された1以上もしくは全部の前記発現量もしくは転写活性が減少した場合、前記候補物質を、多発性嚢胞腎に併発する合併症の治療剤または予防剤として選別する工程。

【0118】

ここで、前記発現量は前述の疾患マーカーを用いて検出することができ、前記転写活性は、当該遺伝子の転写調節領域により制御されるレポーター遺伝子を用いて検出することができる。詳細には、以下の工程を含み得る：

(A-9) 多発性嚢胞腎患者由来のiPS細胞から分化誘導により得られた体細胞と候補物質を接触させる工程であって、当該体細胞が、NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、ACAT2、INSIG1、SCD、HSD3B1、KRT7、USP40、SULT1E1、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1、TF

PI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEより選択される一つ又は複数の遺伝子の転写調節領域により制御されるレポーター遺伝子を含む工程、

(B-9) 当該レポーター遺伝子の発現又は活性を測定する工程、及び

(C-9) 遺伝子がNTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、HSD3B1、KRT7、USP40および/またはSULT1E1である場合、当該レポーター遺伝子の発現量又は活性レベルを、候補物質の非存在下での発現量と比較して増加させる、またはACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1および/またはSIAEである場合、該レポーター遺伝子の発現量を、候補物質の非存在下で検出される発現量と比較して減少させる候補物質を選択する工程。

10

【0119】

好ましくは、iPS細胞から分化誘導により得られた体細胞として血管内皮細胞を用いる方法であり、以下の工程を含み得る：

(A-10) 多発性嚢胞腎患者由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管内皮細胞と候補物質を接触させる工程であって、当該血管内皮細胞が、NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、ACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1およびTFPI2より選択される一つ又は複数の遺伝子の転写調節領域により制御されるレポーター遺伝子を含む工程、

(B-10) 該レポーター遺伝子の発現又は活性を測定する工程、及び

20

(C-10) 遺伝子がNTNG1、POSTN、TNC、KAL1および/またはBST1である場合、該レポーター遺伝子の発現量又は活性レベルを、候補物質の非存在下での発現量と比較して増加させる、またはACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1および/またはTFPI2である場合、該レポーター遺伝子の発現量を、候補物質の非存在下で検出される発現量と比較して減少させる候補物質を選択する工程。

【0120】

あるいは、血管周皮細胞を用いる方法であり、以下の工程を含み得る：

(A-11) 多発性嚢胞腎患者のiPS細胞から分化誘導した血管周皮細胞と候補物質を接触させる工程であって、当該血管周皮細胞が、HSD3B1、KRT7、USP40、SULT1E1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1および/またはSIAEより選択される一つ又は複数の遺伝子の転写調節領域により制御されるレポーター遺伝子を含む工程、

30

(B-11) 該レポーター遺伝子の発現又は活性を測定する工程、及び

(C-11) 遺伝子がHSD3B1、KRT7、USP40および/またはSULT1E1である場合は、該レポーター遺伝子の発現量又は活性レベルを、候補物質の非存在下での発現量と比較して増加させる候補物質を選択する工程、またはMMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1および/またはSIAEである場合、該レポーター遺伝子の発現量を、候補物質の非存在下で検出される発現量と比較して減少させる候補物質を選択する工程。

【0121】

他の態様において、多発性嚢胞腎の合併症の治療剤または予防剤のスクリーニング方法として、以下の工程を含み得る：

40

(A-12) 多発性嚢胞腎の合併症患者由来のiPS細胞から分化誘導した体細胞と候補物質を接触させる工程であって、当該体細胞が、NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、ACAT2、INSIG1、SCD、HSD3B1、KRT7、USP40、SULT1E1、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEより選択される一つ又は複数の遺伝子の転写調節領域により制御されるレポーター遺伝子を含む工程、

(B-12) 該レポーター遺伝子の発現又は活性を測定する工程、及び

(C-12) 遺伝子がNTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、HSD3B1、KRT7、USP40および/またはSULT1E1である場合は、該レポーター遺伝子の発現量又は活性レベルを、候補物質の非存在

50

下での発現量と比較して増加させる、またはACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1および/またはSIAEである場合は、該レポーター遺伝子の発現量を、候補物質の非存在下で検出される発現量と比較して減少させる候補物質を選択する工程。

【0122】

好ましくは、iPS細胞から分化誘導した体細胞として血管内皮細胞を用いる方法であり、以下の工程を含み得る：

(A-13) 多発性嚢胞腎の合併症患者由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管内皮細胞と候補物質を接触させる工程であって、該内皮細胞が、NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、ACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1およびTFPI2より選択される一つ又は複数の遺伝子の転写調節領域により制御されるレポーター遺伝子を含む工程、

10

(B-13) 該レポーター遺伝子の発現又は活性を測定する工程、及び

(C-13) 遺伝子がNTNG1、POSTN、TNC、KAL1および/またはBST1である場合は、該レポーター遺伝子の発現量又は活性レベルを、候補物質の非存在下での発現量と比較して増加させる、またはACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1および/またはTFPI2である場合は、該レポーター遺伝子の発現量を、候補物質の非存在下で検出される発現量と比較して減少させる候補物質を選択する工程。

20

【0123】

より好ましくは、iPS細胞から分化誘導した体細胞として血管内皮細胞を用いる方法であり、以下の工程を含み得る：

(A-14) 脳動脈瘤を併発する多発性嚢胞腎患者由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管内皮細胞と候補物質を接触させる工程であって、該内皮細胞が、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1およびTFPI2より選択される一つ又は複数の遺伝子の転写調節領域により制御されるレポーター遺伝子を含む工程、

(B-14) 該レポーター遺伝子の発現又は活性を測定する工程、及び

30

(C-14) 遺伝子がBMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1、および/またはTFPI2である場合は、該レポーター遺伝子の発現量を、候補物質の非存在下で検出される発現量と比較して減少させる候補物質を選択する工程。

【0124】

あるいは、血管周皮細胞を用いる方法であり、以下の工程を含み得る：

(A-15) 多発性嚢胞腎の合併症患者由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管周皮細胞と候補物質を接触させる工程であって、当該血管周皮細胞が、HSD3B1、KRT7、USP40、SULT1E1、MMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEより選択される一つ又は複数の遺伝子の転写調節領域により制御されるレポーター遺伝子を含む工程、

40

(B-15) 該レポーター遺伝子の発現又は活性を測定する工程、及び

(C-15) 遺伝子がHSD3B1、KRT7、USP40および/またはSULT1E1である場合は、該レポーター遺伝子の発現量又は活性レベルを、候補物質の非存在下での発現量と比較して増加させる候補物質を選択する工程、またはMMP1、TFPI2、HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1および/またはSIAEである場合は、該レポーター遺伝子の発現量を、候補物質の非存在下で検出される発現量と比較して減少させる候補物質を選択する工程。

【0125】

好ましくは、iPS細胞から分化誘導した体細胞として血管周皮細胞を用いる方法であり、以下の工程を含み得る：

50

(A-16) 脳動脈瘤を併発する多発性嚢胞腎患者由来のiPS細胞から分化誘導により得られた血管周皮細胞と候補物質を接触させる工程であって、該周皮細胞が、MMP1、TFPI2、HMG A2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1およびSIAEより選択される一つ又は複数の遺伝子の転写調節領域により制御されるレポーター遺伝子を含む工程、

(B-16) 該レポーター遺伝子の発現又は活性を測定する工程、及び

(C-16) 遺伝子がMMP1、TFPI2、HMG A2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1および/またはSIAEである場合は、該レポーター遺伝子の発現量を、候補物質の非存在下で検出される発現量と比較して減少させる候補物質を選択する工程。

【0126】

本発明において、表1（上記参照）に記載の遺伝子の転写調節領域は該遺伝子のヌクレオチド配列情報に基づきゲノムライブラリーから単離され得る。当該遺伝子の転写調節領域により制御されるレポーター遺伝子を含む細胞は、該転写調節領域配列へ機能的に連結したレポーター遺伝子配列を含有するベクターを細胞へ導入することによって作製され得る。この他の態様として、相同組換え法を用いて、当業者に周知の方法により該転写調節領域の下流へ機能的に連結するようにレポーター遺伝子配列を挿入してもよい。

【0127】

上述のベクターの導入ならびに相同組換え法は、体細胞、iPS細胞、血管内皮細胞および血管周皮細胞のいずれの態様において実施されてもよいが、相同組換え法は、iPS細胞において実施されることが望ましい。

【0128】

本発明において、適切なレポーター遺伝子は当技術分野で周知のレポーター遺伝子を用いることができ、特に限定されないが、緑色蛍光タンパク質(GFP)、黄色蛍光タンパク質(YFP)、赤色蛍光タンパク質(RFP)、ルシフェラーゼ、βグルクロニダーゼ(GUS)、β-ガラクトシダーゼ、HRPまたはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼなどを用いることができる。

【0129】

本発明のスクリーニング方法においては、任意の候補物質を用いることができ、非限定的に、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、微生物発酵産物、海洋生物由来の抽出物、植物抽出物、精製タンパク質又は粗タンパク質、ペプチド、非ペプチド化合物、合成低分子化合物、及び天然化合物が例示される。

【0130】

本発明において、候補物質はまた、(1) 生物学的ライブラリー、(2) デコンヴォリューションを用いる合成ライブラリー法、(3) 「1ビーズ1化合物(one-bead one-compound)」ライブラリー法、及び(4) アフィニティクロマトグラフィー選別を使用する合成ライブラリー法を含む当技術分野で公知のコンビナトリアルライブラリー法における多くのアプローチのいずれかを使用して得ることができる。アフィニティクロマトグラフィー選別を使用する生物学的ライブラリー法はペプチドライブラリーに限定されるが、その他の4つのアプローチはペプチド、非ペプチドオリゴマー、又は化合物の低分子化合物ライブラリーに適用できる(Lam (1997) Anticancer Drug Des. 12: 145-67)。分子ライブラリーの合成方法の例は、当技術分野において見出され得る(DeWitt et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6909-13; Erb et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11422-6; Zuckermann et al. (1994) J. Med. Chem. 37: 2678-85; Cho et al. (1993) Science 261: 1303-5; Carell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059; Carell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061; Gallop et al. (1994) J. Med. Chem. 37: 1233-51)。化合物ライブラリーは、溶液(Houghten (1992) Bio/Techniques 13: 412-21を参照のこと)又はビーズ(Lam (1991) Nature 354: 82-4)、チップ(Fodor (1993) Nature 364: 555-6)、細菌(米国特許第5,223,409号)、孢子(米国特許第5,571,698号、同第5,403,484号、及び同第5,223,409号)、プラスミド(Cull et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865-9)若しくはファージ(Scott and Smith (1990) Science 249: 386-90; Devlin (1990) Science 249: 404-6; Cwirla et al. (19

10

20

30

40

50

90) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6378-82; Felici (1991) J. Mol. Biol. 222: 301-10; 米国特許出願第2002103360号)として作製され得る。

【0131】

<アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAもしくはshRNAおよびこれらを用いた治療剤>

本発明におけるアンチセンスオリゴヌクレオチドには、ACAT2、INSIG1、SCD、BMP6、CD274、CTGF、E2F7、EDN1、FAM43A、FRMD3、MMP10、MYEOV、NR2F1、NRCAM、PCSK1、PLXNA2、SLC30A3、SNAI1、SPOCD1、MMP1、TFPI2 HMGA2、KRTAP4-7、KRTAP4-8、KRTAP4-9、MYPN、RPPH1またはSIAEの塩基配列内の部位にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドが含まれる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは配列番号：11、13、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93または94の塩基配列の少なくとも15連続ヌクレオチド（たとえば20～200連続ヌクレオチド）からなる塩基配列に相補的な塩基配列を有する。上記の少なくとも15連続ヌクレオチドにおいて開始コドンを含む上記のアンチセンスオリゴヌクレオチドが、さらにより好ましい。

10

【0132】

アンチセンスオリゴヌクレオチドの誘導体または修飾産物は、アンチセンスオリゴヌクレオチドとして用いることができる。そのような修飾産物の例には、メチル-ホスホネート型またはエチル-ホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾、ホスホロチオエート修飾、およびホスホロアミデート修飾が含まれる。

20

【0133】

本発明における、siRNAもしくはshRNAのヌクレオチド配列は、www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.htmlから入手可能なsiRNA設計用コンピュータプログラムを用いて設計され得る。このコンピュータプログラムは、以下のプロトコールに基づいてsiRNAもしくはshRNA合成用ヌクレオチド配列を選択する。

【0134】

siRNAもしくはshRNAの標的部位の選択は、次のように行うことができる。

(1)ACAT2（配列番号：45）、INSIG1（配列番号：11）、SCD（配列番号：13）、BMP6（配列番号：47）、CD274（配列番号：49）、CTGF（配列番号：51）、E2F7（配列番号：53）、EDN1（配列番号：55）、FAM43A（配列番号：57）、FRMD3（配列番号：59）、MMP10（配列番号：61）、MYEOV（配列番号：63）、NR2F1（配列番号：65）、NRCAM（配列番号：67）、PCSK1（配列番号：69）、PLXNA2（配列番号：71）、SLC30A3（配列番号：73）、SNAI1（配列番号：75）、SPOCD1（配列番号：77）、MMP1（配列番号：79）、TFPI2（配列番号：81）、HMGA2（配列番号：83）、KRTAP4-7（配列番号：85）、KRTAP4-8（配列番号：87）、KRTAP4-9（配列番号：89）、MYPN（配列番号：91）、RPPH1（配列番号：93）またはSIAE（配列番号：94）のAUG開始コドンを出発点として、その下流部をAAジヌクレオチド配列についてスキャンする。有用なsiRNAもしくはshRNA標的部位として各AAの出現する部位及び3'側に隣接する19塩基を候補配列とする。Tuschl, et al. (1999) Genes Dev 13: 3191-7に従うと、5'側及び3'側の非翻訳領域（UTR）並びに開始コドン付近の領域（75塩基内）に対するsiRNAもしくはshRNAの設計は、UTR結合タンパク質及び/又は翻訳開始複合体が、siRNAエンドヌクレアーゼ複合体の結合と干渉するため推奨されていない。

30

40

【0135】

(2) 標的部位とヒトゲノムデータベースとを比較し、他のコード配列と有意な配列同一性を有するあらゆる標的配列を除外する。配列同一性調査は、NCBIサーバ、ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/において見出され得るBLAST (Altschul SF, et al, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-402または (1990) J Mol Biol. 215(3):403-10)を用いて実行され得る。

【0136】

(3) 合成に適した標的配列を選択する。

このように選択されたsiRNAの標的部位から成るセンス鎖は、対応するアンチセンス鎖

50

とハイブリダイゼーションにより二重鎖RNAを形成し得る。他の態様として、該センス鎖とそれに対応するアンチセンス鎖とをループ配列を介して成る一本鎖RNA、すなわちshRNA、においては、ヘアピンループ構造を形成し得る。このような二重鎖RNAは、10塩基につき1塩基（もしくは1塩基未満）の不一致（ミスマッチ）を含んでも良い。好ましくは、二重鎖複合体の鎖は完全に相補的であり、不一致を含まない。上述のセンス鎖の核酸の一つ又は複数を含むベクター及びそのベクターを含む細胞もまた、本発明に包含される。

【0137】

siRNA組成物として、RNAポリメラーゼIII転写ユニット、例えば、核内低分子RNA (snRNA) U6プロモーター、またはヒトH1 RNAプロモーターによって転写され得るようセンス鎖、アンチセンス鎖、またはいずれも含有するヘアピンループ構造を含むよう連結させた配列 (shRNA) を含有するベクターを用いてもよく、または二重鎖RNAそのものを用いてもよい。

10

【0138】

二重鎖RNAは、インビボでのヌクレアーゼによる分解を防止するために化学的に安定化され得る。化学的に安定化されたRNA分子の調製方法は、当技術分野で周知である。典型的には、このような分子は、リボヌクレアーゼの作用を妨げるよう修飾された骨格及びヌクレオチドを含む。他の修飾として、例えば、コレステロール結合siRNAが例示される (Song et al, (2003) Nature Med. 9:347-51)。siRNA組成物もしくはshRNA組成物にはまた、リボソーム（例えば、カチオン性リボソーム又はアニオン性リボソーム）、ナノ粒子、またはレトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルスを含むウイルスベクターなどが含有されてもよい。さらに、siRNA組成物もしくはshRNA組成物は、例えば、生理学的食塩水などの薬学的に許容される担体を含有してもよい。

20

【0139】

上述のsiRNA組成物もしくはshRNA組成物は、多発性嚢胞腎または多発性嚢胞腎の合併症の治療のため、静脈内、皮下、筋肉内、及び腹腔内送達経路などの非経口投与により用いられ得る。好ましくは、患部への直接注入である。

【0140】

アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNAもしくはshRNAの用量は、体重、年齢、性別、投与時間および投与経路、症状、ならびに同時に投与される他の薬物などの多くの要因に依存する。静脈内投与のための上記薬剤の用量は、およそ $10^6 \sim 10^{22}$ コピーであることが望ましい。

30

【実施例】

【0141】

本発明を以下の実施例でさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はそれら実施例に限定されないものとする。

【0142】

[実施例1]

<iPS細胞株の樹立>

<線維芽細胞>

4名の脳動脈瘤合併多発性嚢胞腎患者および3名の脳動脈瘤合併なしの多発性嚢胞腎患者から同意のもとに生検した皮膚を培養して樹立した線維芽細胞を、それぞれPK-ane線維芽細胞およびPK-free線維芽細胞と命名し、本実施例に用いた。一方、3名の多発性嚢胞腎および脳動脈瘤を発症していない健常人の線維芽細胞株をnonPK線維芽細胞と命名し、本実施例に用いた。

40

【0143】

<iPS細胞誘導>

Oct3/4、Sox2、Klf4およびc-Mycに対するヒトcDNAを、Takahashi, K. et al., Cell, 131(5), 861, 2007に記載の方法に従って、レトロウイルスを用いて前記線維芽細胞へ導入した。同様に、Oct3/4、Sox2およびKlf4に対するヒトcDNAを、Nakagawa, M. et al., Nat Biotechnol 26 (1), 101, 2008に記載の方法に従って、レトロウイルスを用いて前記線

50

維芽細胞へ導入した。遺伝子導入後、線維芽細胞をSNLフィーダー細胞上に移し、翌日に4 ng/mlのbFGF (Wako) を添加した霊長類ES細胞用培養液へ培地を交換した。出現したコロニーをピックアップして、各線維芽細胞につき1つのiPS細胞株を選択した。選択したPK-ane線維芽細胞由来iPS細胞株をPK-ane-iPS1、PK-ane-iPS2、PK-ane-iPS3およびPK-ane-iPS4と命名し、PK-free線維芽細胞由来iPS細胞株をPK-free-iPS1、PK-free-iPS2およびPK-free-iPS3と命名し、ならびにnonPK線維芽細胞由来iPS細胞株をnonPK-iPS1、nonPK-iPS2およびnonPK-iPS3と命名した。ここで、PK-ane-iPS1、PK-ane-iPS2、PK-ane-iPS4、PK-free-iPS2、PK-free-iPS3、nonPK-iPS2およびnonPK-iPS3は、4因子 (Oct3/4、Sox2、Klf4およびc-Myc) の導入により作製され、PK-ane-iPS3、PK-free-iPS1およびnonPK-iPS1は、3因子 (Oct3/4、Sox2およびKlf4) の導入により作製された。

10

【0144】

[実施例2]

<血管内皮細胞への分化誘導>

上記のように作製した各iPS細胞株コロニーを適度なサイズに分離し、I型コラーゲンコーティングディッシュ (Becton Dickinson) 上に散布し、霊長類ES/iPS細胞用培地 (ReproCELL) で1日間培養しディッシュ面に接着させた。2日目にGSK-3 α / β インヒビター (Sigma)、N2サプリメント、B27サプリメント (Invitrogen) を添加しさらに3日間培養した。そして、培地をヒト造血幹細胞用無血清培地 (Invitrogen) に変更し、50ng/ml VEGF (Peprotec Inc) を添加しさらに5日間培養した後、細胞を解離し、VEGFR2陽性、TRA1陰性およびVE-カドヘリン陽性細胞をFACSにより分離した。続いて、分離した細胞をIV型コ

20

【0145】

[実施例3]

<血管周皮細胞への分化誘導>

上記のように作製した各iPS細胞株コロニーを適度なサイズに分離し、I型コラーゲンコーティングディッシュ (Becton Dickinson) 上に散布し、霊長類ES/iPS細胞用培地 (ReproCELL) で1日間培養しディッシュ面に接着させた。2日目にGSK-3 α / β インヒビター (Sigma)、N2サプリメント、B27サプリメント (Invitrogen) を添加しさらに3日間培養した。そして、培地をヒト造血幹細胞用無血清培地 (Invitrogen) に変更しさらに5日間培養した後、細胞を解離し、VEGFR2陽性、TRA1陰性およびVE-カドヘリン陰性細胞をFACSにより分離した。続いて、分離した細胞をIV型コラーゲンコーティングディッシュ (Becton Dickinson) に散布しさらに2% FCSおよび20ng/ml PDGF-BB (Peprotech Inc) を含有するMEM中で培養し、 α 平滑筋アクチン、カルボニン等の血管周皮細胞マーカーを発現し紡錐形を呈する血管周皮細胞 (MC) に分化誘導し回収した。各iPS細胞株から作製したMC細胞

30

40

【0146】

[実施例4]

<各遺伝子発現確認>

実施例2で得られたPK-ane-iPS1-EC、PK-ane-iPS2-EC、PK-ane-iPS3-EC、nonPK-iPS1-EC、nonPK-iPS2-ECおよびnonPK-iPS3-ECにおける、NTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1、INSIG1、SCDおよびACAT2の発現量を表2に記載のプライマーを用いてRT-PCRにより測定し、PK-iPS細胞由来のECの各遺伝子の発現量をnonPK-iPS細胞由来のECと比較したところ、PK-ane-iPS細胞由来のECにおいてNTNG1、POSTN、TNC、KAL1、BST1の発現量が低いこと、ならびに

50

INSIG1、SCDおよびACAT2の発現量が高いことを確認した（図1）。同様に、実施例3で得られたPK-ane-iPS1-MC、PK-ane-iPS2-MC、PK-ane-iPS3-MC、nonPK-iPS1-MC、nonPK-iPS2-MCおよびnonPK-iPS3-MCにおける、HSD3B1、KRT7、USP40およびSULT1E1の発現量を表2に記載のプライマーを用いてRT-PCRにより測定し、PK-iPS細胞由来のMCの各遺伝子の発現量をnonPK-iPS細胞由来のMCと比較したところ、PK-iPS細胞由来のMCにおいてHSD3B1、KRT7、USP40およびSULT1E1の発現量が低いことを確認した（図2）。

【0147】

続いて、実施例2で得られたPK-ane-iPS1-EC、PK-ane-iPS2-EC、PK-ane-iPS3-EC、PK-ane-iPS4-EC、PK-free-iPS1-EC、PK-free-iPS2-ECおよびPK-free-iPS3-ECから抽出したRNAについてAffymetrix社のマイクロアレイを用いて各遺伝子発現強度を測定し、脳動脈瘤合併あり群と脳動脈瘤合併なし群を各クローンの組み合わせ12通りを全て比較し、全ての脳動脈瘤合併あり群において発現が高かった遺伝子群を表3に示す。また、前記12通り中の1例についてPK-ane-iPS1-ECおよびPK-free-iPS1-ECでの発現比を表3に示す。

【0148】

【表3】

脳動脈瘤合併 PKD 被験者の線維芽細胞由来の iPS 細胞の分化誘導により得られた血管内皮細胞で発現量が高い遺伝子群

遺伝子名	変化倍率 (PK-ane-iPS1-EC/PK-free-iPS1-EC)
SPOCD1	2.4045105
PLXNA2	2.0494196
MYEOV	2.5981545
MMP10	1.7859154
MMP1	8.141003
E2F7	3.2456584
SLC30A3	2.6372058
SNAI1	2.5232387
FAM43A	1.5843235
NR2F1	1.7354009
PCSK1	3.1585443
BMP6	2.5192003
EDN1	3.805765
CTGF	2.8271823
TFPI2	1.6620069
NRCAM	3.4262772
CD274	1.5687742
FRMD3	3.1186438

【0149】

同様に、実施例3で得られたPK-ane-iPS1-MC、PK-ane-iPS2-MC、PK-ane-iPS3-MC、PK-ane-iPS4-MC、PK-free-iPS1-MC、PK-free-iPS2-MCおよびPK-free-iPS3-MCから抽出したRNAについてAffymetrix社のマイクロアレイを用いて各遺伝子発現強度を測定し、脳動脈瘤合併あり群と脳動脈瘤合併なし群を各クローンの組み合わせ12通りを全て比較し、全ての脳動脈瘤合併あり群において発現量が高かった遺伝子群を表4に示す。また、前記12通り中の1例についてPK-ane-iPS1-MCおよびPK-free-iPS2-MCでの発現量の比を表4に示す。

【0150】

【表 4】

脳動脈瘤合併 PKD 被験者の線維芽細胞由来の iPS 細胞の分化誘導により得られた血管周皮細胞で発現量が高い遺伝子群

遺伝子名	変化倍率 (PK-ane-iPS1-MC/PK-free-iPS2-MC)
MYPN	1.3425403
SIAE	2.1190434
MMP1	4.1157513
HMGA2	1.9827896
RPPH1	3.5703707
KRTAP4-7 KRTAP4-9 KRTAP4-8	2.1406236
TFPI2	13.641734

10

【0151】

さらに、実施例2又は実施例3で得られたPK-ane-iPS1及びPK-free-iPS3から誘導された内皮(EC)又は周皮細胞(MC)中のCD274、CTGF、MMP10、NRCAM及びMMP1の発現量を、表2に記載のプライマーを使用した定量PCRで測定した。その結果、脳動脈瘤がある場合のiPS細胞から誘導されたEC又はMC中の表示の遺伝子の発現量は、脳動脈瘤のない場合のものと比べてかなり高いという結果になり、一方、脳動脈瘤がある場合及び脳動脈瘤がない場合の未分化細胞での発現量の間には差がなかった(図3)。これらの結果は上記に対応している。

20

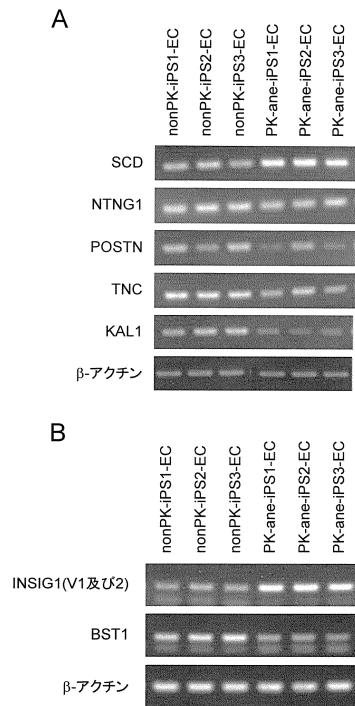
【産業上の利用可能性】

【0152】

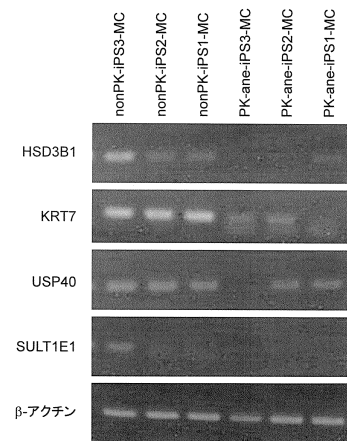
本発明により、常染色体優性多発性嚢胞腎または常染色体優性多発性嚢胞腎合併症の検査方法、ならびにその治療薬のスクリーニングを行うことが可能になり、したがって医療上大変有用である。

30

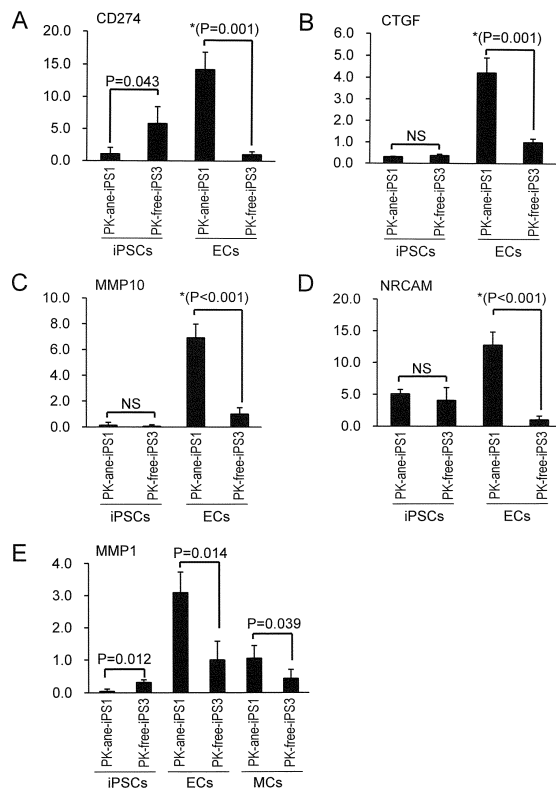
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【配列表】

0006021021000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	31/7088 (2006.01)	A 6 1 K	31/7105
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	A 6 1 P	13/12
		C 1 2 N	15/00 A

(72)発明者 塩田 文彦
京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内

(72)発明者 中尾 一和
京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内

(72)発明者 曾根 正勝
京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内

(72)発明者 田浦 大輔
京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 特開2006-288265 (JP, A)
特表2001-520502 (JP, A)
特開2004-313194 (JP, A)
日本腎臓学会誌, 2010年 5月, Vol.52, No.3, p.302, #02-04-27
日本手術看護学会誌, 2010年 8月, Vol.6, No.2, p.142
日本再生医療学会雑誌, 2009年, Vol.8, No.3, pp.38-42
Kidney International, 2003年, Vol.64, pp.1381-1388
脳神経, 1987年, Vol.39, No.10, pp.909-913
生体医工学, 2006年, Vol.44, No.3, pp.410-415
日本再生医療学会雑誌, 2009年, Vol.8, No.1, pp.28-33, 6
Circulation, 2008年, Vol.118, pp.498-506
Nature, 2000年, Vol.408, No.2, pp.92-96
厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)分担研究報告書, 2010年12月, Vol. H21st, p.27-28
医学のあゆみ, 2011年 3月, Vol.236, No.13, pp.1191-1192
Circulation Research, 2009年, Vol.104, pp.860-869, Supplement Material

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 Q 1/00- 3/00
C 1 2 N 15/00-15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)
CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)
PubMed