

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6621195号
(P6621195)

(45) 発行日 令和1年12月18日(2019.12.18)

(24) 登録日 令和1年11月29日(2019.11.29)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 Q 1/6883 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6883	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	M
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50	Z

請求項の数 10 (全 35 頁)

(21) 出願番号	特願2015-143442 (P2015-143442)	(73) 特許権者	504132272
(22) 出願日	平成27年7月17日(2015.7.17)		国立大学法人京都大学
(65) 公開番号	特開2017-23025 (P2017-23025A)		京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(43) 公開日	平成29年2月2日(2017.2.2)	(74) 代理人	100091096
審査請求日	平成30年7月4日(2018.7.4)		弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100144794
			弁理士 大木 信人
		(72) 発明者	長船 健二
			京都府京都市左京区吉田本町36番地1
			国立大学法人京都大学内
		(72) 発明者	天久 朝廷
			京都府京都市左京区吉田本町36番地1
			国立大学法人京都大学内

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】

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支援する方法であって、以下の工程：

(a) 被験者由来の試料から、表1または表3に記載の遺伝子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(C P C S K 1を除く)の発現量を測定する工程；および

(b) 前記発現量が、対照試料における該遺伝子の発現量と比較して高い場合、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、と判定する工程、を含む方法。

【請求項2】

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) 被験者由来の試料から、表2または表4に記載の遺伝子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

(b) 前記発現量が、対照試料における該遺伝子の発現量と比較して減少する場合、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、と判定する工程、

を含む方法。

【請求項3】

前記被験者由来の試料が血液、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、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記被験者由来の試料が、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であり、工程(a)における遺伝子が表1に記載の遺伝子から成る群より選択される前記遺伝子である、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記被験者由来の試料が、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であり、工程(a)における遺伝子が表2に記載の遺伝子から成る群より選択される遺伝子である、請求項2に記載の方法。 10

【請求項6】

前記被験者由来の試料が、被験者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導した血管平滑筋細胞であり、工程(a)における遺伝子が表3に記載の遺伝子から成る群より選択される遺伝子である、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記被験者由来の試料が、被験者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導した血管平滑筋細胞であり、工程(a)における遺伝子が表4に記載の遺伝子から成る群より選択される遺伝子である、請求項2に記載の方法。

【請求項8】 20

以下の工程：

(a) 候補物質を、多発性嚢胞腎患者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導した血管内皮細胞と接触させる工程、

(b) 表1および表2に記載の遺伝子から成る群より選択された1もしくは2以上から全部の遺伝子(PCSK1を除く)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、表1から成る群より選択された1もしくは2以上から全部の遺伝子(PCSK1を除く)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判定する工程、あるいは、表2から成る群より選択された1もしくは2以上から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、 30

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。

【請求項9】

以下の工程：

(a) 候補物質を、多発性嚢胞腎患者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導した血管平滑筋細胞と接触させる工程、

(b) 表3および表4に記載の遺伝子から成る群より選択された1もしくは2以上から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、表3から成る群より選択された1もしくは2以上から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判定する工程、あるいは、表4から成る群より選択された1もしくは2以上から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、 40

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。

【請求項10】

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、請求項8または請求項9に記載のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】 50

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。

【背景技術】

【0002】

多発性嚢胞腎(Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (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。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。

10

【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1-3)。しかし当該遺伝子をコードする配列は、大変大きくその変異を特定することは容易ではない。

【0004】

そこで、多発性嚢胞腎を早期に検出する方法が所望されており、GLIS3遺伝子の発現が減少することを指標とした診断方法の報告もある(特許文献4)。さらに、多発性嚢胞腎の患者から採取した細胞を用いて樹立したiPS細胞を血管内皮細胞または血管平滑筋細胞へ誘導し、多発性嚢胞腎のマーカーとなる遺伝子を見出している(特許文献5)。

20

【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

【特許文献5】W02012/060109

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0006】

本発明は、被験者の試料から疾患マーカーを比較して、多発性嚢胞腎を検査(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。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、所定の一又は複数の遺伝子の発現上昇(増加)、または所定の一又は複数の遺伝子の発現下降(減少)の有無やその程度を指標にして、多発性嚢胞腎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できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

40

【0009】

すなわち、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) 被験者由来の試料から、表1または表3に記載の遺伝子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

50

(b) 前記発現量が、対照試料における該遺伝子の発現量と比較して高い場合、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、と判定する工程、を含む方法。

[2] 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) 被験者由来の試料から、表 2 または表 4 に記載の遺伝子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

(b) 前記発現量が、対照試料における該遺伝子の発現量と比較して高い場合、該被験者が多発性嚢胞腎を発症していない、または発症するリスクを有していない、と判定する工程、

を含む方法。

[3] 前記被験者由来の試料が血液、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] または [2] の方法。

[4] 前記被験者由来の試料が、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であり、工程 (a) における遺伝子が表 1 に記載の遺伝子から成る群より選択される遺伝子である、[1] の方法。

[5] 前記被験者由来の試料が、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であり、工程 (a) における遺伝子が表 2 に記載の遺伝子から成る群より選択される遺伝子である、[2] の方法。

[6] 前記被験者由来の試料が、被験者の体細胞由来の iPS 細胞から分化誘導した血管平滑筋細胞であり、工程 (a) における遺伝子が表 3 に記載の遺伝子から成る群より選択される遺伝子である、[1] の方法。

[7] 前記被験者由来の試料が、被験者の体細胞由来の iPS 細胞から分化誘導した血管平滑筋細胞であり、工程 (a) における遺伝子が表 4 に記載の遺伝子から成る群より選択される遺伝子である、[2] の方法。

[8] 以下の工程：

(a) 候補物質を、多発性嚢胞腎患者の体細胞由来の iPS 細胞から分化誘導した血管内皮細胞と接触させる工程、

(b) 表 1 および表 2 に記載の遺伝子から成る群より選択された 1 もしくは 2 以上から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、表 1 から成る群より選択された 1 もしくは 2 以上から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判定する工程、あるいは、表 2 から成る群より選択された 1 もしくは 2 以上から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、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。

[9] 以下の工程：

(a) 候補物質を、多発性嚢胞腎患者の体細胞由来の iPS 細胞から分化誘導した血管平滑筋細胞と接触させる工程、

(b) 表 3 および表 4 に記載の遺伝子から成る群より選択された 1 もしくは 2 以上から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、表 3 から成る群より選択された 1 もしくは 2 以上から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判定する工程、あるいは、表 4 から成る群より選択された 1 もしくは 2 以上から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、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。

[10] 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、[8] または [9] のスクリーニング方法。

10

20

30

40

50

【発明の効果】

【0010】

本発明の方法により、多発性嚢胞腎を検査すること、および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ができる。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明は、対照試料と比較して、表1および表3に記載の少なくとも1種の遺伝子の発現上昇（増加）、または表2および表4に記載の少なくとも1種の遺伝子の発現下降（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）し、それを指標とすることによって多発性嚢胞腎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。

【0012】

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/下降の有無またはその程度を測定（定性および/または定量的測定）し、それを指標とすることによって、被験者について多発性嚢胞腎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。このような疾患マーカーとして、ポリヌクレオチドまたは抗体から成る検出試薬が例示される。

【0013】

<疾患マーカーとしてのポリヌクレオチド>

本発明は、多発性嚢胞腎の疾患マーカーとして、表1、表2、表3および表4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を提供する。当該遺伝子の塩基配列のORF配列は、NCBIのAccession番号より容易に入手できる。

【0014】

ここで相補的なポリヌクレオチド（相補鎖、逆鎖）とは、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 and 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(T_m)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、並びに当該鎖と少なくとも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。

【0015】

また、正鎖側のポリヌクレオチドには、当該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。

【0016】

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

本鎖の形態で疾患マーカーとして使用されても、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。

【0017】

以上より、本発明の多発性嚢胞腎の疾患マーカーは、表1、表2、表3および表4に記載される遺伝子の塩基配列のORF配列からなるポリヌクレオチドであってもよいし、その相補配列からなるポリヌクレオチドであってもよい。また、当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。

10

【0018】

なお、ここで「選択的に（もしくは、特異的に）認識する」とは、例えばノーザンプロット法またはマイクロアレイ法を用いる場合には、表1、表2、表3および表4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、表2、表3および表4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プロット法またはマイクロアレイ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、表2、表3および表4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に由来すると判断できるものであればよい。

20

【0019】

そのような本発明の疾患マーカーは、当該遺伝子の塩基配列をもとに、例えばprimer 3 (<http://primer3.ut.ee/>) 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。

【0020】

具体的には、表1、表2、表3および表4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当該配列の一部を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。

30

【0021】

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。

【0022】

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、または当該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。

40

【0023】

上記疾患マーカーを、多発性嚢胞腎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の塩基長を有するものが例示できる。

【0024】

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

50

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。

【0025】

本発明の疾患マーカーは、ノーザンブロット法、マイクロアレイ法、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。

【0026】

<疾患マーカーとしての抗体>

本発明はまた、多発性嚢胞腎の疾患マーカーとして表1、表2、表3および表4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。

【0027】

本発明の抗体は、その形態に特に制限はなく、表1、表2、表3および表4に記載のタンパク質またはその一部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。また、抗体は、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。タンパク質の一部とは、当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でも良い。

【0028】

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)。

【0029】

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、表2、表3および表4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。非ヒト動物に免疫において、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っても良い。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-ゲラン桿菌)やコリネバクテリウム-パルヴムなどのヒトアジュバントなどがある。

【0030】

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)。

【0031】

また、抗体の作製に使用されるタンパク質は、表1、表2、表3および表4に記載の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、表1、表2、表3および表4に記載の遺伝

子がコードす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。

【0032】

なお、本発明の表1、表2、表3および表4に記載の遺伝子がコードするタンパク質には、その相同物も包含される。該相同物としては、当該遺伝子がコードする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、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。

【0033】

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。

【0034】

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。

【0035】

表1、表2、表3および表4に記載の遺伝子がコードするタンパク質に対する本発明の抗体はそれぞれ表1、表2、表3および表4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、多発性嚢胞腎を検査（検出または診断）するために有用である。

【0036】

<多発性嚢胞腎の検査方法>

本発明は、多発性嚢胞腎の検査方法として、次の(a1)および(b1)の工程を含む方法を提供する：

(a1)被験者由来の試料から、表1または表3に記載の遺伝子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

20

30

40

50

(b 1) 前記発現量が、対照試料における発現量と比較して高い場合、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、と判定する工程。

【0037】

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

(a 2) 被験者由来の試料から、表2または表4に記載の遺伝子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

(b 2) 前記発現量が、対照試料における発現量と比較して高い場合、該被験者が多発性嚢胞腎を発症していない、または発症するリスクを有していない、と判定する工程。

【0038】

本明細書で使用される「対照試料」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由来の試料であることが好ましい。本発明において、健常者とは、少なくとも多発性嚢胞腎を罹患していない者を意味し、他の疾患や感染症等の罹患については、特に限定されない。健常者由来の試料は、被験者由来の試料と同様に調製することができる。「対照試料における発現量」は、被験者由来の試料と同様の工程で得られる所定の遺伝子の発現量の測定結果を意味する。

【0039】

本発明において、発現量が「高い」とは、例えば、対照と比較して当該発現量が高いことを意味し、例えば、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、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発症の有無、または発症するリスクの有無を認定することができる。

【0040】

本発明において、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、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平滑筋細胞が例示される。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平滑筋細胞の製造方法は、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。さらに、iPS細胞ならびに血管内皮細胞または血管平滑筋細胞は、後述の方法により製造することができる。

【0041】

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、本発明は、多発性嚢胞腎の検査方法として、次の(a 3)および(b 3)の工程を含む方法を提供する：

(a 3) 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において、表1に記載の遺伝子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

(b 3) 前記発現量が、対照試料における発現量と比較して高い場合、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、と判定する工程。

【0042】

同様に、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：

(a 4) 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において、表2に記載の遺伝子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

10

20

30

40

50

する工程、および

(b 4) 前記発現量が、対照試料における発現量と比較して高い場合、該被験者が多発性嚢胞腎を発症していない、または発症するリスクを有していない、と判定する工程。

【 0 0 4 3 】

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平滑筋細胞を用いた場合、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) 被験者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導した血管平滑筋細胞において、表3に記載の遺伝子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

(b 5) 前記発現量が、対照試料における発現量と比較して高い場合、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、と判定する工程。

【 0 0 4 4 】

同様に、多発性嚢胞腎の検査方法として、次の(a 6)および(b 6)の工程を含む方法を提供する：

(a 6) 被験者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導した血管平滑筋細胞において、表4に記載の遺伝子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

(b 6) 前記発現量が、対照試料における発現量と比較して高い場合、該被験者が多発性嚢胞腎を発症していない、または発症するリスクを有していない、と判定する工程。

【 0 0 4 5 】

本発明において、遺伝子の発現量の測定は、上述したポリヌクレオチドまたは抗体から成る疾患マーカーを用いて行うことができる。

【 0 0 4 6 】

疾患マーカーとしてのポリヌクレオチドを用いる場合、試料は、被験者から単離された細胞またはiPS細胞から分化誘導された体細胞であることが望ましい。

【 0 0 4 7 】

測定対象物としてmRNA、ノンコーディングRNAまたはそれから調製されるポリヌクレオチド(例えば、cDNA、crRNAなど)を利用する場合、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、ノンコーディングRNAまたはそれ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被験者の試料由来の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。

【 0 0 4 8 】

工程(ii)における測定は、前述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、マイクロアレイ法、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。

【 0 0 4 9 】

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³²P、³³P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

10

20

30

40

50

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。

【0050】

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、被験者の試料から調製されたRNA等から常法に従って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。

【0051】

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、二本鎖DNAを一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、一本鎖の鋳型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、二本鎖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。

【0052】

さらにまた、マイクロアレイを利用する場合は、本発明の上記疾患マーカーをDNAプローブ(一本鎖または二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レベルを検出または測定することができるDNAチップとしては、Affymetrix社のGene Chipを挙げることができる。

【0053】

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としての抗体と接触させて、当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、酵素結合免疫吸着定量法(enzyme linked immunosorbent assay: ELISA)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。

【0054】

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としての抗体を用いた後、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ヘルスケア社製など)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としての抗体を用いた後、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。

【0055】

ELISA(例えば、sandwich ELISA)法は、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としての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、当該抗体を固定する。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、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を検出する。

【 0 0 5 6 】

< iPS細胞の製造方法 >

人工多能性幹(iPS)細胞は、特定の初期化因子を、体細胞に作用させることによって作製することができる、ES細胞とほぼ同等の特性を有する体細胞由来の人工の幹細胞である (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; Nakagawa, M.ら, Nat. Biotechnol. 26:101 106 (2008) ; 国際公開W02007/069666)。 10

【 0 0 5 7 】

初期化因子は、ES細胞に特異的に発現している遺伝子、その遺伝子産物もしくはnon coding RNA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、その遺伝子産物もしくはnon coding RNA、あるいは低分子化合物によって構成されてもよい。初期化因子に含まれる遺伝子として、例えば、Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c Myc、N Myc、L Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15 2、Tcl1、beta catenin、Lin28b、Sall1、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3またはGlis1等が例示され、これらの初期化因子は、単独で用いても良く、組み合わせて用いても良い。初期化因子の組み合わせとしては公知の組合せを利用することができ、例えば、W02007/069666、W02008/118820、W02009/007852、W02009/032194、W02009/058413、W02009/057831、W02009/075119、W02009/079007、W02009/091659、W02009/101084、W02009/101407、W02009/102983、W02009/114949、W02009/117439、W02009/126250、W02009/126251、W02009/126655、W02009/157593、W02010/009015、W02010/033906、W02010/033920、W02010/042800、W02010/050626、W02010/056831、W02010/068955、W02010/098419、W02010/102267、W02010/111409、W02010/111422、W02010/115050、W02010/124290、W02010/147395、W02010/147612、Huangfu D, et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26: 795 797、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 2: 525 528、Eminli S, et al. (2008), Stem Cells. 26:2467 2474、Huangfu D, et al. (2008), Nat Biotechnol. 26:1269 1275、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3, 568 574、Zhao Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3:475 479、Marson A, (2008), Cell Stem Cell, 3, 132 135、Feng B, et al. (2009), Nat Cell Biol. 11:197 203、R.L. Judson et al., (2009), Nat. Biotechnol., 27:459 461、Lyssiotis CA, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:8912 8917、Kim JB, et al. (2009), Nature. 461:649 643、Ichida JK, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:491 503、Heng JC, et al. (2010), Cell Stem Cell. 6:167 74、Han J, et al. (2010), Nature. 463:1096 100、Mali P, et al. (2010), Stem Cells. 28:713 720、Maekawa M, et al. (2011), Nature. 474:225 9.に記載の組み合わせが例示される。 20 30 40

【 0 0 5 8 】

初期化因子は、その形態に応じた公知の方法にて体細胞へ接触、または体細胞内へ導入すればよい。

【 0 0 5 9 】

タンパク質の形態の場合、例えばリポフェクション、細胞膜透過性ペプチド(例えば、HIV由来のTATおよびポリアルギニン)との融合、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。

【 0 0 6 0 】

DNAの形態の場合、例えば、ウイルス、プラスミド、人工染色体などのベクター、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。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 50

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（W02010/008054）などが例示される。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、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）。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し、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)、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。また、上記ベクターには、体細胞へ一旦導入して作用させた後、初期化因子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初期化因子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。

【0061】

初期化因子がRNAの形態の場合、例えばリポフェクション、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良い。分解を抑制するため、5メチルシチジンおよびpseudouridine (TriLink Biotechnologies)を取り込ませたRNAを初期化因子として用いても良い（Warren L, (2010) Cell Stem Cell. 7:618 630）。

【0062】

iPS細胞誘導のための培養液は、例えば、10～15%FBSを含有するDMEM、DMEM/F12又はDMEM培養液（これらの培養液にはさらに、LIF、penicillin/streptomycin、puromycin、Lグルタミン、非必須アミノ酸類、メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）または市販の培養液（例えば、マウスES細胞培養用培養液(TX WES培養液、トロンボX社)、霊長類ES細胞培養用培養液（霊長類ES/iPS細胞用培養液、リプロセル社）、無血清培地（mTeSR、Stemcell Technology社））などが例示される。

【0063】

iPS細胞誘導の例としては、たとえば、37℃、5%CO₂存在下にて、10%FBS含有DMEM又はDMEM/F12培養液上で体細胞と初期化因子とを接触させ約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、体細胞と初期化因子の接触から約10日後からbFGF含有霊長類ES細胞培養用培養液で培養することによって、該接触から約30～約45日又はそれ以上ののちにES様コロニーを生じさせることができる。

【0064】

あるいは、37℃、5%CO₂存在下にて、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培養液（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、メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）で体細胞と初期化因子を接触させて培養し、約25～約30日又はそれ以上ののちにES様コロニーを生じさせることができる。望ましくは、フィーダー細胞の代わりに、初期化される体細胞そのものを用いる（Takahashi K, et al. (2009), PLoS One. 4:e8067またはW02010/137746）、もしくは細胞外基質（例えば、Laminin 5（W02009/123349）、Laminin 10（US2008/0213885）、その断片（W02011/043405）およびマトリゲル（BD社））を用いる方法が例示される。

【0065】

この他にも、血清を含有しない培地を用いてiPS細胞を樹立する方法も例示される（Sun N, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:15720 15725）。さらに、樹立効率を上げるため、低酸素条件（0.1%以上、15%以下の酸素濃度）によりiPS細胞を樹立しても良い（Yoshida Y, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:237 241またはW02010/013845）。

【 0 0 6 6 】

iPS細胞の樹立効率を高めるための成分として、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤 (例えば、バルプロ酸 (VPA)、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)、MEK阻害剤 (例えば、PD184352、PD98059、U0126、SL327およびPD0325901)、Glycogen synthase kinase 3阻害剤 (例えば、BioおよびCHIR99021)、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば、5 azacytidine)、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば、BIX 01294 等の低分子阻害剤、Suv39h1、Suv39h2、SetDBIおよびG9aに対するsiRNAおよびshRNA等の核酸性発現阻害剤など)、L channel calcium agonist (例えばBayk8644)、酪酸、TGF 阻害剤またはALK5阻害剤 (例えば、LY364947、SB431542、616453およびA 83 01)、p53阻害剤 (例えばp53に対するsiRNAおよびshRNA)、ARID3A阻害剤 (例えば、ARID3Aに対するsiRNAおよびshRNA)、miR 291 3p、miR 294、miR 295およびmir 302などのmiRNA、Wnt Signaling (例えばsoluble Wnt3a)、神経ペプチドY、プロスタグランジン類 (例えば、プロスタグランジンE2およびプロスタグランジンJ2)、hTERT、SV40LT、UTF1、IRX6、GLIS1、PITX2、DMRTBI等が知られている。iPS細胞の樹立の際にはかかる樹立効率の改善目的にて用いられる成分を添加した培養液を用いてもよい。

【 0 0 6 7 】

上記培養の間には、培養開始2日目以降から毎日1回新鮮な培養液と培養液交換を行う。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 $5 \times 10^3 \sim 約 5 \times 10^6$ 細胞の範囲である。

【 0 0 6 8 】

iPS細胞は、形成したコロニーの形状により選択することが可能である。一方、体細胞が初期化された場合に発現する遺伝子 (例えば、Oct3/4、Nanog) と連動して発現する薬剤耐性遺伝子をマーカー遺伝子として導入し、対応する薬剤を含む培養液 (選択培養液) で培養を行うことにより樹立したiPS細胞を選択することができる。また、マーカー遺伝子として蛍光タンパク質遺伝子を導入し、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、iPS細胞を選択することができる。

【 0 0 6 9 】

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。

【 0 0 7 0 】

< 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、
 (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。

【0071】

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。

【0072】

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、Accutase™または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。

【0073】

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。

【0074】

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、MEM培地、Dulbecco'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の血清代替物)、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、ピルピン酸、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 / 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 / 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。

【0075】

ここで、GSK 3 / 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。

【0076】

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。

【0077】

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。

【0078】

<血管平滑筋細胞の分化誘導方法>

血管平滑筋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。

【0079】

本発明における血管平滑筋細胞は、好ましくは、平滑筋アクチン、カルボニンなどの血管平滑筋細胞マーカーを発現し紡錘形を呈する細胞である。

【0080】

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、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の血清代替物)、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 / 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。

【0081】

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。

【0082】

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。

【0083】

<スクリーニング方法>

本発明は、多発性嚢胞腎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、表2、表3および表4に記載の遺伝子の発現レベル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。

【0084】

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：

(A1)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、

(B1)表1または表3に記載の遺伝子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

20

30

40

50

(C 1) 候補物質と接触させなかった場合と比較して、前記発現量が減少した場合、多発性嚢胞腎の治療剤または予防剤と判定する工程、

あるいは、

(A 2) 候補物質を、多発性嚢胞腎患者由来のiPS細胞から分化誘導した体細胞と接触させる工程、

(B 2) 表2または表4に記載の遺伝子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

(C 2) 候補物質と接触させなかった場合と比較して、前記発現量が増加した場合、多発性嚢胞腎の治療剤または予防剤と判定する工程。

【0085】

ここで、iPS細胞から分化誘導した体細胞として、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平滑筋細胞が例示され、好ましくは、血管内皮細胞または血管平滑筋細胞である。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平滑筋細胞の製造方法は、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平滑筋細胞は、前述の方法により製造することができる。

【0086】

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 3) 候補物質を、多発性嚢胞腎患者由来のiPS細胞から分化誘導した血管内皮細胞と接触させる工程、

(B 3) 表1に記載の遺伝子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

(C 3) 候補物質と接触させなかった場合と比較して、前記発現量が減少した場合、多発性嚢胞腎の治療剤または予防剤と判定する工程。

【0087】

あるいは、

(A 4) 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血管内皮細胞と接触させる工程、

(B 4) 表2に記載の遺伝子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

(C 4) 候補物質と接触させなかった場合と比較して、前記発現量が増加した場合、多発性嚢胞腎の治療剤または予防剤と判定する工程。

【0088】

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、血管平滑筋細胞を用いる方法として、以下の工程を含み得る：

(A 5) 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血管平滑筋細胞と接触させる工程、

(B 5) 表3に記載の遺伝子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

(C 5) 候補物質と接触させなかった場合と比較して、前記発現量が減少した場合、多発性嚢胞腎の治療剤または予防剤と判定する工程。

【0089】

あるいは、

(A 6) 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血管平滑筋細

10

20

30

40

50

胞と接触させる工程、

(B 6) 表 4 に記載の遺伝子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

(C 6) 候補物質と接触させなかった場合と比較して、前記発現量が増加した場合、多発性嚢胞腎の治療剤または予防剤と判定する工程。

【0090】

本発明において、前記発現量は前述の疾患マーカーを用いて検出してもよく、他の態様として、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してもよい。

【0091】

本発明において、表 1、表 2、表 3 および表 4 に記載の遺伝子の転写調節領域は当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、当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当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。

【0092】

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平滑筋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。

【0093】

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、グルクロニダーゼ(GUS)、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。

【0094】

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。

【0095】

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) アフィニティー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。アフィニティー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/Tech niques* 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.

10

20

30

40

50

(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. (1990) 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。

【実施例】

【0096】

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。

【0097】

[実施例1]

<線維芽細胞>

7名の多発性嚢胞腎患者より同意のもと生検した皮膚を培養して、PK線維芽細胞として用いた。一方、7名の多発性嚢胞腎を発症していない日本人の皮膚線維芽細胞をnonPK線維芽細胞として用いた。

【0098】

<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維芽細胞へ導入した。遺伝子導入後6日目に、線維芽細胞をSNLフィーダー細胞上に移し、翌日より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、7種のPK線維芽細胞由来iPS細胞株 (PK iPSC) および7種のnonPK線維芽細胞由来iPS細胞株 (nonPK iPSC) を作製した。

【0099】

[実施例2]

<血管内皮細胞への分化誘導>

各iPS細胞株コロニーを適度なサイズに破碎し、I型コラーゲンコーティングディッシュ (IWAKI) 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日目からGSK 3 / inhibitor (Sigma)、N2 supplement、B27 supplement (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 60陰性およびVE cadherin陽性細胞をFACSにより分離した。続いて、分離した細胞をIV型コラーゲンコーティングディッシュ (Becton Dickinson) に散布し血管内皮細胞用増殖培地 (Lonza) 中で培養し、VE cadherin、CD 31、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血管内皮細胞シートを構築した段階で血管内皮細胞 (EC) として回収した。7種のPK iPSCおよび7種のnonPK iPSCからそれぞれECを作製した (PK ECおよびnonPK EC)。

【0100】

[実施例3]

<血管平滑筋細胞への分化誘導>

各iPS細胞株コロニーを適度なサイズに破碎し、I型コラーゲンコーティングディッシュ (IWAKI) 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日目からGSK 3 / inhibitor (Sigma)、N2 supplement、B27 supplement (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 60陰性およびVE cadherin陰性細胞をFACSにより分離した。続いて、分離した細胞をI型コラーゲンコーティングディッシュ (IWAKI) に散布しさらに2% FCSおよび20ng/ml PDGF BB (Peprotec Inc) を含有するMEM中で培養し、平滑筋アクチン、カルボニン等の血

10

20

30

40

50

管平滑筋細胞マーカーを発現し紡錐形を呈する血管平滑筋細胞（SMC）に分化誘導し回収した。7種のPK iPSCおよび7種のnonPK iPSCからそれぞれSMC（PK SMCおよびnonPK SMC）を作製した。

【 0 1 0 1 】

[実施例4]

< 遺伝子発現確認 >

得られたPK ECおよびnonPK ECから抽出したRNAを用いてAgilent Technologies社のマイクロアレイにより有意に2倍以上差がある遺伝子を確認した。PK ECにおいて2倍発現が多い遺伝子を表1に示し、PK ECにおいて2倍発現が少ない遺伝子を表2に示す。

【 0 1 0 2 】

【表 1】

遺伝子名	Accession 番号
IGFBP7	NM_001253835 NM_001553
IGF1	NM_00 0618 NM_001111283 NM_001111284 NM_001111285
CPE	NM_001873
CNPY4	NM_152755
VTN	NM_000638
PCSK1	NM_000439 NM_001177875
OLFML2A	NM_001282715 NM_182487
NPTX2	NM_002523
LAMC3	NM_006059
IGFBP3	NM_000598 NM_001013398
HTRA1	NM_002775
GPC4	NM_001448
CPXM2	NM_198148
COL5A1	NM_000093 NM_001278074
COL15A1	NM_001855
CLEC4M	NM_001144904 NM_001144905 NM_001144906 NM_001144907 NM_001144908 NM_001144909 NM_001144910 NM_001144911 NM_014257
AMH	NM_000479
EEF1A1	NM_001402

STAG2	NM_001042749 NM_001042750 NM_001042751 NM_001282418 NM_006603
SLN	NM_003063
ZSCAN1	NM_182572
ZNF135	NM_001164527 NM_001164529 NM_001164530 NM_001289401 NM_001289402 NM_003436 NM_007134
ZDHHC9	NM_001008222 NM_016032
TPCN1	NM_001143819 NM_001301214 NM_017901
TNIK	NM_001161560 NM_001161561 NM_001161562 NM_001161563 NM_001161564 NM_001161565 NM_001161566 NM_015028
TNFSF4	NM_001297562 NM_003326
TMEM63C	NM_020431
SULT4A1	NM_014351
ST6GALNAC1	NM_001289107 NM_018414
SRPX2	NM_014467
SPOCK1	NM_004598
SNX10	NM_001199835 NM_001199837 NM_001199838 NM_013322

SLC20A2	NM_001257180 NM_001257181 NM_006749
SEZ6L2	NM_001114099 NM_001114100 NM_001243332 NM_001243333 NM_012410 NM_201575
SELE	NM_000450
RSP04	NM_001029871 NM_001040007
RSP03	NM_032784
RGS11	NM_001286485 NM_001286486 NM_003834 NM_183337
RGCC	NM_014059
RAMP1	NM_005855
RAI2	NM_001172732 NM_001172739 NM_001172743 NM_021785
RAB11FIP1	NM_001002814 NM_025151
PSORS1C1	NM_014068
NKAIN4	NM_152864
MSL3	NM_001193270 NM_001282174 NM_006800 NM_078628 NM_078629
LOX	NM_001178102 NM_002317
KIF1A	NM_001244008 NM_004321
HSD17B6	NM_003725
GRIN2D	NM_000836

GLIPR2	NM_001287010
	NM_001287011
	NM_001287012
	NM_001287013
	NM_001287014
	NM_022343
FZD10	NM_007197
FBLN5	NM_006329
CRABP1	NM_004378
COL1A2	NM_000089
CD209	NM_001144893
	NM_001144894
	NM_001144895
	NM_001144896
	NM_001144897
	NM_001144899
	NM_021155
C1S	NM_001734
	NM_201442
BDNF	NM_001143805
	NM_001143806
	NM_001143807
	NM_001143808
	NM_001143809
	NM_001143810
	NM_001143811
	NM_001143812
	NM_001143813
	NM_001143814
	NM_001143816
	NM_001709
	NM_170731
	NM_170732
	NM_170733
	NM_170734
	NM_170735

【表 2】

遺伝子名	Accession 番号
PRSS36	NM_001258290 NM_001258291 NM_173502
CMA1	NM_001836
HERC2	NM_004667
HAPLN2	NM_021817
TOR3A	NM_022371
CHAT	NM_001142929 NM_001142933 NM_001142934 NM_020549 NM_020984 NM_020985 NM_020986
COL11A2	NM_001163771 NM_080679 NM_080680 NM_080681
DPEP3	NM_001129758 NM_022357
MDGA1	NM_153487
OR10A5	NM_178168
S100A5	NM_002962
SFTPA2	NM_001098668
APOC1	NM_001645

APOL1	NM_001136540 NM_001136541 NM_003661 NM_145343
CD14	NM_000591 NM_001040021 NM_001174104 NM_001174105
HNRNPA3	NM_194247
IAPP	NM_000415
LYNX1	NM_023946 NM_177457 NM_177458 NM_177476 NM_177477
MMP9	NM_004994
NETO1	NM_001201465 NM_138966 NM_138999
NPB	NM_148896
OXT	NM_000915
PHGDH	NM_006623
SLC6A17	NM_001010898
ARHGEF10	NM_014629
COX7A1	NM_001864
FAM57B	NM_031478
LRRD1	NM_001161528
MYO3A	NM_017433
POT1	NM_001042594 NM_015450

CLEC12B	NM_001129998 NM_205852
DNAH17	NM_173628
FAM24B	NM_001204364 NM_152644
HIST1H2AG	NM_021064
HIST1H3J	NM_003535
HOPX	NM_001145459 NM_001145460 NM_032495 NM_139211 NM_139212
IL1RL1	NM_001282408 NM_003856 NM_016232
KCNC3	NM_004977
KCNK17	NM_001135111 NM_031460
KCTD19	NM_001100915
KIAA1257	NM_020741
LOC101929959	XM_011518093 XM_006716901 XM_011518094
MAB21L2	NM_006439
MED29	NM_017592
MIR124-2HG	NR_034102 NR_034103 NR_109792 NR_109793

NUTM2D	NR_075100
SCN3A	NM_001081676 NM_001081677 NM_006922
SNORA16B	NR_004389
TSPYL5	NM_033512
WDR90	NM_145294
YPEL4	NM_145008

【 0 1 0 4 】

同様に、得られたPK SMCおよびnonPK SMCから抽出したRNAを用いてAgilent Technologies社のマイクロアレイにより有意に2倍以上差がある遺伝子を確認した。PK SMCにおいて2倍発現が多い遺伝子を表3に示し、PK SMCにおいて2倍発現が少ない遺伝子を表4に示す。

【 0 1 0 5 】

【表 3】

遺伝子名	Accession 番号
ADAMTSL4	NM_001288607 NM_001288608 NM_019032 NM_025008
COL9A3	NM_001853
EMILIN2	NM_032048
CNPY4	NM_152755
C1QL4	NM_001008223
EGFL8	NM_030652
HSPG2	NM_001291860 NM_005529
SLITRK4	NM_001184749 NM_001184750 NM_173078
EEF1A1	NM_001402
PLAC9	NM_001012973
SLIT2	NM_001289135 NM_001289136 NM_004787
SPANXC	NM_022661
SUSD2	NM_019601
TMEM255A	NM_001104544 NM_001104545 NM_017938
TMEM97	NM_014573
SLN	NM_003063
STAG2	NM_001042749 NM_001042750 NM_001042751 NM_001282418 NM_006603
APPL1	NM_012096
CALB2	NM_001740 NM_007088

CDT1	NM_030928
CLK1	NM_001162407 NM_004071
COLEC12	NM_130386
DLG2	NM_001142699 NM_001142700 NM_001142702 NM_001206769 NM_001300983 NM_001364
DRD2	NM_000795 NM_016574
ENTPD8	NM_001033113 NM_198585
FOXB1	NM_012182
ITGB1BP2	NM_001303277 NM_012278
KAT2A	NM_021078
L3MBTL1	NM_015478 NM_032107
NUF2	NM_031423 NM_145697
QTRT1	NM_031209
SAPCD1	NM_001039651
SCARA3	NM_016240 NM_182826
SLC8A2	NM_015063
SNORD31	NR_002560
SUSD5	NM_015551
TGM1	NM_000359
TNNT1	NM_001126132 NM_001126133 NM_001291774 NM_003283
ZFP42	NM_001304358 NM_174900
ZNRF3	NM_001206998 NM_032173

【表 4】

遺伝子名	Accession 番号
HAPLN2	NM_021817
TOR3A	NM_022371
WNT10B	NM_003394
PRSS36	NM_001258290 NM_001258291 NM_173502
CHAT	NM_001142929 NM_001142933 NM_001142934 NM_020549 NM_020984 NM_020985 NM_020986
COL11A2	NM_001163771 NM_080679 NM_080680 NM_080681
DPEP3	NM_001129758 NM_022357
MDGA1	NM_153487
OR10A5	NM_178168
AHSA2	NM_152392
CHMP1A	NM_001083314 NM_002768
EPS8L3	NM_024526 NM_133181 NM_139053
GDF7	NM_182828
GPC6	NM_005708
MARK2	NM_001039469 NM_001163296 NM_001163297 NM_004954 NM_017490

MROH7	NM_001039464 NM_001291332
PLOD1	NM_000302
S100A5	NM_002962
SFTPA2	NM_001098668
ARHGEF10	NM_014629
COX7A1	NM_001864
FAM57B	NM_031478
LRRD1	NM_001161528
MYO3A	NM_017433
POT1	NM_001042594 NM_015450
ADAMTS7	NM_014272
AKT2	NM_001243027 NM_001243028 NM_001626
CBX3	NM_007276 NM_016587
CCDC33	NM_001287181 NM_025055 NM_182791
CSAG1	NM_001102576 NM_153478
CSAG2	XM_006724857
CSAG3	NM_001129826 NM_001129828
CXCL16	NM_001100812 NM_022059
DKK3	NM_001018057 NM_013253 NM_015881
ETV6	NM_001987
GP9	NM_000174
GREM1	NM_001191322 NM_001191323 NM_013372
GRIN3A	NM_133445
HLA-DRB5	NM_002125

IL33	NM_001199640 NM_001199641 NM_033439
KLHL29	NM_052920
LOC284379	NR_002938
MAGEA2	NM_001282501 NM_001282502 NM_001282504 NM_001282505 NM_005361 NM_175742 NM_175743
MAGEA2B	NM_153488
OPN4	NM_001030015 NM_033282
PLAU	NM_001145031 NM_002658
POLR2H	NM_001278698 NM_001278699 NM_001278700 NM_001278714 NM_001278715 NM_006232
PRB3	NM_006249
PRPH2	NM_000322
PYG02	NM_138300
SNORA34	NR_002968
SSX2	NM_001278697 NM_003147 NM_175698
SSX2B	NM_001164417 NM_001278701 NM_001278702
ST14	NM_021978
SUSD4	NM_001037175 NM_017982

TBXAS1	NM_001061
	NM_001130966
	NM_001166253
	NM_001166254
	NM_030984
TFPI2	NM_001271003
	NM_001271004
	NM_006528
UBE3B	NM_001270449
	NM_001270450
	NM_001270451
	NM_130466
	NM_183415
WDR1	NM_005112
	NM_017491
WDR93	NM_001284395
	NM_001284396
	NM_020212
XKR9	NM_001011720
	NM_001287258
	NM_001287259
	NM_001287260

【0107】

以上の結果から、対象から作製したiPS細胞由来のECにおいて表1に記載の遺伝子が対照と比較して高い場合、当該対象は、多発性嚢胞腎に罹患している可能性が高いと言える。一方、対象から作製したiPS細胞由来のECにおいて表2に記載の遺伝子が対照と比較して高い場合、当該対象は、多発性嚢胞腎に罹患していない可能性が高いと言える。

30

【0108】

また、対象から作製したiPS細胞由来のSMCにおいて表3に記載の遺伝子が対照と比較して高い場合、当該対象は、多発性嚢胞腎に罹患している可能性が高いと言える。一方、対象から作製したiPS細胞由来のSMCにおいて表4に記載の遺伝子が対照と比較して高い場合、当該対象は、多発性嚢胞腎に罹患していない可能性が高いと言える。

【産業上の利用可能性】

【0109】

本発明により、多発性嚢胞腎の検査方法、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、医療上大変有用である。

40

フロントページの続き

(72)発明者 渡辺 亮

京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内

審査官 清野 千秋

(56)参考文献 特表2013-544089(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/6883

C12N 15/00

C12Q 1/02

G01N 33/50

G01N 33/53

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

WPIDS/WPIX(STN)