

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5539739号
(P5539739)

(45) 発行日 平成26年7月2日 (2014.7.2)

(24) 登録日 平成26年5月9日 (2014.5.9)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M
C O 7 K 14/47 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D
請求項の数 21 (全 24 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2009-553875 (P2009-553875)	(73) 特許権者	509230344
(86) (22) 出願日	平成20年3月19日 (2008.3.19)		シュ サントージュスティーマ
(65) 公表番号	特表2010-521184 (P2010-521184A)		カナダ国, アッシュ3テ 1セ5 ケベック, モンレアル, コートーストールリーヌ 3175
(43) 公表日	平成22年6月24日 (2010.6.24)	(74) 代理人	100099759
(86) 国際出願番号	PCT/CA2008/000524		弁理士 青木 篤
(87) 国際公開番号	W02008/113174	(74) 代理人	100077517
(87) 国際公開日	平成20年9月25日 (2008.9.25)		弁理士 石田 敬
審査請求日	平成23年1月24日 (2011.1.24)	(74) 代理人	100087871
(31) 優先権主張番号	60/895,490		弁理士 福本 積
(32) 優先日	平成19年3月19日 (2007.3.19)	(74) 代理人	100087413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 古賀 哲次
(31) 優先権主張番号	60/908,417	(74) 代理人	100108903
(32) 優先日	平成19年3月28日 (2007.3.28)		弁理士 中村 和広
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 思春期特発性側弯症の分類方法、前記方法への使用のための単離された核酸分子及びそれを使用するキット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

思春期特発性側弯症 (AIS) を有する対象の分類方法において、
対象から単離された細胞サンプルを供給し；そして
前記細胞サンプルにおける対様ホメオドメイン転写因子 1 (Pitx1) の発現を検出することを含んで成り；ここで
Pitx1 の発現の欠失が、前記対象が思春期特発性側弯症 (AIS) サブクラスに属することを示す、
ことを特徴とする当該分類方法。

【請求項 2】

臨床試験のための思春期突発性側弯症 (AIS) を有する対象の分類方法において、
対象から単離された細胞サンプルを供給し；そして
前記細胞サンプルにおける対様ホメオドメイン転写因子 1 (Pitx1) の発現を検出することを含んで成り；ここで
Pitx1 の発現の欠失が、前記対象が思春期特発性側弯症 (AIS) サブクラスに属することを示す、
ことを特徴とする当該分類方法。

【請求項 3】

対象における思春期突発性側弯症 (AIS) の発症についての危険性の予測方法において、

10

20

対象から単離された細胞サンプルを供給し；そして
前記細胞サンプルにおける対様ホメオドメイン転写因子1（Pitx1）発現を検出することを含んで成り、ここで
Pitx1発現の欠失が、対象がAISを発症する危険な状態であることを示す、
ことを特徴とする当該予測方法。

【請求項4】

Pitx1発現の欠失が、45°及びそれ以上のCobb角度を発症する危険な状態である、請求項3記載の方法。

【請求項5】

前記検出段階が、Pitx1転写生成物に対して特異的な、単離された核酸分子により実施される、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。

10

【請求項6】

前記単離された核酸分子が検出可能的にラベルされる、請求項5記載の方法。

【請求項7】

前記検出段階が、Pitx1に対して特異的に結合する抗体により実施される、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。

【請求項8】

前記細胞サンプルが、造骨細胞サンプル、軟骨細胞サンプル、骨格筋芽細胞サンプル及び血液サンプルから成る群から選択される、請求項1～7のいずれか1項記載の方法。

【請求項9】

20

前記細胞サンプルが、造骨細胞サンプルである、請求項1～7のいずれか1項記載の方法。

【請求項10】

前記検出段階の結果の観点から、予防作用又は処理を選択する段階をさらに含んで成る、請求項1～9のいずれか1項記載の方法。

【請求項11】

前記対象が、思春期特発性側弯症の発症についての可能性ある候補体であるとして疑われるものである、請求項3又は4記載の方法。

【請求項12】

思春期突発性側弯症の処理において潜在的に有用な化合物の選択方法であって、
（a）試験化合物と、対様ホメオドメイン転写因子1（Pitx1）を発現することが知られている少なくとも1つの細胞とを接触し；そして

30

（b）Pitx1発現レベルを検出する段階を含んで成り；

ここで前記試験化合物が、Pitx1発現レベルが、試験化合物の存在下で、その不在下でのその発現レベルに比較し、高められる場合、選択されることを特徴とする方法。

【請求項13】

前記細胞が造骨細胞である、請求項12記載の方法。

【請求項14】

前記細胞が、思春期突発性側弯症（AIS）を有する対象からである、請求項12又は13記載の方法。

40

【請求項15】

前記細胞がヒトの細胞である、請求項12～14のいずれか1項記載の方法。

【請求項16】

前記対象がヒトである、請求項1～11のいずれか1項記載の方法。

【請求項17】

対様ホメオドメイン転写因子1（Pitx1）の転写生成物に対して特異的な、単離された核酸分子、及び対象が思春期突発性側弯症を発症する危険な状態であるかどうか予測するための前記単離された核酸分子の使用説明書を含んで成るキット。

【請求項18】

対様ホメオドメイン転写因子1（Pitx1）の転写生成物に対して特異的な、単離された

50

核酸分子、及び思春期突発性側弯症を有する対象を分類するための前記単離された核酸分子の使用説明書を含んで成るキット。

【請求項 19】

前記対象からの核酸サンプルのための容器をさらに含んで成る、請求項17または18記載のキット。

【請求項 20】

対様ホメオドメイン転写因子 1 (Pitx1) に対して特異的な抗体、及び対象が思春期突発性側弯症を発症する危険な状態であるかどうか予測するための前記抗体の使用説明書を含んで成るキット。

【請求項 21】

対様ホメオドメイン転写因子 1 (Pitx1) に対して特異的な抗体、及び思春期突発性側弯症を有する対象を分類するための前記抗体の使用説明書を含んで成るキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野：

本発明は、思春期特発性側弯症の分類方法、前記方法への使用のための単離された核酸分子及びそれを使用するキットを言及する。

【背景技術】

【0002】

発明背景：

脊柱変形及び側弯症は特に、子供及び若者（人口の0.2～6％）において最も一般的タイプの整形外科的奇形を表す。公開された研究は、人口の1％～6％が側弯症を発症するであろうことを示唆している。この状態は、主に思春期女性に、数及び重症度において影響を及ぼす脊椎の重度の奇形の形成を導く。

【0003】

現在、思春期突発性側弯症（AIS）の原因は、不明瞭なままで（Connor JM, Conner AN, Connor RA, Tolmie JL, Yeung B, Goudie D. Genetic aspects of early childhood scoliosis. Am J Med Genet. 1987;27:419- 424; 及び Machida M. Cause of idiopathic scoliosis. Spine. 1999;24:2576-2583）、そしてAISを有する子供又は若者を分類し、AISを発症する危険性の子供又は若者を同定し、そして発症の危険性を有する、影響された個人を同定する必要がある。

【0004】

Pitx1+/-マウスが、離乳の後、重度の脊椎奇形を発症することが示されている。対様ホメオドメイン転写因子 1 (Pitx1、これまでPtx1とも呼ばれていた) は、最初に脳下垂体発生中に検出されるホメオドメイン転写因子である。Pitx-ファミリーは、対種類のホメオドメインタンパク質のメンバーである3種の関連するメンバー、Pitx1, Pitx2及びPitx3を含む。それらの3種のPitx因子は、類似する転写性質を有する（Drouin.J., LanctotC, & Tremblay,J.J. La famille Ptx des facteurs de transcription a homeodomaine. Medecine/Sciences 14, 335-339 (1998); Drouin.J., Lamolet.B., Lamonerie.T., Lanctot.C, & Tremblay.J.J. The PTX family of homeodomain transcription factors during pituitary developments. Mol. Cell Endocrinol. 140, 31- 36 (1998);及びLanctot.C, Lamolet.B., & Drouin.J. The bicoid-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. Development 124, 2807- 2817 (1997))。

【0005】

特に、この転写因子は、哺乳類における頭蓋顔面及び後脚の特定構造体の発生を調節する。Pitx1遺伝子は、発生の間、マウス後脚長骨において高く発現され、そして高レベルのPitx1タンパク質の蓄積が、主に、軟骨膜に沿っての関節周囲領域（腰及び膝関節で包含する）における後足長骨骨断片上で、及びまた、増殖性軟骨細胞の核において、免疫組

10

20

30

40

50

織学により検出された (LancototC., Lamolet.B., & Drouin.J. The bicoid-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. Development 124, 2807-2817 (1997))。

【0006】

Pitx1発現はまた、頭蓋顔面構造体、例えば下顎骨において及び側頭一顎関節において検出された。マウスpitx1遺伝子の標的化された不活性化は、頭蓋顔面及び後足発生を重度に害することが示されている。ヌルマウスが出産で死亡するが、出産で正常であるすべてのPITX1 +/-マウスは重度の脊椎奇形を発生する（2ヶ月で出産して100%）。

この記載は、多くの資料を言及し、その内容はすべて引用により本明細書に組み込まれる。

10

【発明の概要】

【0007】

発明の要約：

本発明によれば、対象から単離された細胞サンプルを供給し；前記細胞サンプルにおける対様ホメオドメイン転写因子1 (Pitx1) 発現を検出し；それにより、前記検出段階の結果が、思春期特発性側弯症 (AIS) サブクラスに属する場合、AISを有する対象の分類を可能にすることを含んで成る、AISを有する対象の分類方法が提供される。

【0008】

本発明のもう1つの観点によれば、対象から単離された細胞サンプルを供給し；前記細胞サンプルにおける対様ホメオドメイン転写因子1 (Pitx1) 発現を検出し；そして前記検出段階の結果に基づいて、臨床試験のための対象を分類することを含んで成る、臨床試験のための思春期特発性側弯症 (AIS) を有する対象の分類方法が提供される。

20

【0009】

本発明のもう1つの観点によれば、対象から単離された細胞サンプルを供給し；そして前記細胞サンプルにおける対様ホメオドメイン転写因子1 (Pitx1) 発現を検出することを含んで成り、ここでPitx1発現の不在が、対象がAISを発症する危険な状態であることを示すことを含んで成る、対象における思春期特発性側弯症 (AIS) の発症についての危険性の予測方法が提供される。

【0010】

それらの方法の特定の態様においては、Pitx1発現の不在が、45°及びそれ以上のCobb角度を発症する危険な状態である。もう1つの特定の態様においては、前記検出段階が、Pitx1転写生成物に対して特異的な、単離された核酸分子により実施される。もう1つの特定の態様においては、前記単離された核酸が検出可能的にラベルされる。もう1つの特定の態様においては、前記検出段階が、Pitx1に対して特異的に結合する抗体により実施される。もう1つの特定の態様においては、前記細胞サンプルが、造骨細胞サンプル、軟骨細胞サンプル、骨格筋芽細胞サンプル及び血液サンプルから成る群から選択される。もう1つの特定の態様においては、前記細胞サンプルが、造骨細胞サンプルである。

30

【0011】

もう1つの特定の態様においては、前記方法は、前記検出段階の結果の観点から、予防作用又は処理を選択する段階をさらに含んで成る。もう1つの特定の態様においては、前記対象が、思春期特発性側弯症の発症についての有望な候補体であるものとして予備診断される。

40

本発明のもう1つの観点によれば、(a) 試験化合物と、対様ホメオドメイン転写因子1 (Pitx1) を発現することが知られている少なくとも1つの細胞とを接触し；そして(b) Pitx1発現レベルを検出する段階を含んで成り；ここで前記試験化合物が、Pitx1発現レベルが、試験化合物の存在下で、その不在下でのその発現レベルに比較し、高められる場合、選択されることを特徴とする、思春期特発性側弯症の処理において潜在的に有用な化合物の選択方法が提供される。

【0012】

特定の態様におては、前記細胞が造骨細胞である。もう1つの特定の態様においては、

50

前記細胞が、思春期突発性側弯症（AIS）を有する対象からである。もう1つの特定の態様においては、前記対象はヒトである。

【0013】

本発明のもう1つの観点によれば、対様ホメオドメイン転写因子1（Pitx1）の転写生成物に対して特異的な、単離された核酸分子、及び対象が思春期突発性側弯症を発症する危険な状態であるかどうか予測するためのプローブを使用する説明書を含んで成るキットが提供される。

【0014】

本発明のもう1つの観点によれば、対様ホメオドメイン転写因子1（Pitx1）の転写生成物に対して特異的な、単離された核酸分子、及び思春期突発性側弯症を有する対象を分類するためのプローブを使用する説明書を含んで成るキットが提供される。

10

本発明のもう1つの特定の態様においては、キットは前記対象からのヌクレオチドサンプルのための容器をさらに含んで成る。

【0015】

本発明のもう1つの観点によれば、対様ホメオドメイン転写因子1（Pitx1）に対して特異的な抗体、及び対象が思春期突発性側弯症を発症する危険な状態であるかどうか予測するための抗体を使用する説明書を含んで成るキットが提供される。

本発明のもう1つの観点によれば、対様ホメオドメイン転写因子1（Pitx1）に対して特異的な抗体、及び思春期突発性側弯症を有する対象を分類するための抗体を使用する説明書を含んで成るキットが提供される。

20

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】図1は、重度に影響されたAIS患者及び適合された対象被験者からの造骨細胞におけるPitx1発現を比較する。対照被験者（n=46）及びAISを有する患者（n=29）のヒト造骨細胞におけるpitx1遺伝子発現のための逆転写-ポリメラーゼ鎖反応。Pitx1特異的なmRNA転写体が、対照組織において検出された。pitx1遺伝子発現の損失がすべての試験されたAISサンプルにおいて観察され、そしてβ-アクチン発現が内部対照として使用された。

【図2】図2は、10kbのpitx1プロモーター領域の配列（配列番号1）及びヒト対象間のそのpitx1プロモーター領域における多型現象を示す。前記10kbの領域を包含する異なったアンプリコンを包含するために使用されるプライマーは、下記表5に供給される。

30

【図3】図3は、Pitx1 mRNAの配列（配列番号2）（NM_002653）を示す。

【図4】図4は、Pitx1アミノ酸配列（配列番号3）（NP_002644）を示す。

【発明を実施するための形態】

【0017】

冠詞“a”、“an”及び“the”は、本明細書において使用される場合、冠詞の文法的目的物の1つ又は1よりも多く（すなわち、少なくとも1つ）を言及する。

用語“包含する”及び“含んで成る”とは、本明細書において使用される場合、句“包含するが、但し～だけには限定されない”及び“含んで成るが、但し～だけには限定されない”ことを意味し、そして交換可能的に使用される。

40

【0018】

用語“例えば”とは、本明細書において使用される場合、句“例えば、但し～だけには限定されない”ことを意味し、そして交換可能的に使用される。

【0019】

本明細書において使用される場合、用語“思春期突発性側弯症を発症するための可能性ある候補体”とは、少なくとも片方の親が思春期突発性側弯症を有する子供を包含する。他の要因の中で、年齢（思春期）、性別及び他のファミリー素性が、側弯症を発症する危険性に寄与することが知られ、そしてAISの発症の危険性を評価するために一定の程度まで使用される要因である。ある対象においては、側弯症は、矯正手術を必要とする点まで（しばしば、変形が50°以上のCobb's角度に達する場合）、短期間で急速に進行する

50

。診断される（側弯症が明らかである場合）瞬間IASから入手できる作用の現在の進行は、観察（Cobb's角度が約10～25°である場合）、整形法装置（Cobb's角度が約25～30°である場合）、及び手術（45°以上）を包含する。

【0020】

進行の危険性のより信頼できる決定は、1) 側弯症への誘引体として同定される一定の食品を除くために適切な食餌の選択；2) 最良の剤の選択；及び/又は3) 最少侵襲性の利用可能な処理、例えば体立運動、整形装置、又は低い侵襲性手術又は融合を伴わない手術（脊椎を融合せず、そしてカラム移動性を保存する手術）を可能にする。本発明は、発症するAISの決定された危険性の観点から、最も効率的で且つ少ない侵襲性の既知予防処理の選択を包含する。本発明はまた、本発明の方法によるAIS患者の分類も包含する。

10

【0021】

本明細書において使用される場合、用語“重度のAIS”とは、45°又はそれ以上のCobb's角度により特徴づけられる側弯症を言及する。

本明細書において使用される場合、用語“Pitx1発現”とは、Pitx1転写及び/又はPitx1翻訳を言及する。より特定の態様においては、Pitx1発現は、Pitx1転写を言及する。

【0022】

本明細書において使用される場合、用語“AISを発症する危険性”及び“AISの進行の危険性”とは、交換可能的に使用され、そして将来の時点で側弯症（すなわち、脊椎変形）及び/又はより重度の側弯症を発症する対象の遺伝的又は代謝的性質の言及する。

本明細書において使用される場合、用語“対象”とは、ヒト、、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ブタ、サル、ウマ、等を包含するいずれかの哺乳類を意味する。特定の態様においては、それはヒトを言及する。他の特定の態様においては、それはウマ及びより特定には、競争馬を言及する。

20

【0023】

本明細書において使用される場合、用語“血液サンプル”とは、全血液であり、そしてそれは末梢血液単核細胞を包含する細胞サンプルである。

制限するつもりではないが、Pitx1が発現されることが知られている細胞は、筋肉、骨及び軟骨、例えば造骨細胞、軟骨細胞及び骨格筋芽細胞を包含する。

【0024】

本発明はまた、単一遺伝子、例えばPitx1の転写体又は翻訳生成物の発現のレベルの決定方法にも関する。従って、本発明は、そのような決定のためのいずれか既知の方法、例えば同時PCR及び競争PCR、ノザンブロット、ヌクレアーゼ保護、プラークハイブリダイゼーション及びスロットブロットを包含する。

30

【0025】

本発明はまた、単離された核酸分子、例えばPitx1を検出するためのプローブ及びプライマーにも関する。特定の態様においては、単離された核酸分子は、300以下、又は200以下、又は100以下、又は90以下、又は80以下、又は70以下、又は60以下、又は50以下、又は40以下、又は30以下のヌクレオチドを有する。特定の態様の態様においては、単離された核酸分子は、少なくとも17、又は少なくとも18、又は少なくとも19、又は少なくとも20、又は少なくとも30、又は少なくとも40のヌクレオチドを有する。

40

【0026】

他の特定の態様においては、単離された核酸分子は、少なくとも20～300のヌクレオチドを有する。他の特定の態様においては、単離された核酸分子は、少なくとも20～200のヌクレオチドを有する。他の特定の態様においては、単離された核酸分子は、少なくとも20～100のヌクレオチドを有する。他の特定の態様においては、単離された核酸分子は、少なくとも20～90のヌクレオチドを有する。他の特定の態様においては、単離された核酸分子は、少なくとも20～80のヌクレオチドを有する。

【0027】

他の特定の態様においては、単離された核酸分子は、少なくとも20～70のヌクレオチドを有する。他の特定の態様においては、単離された核酸分子は、少なくとも20～60のヌク

50

レオチドを有する。他の特定の態様においては、単離された核酸分子は、少なくとも20～50のヌクレオチドを有する。他の特定の態様においては、単離された核酸分子は、少なくとも20～40のヌクレオチドを有する。他の特定の態様においては、単離された核酸分子は、少なくとも17～40のヌクレオチドを有する。他の特定の態様においては、単離された核酸分子は、少なくとも20～30のヌクレオチドを有する。他の特定の態様においては、単離された核酸分子は、少なくとも17～30のヌクレオチドを有する。

【0028】

他の特定の態様においては、単離された核酸分子は、少なくとも30～300のヌクレオチドを有する。他の特定の態様においては、単離された核酸分子は、少なくとも30～200のヌクレオチドを有する。他の特定の態様においては、単離された核酸分子は、少なくとも30～100のヌクレオチドを有する。他の特定の態様においては、単離された核酸分子は、少なくとも30～90のヌクレオチドを有する。他の特定の態様においては、単離された核酸分子は、少なくとも30～80のヌクレオチドを有する。他の特定の態様においては、単離された核酸分子は、少なくとも30～70のヌクレオチドを有する。他の特定の態様においては、単離された核酸分子は、少なくとも30～60のヌクレオチドを有する。他の特定の態様においては、単離された核酸分子は、少なくとも30～50のヌクレオチドを有する。

10

【0029】

他の特定の態様においては、単離された核酸分子は、少なくとも30～40のヌクレオチドを有する。同時PCRにおいては、プライマーはまた、この用語の従来の意味を伴わないで、プローブを構成することが理解されるべきである。本発明の方法においてPitx1を検出するために適切なプライマー又はプローブは、Pitx1ヌクレオチド配列を通して分配される配列を用いて、既知方法により企画され得る (Buck et al. Design Strategies and Performance of Custom DNA Sequencing primers . Biotechniques 27:528-536 (September 1999))。

20

【0030】

Pitx1についてのアミノ酸及びヌクレオチド配列が本明細書に包含されるが、本発明はそれにより制限されるものではなく、そして対象から単離されたいずれかのPitx1タンパク質又はヌクレオチドの検出を包含する。制限されるものではないが、本発明は、表1に提供されるPitx1の検出を包含する。

【0031】

30

【表 1】

表 1 : Pitx1配列についての受託番号 :

ヌクレオチド		タンパク質
ゲノム	AC004764. 1	AAC17733. 1
ゲノム	AC008406. 7 (17530. . 24049, 補体)	ナシ
ゲノム	AF009648. 1	AAB65251. 1
ゲノム	AF009649. 1	AAB65251. 1
ゲノム	AF009650. 1	AAB65251. 1
ゲノム	CH471062. 2	EAW62226. 1
		EAW62227. 1
ゲノム	CS278249. 1	CAJ86537. 1
mRNA	AK290635. 1	BAF83324. 1
mRNA	AL578756. 2	ナシ
mRNA	BC003685. 1	AAH03685. 1
mRNA	BC009412. 1	AAH09412. 1
mRNA	BX362641. 2	ナシ
mRNA	CR601326. 1	ナシ
mRNA	CR603120. 1	ナシ
mRNA	CR610821. 1	ナシ
mRNA	U70370. 1	AAC51126. 1
合成	EU446647. 1	ABZ92176. 1
		P78337. 2
mRNA	NM_002653バージョンNM_002653. 4	NP_002644バージョン NP_002644. 4
染色体 5、参照アセンブリー、完全配列	NC_000005 (134391323-134397863)	NC_000005. 8
ゲノム	NC_000005. 8参照アセンブリー 134397863. . 134391323, 補体	
ゲノム	NT_034772. 5 36784977. . 36778437, 補体	
ゲノム	AC_000048. 1 130493751. . 130487209, 補体	
ゲノム	NW_922784. 1 8121767. . 8115225, 補体	
ゲノム	AC_000137. 1 91265592. . 91277386	
ゲノム	NW_001838952. 2 4413502. . 4425296	
ゲノム	NW_001838952. 2 4413502. . 4425296	

【 0 0 3 2 】

天然に存在する糖ーホスフェート主鎖、及び修飾された主鎖、例えばホスホロチオエート、アルキルホスホネート及び α -ヌクレオチド及び同様のものを有する本発明のプロープが使用され得る。修飾された糖ーホスフェート主鎖は一般的に知られている (Miller, 1988. Ann. Reports Med. Chem. 23:295; Moran et al., 1987. Nucleic Acids Res., 14:5019)。本発明のプロープは、リボ核酸 (RNA) 又はデオキシリボ核酸 (DNA) のいずれか、及び好ましくはDNAから構成され得る。

【0033】

プローブが使用され得る検出方法のタイプは、サザンブロット（DNA）検出）、ドット又はスロットブロット（DNA、RNA）及びノザンブロット（RNA検出）を包含する。それ程好ましくはないが、ラベルされたタンパク質はまた、それが結合する特定の核酸配列を検出するためにも使用され得る。他の検出方法は、計量棒セットアップ及び同様のもの上にプローブを含むキットを包含する。

【0034】

本明細書において使用される場合、用語“検出可能的にラベルされた”とは、本発明の方法及びキットにおいてPitx1発現の検出を可能にするであろう、本発明のプローブ又は抗体の標識を言及する。本発明は特に、特定の核酸配列の検出のためへのラベルの使用に依存するものではないが、そのようなラベルは、検出の感度を高めることにより、有益であり得る。さらに、それは自動化を可能にする。プローブは、多くの良く知られている方法に従ってラベルされ得る。

【0035】

検出可能マーカの非制限的例は、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 及び ^{35}S を包含する。検出可能マーカの非制限的例は、リガンド、蛍光発色団、化学発光剤、酵素及び抗体を包含する。本発明の方法の感度の上昇を可能にすることができる、プローブと共に使用するための他の検出可能マーカは、ビオチン及び放射性ヌクレオチドを包含する。特定のラベルの選択が、それがプローブ又は抗体に結合される態様を指図することは、当業者に明らかであろう。

【0036】

一般的に知られているように、放射性ヌクレオチドは、いくつかの方法により、本発明のプローブ中に組み込まれ得る。その非制限的例は、 γ ^{32}P ATP及びポリヌクレオチドキナーゼを用いてのプローブの5'末端のキナーゼ処理、放射性dNTPの存在下でのE. コリのPol Iのクレノウフラグメントの使用（例えば、低溶融ゲルにおけるランダムオリゴヌクレオチドプライマーを用いての均等にラベルされたDNAプローブの使用）、1又は複数の放射性NTPの存在下でのDNAセグメントを転写するためへのSP6/T7システムの使用、及び同様のものの使用を包含する。

【0037】

本発明はまた、化合物の選択方法にも関する。本明細書において使用される場合、用語“化合物”とは、天然、合成又は半合成化合物、例えば化学物質、高分子、細胞又は組織抽出物（植物又は動物からの）、糖酸分子、ペプチド、抗体及びタンパク質を包含するが、但しそれらだけには限定されない。

【0038】

本発明はまた、アレイにも関する。本明細書において使用される場合、“アレイ”とは、合成的に又は生合成的に調製され得る分子の意図的に創造された収集である。アレイにおける分子は、お互い同一であるか、又はお互い異なることができる。アレイは、種々の形、例えば可溶性分子のライブラリー；樹脂ビーズ、シリカチップ、又は他の固体支持体に接合される化合物のライブラリーを仮定することができる。

【0039】

本明細書において使用される場合、“核酸分子のアレイ”とは、種々の形（例えば、可溶性分子のライブラリー；及び樹脂ビーズ、シリカチップ又は他の固体支持体に結合されるオリゴヌクレオチドのライブラリー）で、合成的に又は生合成的に調製され得る核酸の意図的に創造された収集である。さらに、用語“アレイ”とは、実質的にいずれかの長さの核酸（例えば、1～約1000個の長さのヌクレオチドモノマー）を、支持体上にスポットすることにより調製され得る核酸のそれらのライブラリーの包含を意味する。

【0040】

用語“核酸”とは、本明細書において使用される場合、プリン及びピリミジン塩基、又は他の天然の、化学的に又は生化学的に修飾された、非天然の又は誘導体化されたヌクレオチド塩基を含んで成る、いずれかの長さのポリマー形のヌクレオチド、すなわちポリヌ

10

20

30

40

50

クレオチド、デオキシリボヌクレオチド又はペプチド核酸（PNA）のいずれかを言及する。

【0041】

ポリヌクレオチドの主鎖は、典型的には、RNA又はDNAに見出され得るように、糖又はホスフェート基、又は修飾された又は置換された糖又はホスフェート基を含んで成る。ポリヌクレオチドは、修飾されたヌクレオチド、例えばメチル化されたヌクレオチド及びヌクレオチド類似体を含んで成る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分により中断され得る。従って、用語ヌクレオシド、ヌクレオチド、デオキシヌクレオシド及びデオキシヌクレオチドは一般的に類似体、例えば本明細書に記載されるそれらを包含する。

【0042】

それらの類似体は、核酸又はオリゴヌクレオチド配列中に組み込まれる場合、それらが溶液において天然に存在する核酸配列とのハイブリダイゼーションを可能にするよう、天然に存在するヌクレオシド又はヌクレオチドと同じ様にいくつかの構造的特徴を有するそれらの分子である。典型的には、それらの類似体は、塩基、リボース又はホスホジエステル成分の置換及び/又は修飾により、天然に存在するヌクレオシド及びヌクレオチドから誘導される。前記変化は、ハイブリッド形成を安定化するか又は不安定化するか、又は所望には、相補的核酸配列とのハイブリダイゼーションの特異性を増強するためにオーダーメイドされ得る。

【0043】

本明細書において使用される場合、“固体支持体”、“支持体”及び“基質”とは、交換可能的に使用され、そして硬質又は半硬質の表面を有する材料又は材料グループを言及する。多くの態様においては、固体支持体の少なくとも1つの表面は、実質的に平らであるが、但しいくつかの態様においては、例えばウェル、高められた領域、ピン、蝕刻溝又は同様のものにより、異なった化合物のための合成領域を物理的に分離することが所望される。他の態様によれば、固体支持体は、ビーズ、樹脂、ゲル、微小球又は他の幾何学的形状の形を取るであろう。

【0044】

いずれかの既知核酸アレイが本発明に従って使用され得る。例えば、そのようなアレイは、短い又は長いオリゴヌクレオチドプローブ又はプライマー、又はポリメラーゼ鎖反応（PCR）生成物に基づかれるそれらを包含する（Lyons P., 2003. Advances in spotted microarray resources for expression profiling. Briefings in Functional Genomics and Proteomics 2, 21-30）。他の方法は、遺伝子発現の一連の分析（SAGE）、示差表示（Ding G. and Cantor C. R., 2004. Quantitative analysis of nucleic acids - the last few years of progress. J Biochem Biol 37, 1-10）及び減法ハイブリダイゼーション方法（Scheel J., Von Brevern M. C, Horlein A., Fisher A., Schneider A., Bach A. 2002. Yellow pages to the transcriptome. Pharmacogenomics 3, 791-807）、示差スクリーニング（DS）、RNA任意プライマー（RAP）-PCR、示差的に発現された配列の制限エンドヌクレオリティック分析（READS）、増幅された制限フラグメント-長多形現象（AFLP）を包含する。

【0045】

核酸ハイブリダイゼーション実験、例えばサザン及びノザンハイブリダイゼーションにおける“緊縮ハイブリダイゼーション条件”及び“緊縮ハイブリダイゼーション洗浄条件”は、配列依存性であり、そして異なった環境パラメーター下で異なる。T_mは、標的配列の50%が完全に適合されたプローブに対してハイブリダイズする温度（定義されたイオン強度及びpH下）である。特異性は典型的には、後-ハイブリダイゼーション洗浄の機能であり、その決定的因子は最終溶液のイオン強度及び温度である。

【0046】

DNA-DNAハイブリッドに関しては、T_mは、Melinkoth and Wahl (1984)の等式、 $T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6 (\log M) + 0.41 (\%GC) - 0.61 (\%形) - 500/L$ から近似され得、ここでMは、一価カチオンのモル濃度であり、%GCはDNAにおけるグアノシン及びシトシンヌクレオチド

10

20

30

40

50

の%であり、%形はハイブリダイゼーション溶液におけるホルムアミドの%であり、そしてLは塩基対におけるハイブリッドの長さである。T_mはそれぞれ1%のミスマッチに関して約1℃低められ；従って、T_m、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄条件は所望する同一性の配列にハイブリダイズするよう調節され得る。例えば、90%以上の同一性を有する配列が調べられる場合、T_mは10℃低められる。

【0047】

一般的に、緊縮条件は、定義されるイオン濃度及びpHでの特定の配列及びその補体に関して、熱溶融点Iよりも約5℃低く選択される。しかしながら、厳しい緊縮条件は熱溶融点Iよりも1, 2, 3又は4℃低い温度でのハイブリダイゼーション及び/又は洗浄を使用し；適度な緊縮条件は熱溶融点Iよりも6, 7, 8, 9又は10℃低い温度でのハイブリダイゼーション及び/又は洗浄を使用し；低い緊縮条件は熱溶融点Iよりも11, 12, 13, 14, 15又は20℃低い温度でのハイブリダイゼーション及び/又は洗浄を使用することができる。

10

【0048】

前記等式、ハイブリダイゼーション及び洗浄組成物、及び所望するTを用いて、当業者は、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄溶液の緊縮性の変動が本質的に記載されていることを理解するであろう。所望する程度のミスマッチが45℃（水溶液）又は32℃（ホルムアミド溶液）よりも低いTをもたらす場合、高い温度が用いられ得るよう、SSC濃度を高めることが好ましい。核酸のハイブリダイゼーションについての集中的なガイドは、Tijssen, 1993に見出される。一般的に、高い緊縮ハイブリダイゼーション及び洗浄条件が、定義されるイオン強度及びpHでの特定の配列に関して、熱溶融点T_mよりも約5℃低く選択される。

20

【0049】

高い緊縮洗浄条件の例は、約15分間、72℃での0.15MのNaClである。緊縮洗浄条件の例は、15分間、65℃での0.2×SSC洗浄である（Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY for a description of SSC bufferを参照のこと）。しばしば、高い緊縮洗浄は、バックグラウンドプローブシグナルを除去するために低い緊縮洗浄に続く。例えば100以上のヌクレオチドの重複体の中位の緊縮洗浄の例は、15分間、40℃での4～6×SSCである。

【0050】

30

短いプローブ（例えば、約10～50のヌクレオチド）に関しては、緊縮条件は典型的には、約1.5以下、より好ましくは約0.01～0.1Mの塩濃度、pH7.0～8.3でのNaイオン濃度（又は他の塩）を包含し、そして温度は典型的には、長いプローブ（例えば、50以上のヌクレオチド）に関しては、少なくとも30℃及び少なくとも約60℃である。緊縮条件はまた、脱安定化剤、例えばホルムアミドの添加により達成され得る。

【0051】

一般的に、特定のハイブリダイゼーションアッセイにおける未関係のプローブについて観察されるシグナル：ノイズ比の2倍（又はそれ以上）のその比は、特定のハイブリダイゼーションの欠失を示す。緊縮条件下でお互いハイブリダイズしない核酸は、それらがコードするタンパク質が実質的に同一である場合、まだ実質的に同一である。これは、例えば、核酸のコピーが遺伝子コードにより可能にされる最大コドン縮重を用いて創造される場合、発生する。

40

【0052】

非常に高い緊縮条件が、特定のプローブについてのT_mに等しくあるよう選択される。サザン又はノザンプロットにおいてフィルター上に100よりも多くの相補的残基を有する相補的核酸のハイブリダイゼーションについての緊縮条件の例は、50%ホルムアミド、例えば37℃での、50%ホルムアミド、1MのNaCl、1%SDSにおけるハイブリダイゼーション、及び60～65℃での0.1×SSCにおける洗浄である。典型的な低い緊縮条件は、37℃での30～35%ホルムアミド、1MのNaCl、1%SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）の緩衝溶液、及び50～55℃での1×～2×SSC（20×SSC=3.0MのNaCl/0.3Mのクエン酸三ナトリウム）における

50

洗浄によるハイブリダイゼーションを包含する。典型的な中位の緊縮条件は、37℃での40～45%のホルムアミド、1.0MのNaCl、1 %SDS、及び55～60℃での0.5×～1XSSCにおける洗浄におけるハイブリダイゼーションを包含する。

【0053】

塩化テトラメチルアンモニウム (TeMAC) を含む溶液による洗浄は、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションを用いる単一のミスマッチの検出を可能にする。なぜならば、そのようなミスマッチはアニーリング温度において10℃の差異を生成することができたからである。洗浄温度を決定するための公式は、 $T_m (^\circ\text{C}) = 1 - 682 (L^{-1}) + 97$ であり、ここでLは、ハイブリダイゼーションのために使用されるであろうオリゴヌクレオチドの長さを表す。

10

【0054】

本発明は、単離された核酸、タンパク質又はリガンド、例えば本発明の抗体を含んで成る、AISを分類し、そして/又は対象がAISを発症する危険性を有するかどうかを予測するためのキットに関する。例えば、本発明の仕切られたキットは、試薬が別々の容器に含まれるいずれかのキットを包含する。そのような容器は、小さなガラス容器、プラスチックの容器、又はプラスチックは低のストリップを包含する。そのような容器は、サンプル及び試薬がクロス汚染されず、そして個々の容器の剤又は溶液が1つの区画からもう1つの区画に定量的に添加されるよう、1つの区画からもう1つの区画への試薬の効果的移行を可能にする。

【0055】

20

そのような容器は、対象サンプル (DNAゲノム核酸、細胞サンプル又は血液サンプル) を受容するであろう容器、本発明のいくつかのキットに、本発明の方法に使用されるプローブを含む容器、酵素を含む容器、洗浄試薬を含む容器、及び拡張生成物を検出するために使用される試薬を含む容器を包含するであろう。本発明のキットはまた、AISを分離し、又は対象がAISの発症の危険性を有するかどうか予測するためにそれらのプローブ及び/又は抗体を使用する説明書を含むことができる。

【0056】

本明細書において使用される場合、表現“精製された抗体”における用語“精製された”とは、動物により、それ自身の抗原に対して天然において生成され得る抗体を、人工抗体とを区別することを単純に意味する。従って、未精製血液、及び抗-Pitx1抗体を含むハイブリドーマ培養培地は、本発明の意味内の“精製された抗体”である。

30

【0057】

本明細書において使用される場合、用語“リガンド”とは、天然、合成又は半合成分子を広くは言及する。従って、用語“分子”とは、例えば化学物質、高分子、細胞又は組織抽出物 (植物又は動物からの) 及び同様のものを示す。分子の非制限的例は、核酸分子、ペプチド、抗体、炭水化物及び薬剤を包含する。本発明のための適切なリガンドは、種々の手段、例えばランダムスクリーニング、合理的選択、及び例えばタンパク質又はリガンドモデリング方法、例えばコンピューターモデリングを用いての合理的企画により選択され、そしてスクリーンされ得る。

【0058】

40

用語“合理的に選択される”又は“合理的に企画される”とは、本発明の相互作用ドメインの立体配位に基づいて選択された化合物を定義することを意味する。当業者により理解されるように、天然において存在しない修飾を有する高分子はまた、用語“リガンド”の範囲内である。例えば、医薬産業において良く知られ、そして一般的にペプチド類似体として言及されるペプチド擬似体は、上記に言及されるようなモデリングにより生成され得る。

【0059】

抗体：

Pitx1に向けられモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体の両者は、それらが当業者に知られている十分に確立された方法により生成され得る場合、本発明の範囲内に包含

50

される。さらに、第1抗体に向けられるいずれかの第2抗体（モノクローナル又はポリクローナルのいずれか）もまた、本発明の範囲内に包含される。

【0060】

本明細書において使用される場合、用語“抗体-Pitx1抗体”又は“免疫学的に特異的な抗-Pitx1抗体”とは、Pitx1タンパク質に対して特異的に結合し（相互作用し）、そしてPitx1タンパク質と同じ抗原決定因子を共有するタンパク質以外の他の天然に存在するタンパク質に対する実質的な結合を示さない抗体を言及する。用語、抗体又は免疫グロブリンは最も広い意味で使用され、そしてそれらが所望する生物学的活性を示す限り、モノクローナル抗体（十分な長さのモノクローナル抗体を包含する）、ポリクローナル抗体、多特異的抗体、及び抗体フラグメントを包含する。抗体フラグメントは、十分な長さの抗体の一部、一般的にその抗原結合又は可変領域を含んで成る。

10

【0061】

抗体フラグメントの例は、Fab、Fab'、F(ab')₂及びFvフラグメント、ジアボディー（diabodies）、線状抗体、一本鎖抗体分子、単ドメイン抗体（例えば、ラクダからの）、サメNAR単ドメイン抗体、及び抗体フラグメントから形成される多特異的抗体を包含する。抗体フラグメントはまた、CDR又は抗原結合ドメイン、例えばVH領域（V_H、V_H-V_H）、アンチカリン（anticalins）、PepbodiesTM、抗体-T細胞エピトープ融合体（Trobodies）又はPeptibodies（但し、それらだけには限定されない）を含んで成る結合成分を言及する。さらに、第1抗体に向けられるいずれかの第2抗体（モノクローナル又はポリクローナル）はまた、本発明の範囲内に包含される。

20

【0062】

一般的に、抗体（モノクローナル抗体及びハイブリドーマを包含する）の調製及び抗体を用いての抗原の検出技法は、当業界において良く知られている（Campbell, 1984, In "Monoclonal Antibody Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", Elsevier Science Publisher, Amsterdam, The Netherlands、及びHarlow et al., 1988、Antibody A Laboratory Manual, CSH Laboratories）。用語、抗体とは、ポリクローナル、モノクローナル抗体及び抗体変異体、例えば一本鎖抗体、ヒト適合された抗体、キメラ抗体及びHyphenにおけるそれらのそれぞれの相互作用ドメイン阻害するか、又は中和し、そして/又はそれらに対して特異的である抗体の免疫学的活性フラグメント（例えば、Fab及びFab'フラグメント）を包含する。

30

【0063】

ポリクローナル抗体は好ましくは、アジュバントを伴って、又は伴わないで、適切な抗原の複数回の皮下（sc）、静脈内（iv）又は腹腔内（ip）注射により、動物において発生される。免疫化される種において免疫原であるタンパク質、例えばスカシガイヘモシアニン、血清アルブミン、ウシチログロブリン、又は大豆トリプシンインヒビターに、適切な抗原を、二官能価又は誘導化剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシイミドエステル（システイン残基を通しての場合）、N-ヒドロキシスクシンイミド（リシン残基を通して）、グルタルアルデヒド、無水琥珀酸、SOCl₂又はR1N=C=NR（ここでR及びR¹は異なったアルキルである）を用いて接合することは有用である。

【0064】

40

動物は、抗原又は接合体（例えば、ウサギに関して100 µg又はマウスに関しては5 µg）と、3体積のフロント完全アジュバントとを組合し、そして複数部位で前記溶液を皮膚内に注射することにより、抗原、免疫原性接合体又はイ誘導体に対して免疫化され得る。1ヵ月後、動物は、フロント完全アジュバント中、抗原又は接合体（例えば、免疫化するために使用される元の量1/5〜1/10）により、複数部位で皮下注射することにより追加免疫化される。7〜14日後、動物は放血され、そして血清が抗体力価についてアッセイされる。動物は、力価プラトーまで、追加免疫化される。好ましくは、接合体免疫化に関しては、動物は、同じ抗原の、但し異なったタンパク質に及び/又は異なった架橋剤を通して接合される接合体により追加免疫化される。接合体はまた、タンパク質融合体として、組換え細胞培養物において製造され得る。また、凝集剤、例えばミョウバンが、免疫応答を増

50

強するために、適切には使用される。

【0065】

モノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975)により最初に記載されたハイブリドーマ方法を用いて製造され得るか、又は組換えDNA方法（例えば、アメリカ特許第6,204,023号）により製造され得る。モノクローナル抗体はまた、アメリカ特許第6,025,155号 及び第6,077,677号 、並びに アメリカ特許出願公開番号 2002/0160970号及び2003/0083293号（例えば、またLindenbaum et al., 2004を参照のこと）に記載される技法を用いて製造され得る。

【0066】

ハイブリドーマ方法においては、マウス又は他の適切な宿主動物、例えばラット、ハムスター又はモンキーが免疫化され（例えば、上記に記載されるようにして）、免疫化のために使用される抗原に対して特異的に接合するであろう抗体を生成するか又は生成できるリンパ球が誘発される。他方では、リンパ球はインビトロ免疫化され得る。次に、リンパ球は、ハイブリドーマ細胞を形成するために、適切な融合剤、例えばポリエチレングリコールを用いてメラノーマ細胞により融合される。

10

【0067】

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞は、融合されていない親メラノーマ細胞の増殖又は生存を阻害する1又は複数の物質を、好ましくは含む適切な培養培地に接種され、そして増殖される。例えば、親メラノーマ細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRT又はHPRT）を欠いている場合、ハイブリドーマのための培養培地又は典型的には、HGPRT－欠失細胞の増殖を妨げる、ヒポキサンチン、アミノタンパク質及びチミジン（HAT培地）を含むであろう。

20

【0068】

本発明のほかの目的、利点及び特徴は、添付図面に関してのみ例により与えられるが、その特定の態様の次の非制限的記載に基づいて、より明らかになるであろう。

【0069】

例示態様の記載：

本発明は、重度に影響されたAIS患者（ $n=46$ ）の外科手術的に得られた生検に由来する造骨細胞におけるpitx遺伝子発現の損失を、RT-PCR分析により示し、ところが非側弯患者（外傷患者）に由来する造骨細胞はまだPitx1を発現した（ $n=29$ ）。

30

本発明、次の非制限により、さらに詳細に示される。

【0070】

ヒト検体：

告知同意は、それぞれ個々の及び集合的Institutional Review Board (Ste-Justine University Hospital, Montreal's Children Hospital and The Shriners Hospital for Children all located in Montreal)により承認されるよう、すべての研究参加者から得られた。すべての個人は、問題の突発的性質を仮定して、病歴及び臨床学的データを包含する一連の段階を通してスクリーンされた。これに続いて、脊柱放射線写真を再考した。病歴及び身体的試験が突発性側弯症の診断と一致し、そして脊柱回転により前頭面における最少 10° の弯曲が放射線写真上に見出される場合、個人はAISにより影響されると思われた。参加者はまた、ケースバイケースに基づいて、障害の潜在的家族分布に関してスクリーンされるであろう。傷害が家族に見出される場合、家族メンバーは、その病状の存在又は不在について同様のスクリーニングを受けているであろう。我々の外傷クリニックを訪問する他の患者（側腕章を有さない）が対照として使用された。

40

【0071】

試験されたAIS及び対照被験者の臨床学的特徴がそれぞれ、表2～表4に示される。AIS以外の診断の側弯症患者は、対照被験者として試験された。

【0072】

【表 2】

表 2 : 試験されたAIS被験者の臨床学的特徴 :

番号	GeN/AER	年齢	曲線タイプ	Cobb角度	遺伝性
1006	f	12, 65	二重主要部	61-46	なし
1007	m	18, 67	右胸腰	61	あり
1045	f	19, 48	左胸腰	38	なし
1066	f	17, 33	右胸部	53	あり
1137	f	20, 54	二重主要部	65-42	なし
1167	m	14, 58	左胸部	49	なし
1263	f	13, 32	二重主要部	53	なし
1266	m	15, 56	二重主要部	52	なし
1274	f	13, 27	二重主要部	42	なし
1276	f	15, 26	左胸部	42	なし
1277	f	12, 73	二重主要部	57-48	なし
1280	f	14, 4	二重主要部	56-46	なし
1294	f	16, 92	左胸部	N/A	あり
1306	f	13, 15	二重主要部	77-48	あり
1308	f	15, 3	二重主要部	77-20	なし
1310	f	15, 42	二重主要部	55-42	なし
1311	f	14, 6	二重主要部	78	あり
1315	f	14, 62	右胸部	91	なし
1317	f	13, 97	右胸部	53	あり
1318	f	13, 7	左胸腰	49	なし
1322	f	13, 11	二重主要部	51	なし
1325	f	16, 16	左胸部	44	あり
1329	m	14, 02	右胸腰	61	あり
1335	f	17, 6	二重主要部	47-50	なし
1337	f	14, 13	二重主要部	57-48	あり
1339	f	14, 28	右胸部	31	なし
1346	f	13, 54	二重主要部	50-34	あり
1347	f	18, 55	二重主要部	56-45	なし
1349	f	11, 69	左胸腰	74	なし
1352	f	7, 8	右胸部	51	なし
1360	f	9, 92	二重主要部	53-46	あり
1385	f	16, 06	二重主要部	42-23	なし
1390	f	15, 61	左胸腰	53	なし

【 0 0 7 3 】

【表 3】

表 3 (表 2 の続き)

1391	f	15, 01	左腰部	54	なし
1395	f	17, 79	左胸腰	84	あり
1402	f	15, 82	右胸部	51	なし
1406	f	14, 89	二重主要部	62-60	なし
1409	f	13, 62	右胸部	40	なし
1410	f	13, 73	右胸部	56	あり
1417	f	13, 24	右胸部	59	あり
1418	f	13, 08	右胸部	41	なし
1420	f	13, 42	二重主要部	60-48	あり
1422	f	12, 44	二重主要部	60-50	あり
1425	f	13, 42	右胸部	68	あり
1439	f	N/A	右胸部	69	あり
1442	f	N/A	右胸部	60	なし

N/A: 入手できなかった

10

20

【0 0 7 4】

【表 4】

表 4：試験された対照被験者の臨床学的特徴：

番号	性別	年齢	健康状態	曲線タイプ	Cobb 角度	遺伝性
C100	f	N/A	健康	nd	nd	なし
C101	N/A	N/A	健康	nd	nd	なし
C102	f	18	健康	nd	nd	なし
C103	N/A	N/A	健康	nd	nd	なし
C104	f	14	健康	nd	nd	なし
C105	f	11	健康	nd	nd	なし
C106	m	12	健康	nd	nd	なし
C107	f	13	健康	nd	nd	なし
C108	f	12	健康	nd	nd	なし
C109	m	14	健康	nd	nd	なし
C110	m	15	健康	nd	nd	なし
C111	m	14	健康	nd	nd	なし
C112	f	11	健康	nd	nd	なし
C113	m	14	健康	nd	nd	なし
C114	N/A	N/A	健康	nd	nd	なし
C115	m	17	健康	nd	nd	なし
C116	m	12	健康	nd	nd	なし
C117	m	16	健康	nd	nd	なし
C118	m	12	健康	nd	nd	なし
C119	f	15	健康	nd	nd	なし
C120	f	15	健康	nd	nd	なし
C121	f	8	健康	nd	nd	なし
1285	f	15, 87	麻痺性側弯症	N/A	72	あり
1293	m	11, 79	先天性側弯症	左腰	38	なし
1341	f	11, 14	先天性側弯症	二重主要部	61-65	なし
1375	f	13, 71	先天性側弯症	右胸腰	53	あり
1431	m	19, 13	神経学的側弯症	二重主要部	90-90	なし
1434	f	12, 43	先天性側弯症	二重主要部	79-77	なし
1436	f	13, 93	脊柱後弯症	脊柱後弯症	120	なし

N/A：入手できなかった。nd：検出されなかった。

【0075】

造骨細胞培養物：

造骨細胞は、AIS患者の脊柱手術及び対照被験者の場合、外傷手術の間、外科手術的に採取された骨検体から得られた。この細胞型は、前に記載されたように、この研究のための細胞モデルとして選択された (Rodriguez MM, Ron D, Touhara K, Chen CH, Mochly-Rosen D. RACK1, a protein kinase C anchoring protein, coordinates the binding of activated protein kinase C and select pleckstrin homology domains in vitro. Biochemistry. 1999;38: 13787-13794)。

【0076】

ヒト造骨細胞の単離：

すべての場合、造骨細胞は、脊髄に起因する骨検体から外科手術的に得られた（実施される手術方法に従ってT3～L4に異なる）。骨断片は、無菌条件下で骨カッターにより、より小さな断片に機械的に小さくされ、そして10%ウシ胎児血清（FBS）（証明されたFBS、

Invitrogen, Burlington, ON, Canada) 及び 1 % ペニシリン/ストレプトマイシン (Invitrogen) を含む DMEM 培地の存在下で 100mm の培養皿において 5% CO₂ 下で 37℃ でインキュベートされた。30 日の期間の後、骨断片に由来する造骨細胞が、トリプシン処理により、残る骨断片から集密下で分離された。

【0077】

合計の RNA 単離及び RT-PCR :

造骨細胞からの RNA の抽出が、標準の Trisol 試薬方法 (Invitrogen) を用いて行われた。

造骨細胞から得られた RNA は、Invitrogen ThermoscriptTM RT-PCR システム 及び 次の条件下でのそれぞれのプロトコールにより実施される cDNA 合成のために使用された : 使用される酵素 : InvitrogenTM からの Taq DNA ポリメラーゼ、PCR 条件 : 95℃、5 分、ホットスタート (1 サイクル)、次の 3 種の反応 (32 サイクル) : 94℃、44 秒の変性 ; 55℃、45 秒 ; プライマーアニーリング : 72℃ 1 分の延長 ; 72℃ 2 分 最後の延長 (1 サイクル) ; 4℃ 20 分の休止 ; 持続期間 : 2 時間 42 分。cDNA の品質が、センスプライマー 5'-GGAAATCGT GCGTGACAT-3' (配列番号 4) 及び アンチセンスプライマー 5'-TCATGATGGAGTTGAATGTAGTT-3' (配列番号 5) を用いて、ヒト β-アクトチンの 233bp フラグメントを増幅することにより試験された。定量的分析に関しては、すべての増幅は、ハウスキーピング遺伝子 β-アクトチンの増幅に対して標準化された。PCR 増幅された生成物は、1.5% アガロースゲル上で分離され、そして臭化エチジウム染色により可視化された。

【0078】

Pitx1 の発現分析 :

長さ 501bp の Pitx1 のコード領域が、センスプライマー 5'- GACCCAGCCAAGAAGAAGAA-3' (配列番号 6) 及び アンチセンスプライマー 5'- GAGGTTGTTGATGTTGTTGAGG-3' (配列番号 7) を用いて、次の PCR 条件下で cDNA から増幅された : 使用される酵素 : InvitrogenTM からの TaqDNA ポリメラーゼ、PCR 条件 : 95℃ 10 分のホットスタート (1 サイクル) ; 次の 3 種の反応 (34 サイクル) : 94℃ 45 秒の第 2 変性 ; 69℃ 45 秒のプライマーアニーリング : 72℃ 1 分の延長 : 72℃ 2 分の最後の延長 (1 サイクル) ; 4℃ 20 分 ; 4℃ 休止 ; 持続期間 : 2 時間 34 分 11 秒。

【0079】

Pitx1 プロモーター配列決定 :

pitx1 プロモーター 10kb 領域が、突然変異についてスクリーンするために、次の条件下で増幅され、そして配列決定された : 使用される酵素 : InvitrogenTM Taq DNA ポリメラーゼ ; 95℃ 5 分のホットスタート (1 サイクル) ; 次の 3 種の反応 (35 サイクル) : 94℃ 45 秒の変性 ; 61.8℃ 45 秒のプライマーアニーリング ; 72℃ 1 分の延長 ; 72℃ 5 分の最後の延長 (1 サイクル) ; 4℃ 20 分 ; 及び 4℃ 休止。

100ng のゲノム DNA が、200 μM の dNTP、1.5mM の MgCl₂、10pM の個々のプライマー (使用されるプライマーの列挙については下記表 4 を参照のこと) 及び 1U の Pfx DNA-ポリメラーゼ (Invitrogen) 又は他の DNA ポリメラーゼを含む、25 μl の最終体積で混合された。

【0080】

PCR 条件 : 領域 PP1, PP2, PP3, PP6, PP7 が、次の PCR 条件下で、InvitrogenTM からの Platinum (商標) pfx DNA ポリメラーゼを用いて増幅された : 95℃ 5 分のホットスタート (1 サイクル) ; 次の 3 種の反応 (35 サイクル) : 94℃ 30 秒の変性 ; 60℃ 30 秒 ; プライマーアニーリング ; 68℃ 1 分 20 秒の延長 ; 68℃ 2 分 ; 最後の延長 (1 サイクル) ; 4℃ 20 分 ; 4℃ 休止 ; 持続期間 : 2 時間 35 分 26 秒。

【0081】

領域 PP4, PP8, PP9 及び PP10 が、次の条件下で、InvitrogenTM からの高適合性 Platinum (商標) Taq DNA ポリメラーゼを用いて増幅された : 95℃ 2 分のホットスタート (1 サイクル) ; 次の 3 種の反応 (35 サイクル) ; 94℃ 45 秒の変性 ; 60℃ 45 秒のプライマーアニーリング ; 72℃ 1 分 20 秒の延長 ; 72℃ 5 分の最後の延長 (1 サイクル) ; 4℃ 20 分 ; 4℃ 休止 ; 持続期間 : 2 時間 53 秒 4 秒。

【0082】

【表 5】

表 5 : Pitx プロモータープライマー :

PP1 (962bp)	前方向プライマー5'-CTGTTTGCTCAAGACGCTGA-3' (配列番号 8) 逆方向プライマー5'-CTCGGCCTCACAAAAGAAAC-3' (配列番号 9)
PP2 (966bp)	前方向プライマー5'- TGTCTGCATTGAGGCTGTTT -3' (配列番号10) 逆方向プライマー5'- GATTCCCTCCTCGAGTCCTT -3' (配列番号11)
PP3 (1039bp)	前方向プライマー5'-CAAGTGAGCTGGATGCTGAA -3' (配列番号12) 逆方向プライマー5'-AGGGAGTGTCCCTTCACAGA -3' (配列番号13)
PP4 (1085bp)	前方向プライマー5'-GCTCAGCCATTCTCAGGAAC -3' (配列番号14) 逆方向プライマー5'-GCCATTGTCCAGTCAAGAT -3' (配列番号15)
PP5 (1011bp)	前方向プライマー5'-TCGCGTCAAGAGGGTATTTT -3' (配列番号16) 逆方向プライマー5'-TAGGACCCATGGCTCTACCC -3' (配列番号17)
PP6 (1098bp)	前方向プライマー5'-CACGAGTCAGGTGGGAAACT -3' (配列番号18) 逆方向プライマー5'-GACGTCTGCTGCTTTTCTGC -3' (配列番号19)
PP7 (963bp)	前方向プライマー5'-AGGCACGGACTAGCAGGAC -3' (配列番号20) 逆方向プライマー5'-ATGCGGACGAAGCCAGAG -3' (配列番号21)
PP8 (986bp)	前方向プライマー5'-TTAGCATTCAGCCCTCTGT -3' (配列番号22) 逆方向プライマー5'-TTCATGAGATGCAGTCAGCAG -3' (配列番号23)
PP9 (951bp)	前方向プライマー5'-ACAACCTGGTAGGGGCAACAG -3' (配列番号24) 逆方向プライマー5'-TGTGTGGCTTTGGCAAATAA -3' (配列番号25)
PP10 (990bp)	前方向プライマー5'-GCACTGTGCTCCAACCTGTGT -3' (配列番号26) 逆方向プライマー5'-GGGGGAGTGTCTTTTCCTT -3' (配列番号27)

【実施例】

【0083】

例1: 適合された対照の造骨細胞におけるPitx1発現とAIS対象の造骨細胞におけるPitx1発現との比較:

Pitx1がAIS発症及び/又は進行の遺伝的制御において役割を演じるかどうかを決定するために、重度に影響されたAIS患者 (n=46) の外科手術的に得られた生検及び非特異的患者 (外傷の場合) 対照被験者 (n=29) に由来する造骨細胞培養物から調製されたRNAを用いてpitx1遺伝子の発現分析を、実施した。

図1に見られ得るように、AIS患者に由来するすべての造骨細胞はpitx1 mRNA発現の欠失を示したが、ところが対象被験者は、mRNAをまだ発現した。

【0084】

例2: 対象サンプルにおけるPitx1発現の決定:

組織、例えば筋肉 (例えば、副脊髄領域において針を用いて)、骨、軟骨、末梢血液単核細胞 (PBMC, 例えばT及びBリンパ球、及びマクロファージ) 又はPitx1が発現される組織に由来するいずれかの細胞を、患者から単離した。それらの組織からRNAの抽出を、いずれかの標準RNA抽出方法、例えば標準Trisol 試薬方法を用いて行った。長さ501bpのPitx1のコード領域を、例えばRT-PCR又は同時PCRを用いて、cDNAから増幅した。次のPCR条件下でのセンスプライマー5'- GACCCAGCCAAGAAGAAGAA-3' (配列番号6) 及びアンチセンスプライマー5'- GAGGTTGTTGATGTTGTTGAGG-3' (配列番号7) を用いた: 使用される酵素: Invitrogen™からのTaq DNAポリメラーゼ; PCR条件: 95°C 5分のホットスタート (1サイクル)、次の3種の反応 (32サイクル): 94°C 45秒の変性: 55°C 45秒のプライマーアニーリング; 72°C 1分の延長; 72°C 2分の最後の延長 (1サイクル) 及び4°C 20分の休止、持続期間: 2時間42分。

【0085】

本発明はその特定の態様により本明細書において記載されてきたが、それは本発明の範囲内で修飾され得る。

【図 1】

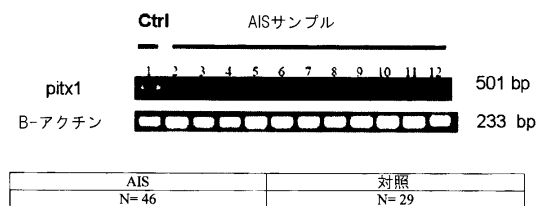


Figure 1

【図 2 - 1】

CCCAATTGCTATCTGTGATAGTGGCTGTGCCCTTCGGGCGCTGAGCACCCCTGTCTGTG
CA
-10006
GCAGTCAGATATCTGGAGSGAGACTGAGGCCTGGCTGCAGAGCTTGTGATCATGAGAGAGCTCACTA
GG
-9940
ACTACAGATGGGTAAACTGAGGCGCTTCGAGGGGCGAGCTOCAGAAAGCGAGGGCCATAATGTCTCACC
TT
-9869
CATATTTCCCGTGGCAAGCTGTGGCTTCTGCATTTCATGGCAGATGAGTGGACAAAGGCTGATGGACTG
AT
-9798
GGACAAACAAAGGGATAGATGGAGCAGCTGGGCGAGCTCAGCAATGATGCTGCAATGATCTCTCCAA
CT
-9727
CACCTCAAAATCCATCCTTCTCTCTCCAGGCGAGTGGGCTTTAAGATACACATCTGGCCAGGCTCTC
AC
-9656
TGTTCAAACCGCTTCATCTGCTCCTTTTTCCTTCAGGATAACATCCACCGCTCCTATCAGGACTATGG
AG
-9595
CCCTGGGATCTGGTTOCCACTTGATTTCTCAACTTCTCTTCCCTATGCGCTGCTTCTCATCTGT
TC
-9514
CAGTGCATATGAAGCCACAGTCTTCTCTTATTATCAAGCATACACAGTTTATCTCACCTCAGAG
GC
-9443
TTTGCAGATATATTTCTAGGAGGGTCCCGAGGTGCTAGAAAAAGGTTACAGCCAACTCTTCCA
TG
-9372
TGTCACTCAAGACCGTTCAACAGCAGGCTGCAGATTTCTCTCCAGCACTGTGCTCAACTGTGTAAATG
GA
-9301
TTCTGTGTCTGCTCCTTGACTCAACCCAAATGAACAGAGCCATCTATCTGTATCTCTGCAATCA
CA
-9230
GGCAGAAATAGGTGCTCTACATTTTTCACACCTGAGAGGCCATTCTAGAAGGCTCTCAGGCCACG
GT
-9159
TCTGTCCAGTATTCATGCGAGATGCTGACAGGACTGCAATTAATAAATACCTTGAGATGCCAAATGCC
CA
-9088
AATAGCTTCTCATTTTGTCTTGACTACCAATTAATGCAAGTGCAATAGATAATGCTCAATACATTA
AG
-9017
ATCTTACTTGATCTAGGGGTCCTCTCTACTTTTAAAGCCTCAAACTTCTCTCTCTCACAGGTGAAA
AG
-8946
GGAGTCAAAATACATTCCTTCTCTGCTGCGGATCCATTCCTACAGGTAGTCAAGACTCTGAGCTT
CC
-8875
CCTCTGACTTCTGCGAGTGTCTCACCTTCCGCCACAGATGAGTGCAGGAACAATCTAACAGACTTCA
GA
-8804
CTCTTCCACAGAGCAATCCCTCCCATCACTTGGAGTGGACTTCTTACCCACACCATCAACAGGCC
CC
-8733
TGAGAACTTCACAGGSCAGGGGCTTCTTTGGTAAACCAACCCCTTCTCTTCCACAGCTCAGAGAAAT
TG
-8662

PP10

CAACAAATATTAGTCACCTTTCTGAAAAACATAATCTGAAAAACAAATATCTCTGCATACCGCTGT
-4331 T (-4320) R87732241
CCTCTGAAAGGCCACCAAGGCCAGGAGGAAATCCCAAGTTCCTGCTCCACCTGGGGAGGATTCAGGCT
TG
-4260 R83502036 (-4245) C (-4238) R87712060 (-4211) G R810054126
GGGTCAGGCTTCACGGTACAGGGCCAAAGCTACAGCAGCAGGGGACGACACAGAGCTTCTGCTCC
CC
-4189 R84976261 (-
4120) G
GTGCCCTTCTCCGGGGCTGCTTCTGGCCTCCCGCATCTCTCCAGGAAAGGAAAGAGGCTGGCTGGG
GC
-4118
GTGGAGCCAGGCTGCTGGACTAGATGTCAGAGGCTCCAGACAGGCTCAGGGTGCTCTTCTCCCA
TG
-4047 G (-4039) R86871427
AAACAGGCTCTGGGACGAGAGGACTATGTCATCAATAAGTGCCTCTCTGCTCCCAAGTGTGGCA
CC
-3976 A (-3966) R81748539
AGCTGTACCTCTTCTAGTCTCTCTCCCCACAGCTCAGCAATCTCAGGAACGACAGCAGCTCATG
-3905
CTTAGGTGAGAGTATGGCGGGGTAGAGCCATGGTCTACCAAGCGGTGACTAGCGGGCCCAAGGACA
CA
-3834
GTCTGAGTTCATATCTCCACTGTCTGGCTCATCTGGGCGGAGTCTGTCTCAATATCATCTGGCTCTCC
CC
-3763
GGCAGAGCTGTACCATTCCTATTTGGCAGAGAGCTCAGACTGGGTGCCAGGAAGCTTAAAGAGCCA
GT
-3692
CGAGTCTTCCAGGCTTACCTAGCAGACCTCTCTCCCACTTACCGAGTAATGCTGTATTCAAGAAA
CG
-3621
GGAGCTTTTATTGGGAGGGGGTGTATAGTACAGCAGAAACAGTAGTGTCACCACTGCACTCCCA
AA
-3570
ACAGGGTTTCAAGTTTGAATCTTCCACGAGCTTAAGAGGCTTACGGTGGAAATGTCCACAGAGTCAT
GT
-3479 R810591676 (-3451) AGT
ATAGCCTGTGGTGGAGGCATGGCATCTCTCTCTTTCTCAATAATCTGATTGTCCAGGACCA
AT
-3408
TAGGCAAGGTGCCCGCTGGTGGTGAAGAGGATGCCCCCACTCAGAGGCTTCCAAACACCTTCC
CA
-3337
AATTACATCTAAACCAATCTTTGGGCACAGGGTGTTTTAGTGAGCCAGCTTCAGAGAGGGTCTCTCA
TG
-3266
GTGACTACTTCAACCCCAACAGCCCAAGCTCTCTGTCTGACGCCAGCAGACGCTTAACCTCCAAAA
AT
-3195
CTTGAAATCAGAGAAATATGCTGGCTTTGTCTGGTCACGAGGGGGTGGGAAACAGGGGCACATGTTCT
CA
-3124
GCTCCACTAAGCCCCCTCCCTCTCTGTGTGCTCCATCAGCAGTGAAGTGTGATGCTGAAGCAGCA
G
-3053
CAGAGTCGGGTGTGGACATGGGAAGTGAAGCAGTGCAGATCAAGCCTTAACCTTGAAGGAAACAC

guttggtggc	ccagaggccca	cccacccagg	caacccctggc	gaagggaatg	cttggaacctg
61	ctgtgcgttt	aaagcagaact	ctgcgcgggc	cgctgcggagc	cttagaagacc
cgcccgagat	121	cgcccgagccg	agccggagccg	ggagccggggg	tgcttagggccc
gagagggagc	181	gagcgagcgtg	acagcaggccg	ccagctgcggc	gaagctgcggc
cgagctctggc	241	cgccgcggcgc	ggcggtggcca	tgggggcgggc	acggcgctgcg
461	cgccgcggcgc	ccgagagccgc	ggcggtggcca	tgggggcgggc	acggcgctgcg
301	ggagcgccctg	gaaggcgacgc	gcttagggcgc	tgcgctcttgg	tcccgcgaagg
tcgcagccagc	361	ggcgccggggg	cgccggccctc	ggagcgccgcg	ccgcggctgcg
cactccacacg	421	gaagctctcgg	agggcgctgag	cgagctggggc	aggagctgcgc
ggcgccggcgc	481	ccgcacccccc	ctgcgcggctc	caactggccc	ggcccgcggca
ccgcggcgag	541	ccgctcgaga	actccgcagc	cgagtctgtt	gaacgcggac
gagcgcgggc	601	ggggacaacca	agggcgccagg	ggacactggt	cgcgagggagc
cgccggcgag	661	ggagcagccgc	agaaagaagaa	gcagcggcgcg	caagctagcgc
cgacagagtg	721	caaggagctag	aggccacgctt	ccagaggaac	cgctaccgcc
ggagggaggg	781	atctgcgctgt	ggacccaacct	caocggagccg	cgctgggggg
gaacccgtga	841	gccaaagctga	gtaagccagc	cgctaaccag	cgagctggacc
tgagctgactg	901	ctcccgagcttc	ggcgctcgtg	ggagccctac	aacgcggcgct
ctatctctac	961	aaacactggcg	ccgcgcaagag	ctcgggcgcca	gcgcgcgtct
cttacccttt	1021	tttcaactctca	tgagcccgctg	gtgctggcag	tcctatgtct
ctctatctct	1081	ttcatcagctca	tgcgctcagc	caatggggcca	cgcgcccgctc
caactcggcg	1141	ttccacacacaa	tcacaacactc	ccggcgctctc	tgctctcaact
ggcgggcgctg	1201	tgccgctlaag	gcactccgcgc	ctcgccctacc	agqgcttacc
caactcggcg	1261	ggcgccagcgc	tgcggtctaa	gtccaaaagcg	caactctcgt
cgcccgctgc	1321	ggccgcgcctg	cggggctcaag	cgcgctggcag	tacaacagct
cgccacccagc	1381	ggcgccggggg	ggcggagggcg	ggggcggggag	gagccgcggcg
ggcgccggcg	1441	tcggagaccc	cagactcacgc	gtccaccagct	cgacgcccccc
tcctccctac	1501	tcacacactcgc	gggtgglttt	gtgttggctt	ttccgggacc
tcacaaaaga	1561	caaaaanaaaa	aaaaaaaana	gaactcgagag	aaaagtgcgc
cgaaaaatatg	1621	gaagaaagaaa	aattctctc	ggagctggcg	gggtggatgc
cgccggccgc	1681	ggagcccccac	tcgcggggag	ggcgagggcg	ggcgagggcgc
caacggcgcg	1741	ggagggagagc	acctcgatc	ccgcgtccccc	gcgcgcgtgg
atcgccggcg					

【図 3－2】

```
1801  cctgcccact  ggaatgtgcg  ggccctggact  tgccctaggat  ttcccgaacc
cgtacaaacc
1861  aagttgcct  ctccgaagcta  gcccgcgcg  agaagccctt  agctcagtc
ggatccgtgt
1921  tggggcgggc  gttgggtttg  ggggacggt  gccccagcc  caggatcggg
cactcagtg
1981  agcgcacac  ggccccggcg  cgcctggtag  agcctcgtg  gccccgcgc
ccggagccct
2041  atattaaggc  cagcgagcga  cagcggcgcg  tgcgggcctg  gcgggaggtg
ggggaggtcc
2101  atctcagaac  accccagcct  tgagcttagc  tgacggccca  ggccctctg
tcctgcctcg
2161  ggttaggagg  tggccctctg  totgggcgaa  cagcccccct  ctacccgcc
gccgtgcaag
2221  agtcagacc  gcagagcaag  gggcgccgcc  ccaggccct  gcgccacctt
tgcacaccgg
2281  ctctccggcc  cgcgccctg  ttacagcgt  cctgtgtat  gttggactga
ctgtaataaa
2341  tctgtctata  tgcactaaaa  aaaaaaaaa  aaa
```

Figure 3

【図 4】

```
MDAFKGMSELRLEGLRPPPPPHDMGPAFULARPADPREPLENSASLSDTELFEXERCGEPKCPED
SGAGGTGCGGADDEAKKKQRQRTHFTSQIQELKATFORNRYFDMSMREZIAVWNLTEPRVRVWFK
NRRAKVRKRRNQQLDLCKGVVPQFSGLVQPYEDVYAAGYSYNWAKSLAPLSTKSTFFNSMSP
LSQSMFSAFSSISSMTMPSSMGPGAVGPMFNSGLNNINLTGSSLNSAMSPGACPYGTASPYSVYRD
TCNSLALSLKSKQHSSFYGLQGPAAGLACQYNS
```

Figure 4

【配列表】

0005539739000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 K 14/47

(74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977
弁理士 中島 勝

(72)発明者 モロー, アレン
カナダ国, アッシュ1ア 5テ5, ケベック, モンレアル, ジュールーウオ 3489

審査官 木原 啓一郎

(56)参考文献 国際公開第03/073102 (WO, A1)
Clin Orthop Relat Res., 2007年 9月, Vol.462, p.59-66

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 Q 1 / 6 8
C 1 2 N 1 5 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I)
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S / W P I D S (S T N)