(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5930556号
(P5930556)

(45)発行日　平成28年6月8日(2016.6.8)　(24)登録日　平成28年5月13日(2016.5.13)

(51)Int.Cl.		F I		
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	F
C12N 15/115	(2010.01)	C12N	15/00	H
G01N 37/00	(2006.01)	G01N	37/00	102
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	M

請求項の数 23　(全 31 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2014-516005 (P2014-516005)
(86)(22)出願日　平成24年6月14日 (2012.6.14)
(65)公表番号　特表2014-519341 (P2014-519341A)
(43)公表日　平成26年8月14日 (2014.8.14)
(86)国際出願番号　PCT/US2012/042534
(87)国際公開番号　WO2012/174294
(87)国際公開日　平成24年12月20日 (2012.12.20)
審査請求日　平成26年1月16日 (2014.1.16)
(31)優先権主張番号　61/497,264
(32)優先日　平成23年6月15日 (2011.6.15)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　502329223
ヒルズ・ペット・ニュートリシャン・インコーポレーテッド
アメリカ合衆国カンザス州６６６０３，トピーカ，サウスウエスト・エイス・アベニュー　４００
(74)代理人　100169904
弁理士　村井　康司
(72)発明者　サメル・アル－ムラニ
アメリカ合衆国６６６１４カンザス州トピーカ、サウスウエスト・ラギート・コート　２５１３番

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ネコ科動物における甲状腺機能亢進症を診断および監視する組成物および方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ネコ科動物由来の生体試料における、ＩＹＤ、ＳＬＣ５Ａ５（ＮＩＳ）、およびＴＰＯのいずれか；並びにそれらの発現産物から成る群から選択される１種以上のバイオマーカーの発現レベルを測定する工程を含む、ネコ科動物における甲状腺機能亢進症の存在または高いリスクを診断する方法であって、
正常ネコ科動物またはネコ科動物の個体群由来の試料における発現の対照値、および／またはそのネコ科動物の以前の個体ベースライン値に対する、該試料における該１種以上のバイオマーカーの発現変化が、甲状腺機能亢進症の存在または高いリスクを示し、および該ＩＹＤ、ＳＬＣ５Ａ５（ＮＩＳ）、およびＴＰＯの１種以上の発現変化が少なくとも３倍である、方法。
【請求項２】
正常ネコ科動物またはネコ科動物の個体群由来の試料における発現の対照値、および／またはそのネコ科動物の以前の個体ベースライン値に対する、前記試料におけるＩＹＤ、ＳＬＣ５Ａ５（ＮＩＳ）、およびＴＰＯ；またはそれらの発現産物の発現の増加が、甲状腺機能亢進症の存在または高いリスクを示す、請求項１記載の方法。
【請求項３】
前記１種以上のバイオマーカーの発現レベルが、（ｉ）測定されるべき前記１種以上のバイオマーカーに対応するｍＲＮＡまたはｃＤＮＡに相補的である１種以上のオリゴヌクレオチドを含有するＤＮＡマイクロアレイ、または（ｉｉ）測定されるべき前記１種以上

のバイオマーカーに対応するｍＲＮＡまたはｃＤＮＡに対する、オリゴヌクレオチドプライマーとの定量的ポリメラーゼ連鎖反応のいずれかを用いて、前記１種以上のバイオマーカーの遺伝子発現を測定することによって決定される、請求項１または２記載の方法。

【請求項４】

前記１種以上のバイオマーカーの遺伝子発現を測定する工程が、（ｉ）組織試料からＲＮＡを単離すること、（ｉｉ）該ＲＮＡを逆転写して対応するｃＤＮＡを得ること、（ｉｉｉ）得られたｃＤＮＡを単離および断片化すること、（ｉｖ）該ｃＤＮＡフラグメントを測定されるべき該１種以上のバイオマーカーに対応するｃＤＮＡに相補的である１種以上のオリゴヌクレオチドを含有するＤＮＡマイクロアレイと接触させること、並びに（ｖ）該ＤＮＡマイクロアレイにおける該ｃＤＮＡフラグメントおよび該１種以上のオリゴヌクレオチドの間のハイブリダイゼーションを検出すること、を含む、請求項３記載の方法。

【請求項５】

前記ＤＮＡマイクロアレイにおける前記ｃＤＮＡフラグメントおよび１種以上のオリゴヌクレオチドの間のハイブリダイゼーションがストリンジェントな条件下で行われる、請求項４記載の方法。

【請求項６】

前記バイオマーカーの発現レベルが、発現タンパク質に対する抗体によって検出される、請求項１または２記載の方法。

【請求項７】

前記バイオマーカーの発現レベルが、定量質量分光測定法を用いて前記試料中のタンパク質の量を測定することによって検出される、請求項１または２記載の方法。

【請求項８】

正常またはベースライン組織における発現の対照値に対する、前記生体試料中の前記１種以上のバイオマーカーの発現レベルが、少なくとも３０％である、請求項１～７のいずれか一項記載の方法。

【請求項９】

前記生体試料中の前記１種以上のバイオマーカーの発現レベルが、比較的一定の発現を有することが知られている１種以上の遺伝子の発現に対して標準化される、請求項１～８のいずれか一項記載の方法。

【請求項１０】

前記発現レベルが、同一試料から少なくとも３個のバイオマーカーまたは少なくとも５個のバイオマーカーに対して、測定される、請求項１～９のいずれか一項記載の方法。

【請求項１１】

前記生体試料が、血液および／または甲状腺組織試料である、請求項１～１０のいずれか一項記載の方法。

【請求項１２】

請求項１～１１のいずれか一項記載の方法によって甲状腺障害の存在または高いリスクを診断する工程および食事療法および／または薬物治療によって該障害を管理する工程を含む、甲状腺機能亢進症を治療、改善するまたは進行を遅延させる方法。

【請求項１３】

前記食事療法が、ヨウ素レベルが０．３５ｍｇ／ｋｇ未満であり、セレニウムレベルが０．１ｍｇ／ｋｇ未満およびアラキド酸レベルが０．０２％以下である食事療法である、請求項１２記載の方法。

【請求項１４】

その必要のあるネコ科動物の治療が、Ｔ－４の産生を抑制する有効量の薬剤を投与すること、放射線ヨウ素療法を施すこと、および／または外科的甲状腺摘除術を行うことを含む、請求項１３記載の方法。

【請求項１５】

ネコ科動物由来の生体試料におけるＩＹＤ、ＳＬＣ５Ａ５（ＮＩＳ）、およびＴＰＯ並

びにそれらの発現産物から成る群から選択される１種以上のバイオマーカーの遺伝子発現を測定するための手段、および
ネコ科動物由来の生体試料における前記１種以上のバイオマーカーの発現を測定し、ネコ科動物における甲状腺機能亢進症の存在またはリスクを診断するために、そのような手段を使用するための指示
を含む、ネコ科動物における甲状腺機能亢進症の存在またはリスクを診断する請求項１～１１のいずれか一項記載の方法に使用するためのキット。
【請求項１６】
前記１種以上のバイオマーカーを測定するための手段が、該１種以上のバイオマーカーの遺伝子発現を検出することができる１種以上の核酸プローブを含む、請求項１５記載のキット。
【請求項１７】
前記１種以上のバイオマーカーの遺伝子発現を検出することができる１種以上の核酸プローブを含むＤＮＡマイクロアレイを含む、請求項１６記載のキット。
【請求項１８】
前記１種以上のバイオマーカーを測定するための手段が、前記１種以上のバイオマーカーを検出することができる１種以上の抗体またはアプタマーを含む、請求項１５記載のキット。
【請求項１９】
前記１種以上のバイオマーカーを検出することができる１種以上の抗体、標準としての該バイオマーカーに対応する単離タンパク質および緩衝剤を含むＥＬＩＳＡフォーマットの請求項１８記載のキット。
【請求項２０】
請求項１～１４のいずれか一項記載の方法における、ＩＹＤ、ＳＬＣ５Ａ５（ＮＩＳ）、およびＴＰＯの発現産物から成る群から選択されるネコ科動物タンパク質を認識する抗体の使用。
【請求項２１】
請求項１～１４のいずれか一項記載の方法における、ＩＹＤ、ＳＬＣ５Ａ５（ＮＩＳ）、およびＴＰＯの発現産物から成る群から選択されるネコ科動物タンパク質を認識するアプタマーの使用。
【請求項２２】
請求項１～１４のいずれか一項記載の方法における、ＩＹＤ、ＳＬＣ５Ａ５（ＮＩＳ）、およびＴＰＯの発現産物から成る群から選択される単離および精製したネコ科動物タンパク質または組み換えネコ科動物タンパク質の使用。
【請求項２３】
請求項１～１４のいずれか一項記載の方法における、ＩＹＤ、ＳＬＣ５Ａ５（ＮＩＳ）、およびＴＰＯから成る群から選択されるネコ科動物遺伝子へのハイブリダイゼーションを可能とするオリゴヌクレオチドプローブの使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ネコ科動物における甲状腺機能亢進症、並びに甲状腺機能亢進症に関連するまたは甲状腺機能亢進症から生じるネコ科動物における疾病および障害を診断および／または監視する組成物、材料および方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
甲状腺機能亢進症は、ネコ科動物に最も多いホルモン異常である。年老いたネコ科動物に最も多く、幾分、雄より雌に多い。甲状腺機能亢進症は、甲状腺ホルモン、特にチロキシンまたはＴ－４の過剰産生によって引き起こされる。Ｔ－４の過剰産生は、体重減少、食欲増加、落ち着きのなさ、不十分な被毛、頻脈、飲水増加と排尿増加、嘔吐、下痢、息

切れ、呼吸困難、発熱、血圧上昇につながり、結果的には虚弱、だるさ、筋肉の震え、痩せ、そして死につながる上記動物の基礎代謝率を劇的に増加させる。進行甲状腺機能亢進症は、多くの場合、腎臓の問題と心の問題と関連している。効果的な治療法は、甲状腺ホルモンの産生を阻害するようなメチマゾールまたはカルビマゾールなどの薬物の使用、甲状腺機能亢進細胞を破壊する放射性ヨウ素療法、および外科甲状腺摘出を含む。しかしながら、疾患の検出が遅すぎる場合、健康被害は回復不可能である。従って、早期診断が重要である。

【０００３】

甲状腺機能亢進症を診断するための最も一般的な試験は、有意に上昇したＴ－４レベルが甲状腺機能亢進症を示すＴ－４用の血液検査、またはＴ－３の投与に応答したＴ－４の抑制を測定するＴ－３抑制試験が挙げられ、ここで抑制のないことは、甲状腺機能亢進状態を示します。しかし、ネコ科動物のＴ－３とＴ－４のレベルは、一日の内に変動する可能性があって、テストを信頼性の低いものとし、人為的にＴ－４のレベルを低下することができる様々な疾患もあって、甲状腺機能亢進状態を隠してしまう。テクネチウムを用いる甲状腺の放射性物質を用いた画像撮影法が可能であり、腫瘍または異常な甲状腺組織を検出するのに有用であるが、高額な費用がかかる。

【０００４】

従って、ネコ科動物における甲状腺機能亢進症を検出する効率的かつ効果的な代替方法が必要とされる。

【０００５】

多くの方法は、特異的遺伝子発現、例えば、ＤＮＡマイクロアレイは、発現配列タグ（ＥＳＴ）、遺伝子発現の逐次解析法（ＳＡＧＥ）、サブトラクティブハイブリダイゼーション、サブトラクティブクローニングおよびｍＲＮＡに対するディファレンシャルディスプレイ（ＤＤ）、ＲＮＡ－任意プライムＰＣＲ（ＲＡＰ－ＰＣＲ）、リアルタイムＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）、表象差異分析（ＲＤＡ；ｒｅｐｒｅｓｅｎｔａｔｉｏｎａｌ ｄｉｆｆｅｒｅｎｃｅ ａｎａｌｙｓｉｓ）、二次元ゲル電気泳動、質量分析、およびタンパク質に対するタンパク質マイクロアレイ系抗体結合を研究するために開発されてきた。

【０００６】

甲状腺機能亢進症に関与する生物学的経路および固有の分子間相互作用や細胞間シグナル伝達プロセスの複雑さのために、行われている相互作用を遺伝子レベルで理解することが非常に望ましい。ネコ科動物における甲状腺機能亢進症の初期段階での調節不全遺伝子の検出は、全ゲノムをベースとしてネコ科動物における甲状腺機能亢進症の生物学を理解する上で有用であり、それにより、甲状腺機能亢進症の発症のリスク、素因、診断を決定するための方法、並びに治療計画の考案および監視する方法を設計するのに有用である。

【０００７】

遺伝子発現プロファイリングを通じて関与する生物学的経路のより詳細な理解は、診断手順、試薬や検査キットの開発だけでなく、疾患経路における、有益な医薬品、栄養補助食品と栄養（食事療法）の介入を支援する。これらのアプローチは、基礎疾患の早期発見および潜在的な予防または治療を可能にすることができる。甲状腺疾患の病理に関与する異常調節遺伝子が、障害の診断、潜在的な予防または治療のためのバイオマーカーとして重要な働きをし、かつ適当な医薬、機能性食品および栄養（食事療法）介入の選択を最適化することができる。

【０００８】

ネコ科動物における遺伝子発現レベルおよび／または発現遺伝子産物の機能のレベルの決定は、治療的または予防的用途の適切な薬剤を選択するために使用されることができる。このデータは、遺伝子発現プロファイリングによって、当業者がネコ科動物における腎疾患の予防または治療剤としての適切な薬物を選択するのに使用してもよい。遺伝子発現データと解析はまた、腎機能の健全な状態を示すバイオマーカーを利用することによって、正常な甲状腺機能のパフォーマンスを促進する上で有益な効果を有する栄養組成物、栄養補助食品、および機能性食品を選択するために使用されてもよい。

【０００９】
ネコ科動物における疾患の診断に関連した遺伝子発現プロファイルのネコ科動物のゲノムをスクリーニングすることにおいて、これまでに非常に限られた研究だけが行われてきた。本明細書中に記載されているような甲状腺機能亢進症などの疾患を有する個体群に対してネコ科動物の健康な個体群での研究は広範囲に行われてこなかった。ネコ科動物ゲノムの発現プロファイル、特に経時的ネコ科動物における腎疾患の発症に関する入手可能なデータはほとんどない。
【００１０】
甲状腺機能亢進症は、ネコ科動物の死亡の主要な原因である。効果的に甲状腺機能亢進症を治療するために、心臓および／または腎臓への回復不能な被害がある前に、早期診断と治療が不可欠である。従って、適切に治療することができるように、甲状腺機能亢進症を有する、または甲状腺機能亢進症に対するリスクが上昇した動物を同定するためのより良い方法が必要である。
【発明の概要】
【００１１】
本発明者らは、甲状腺機能亢進症を有するネコ科動物における甲状腺組織および全血における遺伝子発現を研究してきた。上記組織の研究においては、１３０８の重要な特異的発現遺伝子が、発現におけるＦＤＲ（偽発見率）＝０．１および発現比が±１．２５以上で、甲状腺機能亢進ネコ科動物と非甲状腺機能亢進ネコ科動物の間で発見された。上記全血の研究では、上記と同様のカットオフで、１０９４の重要な遺伝子が、甲状腺機能亢進ネコ科動物と非甲状腺機能亢進ネコ科動物の間で発見された。上記組織の研究では、甲状腺ホルモンの産生を導く経路に関与することが知られている全ての遺伝子は、甲状腺機能亢進のネコ科動物において発現増加されることが見出されている。これらの遺伝子の発現増加は、明らかにネコ科動物体内で高Ｔ－４の産生に貢献している。上記全血の研究では、６０の遺伝子は、上記組織の研究に見られるのと同じ方向に調節されると思われる固形組織の研究から見出されたものと重複することが見出されている。これらの６０の遺伝子を用いることによって、上記全血および組織で試験したように、上記甲状腺機能亢進のネコ科動物は、正常なネコ科動物と区別することができる。以下の表ＡおよびＢに記載されているこれらの６０遺伝子は、ネコ科動物の甲状腺機能亢進症の検出を可能にすることができる。
【００１２】
従って、本発明により、ネコ科動物における甲状腺機能亢進症並びに甲状腺機能亢進症に関連または起因する疾患および障害を診断および／または監視するための組成物、材料および方法、例えば、ネコ科動物における甲状腺機能亢進症の、発症のリスクを決定する、素因を同定する、診断する、その治療計画を考案および監視する、およびその状態を監視するための組成物および方法を提供し、上記甲状腺機能亢進症は、そのようなネコ科動物から採取された生物学的試験試料から単離され、測定された少なくとも１つの関連するバイオマーカーを利用することによって検出可能であり、上記バイオマーカーの発現は、疾患に正または負の相関を有する。本発明の組成物および方法の実施に関連するバイオマーカーは、そのようなネコ科動物の生物学的試験試料中に存在するポリヌクレオチドまたはタンパク質を含む。本発明の方法を実施するための生物学的試験試料は、例えば、そのようなネコ科動物からの組織試料を含んでもよい。上記バイオマーカーは、分泌されることに基づいても選択されているので、血清または血漿中または尿中で検出することができる。従って、生物学的試験試料は、例えば血液または尿などの、そのようなネコ科動物から採取された生物学的流体の試料であってもよい。
【００１３】
甲状腺ホルモンの過剰産生により特に発現増加されたことが判明している遺伝子には、以下のものを含む。
【００１４】
ＩＹＤ（４．５５倍の増加）：この遺伝子は、甲状腺ホルモンの産生のハロゲン化副産

物であるモノおよびジヨードチロシンの酸化ＮＡＤＰＨ依存－脱ヨード化を触媒する酵素をコード化する。上記タンパク質のＮ－末端は、膜アンカーとして機能する。この遺伝子の突然変異は、脱ヨウ素酵素欠乏、またはヨードチロシン脱ハロゲン酵素欠乏とも呼ばれている内分泌機能不全タイプ４（ｄｙｓｈｏｒｍｏｎｏｇｅｎｅｓｉｓ ｔｙｐｅ ４）、または甲状腺ホルモン産生タイプ４（ｔｈｙｒｏｉｄ ｈｏｒｍｏｎｏｇｅｎｅｓｉｓ ｔｙｐｅ ４）のために、先天性甲状腺機能亢進症を生じる。

【００１５】

ＴＧ（２．０２倍の増加）：サイログロブリン（Ｔｇ）は、甲状腺によって主に産生される糖タンパク質のホモ二量体である。それは、チロキシンとトリヨードチロニンとの合成のための基質としてだけでなく、不活性型の甲状腺ホルモンとヨウ素の貯蔵として作用する。上記サイログロブリンは、小胞体から、濾胞腔における、ヨウ素化およびその後のチロキシンの生合成の位置に分泌される。この遺伝子の突然変異により、甲状腺腫として現れる甲状腺内分泌機能不全（ｔｈｙｒｏｉｄ ｄｙｓｈｏｒｍｏｎｏｇｅｎｅｓｉｓ）を生じ、中等度から重度の先天性甲状腺機能亢進症に関連する。

【００１６】

ＳＬＣ５Ａ５、ＮＩＳ（４．６倍の増加）：この遺伝子は、ナトリウムグルコース共輸送体ファミリーのメンバーをコード化する。コード化されたタンパク質は、甲状腺組織や授乳中の乳房組織のような組織中のヨウ素の摂取に関与する。甲状腺に取り込まれたヨウ素は、代謝調節因子のトリヨードチロニン（Ｔ－３）およびテトラヨードチロニン（Ｔ－４）に組み込まれる。この遺伝子における突然変異は、甲状腺内分泌機能不全１に関連している

【００１７】

ＴＰＯ（４．０６倍増加）：この遺伝子は、膜結合糖タンパク質をコード化する。コード化されたタンパク質は、酵素として作用し、甲状腺機能において中心的な役割を果たす。上記タンパク質は、サイログロブリン中のチロシン残基のヨウ素化およびヨウ素化チロシンのペア間におけるフェノキシ－エステル形成において機能して、甲状腺ホルモン、チロキシンおよびトリヨードチロニンを生成する。この遺伝子の突然変異は、先天性甲状腺機能亢進症、先天性甲状腺腫、甲状腺ホルモンヨード有機化障害ＩＩＡを含む甲状腺ホルモン産生の重度の障害に関連する。

【００１８】

ＴＳＨＲ（２．２倍の増加）：この遺伝子によってコード化されるタンパク質は、膜タンパク質であり、および甲状腺細胞代謝の主要なコントローラである。上記コード化されたタンパク質は、サイロトロピン（ｔｈｙｒｏｔｈｒｏｐｉｎ）およびサイロスティムリン（ｔｈｙｒｏｓｔｉｍｕｌｉｎ）に対する受容体であり、その活性は、アデニル酸シクラーゼによって媒介される。この遺伝子における障害は、重度タイプの甲状腺機能亢進症の原因となっている。

【００１９】

ＤＵＯＸ２、ＴｈＯＸ（１．５５倍の増加）：この遺伝子によりコード化されるタンパク質は、糖タンパク質であり、およびＮＡＤＰＨオキシダーゼファミリーのメンバーである。甲状腺ホルモンの合成は、甲状腺濾胞細胞の頂端膜に位置するタンパク質複合体によって触媒される。この複合体は、ヨウ化物輸送体、甲状腺ペルオキシダーゼ、およびそのコード化されたタンパク質とＤＵＯＸｌを含む過酸化物生成システムを含有する。このタンパク質は、ペルオキシダーゼ相同性ドメインとｇｐ９１ｐｈｏｘドメインとの両方を有するので、デュアルオキシダーゼ（ｄｕａｌ ｏｘｉｄａｓｅ）として知られている。

【００２０】

甲状腺機能亢進ネコ科動物の血液および甲状腺組織の両方で発現増加される他の遺伝子には、以下のものがある。

【００２１】

【表Ａ－１】

表Ａ：

CHI3L1	チキナーゼ ３－様 1 (chitinase 3-like 1) (cartilage glycoprotein-39)
PDZK1IP1	PDZK1 interacting protein 1
MAPK13	マイトジェン活性化プロテインキナーゼ13 (mitogen-activated protein kinase 13)
PGD	ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ (phosphogluconate dehydrogenase)
MBOAT7	膜結合 O-アシルトランスフェラーゼドメイン含有7 (membrane bound O-acyltransferase domain containing 7)
CTSD	フェリネヘプシン D (felinehepsin D)
CYP4F3	シトクロム P450, ファミリー 4, サブファミリー F, ポリペプチド 3 (cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 3)
TGFB1	トランスフォーミング増殖因子β 1
C20orf3	クロモソーム 20 オープンリーディテングフレーム 3 (chromosome 20 open reading frame 3)
ACAA2	アセチル-CoAアシルトランスフェラーゼ2 (acetyl-CoA acyltransferase 2)
HTATIP2	HIV-1 Tat interactive protein 2, 30kDa
RHOC	ras ホモログ・ジーン・ファミリー, メンバーC (ras homolog gene family, member C)
G6PD	グルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ

【表Ａ－２】

GSTP1	グルタチオンＳ－トランスフェラーゼπ1
CAPG	キャピングタンパク質(アクチンフィラメント), ゲルソリン様 [capping protein (actin filament), gelsolin-like]
AP1S1	アダプター関連タンパク質複合体1, シグマ1, サブユニット (adaptor-related protein complex 1 , sigma 1 subunit)
ATP6V1D	ATPase, H+ トランスポーティング, リソソーム 34kDa, VI サブユニット D (ATPase, H+ transporting, lysosomal 34kDa, VI subunit D)
CAPN1	カルパイン 1, (mu/I) ラージサブユニット [calpain 1, (mu/I) large subunit]
LASS4	LAG1 ホモログ, セラミド・シンターゼ 4 [LAG1 homolog, ceramide synthase 4]
PDCL	phosducin-like
HSD3B7	ヒドロキシ-デルタ-5-ステロイド・デヒドロゲナーゼ, 3 ベーター アンド ステロイド デルタ-イソメラーゼ 7 (hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 7)
LRPAP1	低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質関連タンパク質1 (low density lipoprotein receptor-related protein associated protein 1)
PARP3	ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ ファミリー, メンバー 3 [poly (ADP-ribose) polymerase family, member 3]
ATP6AP1	ATPase, H+ トランスポーティング, リソソームアクセサリープロテイン [ATPase, H+ transporting, lysosomal accessory protein 1]
B3GNT8	UDP-GlcNAc:ベータGal ベーター1,3-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ 8 [UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 8]
SORT1	ソルティリン 1 (sortilin 1)

【００２２】

従って、例えば、上記表Ａの遺伝子の発現増加は、甲状腺機能亢進症のバイオマーカーとして有用である。これらの遺伝子は、以前には甲状腺機能亢進症に関与することが知られていなかった。例えば、ＴＧＦＢ１は、多くの細胞型において増殖、分化、接着、泳動およびその他の機能を調節する多機能性ペプチドであるサイトカインのトランスフォーミング増殖因子β（ＴＧＦＢ）ファミリーのメンバーをコード化する。タンパク質は、多くの他の成長因子を正および負に調節する。分泌されたタンパク質は、潜在型関連ペプチド潜伏関連ペプチド（ＬＡＰ：latency-associated peptide）および成熟ＴＧＦＢ１ペプチドに切断される。上記成熟ペプチドはまた、他のＴＧＦＢファミリーのメンバーとのヘテロ二量体を形成してもよい。この遺伝子は、腫瘍細胞においてしばしば発現増加され、この遺伝子における突然変異は、結果としてエンゲルマン病（Camurati-Engelmann disease）に結びつく。以前には甲状腺機能に関与することが知られていなかった。ＣＴＳＤは、リソソームアスパラギン酸プロテアーゼをコード化する。ペプチダーゼＣ１ファミリーのメンバーである、このプロティナーゼは、ペプシンＡの特異性よりも狭いが、ペプシンＡに類似した特異性を有する。この遺伝子の転写は、エストロゲン調節転写の開始部位であるものを含むいくつかの部位から開始される。この遺伝子における突然変異は、乳癌およびおそらくアルツハイマー病を含むいくつかの疾患の病因に関与する。この遺伝子は、以前には甲状腺機能に関与することが知られていなかった。

【００２３】

甲状腺機能亢進ネコ科動物の血液および甲状腺組織の両方で発現減少される遺伝子には、以下のものがある。

【００２４】

【表Ｂ】

表Ｂ：

C13orf27	クロモソーム 13 オープンリーディテングフレーム 27 (chromosome 13 open reading frame 27)
GP1BB	グリコプロテインIb (platelet), ベータ ポリペプチド [glycoprotein Ib (platelet), beta polypeptide]
IGLL1	免疫グロブリン ラムダ様 ポリペプチド 1 (immunoglobulin lambda-like polypeptide 1)
LRRC4B	ロイシン リッチ リピート含有 4B (leucine rich repeat containing 4B)
MALT1	mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translofelineion gene 1
REV3L	REV3-like, felinealytic subunit of DNA polymerase zeta (yeast)
GNL3	グアニン ヌクレオチド結合タンパク質様 3 (核小体) [guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)]
RNPC3	RNA結合領域 (RNP1、RRM) 含有 3 [RNA-binding region (RNP1, RRM) containing 3]
LMO4	LIM ドメイン オンリー 4 (LIM domain only 4)
RFXAP	調節因子X関連タンパク質 (regulatory factor X-associated protein)
MPP6	membrane protein, palmitoylated 6 (MAGUK p55 subfamily member 6)
DTWD1	DTW ドメイン含有 1 (DTW domain containing 1)
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
TCEA3	転写伸長因子A(SII), 3 [transcription elongation factor A (SII), 3]
RPAP2	RNAポリメラーゼ II 関連タンパク質2 (RNA polymerase II associated protein 2)
ZNF292	ジンク フィンガー タンパク質 292 (zinc finger protein 292)
CSGALNACT1	硫酸コンドロイチン N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ 1 (chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1)
ZFP37	ジンク フィンガー タンパク質 37 ホモログ (マウス) [zinc finger protein 37 homolog (mouse)]
IGJ	immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobul in alpha and mu polypeptides
LTBP1	潜在型トランスフォーミング増殖因子ベータ結合タンパク質 1 (latent transforming growth factor beta binding protein 1)
ABCA5	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 5
GPRASP2	Gタンパク質共役受容体関連タンパク質選別 2 (G protein-coupled receptor associated sorting protein 2)
ARMCX1	アルマジロ リピート含有、X連鎖 1 (armadillo repeat containing, X-linked 1)
SEPP1	セレノプロテイン P, プラズマ, 1 (selenoprotein P, plasma, 1)
DCN	デコリン (decorin)

【００２５】

したがって、例えば、上記表Ｂの遺伝子の発現減少は、甲状腺機能亢進症のバイオマーカーとして有用である。例えば、ＤＣＮ遺伝子によってコード化されるタンパク質は、バイグリカンタンパク質に構造的に密接に関連する小さな細胞性または細胞周囲のマトリックスプロテオグリカンである。それは、Ｉ型コラーゲン線維に結合し、マトリックスアセンブリ内の役割を果たす、結合組織の構成要素である。これは、種々の腫瘍細胞株の増殖を抑制することができる。この遺伝子は、マルファン症候群の候補遺伝子である。以前には甲状腺機能に関連することが知られていなかった。ＳＥＰＰ１は、分泌タンパク質であり、血漿中のセレンの大部分を構成する、ポリペプチド当たり１０セレノシステイン残基を含むという点で異例である。これは、細胞外抗酸化剤として、およびセレンの輸送に関与しているが、以前には甲状腺機能に関与することが知られていなかった。

【００２６】

従って、本発明は、表Ａ（例えばＴＧＦＢ１および／またはＣＴＳＤ）および表Ｂ（例えばＤＣＮおよび／またはＳＥＰＰ１）に列挙された遺伝子；以下の遺伝子：ＩＹＤ、ＴＧ、ＳＬＣ５Ａ５、ＮＩＳ、ＴＰＯ、ＴＳＨＲ、ＤＵＯＸ１およびＤＵＯＸ２（ＴｈＯＸ）のいずれか；これらの遺伝子の発現産物；並びにそれらの組み合わせから成る群から選択される１種以上のバイオマーカーのネコ科動物における発現レベルを測定することによって、ネコ科動物において、甲状腺機能亢進症を診断する、或いは甲状腺機能亢進症のリスクまたは素因を測定する方法（方法１）を提供する。例えば、いかの方法のいずれかに

したがって、正常個体群に対する１種以上、例えば少なくとも３種、例えば５種以上、例えば少なくとも１０種の上記バイオマーカーの発現変化、または上記ネコ科動物の個々のベースラインに対する発現変化が、甲状腺機能亢進症、或いは甲状腺機能亢進症の増大したリスクまたは素因を示す。

【００２７】

１．１．上記１種以上のバイオマーカーの発現レベルが、（ｉ）測定されるべき前記１種以上のバイオマーカーに対応するｍＲＮＡに相補的である１種以上のオリゴヌクレオチドまたはｃＤＮＡを含有するＤＮＡマイクロアレイ、または（ii）測定されるべき前記１種以上のバイオマーカーに対応するｍＲＮＡまたはｃＤＮＡに対する、オリゴヌクレオチドプライマーとの定量的ポリメラーゼ連鎖反応のいずれかを用いて決定される、方法１であり、例えば

（ａ）１種以上のバイオマーカーの遺伝子発現を測定する工程が、（ｉ）組織試料からＲＮＡを単離すること、（ii）上記ＲＮＡを逆転写して対応するｃＤＮＡを得ること、（iii）得られたｃＤＮＡを単離および断片化すること、（iv）上記ｃＤＮＡフラグメントを測定されるべき上記１種以上のバイオマーカーに対応するｃＤＮＡに相補的である１種以上のオリゴヌクレオチドを含有するＤＮＡマイクロアレイと接触させること、並びに（ｖ）上記ｃＤＮＡフラグメントおよび上記１種以上のオリゴヌクレオチドの間のハイブリダイゼーションを検出すること、を含む上記方法があり、

（ｂ）上記ＤＮＡマイクロアレイにおける上記ｃＤＮＡフラグメントおよび１種以上のオリゴヌクレオチドの間のハイブリダイゼーションがストリンジェントな条件下で行われる、ハイブリダイゼーションを検出することを含む上記方法のいずれかがある。

【００２８】

１．２．上記バイオマーカーの発現レベルが、発現タンパク質に対する抗体によって検出される、方法１。

（ａ）上記バイオマーカーが、競合結合測定法、非競合結合測定法、放射免疫測定法、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）、サンドイッチ測定法、沈降反応、ゲル拡散免疫拡散測定法、凝集アッセイ、蛍光免疫測定法、化学発光免疫測定法、ｉｍｍｕｎｏ ＰＣＲ 免疫測定法、プロテインＡまたはプロテインＧ免疫測定法および免疫電気泳動測定法から成る群から選択される免疫測定法によって検出される、方法１．２。

（ｂ）酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）である上記方法。

（ｃ）上記測定法が側方流免疫クロマトグラフィー測定法である、方法１．２。

（ｄ）生体試料が血液または尿である、方法１．２。

【００２９】

１．３．上記バイオマーカーの発現レベルが、定量質量分光測定法を用いて、生体試料、例えば血液または尿における発現タンパク質を測定することによって検出される、方法１。

【００３０】

１．４．上記バイオマーカーの発現レベルが、発現タンパク質を認識するアプタマーによって検出される、方法１。

（ａ）上記アプタマーがオリゴヌクレオチドである、方法１．４。

（ｂ）上記アプタマーがペプチドである、方法１．４。

（ｃ）生体試料が血液または尿である、方法１．４。

【００３１】

１．５．正常試料における発現の対照値に対する生体試料中の１種以上のバイオマーカーの発現レベルが、１．２５倍、例えば少なくとも３０％変化である、上記方法のいずれか。

【００３２】

１．６．生体試料中の１種以上のバイオマーカーの発現レベルが、比較的一定の発現を有することが知られている１種以上の遺伝子の発現に対して標準化される、上記方法のいずれか。

【００３３】
１．７．生体試料が、甲状腺組織試料である、上記方法のいずれか。
【００３４】
１．８．生体試料が、血液である、上記方法のいずれか。
【００３５】
１．９．甲状腺機能亢進症、或いは甲状腺機能亢進症の増大したリスクまたは素因を有するネコ科動物に、ヨウ素、セレニウムまたはアラキド酸の少なくとも１種を制限する食事療法、例えばヨウ素レベルが０．３５ｍｇ／ｋｇ未満、例えば０．０１～０．２５ｍｇ／ｋｇであり、セレニウムレベルが０．１ｍｇ／ｋｇ未満、例えば０．０１～０．０５ｍｇ／ｋｇおよび／またはアラキド酸レベルが０．０２％以下、例えば０．００５～０．０１％である食事療法を提供する工程を更に含む、上記方法のいずれか。
【００３６】
１．１０．甲状腺機能亢進症、或いは甲状腺機能亢進症の増大したリスクまたは素因を有するネコ科動物に、甲状腺ホルモン産生を低減する治療、例えばＴ－４の産生を抑制する有効量の薬剤、例えばメチマゾールまたはカルビマゾールを投与すること、および／または放射線ヨウ素療法を施すこと、および／または外科的甲状腺摘除術を行うことを更に含む、上記方法のいずれか。
【００３７】
更なる態様において、本発明により、ＩＹＤ、ＴＧ、ＳＬＣ５Ａ５、ＮＩＳ、ＴＰＯ、ＴＳＨＲ、ＤＵＯＸ１およびＤＵＯＸ２（ＴｈＯＸ）；或いは表Ａまたは表Ｂの遺伝子、例えばＴＧＦＢ１、ＣＴＳＤ、ＤＣＮまたはＳＥＰＰ１；並びにそれらの発現産物から成る群から選択される１種以上のバイオマーカーの発現レベルの検出に有用な、場合により標識化された試薬を提供する。それらの例として、例えば以下のものがある。
（ａ）ＩＹＤ、ＴＧ、ＳＬＣ５Ａ５、ＮＩＳ、ＴＰＯ、ＴＳＨＲ、ＤＵＯＸ１またはＤＵＯＸ２（ＴｈＯＸ）；或いは表Ａまたは表Ｂの遺伝子、例えばＴＧＦＢ１、ＣＴＳＤ、ＤＣＮまたはＳＥＰＰ１；の発現産物から成る群から選択されるネコ科動物タンパク質を認識する抗体、例えばモノクローナル抗体、一本鎖抗体および機能的抗体フラグメント。
（ｂ）ＩＹＤ、ＴＧ、ＳＬＣ５Ａ５、ＮＩＳ、ＴＰＯ、ＴＳＨＲ、ＤＵＯＸ１またはＤＵＯＸ２（ＴｈＯＸ）；或いは表Ａまたは表Ｂの遺伝子、例えばＴＧＦＢ１、ＣＴＳＤ、ＤＣＮまたはＳＥＰＰ１；の発現産物から成る群から選択されるネコ科動物タンパク質を認識するアプタマー、例えば核酸またはヘプチド核酸アプタマー。
（ｃ）ＩＹＤ、ＴＧ、ＳＬＣ５Ａ５、ＮＩＳ、ＴＰＯ、ＴＳＨＲ、ＤＵＯＸ１またはＤＵＯＸ２（ＴｈＯＸ）；或いは表Ａまたは表Ｂの遺伝子、例えばＴＧＦＢ１、ＣＴＳＤ、ＤＣＮまたはＳＥＰＰ１；の発現産物から成る群から選択されるネコ科動物タンパク質を認識する単離および精製したまたは遺伝子組み換えしたネコ科動物タンパク質。
（ｄ）ＩＹＤ、ＴＧ、ＳＬＣ５Ａ５、ＮＩＳ、ＴＰＯ、ＴＳＨＲ、ＤＵＯＸ１またはＤＵＯＸ２（ＴｈＯＸ）；或いは表Ａまたは表Ｂの遺伝子、例えばＴＧＦＢ１、ＣＴＳＤ、ＤＣＮまたはＳＥＰＰ１；から成る群から選択されるネコ科動物遺伝子へのハイブリダイゼーションを可能とするオリゴヌクレオチドプローブ。
（ｅ）更なる態様において、本発明により、
（ｉ）ＩＹＤ、ＴＧ、ＳＬＣ５Ａ５、ＮＩＳ、ＴＰＯ、ＴＳＨＲ、ＤＵＯＸ１、ＤＵＯＸ２（ＴｈＯＸ）、ＴＧＦＢ１、ＣＴＳＤ、ＤＣＮおよびＳＥＰＰ１並びにそれらの発現産物から成る群から選択される１種以上のバイオマーカーのネコ科動物由来の生体試料における遺伝子発現を測定するための手段、および
（ii）ネコ科動物由来の生体試料における１種以上のバイオマーカーの発現を測定し、ネコ科動物における甲状腺機能亢進症の存在またはリスクを診断するために、そのような手段を使用するための指示
を含む、ネコ科動物における甲状腺障害を診断、予後または監視するためのキット（キット１）を提供する。

１．１　上記１種以上のバイオマーカーを測定するための手段が、１種以上のバイオマーカーの遺伝子発現を検出することができる１種以上の核酸プローブである、キット１。

１．２　上記１種以上のバイオマーカーの遺伝子発現を検出することができる１種以上の核酸プローブを含むＤＮＡマイクロアレイを含む、上記キットのいずれか。

１．３　上記１種以上のバイオマーカーを測定するための手段が、上記１種以上のバイオマーカーを検出することができる１種以上の抗体である、キット１。

１．４　上記１種以上のバイオマーカーを検出することができる抗体；発現タンパク質に対応する単離、精製または遺伝子組み換えしたタンパク質；および緩衝剤を含む、ＥＬＩＳＡフォーマットにおけるキット１．３。

１．５　上記１種以上のバイオマーカーを測定するための手段が、前述のように、発現タンパク質を認識することによって、上記１種以上のバイオマーカーの遺伝子発現を検出することができる１種以上のアプタマーである、キット１．３。

１．６　上記方法１のいずれかにおける用途に用いられる上記キットのいずれか。

【００３８】

本発明は更に、方法１に従った方法、またはキット１に従ったキットの製造において、

ＩＹＤ、ＴＧ、ＳＬＣ５Ａ５、ＮＩＳ、ＴＰＯ、ＴＳＨＲ、ＤＵＯＸ１またはＤＵＯＸ２（ＴｈＯＸ）；或いは表Ａまたは表Ｂからの、例えばＴＧＦＢ１、ＣＴＳＤ、ＤＣＮまたはＳＥＰＰ１；に対する遺伝子に対応するまたは相補的なヌクレオチド配列の使用方法、または

ＩＹＤ、ＴＧ、ＳＬＣ５Ａ５、ＮＩＳ、ＴＰＯ、ＴＳＨＲ、ＤＵＯＸ１またはＤＵＯＸ２（ＴｈＯＸ）；或いは表Ａまたは表Ｂからの、例えばＴＧＦＢ１、ＣＴＳＤ、ＤＣＮまたはＳＥＰＰ１；から選択されるタンパク質への抗体の使用方法、または

ＩＹＤ、ＴＧ、ＳＬＣ５Ａ５、ＮＩＳ、ＴＰＯ、ＴＳＨＲ、ＤＵＯＸ１またはＤＵＯＸ２（ＴｈＯＸ）；或いは表Ａまたは表Ｂからの、例えばＴＧＦＢ１、ＣＴＳＤ、ＤＣＮまたはＳＥＰＰ１；から選択されるタンパク質へのアプタマーの使用方法、または

ＩＹＤ、ＴＧ、ＳＬＣ５Ａ５、ＮＩＳ、ＴＰＯ、ＴＳＨＲ、ＤＵＯＸ１またはＤＵＯＸ２（ＴｈＯＸ）；或いは表Ａまたは表Ｂからの、例えばＴＧＦＢ１、ＣＴＳＤ、ＤＣＮまたはＳＥＰＰ１；から選択される単離、精製または遺伝子組み換えしたネコ科動物タンパク質の使用方法

を提供する。

【００３９】

以下に示す詳細な説明から、更に本発明の利用可能性の範囲が明らかとなる。詳細な説明および特定の実施例は、本発明の好ましい態様を示すものであるが、説明の目的のみに用いられ、本発明を制限しようとするものではないと解されるべきである。

【発明を実施するための形態】

【００４０】

以下の好ましい態様の記載は、単なる例示であり、本発明、その用途または使用を制限しようとするものではない。

【００４１】

（用語の定義）

上記「抗体」の語は、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤおよびＩｇＥ抗体を含む、特定の抗原に結合する免疫グロブリンを意味する。上記語には、ポリエピトープ特異性を有する、ポリクローナル抗体組成物、モノクローナル抗体組成物、ヒト化抗体組成物、ヘテロ共役抗体組成物；キメラ抗体、二重特異性抗体、二特異性抗体、一本鎖抗体および抗体フラグメント、例えばＦａｂ、Ｆａｂ’、$F(ab')_2$およびＦｖ、または他の抗原結合フラグメントを含む。

【００４２】

上記「アレイ」の語は、基質上に少なくとも２つのプローブの規則正しい配列を意味す

る。上記プローブの少なくとも１つ対照または標準であり、上記プローブの少なくとも１つは診断プローブである。基質上の約２～約４０，０００のプローブの配列は、プローブと試料ポリヌクレオチドまたはポリペプチドとの間に形成された各標識複合体のサイズおよびシグナル強度が個々に区別できることを保証する。上記アレイ上に配置された分子の集合体を生合成的に調製してもよい。上記アレイは、可溶性分子のライブラリー、樹脂ビーズ、シリカチップまたは他の固相担体に結合した化合物のライブラリーなどの様々な形をとることができる。核酸のアレイには、核酸を基板上に本質的に任意の長さに（長さで１～１，０００ヌクレオチド）配置することによって調製される核酸のライブラリーを含むことができる。核酸プローブのアレイは、好ましくは基板の既知の位置に結合した核酸を含む。他の態様では、上記系には、固相担体または支持体、例えば膜、フィルター、スライドガラス、マイクロウェル、試験管、ビーズ、ビーズアレイなどを含んでいてもよい。上記固体担体は、紙、セルロース、ナイロン、ポリスチレン、ポリカーボネート、プラスチック、ガラス、セラミック、ステンレス鋼などの種々の材料から作製されてもよい。上記固体担体は、好ましくは硬質または半硬質表面を有してもよく、好ましくは球状（例えばビーズ）、適当な縦穴を有する実質的に平面状（例えば、平坦表面）、隆起した部位、エッチングされた溝形などであってもよい。上記固相担体はまた、その中に核酸が埋め込まれていてもよいゲルまたはマトリックスを含んでいてもよい。

【００４３】

「バイオマーカー」の語は、遺伝子および本発明の遺伝子によってコード化された遺伝子産物またはそれらのホモログ、特にネコ科動物のホモログを表し、上記遺伝子は疾病、条件、障害、或いは物質、薬剤、栄養分または食事療法成分の投与、或いはそれらの組み合わせの結果として、特異的に発現したことが同定される。バイオマーカーは、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、タンパク質、ＲＮＡ転写産物を含むＲＮＡ、ＤＮＡ、ｃＤＮＡ、上記分子の１種以上の代謝物質、或いは上記分子のいずれか１種の有用な変異体であってもよく、上記物質の特異的発現が甲状腺障害に関連し、試験動物から採取された試料と対照動物から採取された試料における特異的発現の相関関係が、それらを必要とする動物における診断；予後；体調、疾病または障害の監視または治療；に使用することができる。加えて、バイオマーカーは、例えば本発明の測定法または他の方法において、完全長遺伝子またはタンパク質を同定または関連づけることが可能である、そのような遺伝子またはタンパク質の任意の部分またはセグメントを示すのに一般に用いることができる。バイオマーカー発現は、バイオマーカー翻訳の検出（即ち、試料中のバイオマーカータンパク質の検出）によっても確認することができる。バイオマーカータンパク質の検出に好適な方法には、細胞または細胞抽出物からタンパク質を検出および／または測定する任意の好適な方法が挙げられる。そのような方法には、それらに限定されないが、免疫ブロット（例えばウェスタンブロット）、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）、放射免疫測定法（ＲＩＡ）、免疫沈降測定法、免疫組織化学染色測定法および蛍光免疫測定法が挙げられる。タンパク質を検出するのに特に好ましい方法には、免疫組織化学染色アッセイおよび蛍光免疫アッセイなどの単細胞アッセイが挙げられる。そのような方法は当業者に公知である。更に、本明細書中に記載のバイオマーカーの内のいくつかに対する抗体は当業者に公知であり、公開文献に記載されており、それらの作製方法は当業者に公知である。

【００４４】

試験試料の発現を対照試料と比較するのに用いられる上記「比較的（に）」の語は、類似の特徴および量を示すものを意味し、それらに限定されないが、上記比較が行われ、値が試験試料と対照試料との間で特異的発現を包含する平均値付近の１つの標準偏差内の値を含む。

【００４５】

「特異的に発現した遺伝子」、「特異的遺伝子発現」、「特異的発現」または「特異的に発現した」の語、およびそれらの同意語により、互換的に用いられるが、疾病、体調または障害を患う被験体において、または物質、薬剤、栄養分または食事療法成分或いはそれらの組み合わせの投与の結果として、その発現が、正常または対照の被験体に対して、

より高いまたはより低いレベルに活性化される遺伝子を表す。上記語には、同一疾病の異なる段階で、その発現がより高いまたはより低いレベルに活性化される遺伝子も含む。

【００４６】

また、特異的に発現した遺伝子は上記核酸レベルまたはタンパク質レベルで活性されるか、または抑制されるかのいずれかであってもよく、または択一的なスプライジングを受けて異なるポリペプチド産生物となってもよいと解される。そのような違いは、ｍＲＮＡレベル、ポリペプチドの表面発現、分泌または他の分配における変化によって証明されてもよい。特異的遺伝子発現には、正常被験体と疾病、体調または障害を患う被験体との間で異なる；或いは物質、薬剤、栄養分または食事療法成分或いはそれらの組み合わせの投与の結果として異なる；或いは同一の疾病体調または障害の種々の段階の間で異なる；或いは物質、薬剤、栄養分または食事療法成分或いはそれらの組み合わせの異なる投与量の結果として異なる、２種以上の遺伝子またはそれらの遺伝子産物の間の発現の比較；または２種以上の遺伝子またはそれらの遺伝子産物の間の発現比の比較；または同一遺伝子の２つの異なる処理産物の比較；を含んでもよい。特異的発現には、例えば、正常細胞および疾病細胞の内、または異なる疾病発症または疾病段階の内の、遺伝子またはその発現産物中の時間的発現パターンまたは細胞発現パターンにおける定性的差異と同様、定量的差異の両方を含む。本発明の目的のために、試料中の転写ポリヌクレオチドまたは翻訳タンパク質の量における少なくとも約２．０、１．９、１．８、１．７、１．６、１．５、１．４、１．３、１．１または１．０倍、好ましくは少なくとも約２倍以上、より好ましくは少なくとも約２．５、３または４倍以上の変化がある場合、「特異的遺伝子発現」が存在すると考えられる。

【００４７】

特異的遺伝子発現の測定として用いられる場合の「倍」の語により、比較のネコ科動物、例えばそのような体調を示さない動物に比べて、甲状腺機能亢進症に対する兆候を有するネコ科動物、甲状腺機能亢進症に対するリスクを有するまたは甲状腺機能亢進症を有するネコ科動物における遺伝子発現量に比較して、多数または少量の遺伝子発現であるネコ科動物における遺伝子発現量を意味する。例えば、上記比較動物に比べて、上記動物において２倍多く発現した遺伝子は、２倍の特異的遺伝子発現を有し、上記比較動物に比べて、上記動物において半分多く発現した遺伝子も、２倍の特異的遺伝子発現を有する。

【００４８】

「フラグメント」の語により、（１）完全配列の一部であり、特定用途に対して完全ポリヌクレオチド配列と同様または類似の活性を有するオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列、或いは（２）完全配列の一部であり、特定用途に対して完全ポリペプチド配列と同様または類似の活性を有するペプチドまたはポリペプチド配列を意味する。そのようなフラグメントは、特定用途に好適であると考えられるいくつのヌクレオチドまたはアミノ酸を含有していてもよい。上記完全配列から、一般に、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドフラグメントは、少なくとも約１０、５０、１００または１，０００のヌクレオチドを含有し、ポリペプチドフラグメントは連続する少なくとも約４、１０、２０または５０のアミノ酸を含有する。上記語には、上記フラグメントのポリヌクレオチドおよびポリペプチド変異体を包含する。例えば、ポリヌクレオチドは、複数のセグメントに分解、または断片化されることができる。

【００４９】

核酸を断片化する様々な方法が、当業者に公知である。これらの方法は、例えば性質上、化学的方法または物理的方法のいずれであってもよい。化学的断片化には、ＤＮＡｓｅを用いる部分的分解；酸を用いる脱プリン化；制限酵素の使用；イントロンによりコード化されるエンドヌクレアーゼ；核酸セグメントの特殊ハイブリダイゼーションに依存して切断剤を核酸分子中の特定位置に制限するＤＮＡ系切断法、例えば三重螺旋およびハイブリッド形成法；または、ＤＮＡを既知または未知の位置で切断する他の酵素または化合物を含む。物理的断片化法には、ＤＮＡに高剪断速度をかける方法を含む。高剪断速度は、例えばＤＮＡを、穴またはスパイクを有するチャンバーまたは通路を通過して移動させる

ことによって、或いは上記ＤＮＡ試料をサイズを制限した流路、例えばミクロンまたはサブミクロンサイズの断面寸法を有する開口を強制的に通過させることによって、生じさせることができる。他の物理的方法には、音波破砕および噴霧化を含む。更に、物理的および化学的断片化法を組み合わせてもよく、例えば熱およびイオン媒介加水分解による断片化がある。例えば、Sambrook et al., “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)（以下、“Sambrook et al.”という）参照、その記載をすべての目的のために、本明細書中に挿入する。これらの方法は、核酸を選択されたサイズ範囲のフラグメントに消化するように最適化することができる。有用なサイズ範囲は、１００、２００、４００、７００または１，０００から、５００、８００、１，５００、２，０００、４，０００または１０，０００塩基対（ｂｐ）であってもよい。しかしながら、より大きいサイズ、例えば４，０００、１０，０００または２０，０００から１０，０００、２０，０００または５００，０００塩基対（ｂｐ）も有用であってもよい。

【００５０】

「遺伝子」の語により、コード領域の前後の領域（リーダーおよびトレーラー）および個々のコードセグメント（エクソン）の間の介在配列（イントロン）を含む、ポリペプチドの産生に関与するＤＮＡの完全なまたは部分的セグメントを意味する。上記語には、遺伝子コード配列の相補体にハイブリダイゼーションする、如何なるＤＮＡ配列も包含する。

【００５１】

「ホモログ」の語により、（１）３０％、５０％、７０％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％を超えるポリヌクレオチドに対する配列類似性を有し、完全なポリヌクレオチドと同一または実質的に同一の特性を有し、同一または実質的に同一の機能を果たし、ストリンジェントな条件下でポリヌクレオチドに対して特異的にハイブリダイゼーションすることができる、同一または異なる動物種由来のポリヌクレオチド類を含むポリヌクレオチド、或いは

（２）ポリヌクレオチドの発現によって同定されるポリペプチドに対する、３０％、５０％、７０％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％を超える配列類似性を有し、完全なポリペプチドと同一または実質的に同一の特性を有し、同一または実質的に同一の機能を果たし、ポリヌクレオチドの発現によって同定されるポリペプチドに特異的に結合することができる、同一または異なる動物種由来のポリペプチド類を含むポリペプチド、を意味する。２つのポリペプチド配列または２つのポリヌクレオチド配列の配列類似性は、当業者に公知の方法、例えば、ＫａｒｌｉｎおよびＡｌｔｓｃｈｕｌ（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268（1990））のアルゴリズムを用いて決定される。このようなアルゴリズムは、ＡｌｔｓｃｈｕｌらのＮＢＬＡＳＴおよびＸＢＬＡＳＴプログラム（J. Mol. Biol. 215:403-410（1990））に組み込まれている。Ａｌｔｓｃｈｕｌら（Nucl. Acids Res. 25：3389-3402（1997））に記載されるように、比較目的のギャップ付きアラインメントを得るために、Ｇａｐｐｅｄ Ｂｌａｓｔを利用することができる。ＢＬＡＳＴおよびＧａｐｐｅｄＢＬＡＳＴプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えば、ＸＢＬＡＳＴおよびＮＢＬＡＳＴ）のデフォルトパラメーターが使用される。http://www.ncbi.nlm.nih.gov　参照。

【００５２】

「ハイブリダイゼーション」の語により、２つの一本鎖ポリヌクレオチドが非共有結合して、安定した二本鎖ポリヌクレオチドを形成する方法を表す。また、「ハイブリダイゼーション」の語により、三本鎖ハイブリダイゼーションを表してもよい。得られる（通常は）二本鎖ポリヌクレオチドは「ハイブリッド」である。安定なハイブリッドを形成するポリヌクレオチドの集団の比率は、本明細書では、「ハイブリダイゼーションの程度」と表す。

【００５３】

ハイブリダイゼーション反応は、絶対的または示差的ハイブリダイゼーション形式で行

うことができる。絶対的ハイブリダイゼーション形式では、１つの試料に由来するポリヌクレオチドを、核酸アレイ中のプローブに対してハイブリダイゼーションする。ハイブリダイゼーション複合体の形成後に検出されたシグナルは、試料中のポリヌクレオチドレベルと相関する。示差的ハイブリダイゼーション形式では、２つの試料に由来するポリヌクレオチドが、異なる標識部分を用いて標識される。これらの異なった標識をされたポリヌクレオチドの混合物を、核酸アレイに加える。上記核酸アレイは、次いで、２つの異なる標識からの発光が個々に検出される条件下で試験される。１つの態様においては、フルオロフォアＣｙ３およびＣｙ５（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）を、示差的ハイブリダイゼーション形式のための標識部分として使用する。

【００５４】

核酸アレイから収集されたシグナルは、例えば、ＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘまたはＡｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによって提供されるような、市販のソフトウェアを用いて分析することができる。このような走査感度、プローブ標識およびｃＤＮＡまたはｃＲＮＡ定量化のための対照は、好ましくはハイブリダイゼーション実験に含まれる。ハイブリダイゼーションシグナルは、さらなる分析の対象とされる前にスケーリングまたは標準化することができる。例えば、個々の各プローブに対するハイブリダイゼーションシグナルは、複数のアレイが同様の試験条件下で使用される場合、ハイブリダイゼーション強度の変動を考慮に入れるように標準化することができる。ハイブリダイゼーションシグナルは、各アレイ上に含まれる内部標準化対照に由来する強度を用いて標準化することができる。また、試料内で比較的一定の発現レベルを有する遺伝子は、他の遺伝子の発現レベルを標準化するために使用することができる。１つの態様では、特定のメンテナンス遺伝子（ｍａｉｎｔｅｎａｎｃｅ ｇｅｎｅｓ）のためのプローブは、本発明の核酸アレイに含まれる。様々な組織内で安定した発現レベルを示すため、これらの遺伝子が選択される。ハイブリダイゼーションシグナルは、これらのメンテナンス遺伝子の発現レベルをベースとして、標準化および／またはスケーリングすることができる。

【００５５】

「ハイブリダイゼーション複合体」の語により、１つのポリヌクレオチド水素結合のプリンが、相補的なポリヌクレオチドのピリミジン、例えば３’－Ｔ－Ｃ－Ａ－Ｇ－５’を有する５’－Ａ－Ｇ－Ｔ－Ｃ－３’塩基対と結合する際に、試料ポリヌクレオチド間に形成される複合体を意味する。相補性の程度およびヌクレオチド類似体の使用により、ハイブリダイゼーション反応の効率およびストリンジェンシーに影響を与える。

【００５６】

「ハイブリダイゼーションプローブ」の語により、核酸の相補鎖に塩基特異的に結合することができる核酸（オリゴヌクレオチドなど）を含む。そのようなプローブには、Nielsen et al, Science 254: 1497-1500（1991）、Nielsen Curr. Opin. Biotechnol, 10:71-75（1999）に記載されているようなペプチド核酸、および他の核酸類似体および核酸模倣物を含む。１９９６年４月３日出願の米国特許第６，１５６，５０１号参照。

【００５７】

「核酸配列」の語により、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチドまたはポリヌクレオチド、およびそれらのフラグメントまたはその一部、並びに一本鎖または二本鎖であってもよく、かつセンスまたはアンチセンス鎖を表してもよい、ゲノムまたは合成起源のＤＮＡまたはＲＮＡを意味する。

【００５８】

「ポリヌクレオチド」または「オリゴヌクレオチド」の語により、ヌクレオチドのポリマーを意味する。上記語には、一本鎖または二本鎖のいずれかである（ｃＤＮＡおよびｍＲＮＡを含む）ＤＮＡおよびＲＮＡ分子を包含し、一本鎖であれば、線状または環状形態のいずれかの、その相補的な配列を包含する。上記語はまた、元の配列と、同一または実質的に同一である特性を有し、かつ同一または実質的に同一の機能を果たすための適切な配列として、フラグメント、変異体、ホモログ、および対立遺伝子を包含する。上記配列

は整列させた場合に完全に相補的（不一致なし）であってもよく、または約３０％以下の配列の不一致を有していてもよい。ポリヌクレオチド鎖には、好ましくは約２０～１０，０００のヌクレオチド、より好ましくは約１５０～３，５００のヌクレオチドを含有する。オリゴヌクレオチド鎖には、好ましくは約２から１００のヌクレオチド、より好ましくは約６～３０のヌクレオチドを含有する。ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの正確なサイズは、様々な要因、並びにポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの特定の適用および用途に依存する。上記語には、合成し、単離し、天然源から精製されるヌクレオチドのポリマーを含む。「ポリヌクレオチド」の語には、「オリゴヌクレオチド」が包含されている。

【００５９】

「ポリペプチド」、「ペプチド」または「タンパク質」の語により、アミノ酸のポリマーを意味する。上記語には、天然および非天然（合成）ポリマー、並びに人工の化学的ミメティクスで１つ以上のアミノ酸を置換したポリマーを包含する。上記語にはまた、元の配列と、同一または実質的に同一の特性を有し、同一または実質的に同一の機能を果たす、フラグメント、変異体、およびホモログを包含する。上記語には、任意の長さのポリマー、好ましくは約２～１，０００のアミノ酸、より好ましくは約５～５００のアミノ酸を含有するポリマーを包含する。上記語には、合成し、単離し、天然源から精製されるアミノ酸ポリマーを含む。

【００６０】

「プローブ」の語により、（１）精製された制限酵素消化物のように天然に存在しようとも合成により生成されようとも、プローブに相補的な配列とのアニーリングが可能であるか、またはプローブに相補的な配列と特にポリヌクレオチドにハイブリダイゼーションすることが可能であるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド、ＲＮＡまたはＤＮＡのいずれか、或いは（２）他のタンパク質またはタンパク質フラグメントを実質的に排除するように、特定のタンパク質またはタンパク質フラグメントを特に結合することができるペプチドまたはポリペプチド、を意味する。オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドプローブは、一本鎖または二本鎖のいずれであってもよい。プローブの正確な長さは、温度、供給源、および用途を含む多くの要因に依存する。例えば、診断用途のために、標的配列の複雑さに依存して、オリゴヌクレオチドプローブは、典型的には約１０～１００、１５～５０、または１５～２５のヌクレオチドを含む。ある特定の診断用途においては、ポリヌクレオチドプローブは、約１００～１，０００、３００～６００のヌクレオチド、好ましくは約３００のヌクレオチドを含む。本明細書中におけるプローブは、特定の標的配列の異なる鎖に「実質的に」相補的であるように選択される。これは、プローブが１組の所定の条件下で、それらのそれぞれの標的配列と特異的にハイブリダイゼーションまたはアニールするのに十分に相補的でなければならないことを意味する。したがって、プローブ配列は、標的の正確な相補配列を反映する必要はない。例えば、非相補的ヌクレオチドフラグメントがプローブ配列の残りが標的配列に相補的で、プローブの５'または３'末端に結合してもよい。あるいは、プローブ配列が、標的ポリヌクレオチドに特異的にアニーリングするのに標的ポリヌクレオチドの配列と十分な相補性を有する限り、非相補的塩基またはより長い配列は、プローブ内に散在させることができる。ペプチドまたはポリペプチドプローブは、（ＤＮＡ結合タンパク質の）ＤＮＡ、抗体、細胞膜受容体、ペプチド、補因子、レクチン、糖類、多糖類、細胞、細胞膜、細胞小器官および細胞小器官の膜を含む、タンパク質またはペプチドが特異的に結合する任意の分子であってもよい。

【００６１】

「試料」および「検体」の語により、ＤＮＡおよびＲＮＡを含有する細胞や他の組織などの、任意の動物組織またはポリヌクレオチドを含有する液体、を意味する。例としては、血液、腎臓、結合組織（ｃｏｎｎｅｃｔｉｖｅ）、上皮細胞、リンパ系、筋肉、神経、痰などが挙げられる。試料は固体または液体であってもよく、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ｃＤＮＡを含有してもよく、例えば、血液や尿などの体液、細胞、細胞調製物または可溶性画分、或いはそれらのメディアアリコート、染色体、細胞小器官などを含むことができる。

【００６２】
「特異的に結合する」の語により、その構造に依存している２つの分子、特にその分子側鎖基間の特別かつ正確な相互作用を意味する。例えば、ＤＮＡ分子の主溝内への調節タンパク質の挿入、２つの一本鎖核酸間の主鎖に沿った水素結合、またはタンパク質のエピトープとアゴニスト、アンタゴニスト、または抗体との間の結合がある。
【００６３】
「特異的にハイブリダイゼーションする」の語によって、当該分野で一般的に使用される所定の条件でこのようなハイブリダイゼーションを可能にするのに十分に相補的な（時には「実質的に相補的な」）配列の２つの一本鎖ポリヌクレオチド間の会合を意味する。例えば、上記語は、非相補的配列の一本鎖ポリヌクレオチドとポリヌクレオチドプローブとのハイブリダイゼーションを実質的に排除して、本発明の態様の一本鎖ＤＮＡまたはＲＮＡ分子内に含まれる実質的に相補的な配列を有するポリヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーションを表してもよい。
【００６４】
「ストリンジェントな条件」の語により、０．２×ＳＳＣおよび０．１％ＳＤＳ中４２℃での洗浄、または０．０１５ＭのＮａＣｌ、０．００１５Ｍのクエン酸ナトリウム、０．１％のNa_2SO_4を用いる５０℃での洗浄、或いは類似の低イオン強度および高温洗浄剤および類似の変性剤を用いる類似の技術分野で認められた手順を用いる、（１）０．１％ウシ血清アルブミン、０．１％フィコール、０．１％ポリビニルピロリドン、７５０ｍＭのＮａＣｌを含むｐＨ６．５の５０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液、７５ｍＭクエン酸ナトリウムを有する、５０％（体積／体積）のホルムアミド中４２℃でのハイブリダイゼーション、（２）５×ＳＳＣ（０．７５ＭのＮａＣｌ、０．０７５Ｍのクエン酸ナトリウム）、５０ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ６．８）、０．１％ピロリン酸ナトリウム、５×デンハルト（Ｄｅｎｈａｒｄｔ‘ｓ）溶液、超音波処理したサケ精子ＤＮＡ（５０ｍｇ／ｍＬを、０．１％ＳＤＳ、および４２℃での１０％硫酸デキストランを有する、５０％（体積／体積）のホルムアミド中４２℃でのハイブリダイゼーションを意味する。
【００６５】
「有用な変異」の語により、（１）ポリヌクレオチドについて、ポリヌクレオチドの相補体、ポリヌクレオチドのホモログおよびその相補体；ポリヌクレオチドの変異体、その相補体、およびそのホモログ；並びにポリヌクレオチドのフラグメント、その相補体、そのホモログ、およびその変異体、並びに（２）ポリペプチドについて、ポリペプチドのホモログ；ポリペプチドの変異体およびそのホモログ；およびポリヌクレオチドのフラグメント、そのホモログ、およびその変異体を意味する。
【００６６】
「変異体」の語により、（１）ポリヌクレオチド配列から、またはポリヌクレオチド配列への、１つまたはそれ以上のヌクレオチドの任意の置換、変異、改変、置換、欠失、または付加を含み；かつ元の配列と、同一または実質的に同一の特性を有し、同一または実質的に同一の機能を果たす、ポリヌクレオチド配列、並びに（２）ポリペプチド配列から、またはポリペプチド配列への、１つまたはそれ以上のアミノ酸の任意の置換、変異、改変、置換、欠失、または付加を含み；かつ元の配列と、同一または実質的に同一の特性を有し、同一または実質的に同一の機能を果たす、ポリペプチド配列を意味する。従って、上記語には、一塩基多型（ＳＮＰｓ）および対立遺伝子変異体を含み、ポリペプチドにおける保存的および非保存的アミノ酸置換を含む。上記語はまた、適当な方法で、天然に生じないヌクレオチドまたはアミノ酸を用いる、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの化学的誘導体およびヌクレオチドまたはアミノ酸の置換を包含する。
【００６７】
特に定義しない限り、本明細書で用いられるすべての技術用語および科学用語並びに略語は、通常、本発明の技術分野における当業者によって理解されるものと同様の意味を有する。
【００６８】

（プローブ）
本発明の実施に有用であり、ネコ科動物試料中のネコ科動物バイオマーカーの同定に用いられるプローブは、より十分に本明細書で説明されるように、アフィメトリクス（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ）製の独自のネコ科動物遺伝子チップ、「Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ Ｆｅｌｉｎｅ ＧｅｎｅＣｈｉｐ（登録商標）」に用いられる以下のプローブ識別番号に対応している。

【００６９】
本発明の他のおよび更なる目的、特徴、および優位性は、当業者には容易に明らかであろう。

【００７０】
本開示を通して、本発明の様々な態様が範囲形式で提示することができる。範囲形式での記載が単に便宜上および簡潔化のためであり、本発明の範囲に対する柔軟性のない限定であると解釈すべきではないことを理解すべきである。従って、範囲の記載は、その範囲内の全ての可能な部分範囲、ならびに個々の数値を明確に開示していると考えるべきである。例えば、１～５のような範囲の記載は、１～３、１～４、２～４、２～５、３～５などの具体的に開示された部分範囲、並びに範囲内の個々の数、例えば、１、２、３、４、および５を有すると考えるべきである。これは範囲の広さにかかわらず適用される。

【００７１】
特に表示しない限り、本発明の実施は、本技術分野の範囲内である有機化学、ポリマー技術、（組換え技術を含む）分子生物学、細胞生物学、生化学、および免疫学の従来技術および記載を使用することができる。このような従来技術には、ポリマーアレイ合成、ハイブリダイゼーション、ライゲーション、および標識を用いたハイブリダイゼーションの検出を含む。好適な技術の具体的な説明は、以下の例を参照することにより得ることができる。しかしながら、他の同等の従来の方法も、当然、使用することができる。そのような従来技術および記載は、次のような標準的な実験室マニュアル、例えば、ゲノム解析：A Laboratory Manual Series (Vols. I-IV)；抗体の使用：A Laboratory Manual；細胞：A Laboratory Manual；ＰＣＲプライマー：A Laboratory Manual；および
分子クローニング：A Laboratory Manual (all from Cold Spring Harbor Laboratory Press); Stryer, L. (1995) Biochemistry (4th Ed.) Freeman, New York; Gait, "Oligonucleotide Synthesis: A PracticaＬＡＰproach" 1984, IRL Press, London, Nelson and Cox (2000); Lehninger, Principles of Biochemistry 3rd Ed., W.H. Freeman Pub., New York, N.Y; and Berg et al. (2002) Biochemistry, 5th Ed., W.H. Freeman Pub., New York, N.Y.；に記載されており、すべての目的のための参照により、その全体が本明細書中に組み込まれる。

【００７２】
本発明に有用である核酸アレイとして、アフィメトリクス（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ；カリフォルニア州サンタクララ）社から商品名「ＧｅｎｅＣｈｉｐ（登録商標）」で市販されているものが挙げられる。例えば、アレイの例は、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ.ｃｏｍのウェブサイトに示されている。

【００７３】
また、本発明は、固体基質に付着したポリマーのための多くの用途を想定している。これらの用途には、遺伝子発現の監視、プロファイリング、ライブラリースクリーニング、遺伝子型判定および診断が含まれる。遺伝子発現を監視およびプロファイリングする方法は、米国特許第５，８００，９９２号、第６，０１３，４４９号、第６，０２０，１３５号、第６，０３３，８６０号、第６，０４０，１３８号、第６，１７７，２４８号、第６，３０９，８２２号および第６，３４４，３１６号に示されている。遺伝子型判定および使用は、したがって、米国特許出願第６０／３１９，２５３、第１０／０１３，５９８号、並びに米国特許第５，８５６，０９２号、第６，３００，０６３号、第５，８５８，６５９号、第６，２８４，４６０号、第６，３６１，９４７号、第６，３６８，７９９号および第６，３３３，１７９号に示されている。他の使用は、米国特許第５，８７１，９２

８号、第５，９０２，７２３号、第６，０４５，９９６号、第５，５４１，０６１号および第６，１９７，５０６号において具体化される。

【００７４】

当業者は、本発明において具体化される製品および方法は、当技術分野で公知の種々の方法を用いて様々な材料で構成される、核酸プローブアレイ、膜ブロット、マイクロウェル、ビーズおよび試験管などの市販の遺伝子発現監視システムを含む種々のシステムに適用することができることを認識するであろう。従って、本発明は、如何なる特定の環境にも限定されるものではなく、本発明の特定の実施態様の以下の説明は、例示の目的のためだけである。

【００７５】

好ましい実施態様では、遺伝子発現監視システムは、（オリゴヌクレオチドアレイ、ｃＤＮＡアレイ、スポットされたアレイ等を含む）核酸プローブアレイ、（例えば、ノーザン、サザン、ドットなどのハイブリダイゼーション分析で使用される）膜ブロット、或いはマイクロウェル、試験管、ビーズまたは繊維（または結合した核酸を含む任意の固相担体）を含んでもよい。参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第５，７７０，７２２号、第５，７４４，３０５号、第５，６７７，１９５号、第５，４４５，９３４号および第６，０４０，１９３号を参照のこと。遺伝子発現監視システムはまた、溶液中の核酸プローブを含んでもよい。

【００７６】

また、本発明は、増幅を含む試料調製を考慮している。ゲノム試料は、例えば、それらの内のいくつかがＰＣＲを用いることができる種々の機構によって増幅することができる。例えば、ＰＣＲ技術：Principles and Applications for ＤＮＡ Amplification (Ed. H. A. Erlich, Freeman Press, NY, N.Y., 1992)；ＰＣＲプロトコル：A Guide to Methods and Applications (Eds. Innis, et al, Academic Press, San Diego, Calif, 1990)；Mattila et al, Nucleic Acids Res. 19, 4967 (1991)；Eckert et al, PCR Methods and Applications 1, 17 (1991)；PCR (Eds. McPherson et al, IRL Press, Oxford)；および米国特許第４，６８３，２０２号、第４，６８３，１９５号、第４，８００，１５９号、第４，９６５，１８８号および第５，３３３，６７５号を参照のこと、およびこれらの各々は、すべての目的のための参照により、その全体が本明細書中に組み込まれる。上記試料は、アレイ上で増幅されてもよい。例えば、参照により本明細書中に組み込まれる、米国特許第６，３００，０７０号および米国特許出願第０９／５１３，３００号を参照のこと。

【００７７】

他の好適な増幅方法には、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）（例えば、Wu and Wallace, Genomics 4, 560 (1989), Landegren et al, Science 241, 1077 (1988) および Barringer et al. Gene 89:117 (1990)）、転写増幅（Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173 (1989)および国際公開第８８／１０３１５号）、自家持続配列複製法（self-sustained sequence replication; Guatelli et al, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 87, 1874 (1990)および国際公開第９０／０６９９５号）、標的ポリヌクレオチド配列の選択的増幅（米国特許第６，４１０，２７６号）、コンセンサス配列プライムドポリメラーゼ連鎖反応（ＣＰ－ＰＣＲ）（米国特許第４，４３７，９７５号）、任意プライムポリメラーゼ連鎖反応（ＡＰ－ＰＣＲ）（米国特許第５，４１３，９０９号、第５，８６１，２４５号）と核酸系配列増幅（ＮＡＢＳＡ）（参照により本明細書に組み込まれる各々は、米国特許第５，４０９，８１８号、第５，５５４，５１７号および第６，０６３，６０３号を参照のこと）を含む。使用され得る他の増幅方法は、米国特許第５，２４２，７９４号、第５，４９４，８１０号、第４，９８８，６１７号、第６，３４４，３１６号および米国特許出願第０９／８５４，３１７号に記載されており、これらの各々は、参照により本明細書中に組み込まれる。

【００７８】

試料調製の追加の方法および技術は、Dong et al, Genome Research 11, 1418 (2001)

、米国特許第６，３６１，９４７号、第６，３９１，５９２号、米国特許出願第０９／９１６，１３５号、第０９／９２０，４９１号、第０９／９１０，２９２号および第１０／０１３，５９８号に記載されている。

【００７９】

本発明の遺伝子発現監視システムは、異なる細胞または組織、同じ細胞または組織の異なる亜個体群、同じ細胞または組織の異なる生理的状態、同じ細胞または組織の異なる発育段階、或いは同じ組織の異なる細胞個体群における発現の比較分析を容易にするために使用され得る。好ましい施態様において、本発明の比例増幅方法は、試験した試料中の定性的な違いと同様に定量的な違いの測定を容易にするのに十分な（即ち、統計的に有意な誤差または信頼度の範囲内で）再現性のある結果を提供することができる。

【００８０】

ポリヌクレオチドハイブリダイゼーションアッセイは、当業者に公知である。ハイブリダイゼーションアッセイの手順および条件は、用途に応じて変化し、Maniatis et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Ed. Cold Spring Harbor, N.Y, 1989); Berger and Kimmel Methods in Enzymology, Vol. 152, Guide to Molecular Cloning Techniques (Academic Press, Inc., San Diego, Calif, 1987); Young and Davis, P.N.A.S, 80: 1194 （1983）に記載されたものを含む公知の一般的結合方法に従って、選択される。繰り返しおよび制御されたハイブリダイゼーション反応を実施するための方法および装置は、それぞれが参照により本明細書中に組み込まれる、米国特許第５，８７１，９２８号、第５，８７４，２１９号、第６，０４５，９９６号、第６，３８６，７４９号および第６，３９１，６２３号に記載されている。特定の好ましい実施態様におけるリガンド間のハイブリダイゼーションのシグナル検出は、米国特許第５，１４３，８５４号、第５，５７８，８３２号、第５，６３１，７３４号、第５，８３４，７５８号、第５，９３６，３２４号、第５，９８１，９５６号、第６，０２５，６０１号、第６，１４１，０９６号、第６，１８５，０３０号、第６，２０１，６３９号、第６，２１８，８０３号および第６，２２５，６２５号、米国特許出願第６０／３６４，７３１号およびＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＵＳ９９／０６０９７（国際公開第９９／４７９６４号として公開）を参照のこと、これらの各々はまた、すべての目的のための参照により、その全体が本明細書中に組み込まれる。信号検出および強度データの処理のための方法および装置は、例えば、米国特許第５，１４３，８５４号、第５，５４７，８３９号、第５，５７８，８３２号、第５，６３１，７３４号、第５，８００，９９２号、第５，８３４，７５８号、第５，８５６，０９２号、第５，９０２，７２３号、第５，９３６，３２４号、第５，９８１，９５６号、第６，０２５，６０１号、第６，０９０，５５５号、第６，１４１，０９６号、第６，１８５，０３０号、第６，２０１，６３９号、第６，２１８，８０３号および第６，２２５，６２５号、米国特許出願第６０／３６４，７３１号およびＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＵＳ９９／０６０９７（国際公開第９９／４７９６４号として公開）に開示されており、その各々はまた、すべての目的のための参照により、その全体が本明細書中に組み込まれる。

【００８１】

変更することができるため、本発明は、本明細書中に記載された特定の方法、プロトコル、および試薬に限定されない。また、本明細書中で使用される用語は、特定の実施態様を説明する目的のためだけであり、本発明の範囲を限定しようするものではない。

【００８２】

１つの実施態様において、本発明は、正常な動物と比較して異常な動物において特異的に発現する、１つ以上の遺伝子または遺伝子セグメント（本明細書で定義される「遺伝子」）を包含する。本発明は、正常な動物と比較して異常な動物において特異的に発現するポリヌクレオチドの発見に基づくものである。上記遺伝子は、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ ＧｅｎｅＣｈｉｐ（登録商標）技術を使用して、正常と診断された動物からの組織試料中の遺伝子と、異常を有すると診断された動物から採取した組織試料における遺伝子の発現を比較することによって同定される。

【００８３】

上記ポリヌクレオチドおよび遺伝子は、正常と診断されたネコ科動物からの組織試料における遺伝子発現と比較して、異常と診断され、甲状腺障害を有するネコ科動物から採取した組織試料との遺伝子発現の違いを測定することによって同定される。遺伝子発現における変化は、当業者に公知の任意の方法によって決定することができる。一般に、遺伝子発現における変化は、転写を測定する（遺伝子によって産生されるｍＲＮＡの量を決定する）ことによって、または翻訳を測定する（遺伝子によって産生されるタンパク質の量を決定する）ことによって決定される。遺伝子によって産生されるＲＮＡまたはタンパク質の量は、ポリヌクレオチドおよびタンパク質を定量するための当業者に公知の任意の方法を用いて決定することができる。

【００８４】

一般に、ｍＲＮＡ発現は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）（それらに限定されないが、逆転写-ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）および定量的リアルタイムＰＣＲ（ｑＰＣＲ））、短いまたは長いオリゴヌクレオチドアレイ、ｃＤＮＡアレイ、ＥＳＴ配列決定、ノーザンブロット法、ＳＡＧＥ、ＭＰＳＳ、ＭＳ、ビーズアレイおよび他のハイブリダイゼーション法を用いて決定される。測定されたＲＮＡは、通常、ｍＲＮＡまたは逆転写されたｍＲＮＡの形である。

【００８５】

タンパク質またはポリペプチドの発現は、定量的ウェスタンブロット法、ＥＬＩＳＡ、２Ｄ－ゲル、ガスクロマトグラフィーまたは液体クロマトグラフィー、質量分析、ローリーアッセイ、ビウレットアッセイ、蛍光アッセイ、比濁法、ビシンコニン酸アッセイ、タンパク質チップ技術、赤外線吸光度、ニンヒドリン、ブラッドフォードアッセイ、および紫外線吸光度などの様々な比色および分光学的アッセイおよび方法を使用して決定される。

【００８６】

遺伝子チップは、生物学的プロセスの大規模な研究と、ある一定の時点での細胞内の活性の測定を可能とする。マイクロアレイ解析は、大規模な遺伝学的基礎についての表現型の差異を考慮できるようにするものである。遺伝子発現産物の実際の測定は、配列の決定それ自体より、遺伝子機能のより正確な指標である。マイクロアレイ解析は、所定の時点での細胞における遺伝子のｍＲＮＡ転写物の濃度を定量することをベースとしている。ＤＮＡは媒体上に固定され、標識された標的ｍＲＮＡは、アレイ上でプローブを用いてハイブリダイゼーションする。プローブへの標識されたｍＲＮＡの結合は、レーザー解析によって測定される。測定は、放出された光子のカウントである。チップ全体を走査し、デジタル画像化する。画像は、プローブを配置し、各プローブに強度測定を割り当てるために処理される。このように、発現増加およびダウンした遺伝子を決定することができる。上記分析により、当業者が、類似した発現プロファイルを有する遺伝子群を発見することおよび類似した発現プロファイルを有する組織を決定することを可能とする。このように、組織試料において観察された違いを説明する遺伝子を同定することができる。

【００８７】

アフィメトリクス（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ）遺伝子チップは、通常、２５ｂｐのプローブおよび特定の遺伝子またはＥＳＴに対応する１１から２０までのプローブのプローブセットを採用している。上記チップは、２５ｂｐの各パーフェクトマッチとミスマッチのプローブで構成されており、前者は遺伝子の特定の領域に完全に相補的であり、後者はミスマッチにするために置換された１３番目の塩基対を有する。プローブ要約アルゴリズム（ｐｒｏｂｅ ｓｕｍｍａｒｉｚａｔｉｏｎ ａｌｇｏｒｉｔｈｍ）を、プローブ値（ｐｒｏｂｅ ｖａｌｕｅ）のプローブ設定発現値への変換である、バックグラウンド補正、正規化およびプローブ要約を決定するために使用する。ＲＭＡは、この目的のために使用され得る上記アルゴリズムの一つである。このアルゴリズムは、プローブレベルの強度測定の分析、正規化および要約（ｓｕｍｍａｒｉｚａｔｉｏｎ）の最後の２つの工程を実行する。パーフェクトマッチの値は、したがって、１組の発現測定値に、バックグラウンド補正され、正規化され、要約される。

【００８８】
生データは、ＧｅｎｅＳｐｒｉｎｇのバージョン７．０（ＧＳ）ソフトウェア（アジレント社（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ））を用いて解析し、Ｒ－バイオコンダクター（Ｒ－Ｂｉｏｃｏｎｄｕｃｔｏｒ；ＲＢ）のフリーウェアを使用して検証される。両方のソフトウェアパッケージは、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔにより作成されたＣＥＬファイルからプローブ強度を計算するために使用される。プローブごとのプレゼント／アブセント/マージナル（Present/Absent/Marginal）のコールおよびＰ値を、別々に、Ｒ－バイオコンダクターとＧｅｎｅＳｐｒｉｎｇのソフトウェアを使用して計算する。

【００８９】
一般的に、正常な動物と比較して異常な動物での特異的遺伝子発現は、少なくとも１つの遺伝子の発現を測定することによって決定される。好ましくは、２つまたはそれ以上の特異的に発現された遺伝子の発現は、遺伝子発現パターンまたは遺伝子発現プロファイルを提供するために測定される。より好ましくは、複数の特異的に発現された遺伝子の発現は、より重要な遺伝子発現パターンまたはプロファイルのための追加情報を提供するために測定される。

【００９０】
本発明は、腎疾患のマーカーとして、共にまたは単独で使用する、または使用することができる複数のマーカーを提供する。本発明の特に有用な実施態様では、これらの複数のマーカーを選択することができ、それらのｍＲＮＡ発現は、本出願に記載された発明の様々な態様において使用するための発現プロファイルを提供するのと同時に測定してもよい。

【００９１】
別の態様において、本発明は、正常なネコ科動物に比べて異常なネコ科動物において特異的に発現する複数の遺伝子の発現を検出するのに好適な装置を提供する。上記装置は、既知の位置で基板に固定された複数の本発明のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドプローブを有する基板を備える。上記装置は、本質的に、本明細書中に記載のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドプローブの固定化されたバージョンです。上記装置は、遺伝子およびポリヌクレオチド並びにその発現パターンおよびプロファイルの、迅速かつ特異的な検出に有用である。典型的には、このようなプローブは、基板または類似の固相担体に結合され、試料ポリヌクレオチドがプローブにハイブリダイゼーションすることができるように、１つまたは複数のポリヌクレオチドを含有する試料（例えば、遺伝子、ＰＣＲ生成物、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）生成物、増幅技術を用いて合成されたＤＮＡ配列、またはそれらの混合物）を、上記プローブに暴露する。上記プローブ、試料ポリヌクレオチド、またはその両方は、典型的には、フルオロフォアまたはストレプトアビジンなどの他のタグで標識し、当業者に公知の方法を用いて検出される。上記試料ポリヌクレオチドが標識される場合、ハイブリダイゼーションは、結合した蛍光を検出することにより検出することができる。プローブが標識される場合、ハイブリダイゼーションは、典型的には、標識の消光によって検出される。プローブと試料ポリヌクレオチドの両方が標識されている場合、ハイブリダイゼーションは、典型的には２つの結合した標識の近接により生じる色ずれ（ｃｏｌｏｒ　ｓｈｉｆｔ）を監視することによって検出される。種々の標識方法および標識が、特に蛍光標識のために、当業者に公知である。好ましくは、上記プローブは、当該分野で公知のものに匹敵する（ＤＮＡマイクロアレイ、遺伝子チップ、バイオチップ、ＤＮＡチップおよび遺伝子アレイを含むいくつかの名前で知られている）アレイを形成するのに好適な基板上に固定化される。

【００９２】
試料中のタンパク質の量や濃度を測定する方法は、当業者に公知である。そのような方法には、放射免疫測定、競合結合測定法、ウェスタンブロット分析、およびＥＬＩＳＡアッセイが含まれる。抗体を使用する方法については、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が好適である。このような抗体は、タンパク質、タンパク質エピトープまたは

タンパク質フラグメントに対して免疫学的に特異的であってもよい。

【００９３】

本発明のいくつかの実施態様は、本発明のポリヌクレオチドの発現によって産生されるタンパク質の検出および定量のための抗体を利用する。タンパク質は免疫沈降法、アフィニティー分離、ウェスタンブロット分析、タンパク質アレイなどによって検出することができるが、好ましい方法は、上記抗体が固相担体上に固定化され、標的タンパク質またはペプチドが固定化抗体に曝露されるＥＬＩＳＡ技術を利用する。プローブまたは標的のいずれか、またはその両方は、公知の方法を用いて標識することができる。

【００９４】

更なる態様において、本発明は、試料中の正常なネコ科動物に比べて異常なネコ科動物において特異に発現した１以上の遺伝子の特異な発現を検出する方法を提供する。上記方法は、（ａ）正常なネコ科動物に比べて異常なネコ科動物において特異的に発現する複数のポリヌクレオチドプローブを含む組み合わせを試料中のポリヌクレオチドとハイブリダイゼーションして、１つ以上のハイブリダイゼーション複合体を形成する工程、（ｂ）任意に、正常なネコ科動物に比べて異常なネコ科動物において特異的に発現する複数のポリヌクレオチドプローブを含む組み合わせを試料中のポリヌクレオチドとハイブリダイゼーションして、１つ以上のハイブリダイゼーション複合体を形成する工程、（ｃ）上記試料からのハイブリダイゼーション複合体および、任意に、上記工程（ｂ）の標準を検出する工程、並びに（ｄ）上記試料からのハイブリダイゼーション複合体を標準からのハイブリダイゼーション複合体と比較する工程を含み、
上記標準と試料との間のハイブリダイゼーション複合体の量の差が、試料中の正常な動物と比較して異常な動物において特異的に発現する遺伝子の特異的発現を示す。

【００９５】

工程（ｂ）と工程（ｃ）の一部は任意であり、２つ以上の試験系の同時比較が相対的に行われるべきである場合に使用されます。しかしながら、好ましい実施態様では、比較のために使用される標準は、上記方法を使用して以前に得られたデータをベースとしている。

【００９６】

これらのプローブは試料に暴露されて、検出され、標準のものと比較されるハイブリダイゼーション複合体を形成する。上記試料および標準からのハイブリダイゼーション複合体間の違いが、ポリヌクレオチドおよび、それによって、上記試料中の正常なネコ科動物に比べて異常なネコ科動物において特異的に発現する遺伝子の特異的発現を示している。好ましい実施態様では、プローブは、本発明によって同定された１つ以上の遺伝子または遺伝子フラグメントによって産生されたポリヌクレオチドまたはそのフラグメントを明確に検出するために作られる。ハイブリダイゼーション複合体を検出するための方法は当業者に公知である。

【００９７】

別の態様において、本発明は、試料中の正常なネコ科動物に比べて異常なネコ科動物において特異的に発現する遺伝子特異的発現を検出する方法を提供する。この方法は、（ａ）複数のポリペプチドプローブを含むと組み合わせを、上記プローブとタンパク質との間に特殊な結合が生じることを可能にする条件下で、試料中のタンパク質と反応させる工程であって、上記プローブによって結合したタンパク質が、正常なネコ科動物に比較して異常なネコ科動物において特異的に発現する工程、（ｂ）任意に、複数のポリペプチドプローブを含む組み合わせを、上記プローブとタンパク質との間に特殊な結合が生じることを可能にする条件下で、標準中のタンパク質と反応させる工程であって、上記プローブによって結合したタンパク質が、正常なネコ科動物に比較して異常なネコ科動物において特異的に発現する工程、（ｃ）上記試料および、任意に（ｂ）からの標準中での特殊な結合を検出する工程、並びに（ｄ）試料中の特殊な結合を標準中のそれと比較する工程であって、上記標準および試料中の特殊な結合間の差異が、試料中の正常なネコ科動物に比べて異常なネコ科動物において特異的に発現する遺伝子の特異的発現を示す工程、を含む。

【００９８】
これらのプローブは試料に暴露されて、検出され、標準のものと比較される特殊な結合を形成する。試料および標準からの特殊な結合間の違いは、タンパク質および、それによって、上記試料中の正常なネコ科動物、特に異常関連遺伝子と比較して、異常なネコ科動物において特異的に発現する遺伝子の特異的発現を示している。好ましい実施態様では、プローブは、本発明によって同定された１つ以上の遺伝子または遺伝子フラグメントによって産生されたタンパク質またはそのフラグメントを明確に検出するために作られる。
【００９９】
一つの態様では、上記方法は、タンパク質とペプチドを反応させる前に、ネコ科動物または試料を被験物質に暴露する工程を更に含む。次いで、比較は、被験物質が、試料中の正常なネコ科動物、特に異常関連遺伝子と比較して、異常なネコ科動物において特異的に発現する遺伝子の発現を変化させたかどうかの指標である。
【０１００】
明細書全体を通して用いられているように、範囲が、範囲内にある各々または個々の値を記述するための略記として使用されている。上記範囲内の任意の値が、範囲の末端として選択することができる。さらに、本明細書中に引用される全ての参考文献は、その全体が本明細書中に参考として援用される。本開示における定義および引用文献での矛盾が発生した場合には、本開示によって制御される。
【実施例】
【０１０１】
（実施例１）甲状腺機能亢進ネコ科動物における遺伝子発現
この研究では、甲状腺機能亢進症を有するネコ科動物における甲状腺組織および全血での遺伝子発現に焦点をあてた。すべての甲状腺機能亢進ネコ科動物は、臨床徴候および上昇したＴ－４濃度に基づいて獣医によって診断された。上記組織の研究においては、１３０８の重要な特異的発現遺伝子が、ＦＤＲ（偽発見率）＝０．１および発現比が±１．２５以上で、甲状腺機能亢進ネコ科動物と非甲状腺機能亢進ネコ科動物の間で発見された。上記全血の研究では、上記と同様のカットオフで、１０９４の重要な遺伝子が、甲状腺機能亢進ネコ科動物と非甲状腺機能亢進ネコ科動物の間で発見された。上記組織の研究では、甲状腺ホルモンの産生を導く経路に関与することが知られている全ての遺伝子は、甲状腺機能亢進のネコ科動物において発現増加されることが見出された。これらの遺伝子の発現増加は、明らかにネコ科動物体内で高Ｔ－４の産生に貢献している。上記全血の研究では、６０の遺伝子は、上記組織の研究に見られるのと同じ方向に調節されると思われる固形組織の研究から見出されたものと重複することが見出された。これらの６０の遺伝子を用いることによって、上記全血および組織で試験したように、上記甲状腺機能亢進のネコ科動物は、正常なネコ科動物と区別することができる。
【０１０２】
ネコ科動物は、２つのグループに分けられる。一つのグループは、疾患の証拠がないネコ科動物を含み、他のグループは、甲状腺機能亢進症を有するネコ科動物を含む。両方の組織および全血を、遺伝子発現解析のために収集した。
【０１０３】
固形組織からのＲＮＡの単離：
組織試料を、ウルトラタラックスＴ２５パワーホモジナイザー（Ｕｌｔｒａ－Ｔｕｒｒａｘ Ｔ２５ Ｐｏｗｅｒ Ｈｏｍｏｇｅｎｉｚｅｒ）を用いて均質化した。ＲＮＡを、ＳＯＰ番号のＬＡＢ－ＬＳ－０２８．３で概説したプロトコルを使用して単離した。ＲＮＡの質および量を、製造業者の説明書に従ってアジレントテクノロジー（Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）社製のアジレント２１００バイオアナライザ（Ａｇｉｌｅｎｔ ２１００ Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒ）を用いて決定した。ＲＮＡの完全性は、ＲＮＡの完全性番号（ＲＩＮ：ＲＮＡ ｉｎｔｅｇｒｉｔｙ ｎｕｍｂｅｒ；アジレント２１００ ＲＩＮベータバージョンのソフトウェア（Ａｇｉｌｅｎｔ ２１００ ＲＩＮ Ｂｅｔａ Ｖｅｒｓｉｏｎ Ｓｏｆｔｗａｒｅ））を用いて決定した。精製したＲＮＡ試料を－７０

℃で保存した。

【０１０４】

全血からの試料調製：

血液をＰＡＸｇｅｎｅのＲＮＡ血液チューブ内の製造業者の説明書に従って収集し、処理した。ＲＮＡが単離される前に、ＰＡＸｇｅｎｅ血液ＲＮＡチューブを－２０℃（短期保存、６ケ月未満）および－７０℃（６ケ月を超える）で保存した。

【０１０５】

全血からのＲＮＡの単離：

ＲＮＡを、製造業者の説明書（Ｑｉａｇｅｎ、ｐ/ｎ ７６２１６４）にしたがってＰＡＸｇｅｎｅ血液ＲＮＡ単離キットを用いて単離した。上記ＲＮＡの質および量は、製造業者の説明書に従って、アジレントテクノロジー（Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）社製のアジレント２１００バイオアナライザ（Ａｇｉｌｅｎｔ ２１００ Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒ）を用いて決定された。ＲＮＡの完全性は、ＲＮＡの完全性番号（ＲＩＮ：ＲＮＡ ｉｎｔｅｇｒｉｔｙ ｎｕｍｂｅｒ；アジレント２１００ ＲＩＮベータバージョンのソフトウェア（Ａｇｉｌｅｎｔ ２１００ ＲＩＮ Ｂｅｔａ Ｖｅｒｓｉｏｎ Ｓｏｆｔｗａｒｅ））を用いて決定した。精製したＲＮＡ試料を－７０℃で保存した。

【０１０６】

全血プローブの製造：

標識試薬および増幅試薬は、ＮｕＧＥＮ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｉｎｃ（サンカルロス、カリフォルニア州、米国）から得られ、ビオチン化されたｃＤＮＡターゲットは製造業者の説明書に従って調製された。二本鎖ｃＤＮＡを約７５ｎｇの全ＲＮＡから合成し、続いて、一本鎖ｃＤＮＡを産生するための線形等温増幅（ＳＰＩＡ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ（登録商標））工程を行った。次いで、増幅されたプローブにビオチンを結合する直接標識法によって、断片化を行った。プローブの精製を、ザイモリサーチ（Ｚｙｍｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ；米国カリフォルニア州、オレンジ）社のＤＮＡ Ｃｌｅａｎ ａｎｄ Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒ－２５を用いて行った。

【０１０７】

固形組織プローブの作製：

標識試薬および増幅試薬は、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ社（９５０５１米国カリフォルニア州サンタクララ、セントラルエクスプレスウェイ３４２０）から入手した。Ｏｎｅ－ｃｙｃｌｅ ｃＤＮＡ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ Ｋｉｔ（ｐ／ｎ ９００４３１）および３’ＩＶＴ Ｌａｂｅｌｉｎｇ Ｋｉｔ（ｐ／ｎ ９００４４９）を用いて、各ｃＤＮＡターゲットを合成、断片化およびに標識化した。すべてのｃＤＮＡ標的を、製造業者の説明書に従って作製した。プローブ精製を、アフィメトリクス（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ）社のＧｅｎｅＣｈｉｐ Ｓａｍｐｌｅ Ｃｌｅａｎｕｐ Ｍｏｄｕｌｅ（ｐ／ｎ ９００３７１）を使用して行った。同等の製品は入手可能であるが、上記標識および増幅製品ラインが再組織化され、名前を変更したので、アフィメトリクス社は、もはやこれらの正確な製品、それ自体を販売していないことに注意することが重要である。

【０１０８】

配列ハイブリダイゼーションおよび処理（全血）：

４５℃で２０分間のプレハイブリダイゼーションの後、ハイブリダイゼーション緩衝液中で、各標的ｃＤＮＡ１．５μｇを、アフィメトリクス（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ）ハイブリダイゼーションコントロールと混合し、４５℃で１６時間、Ｆｅｌｉｎｅ－２ ＧｅｎｅＣｈｉｐ（登録商標）を用いてハイブリダイゼーションした。上記ハイブリダイゼーションカクテルを除去した後、上記チップを、フルーイディクスステーション中において、低ストリンジェンシーバッファー（ＥＤＴＡ、０．０１％のＴｗｅｅｎ ２０を含む６倍標準リン酸緩衝生理食塩水）および高ストリンジェンシーバッファー（１００ｍＭのＮ－モルホリノ－エタンスルホン酸（ＭＥＳ）、０．１ＭのＮａＣｌ、および０．０１％のＴｗｅｅｎ ２０）で洗浄し、ＳＡＰＥ（ストレプトアビジンフィコエリトリン）で染色した。このプロセスに続いて、正常なヤギＩｇＧとビオチン化マウス抗ストレプトアビジン

抗体（Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂ、ＢＡ－０５００）とのインキュベーションを行い、次いでＳＡＰＥで再染色した。上記チップを、アフィメトリクス社（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ Ｉｎｃ；カリフォルニア州サンタクララ）のＧｅｎｅＣｈｉｐ（登録商標） Ｓｃａｎｎｅｒ ３０００ ７Ｇで走査して、ハイブリダイゼーションシグナルを検出した。画像検査を、各走査の後、すぐに手動で行った（ＧｅｎｅＣｈｉｐ（登録商標） Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｔｅｃｈｎｉｃａｌ Ｍａｎｕａｌ．ｐ／ｎ ７０２２３２ Ｒｅｖ．３、Ｃｈａｐｔｅｒ IIおよびIII）。

【０１０９】

配列ハイブリダイゼーションおよび処理（固形組織）：

４５℃で１０分間のプレハイブリダイゼーションの後、ハイブリダイゼーション緩衝液中で、各標的ｃＤＮＡ４．４μｇを、アフィメトリクス（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ）ハイブリダイゼーションコントロールと混合し、４５℃で１６～１８時間、Ｆｅｌｉｎｅ－２ ＧｅｎｅＣｈｉｐ（登録商標）を用いてハイブリダイゼーションした。上記ハイブリダイゼーションカクテルを除去した後、上記チップを、フルーイディクスステーション中において、低ストリンジェンシーバッファー（ＥＤＴＡ、０．０１％のＴｗｅｅｎ ２０を含む６倍標準リン酸緩衝生理食塩水）および高ストリンジェンシーバッファー（１００ｍＭのＮ－モルホリノ－エタンスルホン酸（ＭＥＳ）、０．１ＭのＮａＣｌ、および０．０１％のＴｗｅｅｎ ２０）で洗浄し、ＳＡＰＥ（ストレプトアビジンフィコエリトリン）で染色した。このプロセスに続いて、正常なヤギＩｇＧとビオチン化マウス抗ストレプトアビジン抗体（Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂ、ＢＡ－０５００）とのインキュベーションを行い、次いでＳＡＰＥで再染色した。上記チップを、アフィメトリクス社（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ Ｉｎｃ；カリフォルニア州サンタクララ）のＧｅｎｅＣｈｉｐ（登録商標） Ｓｃａｎｎｅｒ ３０００ ７Ｇで走査して、ハイブリダイゼーションシグナルを検出した。画像検査を、各走査の後、すぐに手動で行った（ＧｅｎｅＣｈｉｐ（登録商標） Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｔｅｃｈｎｉｃａｌ Ｍａｎｕａｌ．ｐ／ｎ ７０２２３２ Ｒｅｖ．３、Ｃｈａｐｔｅｒ IIおよびIII）。

【０１１０】

データ分析：

遺伝子発現データソフトウェア（Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｄａｔａ ｓｏｆｔｗａｒｅ；Ｐａｒｔｅｋ Ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔｅｄ，１２７４７ Ｏｌｉｖｅ Ｂｌｖｄ．，Ｓｕｉｔｅ ２０５，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，Ｍｉｓｓｏｕｒｉ ６３１４１，Ｕ．Ｓ．Ａ．http://www.partek.com/partekgs_geneexpression）用のＰａｒｔｅｋ（登録商標）ＧＳ（ミズーリ州セントチャールズのＰａｒｔｅｋ社）をデータ解析のために使用した。Ｒｏｂｕｓｔ Ｍｕｌｔｉｃｈｉｐ Ａｖｅｒａｇｅ （ＲＭＡ）アルゴリズム（Rafael. A. Irizarry, Benjamin M. Bolstad, Francois Collin, Leslie M. Cope, Bridget Hobbs and Terence P. Speed (2003), Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data Nucleic Acids Research 31(4):el5）を、ＧｅｎｅＣｈｉｐ（登録商標）試料のバックグラウンド補正、正規化、およびプローブレベルの要約に使用した。ＡＮＯＶＡ解析を行って、０．１の最小ＦＤＲ対照および各方向の変化比１．２５倍を有する２つのグループ間に重要な特異的発現遺伝子を発見した。当社の実証研究により、Ｆｅｌｉｎｅ－２ ＧｅｎｅＣｈｉｐ（登録商標）は１．３倍の関連するバックグラウンドノイズレベルを有することを明らかにした。従って、本報告に示されるすべての解析は、（より包括的であるべき）±１．２５倍のカットオフを採用した。さらに、偽発見率の閾値０．１（観測値の１０％は偶然によるものであることを意味する）を、許容される統計的有意性の最小レベルとして選択される。

【０１１１】

本研究は、ネコ科動物の甲状腺機能亢進症に関する、甲状腺組織および全血の遺伝子発現に焦点を当てている。上記組織の研究においては、１３０８の遺伝子が、甲状腺機能亢進ネコ科動物と非甲状腺機能亢進ネコ科動物の間で、ＦＤＲ（偽発見率）＝０．１および発現比が±１．２５以上で、かなり特異的に発現することがわかった。上記全血の研究で

は、上記と同様のカットオフ用いて、１０９４の重要な遺伝子が、識別された。

【０１１２】

両方の研究のＰＣＡ解析により、特異的遺伝子発現に基づいて、甲状腺機能亢進ネコ科動物が一緒に密集し、非甲状腺機能亢進ネコ科動物から分離されていることを示している。

【０１１３】

ネコ科動物の甲状腺機能亢進症は、甲状腺による多すぎる甲状腺ホルモンの産生を含む内分泌障害である。この状態は、年をとった（ｍｉｄｄｌｅ－ａｇｅｄ ａｎｄ ｏｌｄｅｒ）ネコ科動物に影響を与える傾向があり、雄雌とも、この障害を発症する危険性が等しくある。甲状腺機能亢進症は、ネコ科動物の体のあらゆる臓器や細胞に影響を与える（１）。

【０１１４】

甲状腺ホルモンチロキシン（Ｔ４）のレベルは、血液中で測定される。このホルモンの高いレベルは、甲状腺機能亢進症の兆候にほかならない。この内分泌障害を患っているネコ科動物の多くは、Ｔ４レベルが非常に高くて、甲状腺機能亢進症が問題であることが疑うまでもない。しかし、いくつかの場合、ネコ科動物のホルモンレベルは正常範囲の上限のレベル内に入る。このような場合には、Ｆｒｅｅ Ｔ４（ＦＴ４）として知られているさらなる試験が行われる。ほとんどの場合、この第２甲状腺試験は、甲状腺機能亢進症の診断を確認するのに十分である。

【０１１５】

また、血液検査は、リンパ球および好酸球の低レベルとともに、赤血球および白血球細胞のレベルの上昇を明らかにする。また、甲状腺機能亢進症のネコ科動物のいくらかは、高レベルのＡＬＴを有することになる。他の物質、例えば他の酵素、化合物クレアチニン、リン、胆汁色素ビリルビンが、高レベルで更に存在してもよい。正常よりも高いレベルのこれらの内のいくつかは、甲状腺機能亢進症から起こる生理的な合併症によって引き起こされる。

【０１１６】

ネコ科動物の甲状腺は、首に位置する蝶形の腺である。この腺は、身体の代謝率の調節に重要な役割を果たすホルモンチロキシン（Ｔ４）の産生を担当する。すべての臓器および生理系は、例えば体重減少、活動亢進、血圧上昇、および高い心拍数のような古典的な症状を引き起こす、甲状腺機能亢進症によって悪影響を受ける。

【０１１７】

上記組織の研究では、甲状腺ホルモンの産生を導く経路に関与する遺伝子の全てが、甲状腺機能亢進ネコ科動物において発現増加されることが見出されている。上記遺伝子は表Ａに示される。これらの遺伝子の発現の増加は、ネコ科動物の体内の高いＴ４産生に寄与する。

【０１１８】

甲状腺ホルモンの過剰産生に寄与する発現増加した遺伝子の説明：

ＩＹＤ（４．５５倍の増加）：この遺伝子は、甲状腺ホルモンの産生のハロゲン化副産物であるモノおよびジヨードチロシンの酸化ＮＡＤＰＨ依存－脱ヨード化を触媒する酵素をコード化する。上記タンパク質のＮ－末端は、膜アンカーとして機能する。この遺伝子の突然変異により、脱ヨウ素酵素欠乏、またはヨードチロシンデハロゲナーゼ欠乏、または甲状腺ホルモン産生タイプ４（ｔｈｙｒｏｉｄ ｈｏｒｍｏｎｏｇｅｎｅｓｉｓ ｔｙｐｅ ４）とも呼ばれているｄｙｓｈｏｒｍｏｎｏｇｅｎｅｓｉｓ ｔｙｐｅ ４により、先天性甲状腺機能亢進症を生じる。

【０１１９】

ＴＧ（２．０２倍の増加）：サイログロブリン（Ｔｇ）は、甲状腺によって主に産生される糖タンパク質のホモ二量体である。それは、チロキシンとトリヨードチロニンとの合成だけでなく、甲状腺ホルモンとヨウ素の不活性体の保管のための基質として作用する。上記サイログロブリンは、濾胞腔において、小胞体から、ヨウ素化およびその後のチロキ

シンの生合成の位置に分泌される。この遺伝子の突然変異により、甲状腺腫として現れる甲状腺（ｔｈｙｒｏｉｄ）ｄｙｓｈｏｒｍｏｎｏｇｅｎｅｓｉｓを生じ、中等度から重度の先天性甲状腺機能亢進症に関連する。

【０１２０】

ＳＬＣ５Ａ５、ＮＩＳ（４．６倍の増加）：この遺伝子は、ナトリウムグルコース共輸送体ファミリーのメンバーをコード化する。コード化されたタンパク質は、甲状腺組織や授乳中の乳房組織のような組織中のヨウ素の摂取に対して応答する。甲状腺に取り込まれたヨウ素は、代謝調節因子のトリヨードチロニン（Ｔ－３）およびテトラヨードチロニン（Ｔ－４）に組み込まれる。この遺伝子における突然変異は、甲状腺ｄｙｓｈｏｒｍｏｎｏｇｅｎｅｓｉｓ １に関連している

【０１２１】

ＴＰＯ（４．０６倍増加）：この遺伝子は、膜結合糖タンパク質をコード化する。コード化されたタンパク質は、酵素として作用し、甲状腺機能において中心的な役割を果たす。上記タンパク質は、サイログロブリン中のチロシン残基のヨウ素化およびヨウ素化チロシンのペア間におけるフェノキシ－エステル形成において機能して、甲状腺ホルモン、チロキシンおよびトリヨードチロニンを生成する。この遺伝子の突然変異は、先天性甲状腺機能亢進症、先天性甲状腺腫、甲状腺ホルモンヨード有機化障害ＩＩＡを含む甲状腺ホルモン産生の重度の障害に関連する。

【０１２２】

ＴＳＨＲ（２．２倍の増加）：この遺伝子によってコード化されるタンパク質は、膜タンパク質および甲状腺細胞代謝の主要なコントローラである。上記コード化されたタンパク質は、ｔｈｙｒｏｔｈｒｏｐｉｎおよびｔｈｙｒｏｓｔｉｍｕｌｉｎに対する受容体であり、その活性は、アデニル酸シクラーゼによって媒介される。この遺伝子における障害は、重度タイプの甲状腺機能亢進症の原因となっている。

【０１２３】

ＤＵＯＸ２、ＴｈＯＸ（１．５５倍の増加）：この遺伝子によりコード化されるタンパク質は、糖タンパク質およびＮＡＤＰＨオキシダーゼファミリーのメンバーである。甲状腺ホルモンの合成は、甲状腺濾胞細胞の頂端膜に位置するタンパク質複合体によって触媒される。この複合体は、ヨウ化物輸送体、甲状腺ペルオキシダーゼ、およびそのコード化されたタンパク質とＤＵＯＸｌを含む過酸化物生成システムを含有する。このタンパク質は、ペルオキシダーゼ相同性ドメインとｇｐ９１ｐｈｏｘドメインとの両方を有するので、デュアルオキシダーゼ（ｄｕａｌ ｏｘｉｄａｓｅ）として知られている。

【０１２４】

甲状腺機能亢進のネコ科動物組織の研究においては、アラキドン酸産生経路に関与するいくつかの遺伝子が発現増加されている。これらの遺伝子の大部分は、アラキドン酸の合成に関連するものとしての上流遺伝子であり、従って、アラキドン酸の産生を増加させることができる。実際に、ヒトの研究においては、甲状腺機能亢進症におけるアラキドン酸レベルが正常または甲状腺機能亢進症のヒト群のいずかよりも有意に高いことが見出された。アラキドン酸は、体の細胞の膜のリン脂質（特にホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリンおよびホスファチジルイノシトール）中に存在する多価不飽和脂肪酸であり、脳、筋肉、肝臓に豊富である。例えば、ＰＬＣ－γ、ＰＬＣ－δおよびＰＫＣ－α、－βおよび－γアイソフォームのようなシグナル伝達酵素の調節に関与する脂質セカンドメッセンジャーとしての細胞内シグナル伝達に関与することに加えて、アラキドン酸は重要な炎症性の中間体である。アラキドン酸は、負傷し、多くの疾患状態に関連する炎症において中心的な役割を果たしている。それが体内で代謝されるかどうかは、その炎症性または抗炎症活性を決定する。関節の痛みやアクティブ炎症性疾患に罹患している個体は、それがより容易に炎症性化合物に変換されているため、増加アラキドン酸消費量は、症状を悪化させることがあります。同様に、高アラキドン酸消費量は、炎症性疾患の病歴を有するまたは健康を損なった個体のためには勧められない。なお、ＡＲＡ補給は健康な個体における炎症誘発性効果を有するようには見えないが、それはω－３ ＥＦＡの補

給の抗炎症効果に対抗することができることにも注目すべきである。したがって、甲状腺機能亢進ネコ科動物において、食事療法はアラキドン酸を避けるためにフォーマットする必要がある。

【０１２５】

【表Ｃ】

表２：組織において発現増加されるアラキドン酸生産経路の遺伝子

ＩＤ	シグナル ＨＴ/正常	遺伝子記号	遺伝子名
HP06563	4.36	PA24A, cPLA2. PLA	ホスホリパーゼ A2、グループIVA（細胞質ゾル、カルシウム依存性） [phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)]
HP16072, HP05605	2.4	ACSL5	アシル-CoA シンテターゼ長鎖ファミリーメンバー 5 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 5)
HP03050	1.62	PPT1	パルミトイル-タンパク質チオエステラーゼ 1(palmitoyl-protein thioesterase 1)
HP08203	1.46	LIRE	リパーゼ, 内皮 (lipase, endothelial)
HP07277	1.32	ACSL3	アシル-CoA シンテターゼ長鎖ファミリーメンバー 3 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 3)

【０１２６】

全血の遺伝子発現研究において、６０遺伝子は、上記組織分析において発見されたものと重複し、調節の同じ方向を示すことがわかる。しかしながら、これらの遺伝子のいずれも、上記組織の研究に見られるように、甲状腺ホルモンの産生に関連することが見出されなかった。これらの６０の遺伝子を用いて、甲状腺機能亢進ネコ科動物は、血液中だけでなく、同時に上記組織において試験したように、通常のものと区別することができる。６０遺伝子は、表Ｂに示される。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
A61K	***45/00***	***(2006.01)***	G01N	33/53	D
A61P	***43/00***	***(2006.01)***	A61K	45/00	
			A61P	43/00	111

(72)発明者 シャンミン・ガオ
アメリカ合衆国66615カンザス州トピーカ、サウスウエスト・レッド・オークス・コート10
32番

審査官 池上 京子

(56)参考文献 Thyroid, 2005年 2月, Vol.15, No.2, p.114-120
J Vet Intern Med., 2011年 5月 3日, Vol.25, No.3, p.678, ABSTRACT EN-2
Eur J Endocrinol., 2007年 3月 1日, Vol.156, No.3, p.295-301
J Clin Endocrinol Metab., 2009年 4月21日, Vol.94, No.7, p.2602-2609
J Clin Endocrinol Metab., 2004年 2月, Vol.89, No.2, p.930-935

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00
C12Q
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)