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

特許第3589113号
(P3589113)

(45)発行日　平成16年11月17日(2004.11.17)　(24)登録日　平成16年8月27日(2004.8.27)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
C12N 15/09	C12N	15/00	ZNAA
C12Q 1/02	C12Q	1/02	
G01N 33/15	G01N	33/15	Z
G01N 33/50	G01N	33/50	Z
// A61P 13/12	A61P	13/12	

請求項の数 6　(全 28 頁)

(21)出願番号　特願平11-266425
(22)出願日　平成11年9月21日(1999.9.21)
(65)公開番号　特開2001-37486(P2001-37486A)
(43)公開日　平成13年2月13日(2001.2.13)
審査請求日　平成13年2月6日(2001.2.6)
(31)優先権主張番号　特願平10-268846
(32)優先日　平成10年9月24日(1998.9.24)
(33)優先権主張国　日本国(JP)
(31)優先権主張番号　特願平11-147635
(32)優先日　平成11年5月27日(1999.5.27)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(73)特許権者　000002956
田辺製薬株式会社
大阪府大阪市中央区道修町３丁目２番１０号
(74)代理人　100115473
弁理士　石津　義則
(72)発明者　山之内　昌也
滋賀県草津市渋川１－１－３０－９１７
(72)発明者　長谷　裕美
東京都板橋区清水町９２－４－５０５
(72)発明者　本田　章子
大阪府豊中市蛍池東町２－４－８－８０５
(72)発明者　菅谷　健
兵庫県伊丹市北本町１－１１０－１－３－６０１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】腎疾患治療薬およびそのスクリーニング方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

動物の細胞又は組織における肝型脂肪酸結合蛋白質の発現に対する被験物質の増強作用を検定することを特徴とする、腎疾患治療薬もしくは予防薬のスクリーニング方法又は同定方法（但し、当該方法においてはヒトに対する医療行為は除く）。

【請求項２】

動物の細胞又は組織における肝型脂肪酸結合蛋白質の発現に対する被験物質の増強作用を検定することを特徴とする、腎疾患治療薬もしくは予防薬のスクリーニング方法又は同定方法であって、動物がヒトである場合には、当該方法はインビトロにて実施されるものであるスクリーニング方法又は同定方法。

【請求項３】

動物の細胞又は組織が腎臓の細胞又は組織である請求項１又は２記載の方法。

【請求項４】

動物の細胞又は組織が近位尿細管細胞である請求項１又は２記載の方法。

【請求項５】

脂肪酸結合蛋白質遺伝子の転写調節領域とその下流に連結されたレポーター遺伝子からなるＤＮＡ構成が導入された細胞を用いるレポーターアッセイにより、被験物質の作用を検定する工程を含む、請求項１又は２記載の方法。

【請求項６】

（１）動物の細胞又は組織を被験物質の存在下および非存在下で培養する工程；および（

２）動物の細胞又は組織中の脂肪酸結合蛋白質の発現量を決定するとともに、被験物質存在下での発現量と、被験物質非存在下での発現量を相互に比較する工程；を含む請求項１又は２記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】

本発明は、腎疾患治療薬のスクリーニング方法および同定方法に関する。特に、脂肪酸結合蛋白質の発現に着目したスクリーニング方法および同定方法に関する。また、腎臓（近位尿細管）の細胞から樹立した細胞株に関する。

【０００２】

【従来の技術】

腎炎などの腎臓疾患は、複雑で多様な病態を呈するが、いずれも慢性化すると、糸球体硬化や間質の線維化などが起こり、さらには腎不全にいたる重篤な経過をたどることがある。このため早い段階での的確な治療が望まれるが、現状では有効な治療薬は極めて少ない。また、数少ない治療薬の一つであるステロイド系薬物は、明確な効果が認められる反面、副作用が非常に強いという問題があり、新しい優れた治療薬が強く求められていた。

【０００３】

一方、脂肪酸結合蛋白質（ＦＡＢＰ：ｆａｔｔｙ　ａｃｉｄ　ｂｉｎｄｉｎｇ　ｐｒｏｔｅｉｎ）は、サイトゾルに存在し、脂肪酸と結合する能力を有する分子量約１５キロダルトン前後の蛋白質群である。脂肪酸を細胞内に転送したり蓄積することによって代謝酵素系の調節に関与していると考えられているが、これまで、ＦＡＢＰと腎疾患との関連性については何ら知られてはいなかった。

【０００４】

ＦＡＢＰとしては、肝型（Ｌ－ＦＡＢＰ）、腸型（Ｉ－ＦＡＢＰ）、心筋型（Ｈ－ＦＡＢＰ）、脳型（Ｂ－ＦＡＢＰ）、皮膚型（Ｃ－ＦＡＢＰ／Ｅ－ＦＡＢＰ）、脂肪細胞型（ａＰ２）、末梢神経細胞型（ミエリンＰ２）等少なくとも７つの分子種が知られている。これらはいずれも脂肪酸結合能を有し、共通の祖先遺伝子から進化したファミリーであると考えられている。各型のＦＡＢＰは特異的な組織分布を示し、命名は、初めにどの組織から見出されたかを意味するが、その組織にしか存在しないことを必ずしも意味するものではない。

【０００５】

ヒトの腎臓組織中では、肝型（Ｌ－ＦＡＢＰ）と心筋型（Ｈ－ＦＡＢＰ）の少なくとも二種類のＦＡＢＰが発現しており、これらのうちＬ－ＦＡＢＰは近位尿細管に分布し、Ｈ－ＦＡＢＰは主として遠位尿細管に分布している（Ｍａａｔｍａｎら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｊｏｕｒｎａｌ、第２８８巻、第２８５－２９０頁、１９９２年；Ｍａａｔｍａｎら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｊｏｕｒｎａｌ、第２７３巻、第７５９－７６６頁、１９９１年）。

【０００６】

ゲッ歯類の腎臓においては、ＦＡＢＰの発現・分布がヒトとは異なる。Ｌ－ＦＡＢＰは近位尿細管ではほとんど発現しておらず、ごく少量遠位尿細管に分布している（Ｍａａｔｍａｎら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｊｏｕｒｎａｌ、第２８８巻、第２８５－２９０頁、１９９２年）。ゲッ歯類の腎臓における主要なＦＡＢＰは、Ｈ－ＦＡＢＰと腎型ＦＡＢＰ（Ｋ－ＦＡＢＰ）である。Ｈ－ＦＡＢＰは主に遠位尿細管に分布している。Ｋ－ＦＡＢＰは、肝臓で合成されたα_{2U}－グロブリンが血中から腎臓を経由して尿中に排出された後、その一部が尿細管細胞内に再吸収され、細胞内でプロセッシングを受けて腎型ＦＡＢＰに変換されると考えられている（Ｋｉｍｕｒａら、ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔｅｒｓ、第２４６巻、第１０１－１０４頁、１９８９年）。

【０００７】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、新規な作用機序を有する腎疾患治療薬もしくは予防薬、そのスクリーニ

ング方法または同定方法を提供することにある。また、前記スクリーニング方法または同定方法等に有用な新規細胞株を提供することにある。

【０００８】

【課題を解決するための手段】

前記の通り、ＦＡＢＰと腎疾患との関連性については何ら知られてはいなかったが、発明者らは、独自に、腎炎モデルマウスで、マクロファージ浸潤や尿細管間質線維化に先行して、尿中あるいは腎臓組織でＦＡＢＰが減少することを見出した。また、ヒトでも、予後不良を示す腎疾患患者で腎組織のＬ－ＦＡＢＰが減少していることを見出し、これら知見に基づいて、ＦＡＢＰに着目した腎疾患の診断方法を確立した（特開平１１－２４２０２６号、ＷＯ９９／２７３６３）。また、発明者らは、さらに研究を進め、ＦＡＢＰの発現増強が腎炎などの腎疾患治療につながること、すなわち、ＦＡＢＰの発現を増強する薬物は腎疾患治療薬となり得ることを見出し、本発明を完成するにいたった。

【０００９】

すなわち、本発明は、動物細胞における脂肪酸結合蛋白質（ＦＡＢＰ）の発現に対する被験物質の増強作用を検定することを特徴とする、腎疾患治療薬もしくは予防薬のスクリーニング方法又は同定方法である。また、かかる方法により選択又は同定された腎疾患治療薬もしくは予防薬である。また、腎臓の細胞又は組織においてＦＡＢＰの発現を増強する作用を有する薬物（ペルオキシソームプロリフェレータ活性化受容体（ＰＰＡＲ）のアゴニスト作用を有する化合物など）を有効成分とする腎疾患治療薬もしくは予防薬である。さらに、前記スクリーニング方法又は同定方法のために有用な新規なマウス近位尿細管上皮細胞株である。

【００１０】

本発明の方法で選択又は同定される腎疾患治療薬もしくは予防薬、すなわちＦＡＢＰの発現を増強する薬物の作用機作は、以下のように考えられる。

【００１１】

高度蛋白尿は、最近では、単なる腎障害の指標ではなくそれ自体危険因子の一つとされており、例えば、蛋白尿の主成分であるアルブミンと脂肪酸を結合させて尿細管上皮細胞に過剰負荷した場合、マクロファージを活性化する脂質性因子が産生されること等が知られている（Ｋｅｅｓ－Ｆｏｌｔｓら、Ｋｉｄｎｅｙ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、第４５巻、第１６９７－１７０９頁、１９９４年；Ｅｄｄｙら、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｏｆ Ｎｅｐｈｒｏｌｏｇｙ、第５巻、第１２７３－１２８７頁、１９９４年）。

【００１２】

尿蛋白と結合した脂肪酸は、近位尿細管上皮細胞の刷子縁膜から再吸収され、細胞内のＦＡＢＰと結合し、ミトコンドリアやペルオキシソームに輸送されβ酸化されると考えられる。しかし、ＦＡＢＰの存在量が十分でない場合には、脂肪酸が正常なβ酸化を受けず、その結果、マクロファージを活性化する脂質性因子（腎障害性因子）の産生等が誘導されて、免疫学的機序による間質の線維化等を進展させるであろう。これに対して、近位尿細管上皮細胞内でのＦＡＢＰの発現を増強させることにより、脂肪酸代謝を正常化し、腎障害性を有する脂質性因子の産生を抑制することで、病態を改善し得ると考えられる。

【００１３】

【発明の実施の形態】

本発明（スクリーニング方法、同定方法及び治療薬）の対象とする疾患としては、糖尿病性腎症、糸球体腎炎、ネフローゼ症候群、巣状糸球体硬化症、免疫複合体腎症（ＩｇＡ腎症、膜性腎症など）、ループス腎炎、薬剤性腎障害および腎不全などの腎疾患が挙げられる。

【００１４】

また、本発明は、ヒトの疾患に適用されるほか、サル、イヌ、ネコ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、ラット、マウスなどの哺乳動物にも適用される。

【００１５】

ヒトなどの哺乳動物（ゲッ歯類以外）において、腎臓の細胞又は組織には、Ｌ－ＦＡＢＰ及びＨ－ＦＡＢＰが発現している。これらのうちＬ－ＦＡＢＰは近位尿細管に分布し、Ｈ－ＦＡＢＰは主として遠位尿細管に分布している。腎疾患治療薬を創製するためには、腎臓の細胞又は組織におけるＦＡＢＰ、特に、近位尿細管細胞におけるＦＡＢＰ（すなわち、ヒトなどにおいてはＬ－ＦＡＢＰ）に着目することが重要と考えられる。

【００１６】

本発明の方法は、以下のような形態で実施できる。すなわち、動物細胞（哺乳動物の細胞又は組織など）を被験物質の存在下に培養し、細胞内でのＦＡＢＰの発現量を、被験物質非存在下で培養した場合と比較することにより、被験物質のＦＡＢＰ発現増強作用を検定すればよい。あるいは、動物個体に被験物質を投与し、腎臓の組織や細胞などにおけるＦＡＢＰの発現を非投与の場合と比較することにより、被験物質のＦＡＢＰ発現増強作用を検定してもよい。

【００１７】

被験物質の存在下（又は投与例）でのＦＡＢＰ発現量が高かった場合に、被験物質は、その度合いに応じた増強作用を有すると判定され、腎疾患治療薬としての効果が期待できる。ＦＡＢＰ発現増強作用の強い被験物質を選別し候補とすることにより、腎疾患治療薬を好適にスクリーニングすることができる。

【００１８】

また、候補薬のＦＡＢＰ発現増強作用を検定し、ＦＡＢＰ発現増強作用を有する薬物として同定することで、腎疾患治療薬としての作用機序が明確にされ、治療薬としての優れた特徴付けを行うことができる。

【００１９】

ＦＡＢＰの発現を検出する方法としては、遺伝子の発現をレポーターアッセイ法によりレポーター蛋白質を指標として測定する方法が挙げられる。また、遺伝子発現をｍＲＮＡレベルで検出することもできる。あるいはまた、細胞抽出液中のＦＡＢＰの発現を蛋白質レベルで直接検出することできる。

【００２０】

遺伝子発現をレポーターアッセイ法で測定する場合、具体的には、例えば、ＦＡＢＰ遺伝子の転写調節領域とその下流に連結されたレポーター遺伝子からなるＤＮＡ構成を調製し、これを適当な動物細胞に導入する。この細胞を、被験物質の存在下及び非存在下に培養した後、細胞抽出液中のレポーター蛋白質の活性などを測定することにより、発現量を定量し比較すればよい。

【００２１】

ＦＡＢＰのアミノ酸配列や遺伝子配列は、多くの種においてすでに報告されている（Ｖｅｅｒｋａｍｐ ａｎｄ Ｍａａｔｍａｎ、Ｐｒｏｇ．Ｌｉｐｉｄ Ｒｅｓ．、第３４巻、第１７－５２頁、１９９５年）。例えば、Ｌ－ＦＡＢＰについては、ヒトのｃＤＮＡ（Ｌｏｗｅら、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、第２６０巻、第３４１３－３４１７頁、１９８５年；Ｇｅｎｂａｎｋ／ＥＭＢＬ登録番号Ｍ１００５０）、ラットの染色体遺伝子（Ｓｗｅｅｔｓｅｒら、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、第２６１巻、第５５５３－５５６１頁、１９８６年；Ｇｅｎｂａｎｋ／ＥＭＢＬ登録番号Ｍ１３５０１）などの配列情報が既知である。

【００２２】

従って、ＦＡＢＰのｃＤＮＡや染色体遺伝子は、前記のような配列情報をもとにプラーマーやプローブを設計し、ＰＣＲ法、コロニーハイブリダイゼーション法、プラークハイブリダイゼーション法等を適宜組合せて、適当なＤＮＡライブラリーから取得できる。

【００２３】

レポーター構成及びこれを含むレポータープラスミドは、ＦＡＢＰの染色体遺伝子中の５’上流域に存在する転写調節領域と、適当なレポーター遺伝子を用いて、通常の遺伝子組換え技術により調製することができる。

【００２４】

レポーター遺伝子は特に限定されないが、安定でかつ活性の定量的測定が容易な酵素の遺伝子などを用いることが好ましい。このようなレポーター遺伝子としては、β－ガラクトシダーゼ遺伝子（ｌａｃＺ）、バクテリアトランスポゾン由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子（ＣＡＴ）、ホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子（Ｌｕｃ）等が挙げられる。

【００２５】

遺伝子発現をｍＲＮＡレベルで検出する場合は、例えば細胞や組織から、ＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を抽出して、ＰＣＲ法（Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｃｈａｉｎ ｒｅａｃｔｉｏｎ ｍｅｔｈｏｄ）（「ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ」Ｉｎｎｉｓ ＭＡ, Ｇｅｌｆａｄ ＤＨ, Ｓｎｉｎｓｋｙ ＪＪ ａｎｄ Ｗｈｉｔｅ ＴＪ ｅｄｓ., Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ, Ｓａｎｄｉｅｇｏ, １９９０年）、ＲＮＡ分解酵素プロテクションアッセイ法（ＲＮａｓｅ ｐｒｏｔｅｃｔｉｏｎ ａｓｓａｙ ｍｅｔｈｏｄ）（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ、第１２巻、第７０３５－７０５６頁、１９８４年）、あるいはノーザンブロット解析法などを利用して、ＦＡＢＰ遺伝子から転写されたｍＲＮＡを検出定量すればよい。

【００２６】

ＦＡＢＰの発現を蛋白質レベルで検出する場合には、例えば抗ＦＡＢＰ抗体などを用いる免疫化学的方法（ＥＬＩＳＡ法、免疫組織染色法など）を用いることができる。抗体は、免疫抗原として精製ＦＡＢＰを用い、常法により調製できる。ＦＡＢＰの各分子種については、すでにその臓器分布、分子量、一次構造などが報告されている（藤井ら、動脈硬化、第２４巻、３５３－３６１頁、１９９６年； Ｖｅｅｒｋａｍｐ ａｎｄ Ｍａａｔｍａｎ、第３４巻、１７－５２頁、１９９５年；Ｄｒｉｃｋａｍｅｒら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、第２５６巻、３６３４－３６３６頁、１９８１年； Ｕｎｔｅｒｍａｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、第７８巻、３４７８－３４８２頁）。精製ＦＡＢＰは、これら情報をもとに調製できる。あるいは、前記既知遺伝子配列情報に基づいて、ｃＤＮＡを単離し、遺伝子組換え技術により調製して用いてもよい。

【００２７】

本発明の方法をインビトロにて、培養細胞を用いて実施する場合、細胞は、動物細胞（哺乳動物の細胞等）を用いることが望ましい。中でも、動物の腎臓由来の細胞が好ましく、尿細管細胞がより好ましく、とりわけ近位尿細管上皮細胞がとりわけ好ましい。細胞は、初代培養細胞、不死化細胞（株化細胞）のいずれを用いてもよい。不死化細胞（株化細胞）を用いた場合には、培養や取り扱いが容易となる点で有利である。

【００２８】

ヒトの腎臓由来の細胞としては、ヒトの尿サンプルから尿中落下細胞（特に近位尿細管上皮細胞）を分離して用いることができる。ヒトの腎臓由来の細胞を用いた場合には、ヒトでの作用をより確かに予測できる点で有利である。

【００２９】

尿細管由来の既知細胞株としては、具体的には例えば、イヌの尿細管（遠位尿細管）由来細胞株であるＭＤＣＫ（ＡＴＣＣ ＣＲＬ ６２５３）、ブタの尿細管（近位尿細管）由来細胞株であるＬＬＣ－ＰＫ１（ＡＴＣＣ ＣＲＬ １３９２）などが挙げられる。

【００３０】

また、これらの他、マウス細胞株ｍＰｒｏｘ３７－１３（受託番号 ＦＥＲＭ ＢＰ－７０３８；受託日 １９９８年９月９日）など、本発明者らが後記実施例２においてマウスの近位尿細管細胞から樹立した不死化細胞株が挙げられる。これら細胞株は、下記（１）、（２）及び（３）の性質を有する。

（１）上皮細胞の形態を有する。

（２）アルブミン取り込み能を有する。

（３）上皮小体ホルモンによる刺激に応答して細胞内ｃＡＭＰ産生が誘導されるが、バソプレッシンによる刺激には応答しない。

【００３１】

前記の既知尿細管由来細胞株のうち、ＬＬＣ－ＰＫ１は近位尿細管由来とされており上皮細胞であるが、生体内の近位尿細管細胞に特徴的なホルモン応答性である（３）の性質を失っている（後記実施例２参照）。これに対し、本発明者らの樹立した細胞株は、ホルモン応答性も含めて近位尿細管上皮細胞の特徴を明確に維持している株化細胞であるので、これら細胞株を使用すれば、生体内の生理的環境により近い系となる。このような細胞を、使用することは、効果的な腎疾患治療薬のスクリーニング方法及び同定方法のために有利である。

【００３２】

本発明の方法により、ＦＡＢＰの発現を増強する作用が認められた被験物質については、さらに腎疾患の既知病態モデル（ｉｎ　ｖｉｖｏ又はｉｎ　ｖｉｔｒｏ）において治療効果及び予防効果を確認すればよい。

【００３３】

このようなインビトロの病態モデルとしては、尿細管細胞を用いる腎障害性リピド（炎症性リピド）の産生モデル（Ｋｅｅｓ－Ｆｏｌｔｓら、Ｋｉｄｎｅｙ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、第４５巻、第１６９７－１７０９頁、１９９４年；後記実施例５）などが挙げられる。また、インビボの病態モデルとしては、加速型抗ＧＢＭ腎炎モデル（Ｎａｇａｉら、Ｊｐｎ．Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．、第３２巻、第１１１７－１１２４頁、１９８２年）、ＳＴＺ誘発糖尿病性腎症モデル（Ｓｈａｒｍａら、Ｄｉａｂｅｔｅｓ．、第４５巻、第５２２－５３０頁、１９９６年）、ピューロマイシン誘発巣状糸球体硬化症モデル（Ｈｉｒａｎｏら、Ｎｅｐｈｒｏｎ、第６０巻、第４４３－４４７頁、１９９２年）、アドリアマイシン誘発糸球体硬化症モデル（Ｃｈｅｎら、Ｎｅｐｈｒｏｎ、第７８巻、第４４０‐４５２頁、１９９８年）、シクロスポリン腎症モデル（Ｇｉｌｌｕｍら、Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ、第４６巻、第２８５‐２９２頁、１９８８年）などが挙げられる。

【００３４】

ＦＡＢＰ発現増強作用を有する薬物としては、例えば、ペルオキシソームプロリフェレータ活性化受容体（ｐｅｒｏｘｉｓｏｍｅ　ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｏｒ－ａｃｔｉｖａｔｅｄ　ｒｅｃｅｐｔｏｒ；ＰＰＡＲ）のアゴニスト、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ（ｃａｒｎｉｔｉｎｅ　ｐａｌｍｉｔｏｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ；ＣＰＴ）の阻害剤などを見出している。ＦＡＢＰ遺伝子の上流域にペルオキシソームプロリフェレータ応答配列が見られることは、ＰＰＡＲアゴニストがＦＡＢＰ発現増強作用を有することを裏付ける。

【００３５】

ＰＰＡＲのアゴニストとしては、既知のＰＰＡＲアゴニスト（Ｌｅｈｍａｎｎら、Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、第２７０巻、第１２９５３－１２９５６頁、１９９５年；　Ｗｉｌｌｓｏｎら、Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、第３９巻、第６６５－６６８頁、１９９６年）の他、文献記載の方法（ＷＯ９９／１０５３２；　ＷＯ９６／３３７２４；　ＷＯ９６／２２８８４；　Ｍｉｚｕｋａｍｉら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ、第２４０巻、第６１‐６４頁、１９９７年；　Ｋｒｅｙら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ、第１１巻、第７７９‐７９１頁、１９９７年；　Ｂｕｃｋｌｅら、Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ　＆　Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　Ｌｅｔｔｅｒｓ、第６巻、第２１２１‐２１２６頁、１９９６年；　Ｔｏｎｔｏｎｏｚら、Ｇｅｎｅｓ　ａｎｄ　Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ、第８巻、第１２２４‐１２３４頁、１９９４年）により、ＰＰＡＲアゴニスト作用が新たに確認された化合物も使用できる。これらのうち、ＰＰＡＲのアゴニストとしては、ＭＣＣ－５５５（化学名　５－［６－（２－Ｆｌｕｏｒｏｂｅｎｚｙｌｏｘｙ）ｎａｐｈｔｈａｌｅｎ－２－ｙｌｍｅｔｈｙｌ］ｔｈｉａｚｏｌｉｄｉｎｅ－２，４－ｄｉｏｎｅ；ＥＰ６０４９８３）がとりわけ好適に使用できる。

【００３６】

ＣＰＴの阻害剤としては例えば、既知のＣＰＴ阻害剤（Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｈａｒｍａｃ

ｅｕｔｉｃａｌ Ｄｅｓｉｇｎ、第４巻、第１－１５頁、１９９８年）の他、文献記載の方法（Ｓａｅｅｄら、Ａｒｃｈ. Ｂｉｏｃｈｅｍ. Ｂｉｏｐｈｙｓ.、第３０５巻、第３０７－３１２頁、１９９３年；Ｋａｎａｍｕｒａら、Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ、第３７巻、第２１７‐２２３頁、１９８５年；Ｓｈｉｎａｇａｗａら、Ｊ. Ｍｅｄ. Ｃｈｅｍ.、第３０巻、第１４５８‐１４６３頁、１９８７年）により、ＣＰＴ阻害作用が新たに確認された化合物も使用できる。このうち、ＣＰＴの阻害剤としては、エトモキシール（Ｅｔｏｍｏｘｉｒ）（化学名 ｅｔｈｙｌ ２－［６－（４－ｃｈｌｏｒｏｐｈｅｎｏｘｙ）ｈｅｘｙｌ］－ｏｘｉｒａｎｅｃａｒｂｏｘｙｌａｔｅ；ＥＰ４６５９０および Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｅｓｉｇｎ、第４巻、第１－１５頁、１９９８年）、４－ＴＨＡ（化学名 ２－ｈｙｄｒｏｘｙ－３－ｐｒｏｐｙｌ－４－［６－（ｔｅｔｒａｚｏｌ－５－ｙｌ）ｈｅｘｙｌｏｘｙ］ａｃｅｔｏｐｈｅｎｏｎｅ；Ｂｉｏｃｈｅｍｉ. Ｊ. 第２５２巻、第４０９－４１４頁、１９８８年）が好適に使用できる。

【００３７】

ＰＰＡＲアゴニストやＣＰＴ阻害剤は、糖尿病の治療薬として知られている。また、糖尿病病態モデルにおいて、糖尿病に起因する腎疾患の症状が改善されることが報告されている（Ｂｕｃｋｉｎｇｈａｍら、Ｄｉａｂｅｔｅｓ、第４７巻、第１３２６‐１３３４頁、１９９８年）。しかし、これは、原疾患である糖尿病が改善されることに基づくものと推察され、糖尿病に起因しない腎疾患に、ＰＰＡＲのアゴニストやＣＰＴ阻害剤などを適応することについては何ら知られておらず示唆もない。一方、本発明の治療薬又は予防薬は、糖尿病に起因する腎疾患（例えば、糖尿病性腎症）を除く腎疾患にも好適に適応されるものである。

【００３８】

本発明において、被験物質、ＦＡＢＰ発現増強作用を有する薬物、ＰＰＡＲのアゴニスト、ＣＰＴの阻害剤などを動物個体あるいはヒトに投与する場合には、経口、静脈内、筋肉内、皮下などいずれの投与形態を用いてもよい。投与形態に応じた不活性な担体と共に、必要に応じては製剤化して用いることもできる。投与量は、投与方法や個体の年齢、体重、疾患の程度などによって異なるが、通常、１日当たり、経口投与の場合は、１～３００ｍｇ／ｋｇ、非経口投与の場合には、０．０１～５０ｍｇ／ｋｇの範囲で設定される。

【００３９】

本発明の医薬（治療薬又は予防薬）は、ＦＡＢＰ発現増強作用（又はＰＰＡＲのアゴニスト作用、又はＣＰＴの阻害作用）に基づいて生体内での薬効を発現するものである。本発明の医薬としては、生体内での薬効発現のために十分な強さのＦＡＢＰ発現増強作用（又はＰＰＡＲのアゴニスト作用、又はＣＰＴの阻害作用）を有しない薬物は含まれない。また、ＦＡＢＰ発現増強作用（又はＰＰＡＲのアゴニスト作用、又はＣＰＴの阻害作用）以外の他の主作用に基づいて生体内での薬効を発現する薬物は含まれない。また、本発明の医薬としては、毒性あるいは薬物動態の面での好ましからざる性格等のために、疾病の治療又は予防に使用できないものは含まれない。

【００４０】

以下、実施例をもって本発明をさらに詳しく説明するが、これらの実施例は本発明を制限するものではない。

【００４１】

なお、下記実施例において、各操作は特に明示がない限り、「モレキュラー クローニング（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ）」（Ｓａｍｂｒｏｏｋ, Ｊ., Ｆｒｉｔｓｃｈ, Ｅ. Ｆ.及びＭａｎｉａｔｉｓ, Ｔ. 著、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓより１９８９年に発刊）に記載の方法により行うか、または、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

【００４２】

【実施例】

実施例１　Ｌ－ＦＡＢＰレポータープラスミドの作製
（１）ヒトＦＡＢＰのｃＤＮＡの単離
ヒトＬ－ＦＡＢＰのｃＤＮＡを、ヒト肝臓由来のｃＤＮＡライブラリー（クロンテック社製、Ｃａｔ＃ＨＬ１１１５ｂ　ＬＯＴ＃５６２１）からＰＣＲ（ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ　ｃｈａｉｎ　ｒｅａｃｔｉｏｎ）法にて単離した。プライマーは、既知配列情報（Ｌｏｗｅら、Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、第２６０巻、第３４１３－３４１７頁、１９８５年；Ｇｅｎｂａｎｋ／ＥＭＢＬ登録番号Ｍ１００５０）を元に設計し、ＰＣＲで得られる断片の両末端にはＢａｍＨＩ認識部位が付加されるようにした。ＰＣＲにより得られたＤＮＡ断片（約４２０塩基対）は、ヒトＬ－ＦＡＢＰｃＤＮＡの全翻訳領域を含んでいた。この断片を適当なプラスミドに連結した。

【００４３】
（２）ヒトＦＡＢＰの染色体遺伝子の単離
前項（１）で得たヒトＦＡＢＰｃＤＮＡを含む断片（約４２０塩基対、ＢａｍＨＩ断片）をプローブとして用い、ヒト染色体ＤＮＡライブラリー（クロンテック社製、Ｃａｔ＃ＨＬ１００６ｄ　ＬＯＴ＃１９４１２）から、プラークハイブリダイゼーション法によりヒトＬ－ＦＡＢＰの染色体遺伝子をクローニングした。得られたクローンは、約２０ｋｂの挿入断片を含んでいた。部分的に塩基配列を決定したところ、この断片中にヒトＬ－ＦＡＢＰの全翻訳領域が含まれていることがわかった。

【００４４】
この挿入断片のうち、５’上流域を含む断片（約５３６０ｂｐ、ＳａｌＩ－ＫｐｎＩ断片）を切り出し、ベクタープラスミドに組み込んで以下の実験に用いた。５’上流域を含む断片（ＳａｌＩ－ＫｐｎＩ断片）の塩基配列を、後記配列表の配列番号１に示した。

【００４５】
（３）Ｌ－ＦＡＢＰレポータープラスミドの作製
前項（２）で得たＬ－ＦＡＢＰ遺伝子断片（約５３６０塩基対、ＳａｌＩ－ＫｐｎＩ断片）を鋳型とし、ＰＣＲ法により、ＮｓｐＶ認識部位（５’上流域中；配列番号１の４６７０番目の塩基）から約１００塩基ほど下流（開始コドンの直前）までの領域を増幅し、断片（約１００ｂｐ）を得た。また、これとは別に、先のＳａｌＩ－ＫｐｎＩ断片をプラスミドｐＵＣ１８のＳａｌＩ－ＫｐｎＩ切断部位に組み込んだ後、得られたプラスミドをＮｓｐＶ及びＫｐｎＩで消化して、ＮｓｐＶ認識部位から下流の部分を欠失させた。先のＰＣＲで得た断片をこれと連結し、プラスミドｐＵＣ１８－９／２５を得た。

【００４６】
次いでこのプラスミドを、ＳａｌＩ及びＫｐｎＩで消化し、得られる断片（約４７６０塩基対）を、ベクタープラスミドｐＧＶ－Ｂ（東洋インキ社製）に挿入し、レポーターアッセイ用のプラスミドを得た。挿入断片は、配列番号１の第１～４７６０番目（開始コドン直前）までに相当する塩基配列を含み、その３’末端にＫｐｎＩ認識配列（６塩基対）が付加されている。

【００４７】
得られたＬ－ＦＡＢＰレポータープラスミドは、ヒトＬ－ＦＡＢＰ遺伝子の転写調節領域を含む５’上流域の下流にルシフェラーゼ遺伝子（プロモーター領域を含まない）が連結されたレポーター構成を有する。

【００４８】
実施例２　尿細管細胞の初代培養・不死化およびＬ－ＦＡＢＰレポーター構成の導入
（１）ネフロンの単離
顕微解剖法により、以下のようにして、マウスの腎臓からネフロンを単離した。マウスをペントバルビタールにて麻酔後開腹し、０．１％ＢＳＡを含む冷ハンクス緩衝液（Ｈａｎｋ’ｓ　ｂｕｆｆｅｒｅｄ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ：ＨＢＳ）２０ｍｌを、腹部大動脈より灌流した。次いで、０．１％ＢＳＡおよび０．１％コラゲナーゼ（ｃｏｌｌａｇｅｎａｓｅ　ｔｙｐｅ１）を含む冷ＨＢＳ　１０ｍｌを灌流した。これら灌流液は、あらかじめ５％CO_2－９５％O_2混合ガスにより飽和させたものを用いた。次に腎臓を摘出し、外科手

術刃（Ｓｕｒｇｉｃａｌ　Ｂｒａｄｅ）で厚さ０．５～１．０ｍｍのスライス片を作製した。これを０．１％コラゲナーゼ溶液（ＨＢＳ中）１０ｍｌに浸し、３７℃、１０分間酵素処理を行った後、ＨＢＳで２回洗浄した。このスライス片を、氷冷した状態で実体顕微鏡にて観察しながら単一セグメント（ネフロン）を単離した。

【００４９】

（２）尿細管上皮細胞の初代培養

前項（１）で得られた単一セグメント（ネフロン）を用い、以下のようにして尿細管細胞の初代培養を行った。単一セグメントを、１０％ウシ胎児血清を含むＫ１培地（５０：５０　ＤＭＥＭ／Ｈａｍ’ｓ　Ｆ－１２、１５ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ、１３．４ｍＭ　ｓｏｄｉｕｍ　ｂｉｃａｒｂｏｎａｔｅ、５μｇ／ｍｌ　ｉｎｓｕｌｉｎ、５μｇ／ｍｌ　ｔｒａｎｓｆｅｒｒｉｎ、５ｎｇ／ｍｌ　ｓｅｌｅｎｏｕｓ　ａｃｉｄ、０．０５μＭ　ｈｙｄｒｏｃｏｒｔｉｓｏｎｅ、１０ｎｇ／ｍｌ　ｅｐｉｄｅｒｍａｌ　ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ）で２回洗浄した後、９６穴プレートに播種し、同培地中一晩培養した。翌日、支持細胞（Ｆｅｅｄｅｒ　ｌａｙｅｒ）を添加（２．５～５×10^3　ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌ）し、単一セグメントと共培養した。支持細胞としては、マウス腎間葉系由来細胞（密度勾配遠心法によりマウス腎臓から単離した後不死化して得た細胞株）又はマウスＮＩＨ３Ｔ３細胞をＸ線照射して増殖能を欠如させたものを用いた。培地としては、１０％ウシ胎児血清含有Ｋ１培地に、支持細胞の培養上清を等量加え、さらにＨＧＦ（Ｈｅｐａｔｏｃｙｔｅ　Ｇｒｏｗｔｈ　Ｆａｃｔｏｒ）（２５ｎｇ／ｍｌ）を添加したものを用いた。また、プレートは、予め０．１％ゼラチンにてコーティング処理したものを使用した。４～６日間培養後、セグメントから上皮細胞（尿細管上皮細胞）の遊走が顕微鏡下で確認できた。

【００５０】

（３）尿細管上皮細胞の不死化

前項（２）と同様にして尿細管上皮細胞の培養を行った。

【００５１】

上皮細胞の遊走が確認された後、ＳＶ４０　Ｌａｒｇｅ　Ｔ抗原遺伝子及びネオマイシン耐性遺伝子を含むプラスミド（ネオマイシン耐性遺伝子を含む市販プラスミドｐＧＥＭ３ＳＲαｎｅｏにＳＶ４０　Ｌａｒｇｅ　Ｔ抗原遺伝子を挿入して作製したプラスミド）をトランスフェクションした。トランスフェクションは、プラスミドとトランスフェクタム（エアブラウン社製；カチオン性リポソーム）の混合液を添加した培地中で、細胞を１～３時間３７℃で培養することにより行った。

【００５２】

トランスフェクション後、２～３日間培養した後、トリプシン－ＥＤＴＡにて処理して細胞を剥離し、４８穴プレートに継代した。その際、新たに支持細胞を添加（約１ｘ10^4　ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌ）した。継代１～２日後に、再度、同プラスミドをトランスフェクションした。以後培養スケールを拡大しながら上記操作を反復して行い、不死化細胞を取得した。得られた不死化細胞の培養は、以後、支持細胞を用いず、０．１％ゼラチンにてコーティング処理した培養器を用い、１０％ウシ胎児血清を含むＫ１培地中にて行った。

【００５３】

（４）Ｌ－ＦＡＢＰレポータープラスミドの導入

前項（３）で得られた不死化細胞を一晩培養した。次いで、前記実施例１で調製したヒトＬ－ＦＡＢＰレポータープラスミド（１８μｇ）を、ハイグロマイシン耐性遺伝子を含むプラスミド（ｐＰＵＲ、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社製、カタログ＃６１５６－１）（１．８μｇ）とともに用い、トランスフェクションを行った。トランスフェクションは、前項（３）と同様に、トランスフェクタムを用いて行った。

【００５４】

トランスフェクション後、ハイグロマイシン（１００μｇ／ｍｌ）を添加した培地（１０％ウシ胎児血清含有Ｋ１培地）にて培養した。６日培養後に一回継代した後、さらに１０日間培養し、生じたハイグロマイシン耐性コロニーを顕微鏡下で採取して、これらを９６

穴プレートに接種し、培養した。かくして、プラスミドが導入された数種の形質転換細胞株（Ｎｏ．１０～Ｎｏ．１９）を得た。

【００５５】

これら細胞株は、以後、１０％ウシ胎児血清を含む高グルコース含有ダルベッコ－イーグル培地（以下、ＤＭＥＭ培地）（Ｇｉｂｃｏ社製）中にて培養を行った。

【００５６】

（５）細胞株の形態学的及び生理学的解析

前項（４）で得られた細胞株について、近位尿細管上皮細胞としての形態学的特徴および生理学的特徴（ホルモンに対する応答能、ＢＳＡ取込み能の解析）を有しているかどうか解析した。

【００５７】

細胞株について形態学的な観察を行ったところ、位相差顕微鏡による観察では、いずれも上皮細胞に特徴的な敷石構造を取っていることが確認できた。また、細胞株Ｎｏ．１３について、電子顕微鏡で観察したところ、尖端（ａｐｉｃａｌ）側に微絨毛が存在すること、上皮細胞に特徴的な密着結合（ｔｉｇｈｔ　ｊｕｎｃｔｉｏｎ）が形成されていること、側底（ｂａｓｏｌａｔｅｒａｌ）側にアクチンが発現し、ヘモデスモソーム（ｈｅｍｏｄｅｓｍｏｓｏｍｅ）が形成されていること、および、部分的にではあるが極性を有していることが確認された。これらの観察像から、取得した細胞株は、上皮細胞であると考えられた。図１には、細胞株Ｎｏ．１３の電子顕微鏡写真を示す。

【００５８】

尿細管の上皮細胞は、各種ホルモンに対し、各々の分節で特異的な応答性を示し、細胞内のｃＡＭＰ産生を誘導することが知られている。例えば、近位尿細管細胞は、上皮小体ホルモン（ＰＴＨ）に対してのみ応答し、バソプレッシン（ＡＶＰ）に対しては応答を示さない。一方、集合管およびＨｅｎｌｅ係蹄などでは、ＡＶＰに対して応答を示す。

【００５９】

そこで、各細胞株（細胞株Ｎｏ．１０、１３、１４、１５、１６及び１９）について、後記参考例１（６）記載の方法に準じ、ＰＴＨ及びＡＶＰに対する応答を調べた。その結果、図２に示したように、細胞株Ｎｏ．１０を除き全ての各細胞株がＰＴＨ刺激に対して応答を示し、特に細胞株Ｎｏ．１３は非常に高い応答能を維持していた。一方、ＡＶＰに対しては全ての細胞株が応答を示さなかった。これらの結果から、Ｎｏ．１０を除く各細胞株は、ホルモン応答能に関して近位尿細管細胞としての特徴を有しており、特にＮｏ．１３はその特徴がよく維持されていると考えられた。

【００６０】

また、既知の近位尿細管上皮細胞株であるＬＬＣ－ＰＫ１（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ１３９２）について、前記と同様にホルモン応答能を調べた。その結果、ホルモン刺激に対するｃＡＭＰ産生量の比は、コントロール：ＰＴＨ刺激時：ＡＶＰ刺激時で、１：０．７：７．４であり、ＰＴＨには応答せず、ＡＶＰに応答することがわかった。すなわち、ＬＬＣ－ＰＫ１は、細胞株Ｎ０．１３とは異なり、ホルモン応答能に関して近位尿細管細胞としての特徴を有していなかった。

【００６１】

次に、細胞株Ｎｏ．１３及びＮｏ．１６について、後記参考例１（５）記載の方法に準じ、アルブミン取り込み能を調べた。近位尿細管は、糸球体で濾過された濾液中に含まれる蛋白の再吸収を担う分節であり、近位尿細管細胞は、血漿中に多量存在するアルブミン等の取り込み能を有することが知られている。測定の結果、図３に示したように、両細胞株にはアルブミン取り込み能が認められた。特に細胞株Ｎｏ．１３は、コントロールに比して約５倍の高いアルブミン取込み能を示し、このことから、細胞株Ｎｏ．１３は、アルブミン等の取り込み能の点でも近位尿細管細胞としての特徴をよく維持していることがわかった。

【００６２】

（６）Ｌ－ＦＡＢＰ遺伝子挿入領域の確認

細胞株Ｎｏ．１３は、前記の通り、マウス近位尿細管上皮細胞株であるとともに、Ｌ－ＦＡＢＰレポータープラスミドが導入された細胞株である。その染色体上にレポーター構成が挿入されていることを確認するために、以下のようにサザンブロット解析を行った。

【００６３】

レポータープラスミドに由来するヒトＬ－ＦＡＢＰ遺伝子の転写調節領域が欠失を受けずに挿入されていた場合、染色体ＤＮＡを制限酵素Ａｐａ－ＫｐｎＩで切断することにより４．３Ｋｂの断片を生じるはずである。細胞株Ｎｏ．１３の細胞から染色体ＤＮＡを調製し、これを制限酵素ＡｐａおよびＫｐｎＩで処理した後、アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後のゲルから、ナイロン膜（Ｈｙｂａｎｄ　Ｎ＋　ｍｅｍｂｒａｎｅ、Ａｍｅｒｓｈａｍ社製）にＤＮＡをトランスファーした後、膜を２×ＳＳＣで洗浄し乾燥させた。メンブレンを、プレハイブリダイゼーション処理後、プローブを含むハイブリダイゼーション用緩衝液中にて、６５℃で一晩ハイブリダイゼーションを行い、次いで２×ＳＳＣ（０．１％ＳＤＳ含有）で洗浄（６５℃、３０分間）後、オートラジオグラフィーに供した。プローブとしては、ヒトＬ－ＦＡＢＰ遺伝子の５’上流配列を含む断片（１．２Ｋｂ）をＲＩ標識して用いた。

【００６４】

その結果、４．３Ｋｂの断片が検出され、Ｌ－ＦＡＢＰ遺伝子転写調節領域が欠失なく挿入されていることが確認された。このことから、細胞株Ｎｏ．１３は、その染色体上に、Ｌ－ＦＡＢＰレポータープラスミドに由来するＤＮＡ構成（ヒトＬ－ＦＡＢＰ遺伝子転写調節領域およびルシフェラーゼ遺伝子からなる構成）が挿入されていると考えられた。

【００６５】

この細胞株Ｎｏ．１３（以下、ｍＰｒｏｘ３７－１３と称する）は、細胞株の名称「マウス細胞株ｍＰｒｏｘ３７－１３」として、工業技術院生命工学工業技術研究所（ＦＥＲＭ）に寄託されている（受託番号　ＦＥＲＭ　ＢＰ－７０３８；受託日　１９９８年９月９日）。

【００６６】

実施例３　近位尿細管上皮細胞におけるＬ－ＦＡＢＰ発現増強作用の検定

前記実施例２で得られた、Ｌ－ＦＡＢＰレポーターＤＮＡ構成を含む近位尿細管上皮細胞株ｍＰｒｏｘ３７－１３（細胞株Ｎｏ．１３とも称する）を用い、以下のように、レポーターアッセイ法により被験物質のＬ－ＦＡＢＰ発現増強作用を測定した。

【００６７】

まず、細胞株ｍＰｒｏｘ３７－１３を、９６穴平底プレートに5×10^{4}細胞／１００μｌ／ウエルとなるよう分注し、培養した。培養には、０．１％ゼラチンでコーティング処理したプレートを用い、培地は１０％ウシ胎児血清、ペニシリン（１００単位／ｍｌ）及びストレプトマイシン（１００μｇ／ｍｌ）を添加した高グルコース含有ダルベッコＭＥＭ培地（Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ　ＭＥＭ，　ｈｉｇｈ　ｇｌｕｃｏｓｅ；ＤＭＥＭ）（Ｇｉｂｃｏ社製）を用いた。４８時間培養後、無血清培地で１回洗浄を行った後、被験物質を含む無血清培地を加えた。コントロールは、被験物質無添加とした。さらに培養を行った後、２～１０時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。

【００６８】

ルシフェラーゼ活性は、以下のように測定した。細胞をリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で洗浄後、２０μｌの細胞溶解液（培養細胞溶解液ＬＣβ－５１、東洋インキ社製）を加え、室温にて２０分間放置後、－８０℃に一晩保存した。－８０℃に保存したプレートを室温に戻した後、１００μｌの発光基質液（ピッカジーン発光キット、東洋インキ社製）を加え、反応を開始した。発光量は、ルミノメータ（ＭｉｃｒｏＬｕｍａｔ　ＬＰ９８Ｐ、ＢＥＲＴＨＯＬＤ社製）を用いて測定した。反応開始から１０秒間の相対光度（ＲＬＵ）値を積算し、ルシフェラーゼ活性とした。また、この活性値から、ルシフェラーゼ誘導率（Ｌｕｃ誘導率）を以下のように算出した。

【００６９】

Ｌｕｃ誘導率＝被験値／コントロール値

被験物質として、ペルオキシソームプロリフェレータ活性化受容体（ｐｅｒｏｘｉｓｏｍｅ　ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｏｒ－ａｃｔｉｖａｔｅｄ　ｒｅｃｅｐｔｏｒ；ＰＰＡＲ）のアゴニスト（作動薬）であるＭＣＣ－５５５、およびカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ（ｃａｒｎｉｔｉｎｅ　ｐａｌｍｉｔｏｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ；ＣＰＴ）の阻害剤であるエトモキシール（Ｅｔｏｍｏｘｉｒ）を添加したところ、ルシフェラーゼ活性誘導が認められた。このことから、これら化合物は、近位尿細管細胞においてＬ－ＦＡＢＰ遺伝子発現を増強する作用を有するものと同定される。測定結果を、図４に示した。

【００７０】

ＭＣＣ－５５５（化学名　５－［６－（２－Ｆｌｕｏｒｏｂｅｎｚｙｌｏｘｙ）ｎａｐｈｔｈａｌｅｎ－２－ｙｌｍｅｔｈｙｌ］ｔｈｉａｚｏｌｉｄｉｎｅ－２，４－ｄｉｏｎｅ；ＥＰ６０４９８３）およびエトモキシール（化学名　ｅｔｈｙｌ　２－［６－（４－ｃｈｌｏｒｏｐｈｅｎｏｘｙ）ｈｅｘｙｌ］－ｏｘｉｒａｎｅｃａｒｂｏｘｙｌａｔｅ；ＥＰ４６５９０および　Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｄｅｓｉｇｎ、第４巻、第１－１５頁、１９９８年）は文献記載の方法に準じて合成したものを用いた。

【００７１】

実施例４　近位尿細管上皮細胞におけるＬ－ＦＡＢＰ発現増強作用の検定
（ｍＲＮＡレベルおよび蛋白質レベルでの測定）

前記実施例１の（２）項にて単離したヒトＬ－ＦＡＢＰ染色体遺伝子（全長）を含むプラスミドを線状化した後、ブタ尿細管細胞株ＬＬＣ－ＰＫ１、又は前記実施例２の（３）と同様にして得たマウスの不死化尿細管上皮細胞にトランスフェクションし、安定な形質転換細胞を得た。これら細胞は、ヒトＬ－ＦＡＢＰの染色体遺伝子が欠失を受けることなく染色体上に組込まれていた。

【００７２】

これら細胞を用い、以下のようにして被験薬物のＬ－ＦＡＢＰ発現増強作用をｍＲＮＡレベルおよび蛋白質レベルで調べた。細胞を、コンフルエントになるまで培養した後、血清を含まないＤＭＥＭ培地に培地交換し、最終濃度　１μＭになるよう被験薬物を培地中に添加し、３７℃で培養した。また、対照例は、被験薬物無添加とした。

【００７３】

ｍＲＮＡレベルでの測定は以下のように行った。培養後、細胞を回収しトータルＲＮＡを調製した。得られたトータルＲＮＡを鋳型とするＲＴ－ＰＣＲ（Ｒｅｖｅｒｓｅ　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔａｓｅ　－　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ　ｃｈａｉｎ　ｒｅａｃｔｉｏｎ）により、ヒトＬ－ＦＡＢＰのｍＲＮＡを検出した。また、測定値の標準化のために、コントロールとしてＧＡＰＤＨ（Ｇｌｙｃｅｒａｌｄｅｈｙｄｅ　３－ｐｈｏｓｐｈａｔｅ　ｄｅｈｙｄｒｏｇｅｎａｓｅ）のｍＲＮＡを同様のＲＴ－ＰＣＲにて検出した。得られたＰＣＲ産物をアガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色して各バンドを検出し、デンシトメトリー又は目視により発現量を判定した。その結果、被験薬物としてＭＣＣ－５５５を添加した場合、培養後１５分から２４時間までＬ－ＦＡＢＰｍＲＮＡの誘導作用が認められた。

【００７４】

蛋白質レベルでの測定は、以下のように行った。培養後の細胞を回収し、超音波破砕した後、細胞抽出液を調製した。抗ヒトＬ－ＦＡＢＰ抗体を用いるウエスタンブロティング法又はＥＬＩＳＡ法により、抽出液中のＬ－ＦＡＢＰ量を測定した。その結果、被験薬物としてＭＣＣ－５５５を添加することにより、Ｌ－ＦＡＢＰ蛋白質の発現増強作用が認められた。また被験薬物としてエトモキシールを添加した場合にも同様にＬ－ＦＡＢＰ蛋白質の発現増強作用が認められた。

【００７５】

実施例５　腎臓由来細胞における腎障害性リピド産生誘導
（１）腎臓由来細胞の刺激

細胞として、ブタ尿細管細胞株ＬＬＣ－ＰＫ１又は前記実施例４と同様の細胞（マウスの

不死化尿細管上皮細胞の染色体上にヒトＬ－ＦＡＢＰの染色体遺伝子が組み込まれた安定な形質転換株）を用いた。以下のように、オレイン酸による刺激下で、細胞を培養することにより、腎障害性リピド（Ｎｅｐｈｒｏｔｏｘｉｃ　ｌｉｐｉｄ）の産生を誘導した。

【００７６】

細胞は１０ｃｍディッシュを用い、１０％牛胎児血清を含むＤＭＥＭ培地中で培養した。コンフルエントに達するまで培養した後、脂質（オレイン酸などの脂肪酸を結合させたＢＳＡ、リポプロテインなど）を含む無血清培地に培地交換し、３７℃で１６～３６時間インキュベートした。被験物質の作用を検定する場合には、脂質とともに被験物質を添加した培地を用いた。

【００７７】

（２）腎障害性リピドの抽出

培地中に産生される腎障害性リピドは、脂質成分として酢酸エチルで抽出される。また、マクロファージ遊走活性化能を有するので、その存在量は、マクロファージ遊走試験により測定することができる。

【００７８】

そこで、インキュベート後、培地を回収し、これを遠心（３０００ｒｐｍ，５分間）して上清を分取し、脂質成分を以下のように抽出した。すなわち、上清に２倍量の酢酸エチルを加え、２分間激しく振盪した。１０分間静置した後、これを遠心し、その上層（酢酸エチル層）を回収した。下層（水層）にさらに２倍量の酢酸エチルを加えて同様に再度抽出、回収した。回収した脂質抽出物を、マクロファージ遊走試験に供した。

【００７９】

（３）マクロファージ遊走試験

文献（Ｋｅｅｓ－Ｆｏｌｔｓら、Ｋｉｄｎｅｙ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、第４５巻、第１６９７－１７０９頁、１９９４年）記載の方法に準じ、以下のように、脂質抽出物中のマクロファージ遊走活性を測定した。遊走試験は、９６穴ケモタキシスチャンバー（Ｎｅｕｒｏｐｒｏｂｅ社製）と専用フレームフィルター（スタンダード、ポアサイズ５μｍ、Ｎｅｕｒｏｐｒｏｂｅ社製）を用いて行った。遊走細胞としては、マウスマクロファージ系細胞株ＲＡＷ２６４．７（ＡＴＣＣ　ＴＩＢ－７１）を用いた。

【００８０】

培養しておいたＲＡＷ２６４．７をスクレイパーで回収後、2×10^6 個／ｍｌになるように、１０％牛胎児血清含有ＤＭＥＭ培地に懸濁した。また、細胞を蛍光標識するためにカルセイン－ＡＭ（ｃａｌｃｅｉｎ－ＡＭ、同仁化学研究所製）を最終濃度２μＭになるように添加し、３７℃、５分間インキュベートした。これを１０％牛胎児血清含有ＤＭＥＭ培地で一回洗浄後、1×10^6 個／ｍｌとなるように同培地に再懸濁した。

【００８１】

前項（２）で得た脂質抽出物をガラスチューブ内で乾固し、ここに０．２５％ＢＳＡ（ｌｉｐｉｄ　ｆｒｅｅ、Ｓｉｇｍａ社製）を含むＤＭＥＭ培地を加えた。これを５６℃にて１５分間インキュベーション後、１５分間超音波処理（ｓｏｎｉｃａｔｉｏｎ）することにより懸濁化した。懸濁した脂質を、ケモタキシスチャンバーの下室に３１．５μｌずつ注入した。フィルターで分けられた上室には、蛍光標識した細胞の懸濁液（1×10^6 個／ｍｌ）を２００μｌずつ注入した。このチャンバーを、CO_2 インキュベーター中で3時間インキュベートした後、チャンバーを上下反転し、さらに１５分間インキュベートした。

【００８２】

インキュベーション終了後、フレームフィルターを取り、上面の細胞を拭き取った後、フィルター裏面の細胞を１００％メタノールで９０秒間固定した。裏面に付着した細胞（すなわち遊走した細胞）の蛍光強度を、蛍光プレートリーダー（Ｐｏｌａｒ　ｓｔａｒ　、ＢＭＧ　ＬａｂＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を用いて測定（励起波長：４８５ｎｍ、蛍光波長：５３８ｎｍ）し、サンプルのマクロファージ遊走活性を測定した。

【００８３】

刺激により腎臓由来細胞から産生誘導される腎障性リピドの量（遊走活性）が、被験物質の存在下において非存在下の場合より少なければ、その被験物質には、腎障性因子の産生を抑える作用があると判定した。

【００８４】

実施例６　ヒト尿中落下細胞におけるＬ－ＦＡＢＰ発現増強作用の検定（ｍＲＮＡレベルでの測定）

（１）ヒト尿中落下細胞の単離

腎組織から尿中に落下している尿細管上皮細胞（以下、尿中落下細胞とよぶ）を以下のようにしてヒト尿サンプルから分離し、培養に供した。

【００８５】

まず、男児の腎炎患者（０から３才）から、クリーンキャッチ法（ｃｌｅａｎ－ｃａｔｃｈ　ｍｅｔｈｏｄ）により、尿サンプルを採取した。ついで、この尿サンプルを室温で遠心分離（１０００ｒｐｍ、１０分）し、上清を捨て、ペレットを、１０％（ｖ／ｖ）ウシ胎児血清含有のダルベッコーイーグル培地（Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ　ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｅａｇｌｅ’ｓ　ｍｅｄｉｕｍ）にて２回、培養用培地で１回洗浄した。培養用培地としては、ダルベッコーイーグル培地とハムズＦ－１２培地（Ｈａｍ’ｓ　Ｆ－１２　ｍｅｄｉｕｍ）を１：１で混合したものに、ウシ胎児血清（１０％ｖ／ｖ）、インシュリン（５μｇ／ｍｌ）、トランスフェリン（５μｇ／ｍｌ）、亜セレン酸ナトリウム（ｓｏｄｉｕｍ　ｓｅｌｅｎｉｔｅ）（５ｎｇ／ｍｌ）、デキサメタゾン（10^{-8}Ｍ）、ニコチンアミド（５ｍＭ）、ペニシリン（１００ＩＵ／ｍｌ）及びストレプトマイシン（１００μｇ／ｍｌ）を添加したものを用いた。

【００８６】

ペレットを培養用培地に懸濁し、適宜希釈した後、タイプ４コラーゲンでコーティングを施した３．５ｃｍ径ディッシュ（Ｆａｌｃｏｎ社製）中で培養を行った。培養は５％CO_2、３７℃の条件で行った。

【００８７】

培養した細胞が、尿細管上皮細胞であることは、培養器上でコンフルエントに達するとドーム形成が観察されたこと、および　アルカリホスファターゼ染色で陽性を示すことにより確認した。

【００８８】

（２）Ｌ－ＦＡＢＰ発現増強作用の検定

前記（１）で培養したヒト尿中落下細胞（ヒト尿細管上皮細胞）を用い、以下のように、前記実施例４と同様にして、被験薬物のＬ－ＦＡＢＰ発現増強作用をｍＲＮＡレベルで調べた。

【００８９】

まず、細胞を、コンフルエントになるまで培養した後、最終濃度　１μＭになるよう被験薬物を添加したダルベッコーイーグル培地（血清不含）に培地交換し、３７℃で培養した。被験薬物としては、ＭＣＣ－５５５および４－ＴＨＡ（２－ｈｙｄｒｏｘｙ－３－ｐｒｏｐｙｌ－４－［６－（ｔｅｔｒａｚｏｌ－５－ｙｌ）ｈｅｘｙｌｏｘｙ］ａｃｅｔｏｐｈｅｎｏｎｅ）（ＣＰＴ阻害薬）を用いた。また、対照例については、被験薬物を無添加とした。

【００９０】

培養後の細胞を回収しトータルＲＮＡを調製した。得られたトータルＲＮＡを鋳型としてＲＴ－ＰＣＲ（Ｒｅｖｅｒｓｅ　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔａｓｅ　－　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ　ｃｈａｉｎ　ｒｅａｃｔｉｏｎ）を行った。ＰＣＲ産物をアガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色して各バンドを検出し、デンシトメトリー又は目視により発現量を判定した。また、測定値の標準化のために、コントロールとしてｒＢＡＴ（ｒｅｌａｔｅｄ　ｔｏ　$b^{0,+}$　ｓｙｓｔｅｍ　ａｍｉｎｏ　ａｃｉｄ　ｔｒａｎｓｐｏｒｔｅｒ；Ｐｕｒｒｏｙら、Ｇｅｎｏｍｉｃｓ、第３７巻、第２４９－２５２頁、１９９６年）のｍＲＮＡをＲＴ－ＰＣＲにて検出した。

【００９１】
その結果、下表１に示した通り、ヒト尿中落下細胞（ヒト尿細管上皮細胞）におけるＬ－ＦＡＢＰｍＲＮＡの発現量は、ＭＣＣ－５５５および４－ＴＨＡの添加によって増加した。この結果から、これら化合物は、ヒトにおいても、近位尿細管細胞のＬ－ＦＡＢＰの発現増強作用を有するものと同定された。
【００９２】
【表１】

表　１

被験薬物	Ｌ－ＦＡＢＰｍＲＮＡ	ｒＢＡＴｍＲＮＡ
なし	－	＋
ＭＣＣ－５５５（１μＭ）	＋	＋
４－ＴＨＡ（１０μＭ）	＋	＋

【００９３】
実施例７　細胞傷害に対するＬ－ＦＡＢＰ発現抑制の影響
ブタ近位尿細管由来ＬＬＣ－ＰＫ１細胞を用いた低酸素・再酸素化モデル（インビトロ腎虚血再灌流モデル）により、細胞傷害に対するＬ－ＦＡＢＰ発現抑制の影響を、以下のようにして調べた。
【００９４】
まず、ブタＬ－ＦＡＢＰｃＤＮＡをＲＴ－ＰＣＲでクローニングし、ｐＲＣ／ＣＭＶにサブクローニングしてアンチセンスＲＮＡ発現用ベクターｐＬＦＡＢＰ－ｐＲＣ／ＣＭＶを得た。
【００９５】
ついで、６穴プレートにＬＬＣ－ＰＫ１細胞をまき（１ｘ１０^{5}／ウエル）、２４時間培養後、リポフェクトアミン（ＧＩＢＣＯ社製）を用いてｐＬＦＡＢＰ－ｐＲＣ／ＣＭＶをトランスフェクトした。またコントロールとしては、ベクター（ｐＲＣ／ＣＭＶ）のみをトランスフェクトした。これら細胞を２４時間培養後、嫌気性チャンバー（ＣＯＹ社）内に移し低酸素暴露を２４時間行った。さらに、これら細胞を通常の大気中に戻して２４時間再酸素化した後、細胞傷害度を測定した。
【００９６】
細胞傷害度は、培地中に漏出したＬＤＨ（ｌａｃｔｉｃ　ｄｅｈｙｄｒｏｇｅｎａｓｅ；乳酸脱水素酵素）を指標にして測定した。すなわち、低酸素暴露後、培地を回収し、測定キット「ＬＤＨ－細胞毒性テストワコー」（和光純薬製）を用いて培地中のＬＤＨ活性を測定した。
【００９７】
その結果、図５に示した通り、低酸素・再酸素化した後に漏出したＬＤＨ活性は、Ｌ－ＦＡＢＰアンチセンスＲＮＡを一過性に発現させた細胞の場合、ベクターのみをトランスフェクトしたコントロールと比較して大きい値を示し、細胞がより大きい傷害を受けていることが示された。
【００９８】
このように、Ｌ－ＦＡＢＰアンチセンスＲＮＡの発現、すなわちＬ－ＦＡＢＰの発現抑制により、低酸素・再酸素化時の細胞傷害が増大したことから、近位尿細管細胞に傷害を与える腎虚血再灌流などの状態において、Ｌ－ＦＡＢＰは細胞を保護する機能を果たすものと考えられた。
【００９９】
実施例８　細胞傷害に対するＬ－ＦＡＢＰ強制発現の影響

前記実施例７に準じ、近位尿細管細胞を用いた低酸素・再酸素化モデル（インビトロ腎虚血再灌流モデル）を用い、細胞傷害に対するＬ－ＦＡＢＰ強制発現の影響を調べた。

【０１００】

前記実施例１の（２）項にて単離したヒトＬ－ＦＡＢＰ染色体遺伝子（全長）を含むプラスミドを線状化した後、実施例２の（３）項と同様にして取得したマウス近位尿細管細胞（クローン２４）にトランスフェクションし、安定な形質転換細胞（クローン２４－１９）を得た。この細胞は、ヒトＬ－ＦＡＢＰの染色体遺伝子が欠失を受けることなく染色体上に組込まれていた。

【０１０１】

上記で得たクローン２４－１９及び対照細胞としてクローン２４を、各々嫌気性チャンバー（ＣＯＹ社）内で低酸素暴露を２４時間行った。さらに、これら細胞を通常の大気中に戻して２４時間再酸素化した後、細胞傷害度を測定した。細胞傷害度は、培地中に漏出したＬＤＨ（ｌａｃｔｉｃ　ｄｅｈｙｄｒｏｇｅｎａｓ）を指標にして測定した。

【０１０２】

その結果、図６に示した通り、ヒトＬ－ＦＡＢＰ遺伝子を導入して強制発現させた細胞（クローン２４－１９）では、低酸素・再酸素化後に漏出したＬＤＨ活性が、対照細胞（クローン２４）と比較して低値を示し、低酸素・再酸素化に対してより抵抗性が強いことが示された。このように、Ｌ－ＦＡＢＰの強制発現により、低酸素・再酸素化時の細胞傷害に対する抵抗性が増大したことから、近位尿細管細胞に傷害を与える腎虚血再灌流などの状態において、Ｌ－ＦＡＢＰは細胞を保護する機能を果たすものと考えられた。

【０１０３】

実施例９　腎疾患モデルマウスに対する薬物の作用

腎疾患モデルとして、アドリアマイシン誘発糸球体硬化症マウスを用い、これに対するＰＰＡＲ作動薬ＭＣＣ－５５５の効果を以下のように確認した。

【０１０４】

アドリアマイシン（ＡＤ）誘発糸球体硬化症マウスは、ネフローゼ症状を呈しながら、３週間目には巣状糸球体硬化症になり、不可逆的に慢性腎不全に到る病態モデルである（Ｃｈｅｎら、Ｎｅｐｈｒｏｎ、第７８巻、第４４０－４５２頁、１９９８年）。また、ＭＣＣ－５５５は、実施例３、４及び６にも示した通り、Ｌ－ＦＡＢＰ遺伝子発現増強作用が確認されている化合物である。

【０１０５】

マウスは、７週齢の雌性ＢＡＬＢ／ｃ（日本チャールスリバーより購入）を用いた。実験開始日（０日目）に、アドリアマイシン（Ｓｉｇｍａ社製）を、１０ｍｇ／ｋｇ（生理食塩液に１ｍｇ／ｍｌの濃度で溶解したものを１０ｍｌ／ｋｇ）静脈内投与した。正常群には同容量の生理食塩液のみを静脈内投与した。これらマウスに、ＭＣＣ－５５５又は担体のみを、実験開始日から１４日間（０日目から１３日目まで）経口投与した。初回投与はアドリアマイシン投与の１時間前に行い、投与液量はいずれも１０ｍｌ／ｋｇとした。

【０１０６】

薬物投与群（ｎ＝６）は、アドリアマイシン投与マウスにＭＣＣ－５５５（０．１％Ｔｗｅｅｎ８０含有精製水に懸濁したもの）を１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与した。対照群（ｎ＝６）は、アドリアマイシン投与マウスに担体（０．１％Ｔｗｅｅｎ８０含有精製水）のみを投与した。また、正常群（ｎ＝３）も担体のみを投与した。

【０１０７】

マウスは個別に代謝ケージに入れ、自由摂食・摂水下で２４時間採尿した。

【０１０８】

採尿は、３～４、６～７、９～１０及び１３～１４日目の計４回行った。採取した尿については、尿量を測定後、自動分析器（ＳｕｐｅｒＺ－８１８、ニッテク）で尿中蛋白質、ＮＡＧ（Ｎ－ａｃｅｔｙｌ－β－Ｄ－ｇｌｕｃｏｓａｍｉｎｉｄａｓｅ）およびクレアチニン（ｃｒｅａｔｉｎｉｎｅ：ＣＲＥ）濃度を測定した。実験最終日（１４日目）の採尿後、エーテル麻酔下に腹部大動脈より採血し、血清を分離して、自動分析器（ＴＢＡ－８

０ＦＲ、東芝）でコレステロールおよびアルブミン濃度を測定した。また腎を摘出して中性緩衝ホルマリン液で固定した。

【０１０９】

実験の結果、図７に示したように、尿中蛋白質および近位尿細管障害の指標であるＮＡＧ排泄量は、対照群ではＡＤ投与後７～１４日目に上昇した。これに対して薬物投与群では、尿中蛋白質及びＮＡＧ排泄量の上昇が有意に抑制された。

【０１１０】

また、１４日目の血液生化学的検査の結果を図８に示した。図８に示されたように、対照群では、ネフローゼの主症状である高コレステロール血症、低アルブミン血症の症状が認められた。これに対して、薬物投与群ではこれら症状が改善されていた。

【０１１１】

上記のように、ＭＣＣ－５５５は、腎疾患モデルマウス（アドレアマイシン誘発糸球体硬化症モデル）に対して、近位尿細管障害の指標となるＮＡＧ排泄を抑制するとともに、ネフローゼの主症状である蛋白尿や血液生化学的パラメータを改善した。さらに、腎組織像を調べたところ、ＭＣＣ－５５５は、同モデルマウスの腎臓における組織学的変化も抑制していることが確認された。

【０１１２】

実施例１０　ヒト型Ｌ－ＦＡＢＰ遺伝子導入トランスジェニックマウスを用いた腎疾患モデルに対する薬物の作用

ヒト型Ｌ－ＦＡＢＰ遺伝子を導入したトランスジェニックマウス（ｈＦＡＢＰ－Ｔｇマウス）を作製した。このｈＦＡＢＰ－Ｔｇマウスを用いて、以下のように、実施例９に準じた腎疾患モデルを作成し、ＭＣＣ－５５５の作用を確認した。

【０１１３】

ｈＦＡＢＰ－Ｔｇマウスの作製においては、１３週齢以上のＢＣＦ１系雄マウスを不妊交配用及び自然交配用に、１０週齢以上のＩＣＲ系雌マウスを胚移植用および里親用に、１３週齢以上のＢＤＦ１系雄マウスを交配用に、８週齢以上のＢＣＦ１系雌マウスを採卵用に、それぞれ使用する。これにより得られるトランスジェニックマウス（Ｂ６Ｃ３Ｆ１系）についてＢＡＬＢ／ｃマウスともどし交配を行った。

【０１１４】

得られた雌性トランスジェニックマウスを用いて、腎疾患モデル（アドリアマイシン誘発糸球体硬化症モデル）の作製と薬物（ＭＣＣ－５５５）の作用確認を行った。疾患モデルの作製と薬物の作用確認は、前記実施例９に準じた。但、実験開始日（０日目）に投与するアドリアマイシンの投与量は、１５ｍｇ／ｋｇ（生理食塩液に１ｍｇ／ｍｌの濃度で溶解したものを１５ｍｌ／ｋｇ）とした。

【０１１５】

薬物投与群（ｎ＝５）は、アドリアマイシン投与マウスにＭＣＣ－５５５（１０ｍｇ／ｋｇ）を投与し、対照群（実験開始時ｎ＝５）はアドリアマイシン投与マウスに担体のみを投与した。正常群（ｎ＝３）はアドリアマイシン非投与マウスに担体のみを投与した。採尿を、６～７日目（Ｄａｙ７）、１０～１１日目（Ｄａｙ１１）、１３～１４日目（Ｄａｙ１４）の計３回行い、尿量測定後、自動分析器で尿中蛋白質、ＮＡＧ及びクレアチニン濃度を測定した。

【０１１６】

その結果、図９に示したように、対照群ではＡＤ投与後、尿中蛋白質及びＮＡＧ排泄量が上昇したのに対して、薬物（ＭＣＣ－５５５）投与群ではこれらの上昇が顕著に抑制された。また、対照群では、実験期間中３例が死亡したが、薬物（ＭＣＣ－５５５）投与群では死亡例は認められなかった。

【０１１７】

参考例１　密度勾配遠心法による近位尿細管上皮細胞の単離および初代培養

（１）近位尿細管細胞の分離

ビネー（Ｖｉｎａｙ）らの文献（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｐｈｙｓｉ

ｏｌｏｇｙ、第２４１巻、Ｆ４０３－Ｆ４１１、１９８１年）記載の密度勾配遠心法に準じ、以下のようにして、マウスの腎臓から、腎臓皮質部細胞を単離した。

【０１１８】

マウス２匹を断頭脱血後、腎臓を摘出し、これを冷ハンクス緩衝液（Ｈａｎｋ’ｓ　ｂｕｆｆｅｒｅｄ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ：ＨＢＳ）で洗浄した後、皮膜を摘除した。次に、皮膜から皮質部のみを切り出し、１～２ｃｍ角に細切した。細切組織をＨＢＳで軽く洗浄後、コラゲナーゼ溶液（ｃｏｌｌａｇｅｎａｓｅ　ｔｙｐｅ４、４００μｇ／ｍｌ、ＨＢＳ中）５ｍｌを加えて３７℃、３０分間酵素処理を行った。次いで、５分間攪拌後、ナイロンメッシュ（１００μｍ）で濾過して組織塊を除去し、ＨＢＳで洗浄した。これにＨＢＳ（１ｍｌ）を加え、軽くピペッテイングして細胞懸濁液を調製した。

【０１１９】

この細胞懸濁液を、３０％－５０％パーコール（Ｐｅｒｃｏｌｌ）重層液に重層した後、遠心した（３５００ｒｐｍ、４℃、３０分間）。遠心後、パーコール密度勾配中に分離された各層（上から画分１～４の４層）の細胞を注意深く回収した。

【０１２０】

（２）分離した細胞のアルカリフォスファターゼ染色

アルカリフォスファターゼは、腎臓では近位尿細管に局在することが知られている。そこで、上記（１）で回収した各層の細胞の一部を採取し、以下のようにアルカリフォスファターゼ染色を行った。すなわち、細胞懸濁液を遠心した後、プレパラートに固定し、アルカリフォスファターゼ基質キット（フナコシ社製）を用いて染色後、グリセロール封入した。その結果、最上層の画分１において、アルカリフォスファターゼ陽性率が最も高く、従って、近位尿細管細胞の含有率も最も高いと考えられた。

【０１２１】

（３）近位尿細管上皮細胞の初代培養

上記（１）の画分１の細胞について、以下のようにコラゲナーゼ処理した後、初代培養を行った。すなわち、回収した細胞を、ＨＢＳで１回洗浄し、コラゲナーゼ溶液（ｃｏｌｌａｇｅｎａｓｅ　ｔｙｐｅ４、２ｍｇ／ｍｌ、ＨＢＳ中）１ｍｌを加えて３７℃、５分間酵素処理を行った。さらにＨＢＳで２回洗浄した後、培養に供した。

【０１２２】

上皮細胞の初代培養の際には、線維芽細胞が混入することが一般的に知られており、線維芽細胞の増殖を抑制して上皮細胞だけを選択的に増殖させることが必要となる。このため、培養に際しては、（ｉ）線維芽細胞の増殖を選択的に阻害するＭＥＭ／Ｄ－Ｖａｌ培地（ＭＥＭ培地のＬ－バリンをＤ－バリンに置換した培地；Ｇｉｂｃｏ社製）にウシ胎児血清を添加した培地、及び、（ｉｉ）上皮細胞を特異的に増殖させるホルモンおよび成長因子を含み、線維芽細胞の増殖に関与する因子を含まない無血清Ｋ１培地（５０：５０　ＤＭＥＭ／Ｈａｍ’ｓ　Ｆ－１２、１５ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ、１３．４ｍＭ　ｓｏｄｉｕｍ　ｂｉｃａｒｂｏｎａｔｅ、５μｇ／ｍｌ　ｉｎｓｕｌｉｎ、５μｇ／ｍｌ　ｔｒａｎｓｆｅｒｒｉｎ、５ｎｇ／ｍｌ　ｓｅｌｅｎｏｕｓ　ａｃｉｄ、０．０５μＭ　ｈｙｄｒｏｃｏｒｔｉｓｏｎｅ、１０ｎｇ／ｍｌ　ｅｐｉｄｅｒｍａｌ　ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ）を、以下のように組合せて用いた。

【０１２３】

まず、細胞を、１０％ウシ胎児血清含有ＭＥＭ／Ｄ－Ｖａｌ培地にて１～２日培養し、細胞の接着と増殖を確認した後、培地を無血清Ｋ１培地に交換して、さらに約一週間培養を継続した。細胞は、あらかじめ０．１％ゼラチンでコーテングしたプレートに播種し、CO_2インキュベーター内で培養した。

【０１２４】

（４）細胞の形態学的解析

前項（３）の培養細胞を、位相差顕微鏡にて観察したところ、敷石状の細胞増殖が認められた。また、細胞がコンフルエントになる頃に、ドーム形成が認められた。これら所見は、溶質溶媒の経上皮輸送が行われていることを示唆している。これらのことから、得られ

た培養細胞は、尿細管上皮細胞であることが形態学的に確認された。

【０１２５】

（５）アルブミン取込み能

近位尿細管細胞は、アルブミン等の取り込み能を有することが知られている。

【０１２６】

そこで、前項（３）の培養細胞について、アルブミンの取り込み能を、以下のように調べた。細胞を、１０ｃｍデイッシュでコンフルエントになるまで培養した後、培地をＭＥＭ／Ｄ－Ｖａｌ培地に交換し、一晩培養した。ついで、ウシ血清アルブミン（ｂｏｖｉｎｅ　ｓｅｒｕｍ　ａｌｂｕｍｉｎ：ＢＳＡ）を、終濃度が５０ｍｇ／１０ｍｌになるよう培地に添加し、３７℃、９０分間培養を行った。コントロールとしては、同様の細胞を用い、氷上でインキュベーションを行った。培養後、細胞をリン酸緩衝食塩水（ｐｈｏｓｐｈａｔｅ　ｂｕｆｆｅｒｅｄ　ｓａｌｉｎｅ：ＰＢＳ）（ｐＨ７．４）で洗浄した後、回収した。この細胞を、プロテアーゼ阻害剤（ｐｒｏｔｅａｓｅ　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ）を含むＰＢＳ（ｐＨ９．６）２００μｌに懸濁した後、超音波破砕した。破砕液にＰＢＳ（ｐＨ６．４）を加えてｐＨを中性領域に戻した後、遠心（１２０００ｒｐｍ、１５分間）して上清を、細胞抽出液として回収した。得られた細胞抽出液について、ＢＳＡの存在をＥＬＩＳＡ法にて測定した。

【０１２７】

ＥＬＩＳＡには、一次抗体として、抗アルブミン抗体（ウサギポリクローナル抗体、Ｓｉｇｍａ社製）を用い、二次抗体としては、ビオチン標識した抗アルブミン抗体を用いた。一次抗体を９６穴イムノプレートに吸着させた後、前記細胞抽出液（１００μｌ／穴）を加えて室温で２時間反応させ、次いで、二次抗体希釈液を添加し、室温で２時間反応させた。ウエルを洗浄した後、ストレプトアビジン及びビオチン標識ワサビペルオキシダーゼを含む検出キット（ベクターラボラトリー社製、ベクタステインＡＢＣ－ＰＯキット）を用いて発色検出を行った。

【０１２８】

その結果、アルブミン添加条件下３７℃で培養することにより、コントロールの２．３倍量のＢＳＡ取り込みが認められた。このことから、細胞は、近位尿細管細胞としての生理的機能を有することが確認された。

【０１２９】

（６）ホルモンに対する応答能

近位尿細管細胞は、上皮小体ホルモン（ＰＴＨ）に応答して細胞内ｃＡＭＰ産生が誘導されるが、バソプレッシン（ＡＶＰ）には応答しないことが知られている。前項（３）の培養細胞について、以下のとおりこれらホルモンに対する応答能を調べた。

【０１３０】

細胞を、２４穴プレートでコンフルエントになるまで培養した後、細胞表面を培地（ＭＥＭ／Ｄ－Ｖａｌ培地）で２回洗浄した。これに、ＰＴＨ（10^{-7}Ｍ）又はＡＶＰ（１Ｕ／ｍｌ）を、ＩＢＭＸ（３‐イソブチル１‐メチルキサンチン；ｃＡＭＰホスホジエステラーゼ阻害剤）（10^{-4}Ｍ）とともに添加した培地を加えた。コントロールとしては、ＩＢＭＸのみを添加した培地を加えた。

【０１３１】

３７℃で１０分間反応させた後、細胞及び培養液中のｃＡＭＰを６５％エタノールで抽出し、ｃＡＭＰ量をＥＬＩＳＡ法（Ａｍｅｒｓｈａｍ社製のｃＡＭＰ　ＥＩＡシステムキットを使用）により測定した。

【０１３２】

その結果、ＰＴＨ刺激を行った場合、コントロールに対して約１．６倍の細胞内ｃＡＭＰ量が認められ、このことから、この初代培養には近位尿細管細胞が含まれることが確認された。一方、ＡＶＰ刺激時においても、コントロールの
約４．６倍のｃＡＭＰ量が認められたことから、近位尿細管細胞に由来しない細胞もいくらか混入しているものと考えられた。

【０１３３】
【発明の効果】
本発明の方法によれば、新規な腎疾患治療薬及び／又は予防薬を的確に効率よくスクリーニングすることができる。また、本発明の方法により同定され特徴付けされた治療薬及び／又は予防薬（あるいは本発明の治療薬及び／又は予防薬）は、作用機序の明確な優れた腎疾患治療薬及び／又は予防薬となる。また、本発明の新規細胞株は、近位尿細管上皮細胞としての生理的特徴をよく維持しており、腎疾患治療薬などの研究開発などに有用である。
【０１３４】
「配列表フリーテキスト」
配列番号１のフリーテキスト
〈223〉ＧＡＴＡシグナル（GATA_signal）
〈223〉ペルオキシソームプロリフェレータ応答配列（peroxisome proliferator responsive element(PPRE)）
〈223〉ヘパティックヌクレアファクター（ＨＮＦ）結合サイト（hepatic nuclear factor(HNF) binding-site）
〈223〉ヒポキシア誘導因子（ＨＩＦ）結合サイト（hypoxia inducible factor (HIF) binding-site）

【０１３５】
【配列表】

SEQUENCE LISTING

〈110〉 TANABE SEIYAKU CO., LTD.

〈120〉 Medicine for treating renal diseases and screening method of such medicine

〈130〉 A00-4680

〈150〉 JP268846/1998

〈151〉 1998-09-24

〈160〉 1

〈210〉 1

〈211〉 5357

〈212〉 DNA

〈213〉 Homo sapiens

〈220〉

〈221〉 CDS

〈222〉 (4767)...(4835)

〈221〉 intron

〈222〉 (4836)...

〈221〉 TATA_signal

〈222〉 (4691)...(4697)

〈221〉 misc_signal

〈222〉 (4136)...(4141)

〈223〉 GATA_signal

〈221〉 misc_binding

〈222〉 (4654)...(4659)

〈223〉 peroxisome proliferator responsive element(PPRE)

〈221〉 misc_binding

〈222〉 (4661)...(4666)

〈223〉 peroxisome proliferator responsive element(PPRE)

〈221〉 misc_binding

〈222〉 (4544)...(4551)

〈223〉 hepatic nuclear factor(HNF) binding-site

〈221〉 misc_binding

〈222〉 (3758)...(3765)

〈223〉 hypoxia inducible factor(HIF) binding-site

〈400〉 1

GTCGACTGCA GTCAACGGAT CCTCTCCRTY CTCTVACCCT CACCCTCAAC TACGCCCCAG 60

TGTCTGTTGT TCCCCTACTA GTATCCATGT GTTCTCATTG TTTAGCTCCC ACTTATAAGT 120

GAGAACACAC AGTATTTAAT TTTCTGTTCC TGTGTTCGTT TGCTTAGGAT AATGGCCTCT 180

AGCTCCATCC ACGTTGCTGC AAAGGACATG ATCTCATGCT TTTTTATGGC TGCATCATAT 240

TCCATGGTGT ATGTATACCA CGCTTTCTTT ATTCAGTCTA CTGTTGGTGG GCATTAGGTT 300

GATTCCATGT CTTTGCTATT GTGAATAATG CTGCAATGAA CATACTCATG CATGTGTCCT 360

TATGGTAGAA CAATTTATAT TCTTTTGGGC ATATACCCAG TAGTGGGACT GCTGGGTCAA 420

ATGGTAATTC TGTTTTAAGT TCTTTGAGGA ATCACCACAC TGCTTTCCAC AATGGCTGAA 480

TTAATTCACA CTCTCACCAG TAGTCTGAAA TGTTCCTTTT CTCTGCAACC TTGCCAGCAT 540

GTTATTTTTT GACTTTTAAT AGTAGCCATT CTGACTGGTG TGTGATAGTA TCTCATTGTG 600

GTTGTGATTC GTTTACGCAA TTATTTCACA AGGCAAAAAA TGTTGTGACC ATTTAACAGA 660

TAAGCAAGTA GAGGCTCACC AAGGCTCCAC ATCAGGTATA AAGAAGAGCT GGGCCCAAAC 720

CCAAGTCCTT TCCCTCTGCA GCCCTGCCTG TAGCAGAATT ATGGGCTCCT CGGGCCACCT 780

CCTATGTTCA AAACACCCAG GAAATGGGCA GGCTGGCATT GCAGGCACTG AGGTCAAAGG 840

CGCTTGTTCT AAAATGAACA CCTGTCATAT CCTGGCCACC AAGAGGTGAC TCCCCTCCTT 900

TCCCACACCT GCACGCTGCC CGTCTGAGTA GGGATGTGAG AAGAGGGGAT GTCTAGTGTG 960

GAGTGAGCAG GGCCAGAATC TTTGGACACT CCAAAGCTGT GCCCACAGAG TGGGAGTCTC 1020

TTTTTTTCTT TCTTGAAAGC CACTTGAACT TTGTCATTGC AATTAAGCTT ATCTCTTCTT 1080

GTGTTTGCTC AGCTAGTGGG TGGAAGATGT CATTACCCTC TCCTAACTTT ATGGAAAACT 1140

CATGAGTATT AGTTTTTGAA ATGGCTACTG ATCTCTGTGC CCTCAAGATT CACACACACA 1200

CAAAAAAAAA GACAAAGGGA AGTCATCGGG GGTTGCCTAA GAATGGCCAT ATCTCAGACC 1260

TGGGGGAGAG GGGGAGTCCT GGCCTGGCGT TGATCAGCTC AATTTACTTG TCAGGCTGCC 1320

CATCTGCCAG GGAAACTGTC AAGGCTTCAC TGGTTGTGCC AGGCCCTTGA CCAACCTCTG 1380

GGTCAGCTGC ATTCCCAATG CTGTTCTGAG TCTGCAGCGT TGCCTGGACA GGGTAGGCAG 1440
GAAGTGCAGG GTGAGGCAGA GTGGTCCACA AGGAGACAGC TCATGGGTCC TGCTGTTCCT 1500
CAGACACCAG GAAAGGTGCA CCTGGTCCCT ACTTCACCTG AGGCCTCCGG GGTTGGTGCT 1560
GACTTGCTCT ATGGAGAAGC TTTCATGACG CTCCTTCCCA CTCCCCTCCG TAGATCCCAG 1620
AAAGCAGCAG TGTGGGGCAT GATACTTGAC ATTTGCGATC AAGGGGAGAG GGCCTAGTTG 1680
TGGAATGTAT AAGCCAGACA TCCCTTTATC TGAGCGGGAT GTCAGGCAGG CAGCTGGGGG 1740
CATGAGATAA CATGGGCACT TGGAGCAGAT TCTCCCAAAC GAAGCAACTG ATGGGTGTGA 1800
TGGGAGTTGG GCATGGTAAT GACTCTATCA CGGTCATTTT CCTCGGTGAT TATTTCATTG 1860
ATTTTAGGCT GCAAAACTCC TAAGCTCCCC ATCTAAGCAA GTGTTTACGT ATTCCTTCCT 1920
TGACAAATGC TAGAAGAGCT CTTTAGGTAG GTAGTGAATA GGATCTCAGG TATAGAGCTG 1980
AATTTAGCCC TGGGCTGAAC CTTCACATGG TCATTAGACA GACATATGCC AGCTATTGGT 2040
GCAGGCTTTA GGTGTCACAT GTAACCCAGA AGGATCTAAA TAAAATGACC TTGAATTCCT 2100
CCAAAGCCCT TCCTAGGATG TCTAGGGACC TGGGGAACCC TGTAGGGAAT GCATCCCCAC 2160
AGACACTCCA CTTCCTGCAG TCTGGGGGAG GGACAGGAAG ACACACCCAG CCTCTCCTGG 2220
TCTCCTGCAT GAGGGAGCTG CCCTTCTCTT GGTACTGCTT CTGCATGTGC CATCTCAGCC 2280
TCATCACATC CATCCAGAAA TAAAGCTCAG CCTTGCATCA TTTTCCACTT GCTCACATAT 2340
TGATTCAGGC ACTATATTTT ACTGAAGCTT TTGAAATAGT TGGGGTGGAA ATTAAAGAAA 2400
GATGGATGGG GATTCACTGC AGCAAATGAG CAGCTTCAAA GCCAATGCCA TCCTGGAGCT 2460
CCTTTCTGCA GTCTGGGGGA GGGACAGGAA GACACACCCA GCCTCTCCTG GTCTCCTGCA 2520
TGAGGGAGCT GCCCTTCTCT TCACCAGCTT GGCTCTCGCT GACACACGGG TCTGAGGTCT 2580
GGGGTCTCAC ACACTCTGTC TCCCAGGCAG CTAATCCAGT CATTTACACA CACACACACA 2640
CACACACACA CACACACACA CACTAGGAAT TCTCATGCCA GTTCTTAAGA CAATGGATTT 2700
TTTACTTCCT TGCATATACA AAAATGAAAA ATCAGCATCC CATCTGGAGA CCAGGGTCTA 2760
ATATGGACCC CTTTAGTACA ATAGACATGT TAAAAGATGT ATAATCAAAG CTCAGAGCAA 2820
GATGAGAGAA GGACTGTGGG TGTGCCCATA CTTCTTTGAG CCACCTCGCC CCTTCCTGCC 2880
CGCTGTTCAG GTAGTCGTGG TGATTATAAA AAGCCATAAG TTCTCAGCAT GCAGGCCCAC 2940
TTCGCTTGCT GCAGGGACAG CCCCAATTCA TGGCCTGGGA GGCACCTTGT GTCCTAGACA 3000
CTGTCAGAGG AGGGCCAAGC AGGGAGGGCC AGAGCACCCC TCTGTGCTGG AGGGAAAGGT 3060
CTGCTGGTGC CAGAATCTGC ATGGCAGGAC ACTCCATTAG TGAGTGTTCT CTGCCCACAG 3120

TGCTCCAAAG GTGAGGACCT CCCTGTGGCA GGGTACACCT TAACACCACC TGTCAGGGAT 3180
GCTGTAGAAG GACCCTGGCA CTGGGACTGT GGGTGGAGGA GAGAACTTCT GAAGTGCTTT 3240
GCTGGATCAA CATGTCCAAA TGCTGGAGAC CACGGAGGGC AGAGAGAGTG GCATGGACGC 3300
CCCCGATGTG TCCACTTGGC CCTGTGGCTG GAACTGTGGC TTGAGGAGAA GGAAGGAAAA 3360
AGGATGGAAA GGTAGACTGG AGTTGCCTTT TGAGGGCTGG CAGCCCTGCT AGAAGTTTAG 3420
GCAATGGGAG TCATTTTCCA AGCCAAAAAT TAGAACTCAT GATAGGGAAA TGGAAGTGTT 3480
ATTGGGGGTG GCCATCATGA CCCGTCACGT GACACTAGGC CATCCAGGAC CTGTGGCCTC 3540
TGAAGTGATG GGAACCACTG AGGCTCATGC CTGGAGCAGT GGCCCGACTC AGCCTATGCT 3600
TCAGGATGAT CTGTCTAACC ACAGAGTAGA GGAGGCCCAG AGGATGAAGG CTGGAGGCTG 3660
CAGGTGAAAA GGTTGACGCC AAAGTCCAGA CAAAGAAGGG AGAGAATCTA GGGGTGAGGG 3720
GGTGCTTGTA AAGAGCTGCC TCAGAGGCAG GAACTGGGAC GTGCACCCAT TGGGCACCAC 3780
GCCTCTCTGT GCTTCACAAC AAACTGGCAC ATCCCAAGGC CACTGGAAGC CCTGCTGGGC 3840
CATCTCCCCA AGGCCAGTGC TGTACACATA ACCCTACAAG ACCAGTTTCC TACACATAAC 3900
CCTACAAGAC CAGTTTCCTA CACATAACCC CAGATCCCTT GTCCTGTCTT CTCAGTGGGG 3960
CTGGAGCAAG TCAGCAGGTG CCACTTTCTC CTGCCTTGTC TCTGCCTAAT AAAATGCGTC 4020
TCAATGTTTT ACACCTGCCA TTTAGCATGG ACTGCTTTAA CACCTCAAAA AGGCCTGTGG 4080
AGGAGCCTAT AATCATCAAG GAGGAATTCC CAGAATACAA AATAACACTA GCGGCTGATA 4140
ACAACTCTAA AAAATAAGTT TGTGTAATAA TGGGGGTGAG AAGAGATCAT AAGGTTATGT 4200
AAATAAGGTG AGGTTTTGAG TTCAAAGGAA TTCTCTGGTA TTTTTCTGTG TGTGTACACA 4260
TGCACCCACA CACTTGTGTG TATATGTGTA CAGACATATA TAAACACATG CATATAATGT 4320
GTATATATGC ATTACATATA TGCACATTCA TACATCTTTA TGTACAAAAT ACATATATGT 4380
ATATATAAAC ACCGATGTAC AAACACATAC GCACACATCT ATATACATAC ACATGTGTGT 4440
GCACATATAC ACATACCTGC ATATACACAC ATTTCGTGGG GTGCGGAGAG TCACTTAAAG 4500
GCTGCAGGGC CATAAGGCTT CCTGCTTGAC TGATATTCAT TAATGTTTGC TGAATTACAG 4560
CAAACCTTTG CTGTGCCCAT CCTGTTCTTT ATCATTGACC ATTGCTCTCA GGAGTTAATG 4620
TTTGAACCTG GCCATAAAGG AATCAACAGC TGCTGACCTC TGGCCGCTAT TCGAAGGGAA 4680
GGGAGCCCCC TATAAAACAG CCTACAGTGG ACAGTCTGGT CGGCAGAGCC GCAGGTCAGT 4740
CGTGAAGAGG GAGCTCTATT GGATCCATGA GTTTCTCCGG CAAGTACCAA CTGCAGAGCC 4800
AGGAAAACTT TGAAGCCTTC ATGAAGGCAA TCGGTGAGTG CTGGACTGAA AGGCAAAGCT 4860

GTGGGTCACA TCAGTGAGGG TCTAGCTCTA CCAGCAGTGG CTATTTAGGG TCCAAATGTT 4920
GAGATGGGGG GAGAGATTCA GGCTATATAC ACAAACTAGG GGGCATTTTA CTGACTTCTG 4980
GAGTTATTTG CAGCAAGTCC TCACTGCACA AGGCCACCCC ATAGGCAAGT GGAAAGAGCA 5040
CTGAACTAGG GTGTGGTCTG GATTGATGGC CATGTCATTG GCACTTCGTT GTGTGATCCT 5100
ATTCCTGCAT TTATTCATTC TTCAAACAAA CAGTGATTCA AGGCCAACCA CACACTGAGC 5160
ACTGTGCTGG ATAGATACCA GGGAGACAGA TGATAAAGGC AATAAGGCAT TTTCTTATCA 5220
GGGAAGAGAA GAGAAGAAAT AAAGGTAATA AGGCATTCCC TCAGGTGTAT GGAGCGCTGA 5280
CTGTGCCAGG CGACTGTGCT GACCATGGGA TATGCAATAC CCCATCTATT CCTTGCCAAA 5340
AAACTAAGCT GGGTACC 5357

【図面の簡単な説明】

【図１】マウス近位尿細管上皮細胞株Ｎｏ．１３（３７－１３）の形態を示す電子顕微鏡写真。

【図２】マウス近位尿細管上皮細胞株（Ｎｏ．１０、１３、１４、１５、１６及び１９）のホルモン応答能（ＰＴＨ及びＡＶＰで刺激した場合の細胞内ｃＡＭＰ産生誘導）を測定した結果を示した図。

【図３】マウス近位尿細管上皮細胞株（Ｎｏ．１３及び１６）のＢＳＡ取込み能を測定した結果を示した図。

【図４】マウス近位尿細管上皮細胞株を用いるレポーターアッセイにより被験物質のＬ－ＦＡＢＰ発現増強作用を測定した結果を示した図。

【図５】低酸素・再酸素化モデル（インビトロ腎虚血再灌流モデル）における細胞傷害に対するＬ－ＦＡＢＰ発現抑制の影響を示した図。Ｌ－ＦＡＢＰアンチセンスは、Ｌ－ＦＡＢＰアンチセンスＲＮＡ発現ベクターを一過性にトランスフェクトしたブタ近位尿細管由来ＬＬＣ－ＰＫ１細胞を、コントロールは、ベクターのみを一過性にトランスフェクトした同細胞を、各々表す。

【図６】低酸素・再酸素化モデル（インビトロ腎虚血再灌流モデル）における細胞傷害に対するＬ－ＦＡＢＰ強制発現の影響を示した図。「２４」は、マウス近位尿細管細胞（クローン２４）（対照細胞）、「２４－１９」は、マウス近位尿細管細胞（クローン２４）にヒトＬ－ＦＡＢＰ遺伝子を導入して強制発現させた細胞（クローン２４－１９）を、各々表す。

【図７】腎疾患モデル（アドレアマイシン誘発糸球体硬化症モデル）マウスにおける蛋白尿とＮＡＧ排出量に対する薬物（ＭＣＣ－５５５）の作用を調べた結果を示した図。

【図８】腎疾患モデル（アドレアマイシン誘発糸球体硬化症モデル）マウスにおける血液生化学的パラメータ（血中コレステロール量および血中アルブミン量）に対する薬物（ＭＣＣ－５５５）の作用を調べた結果を示した図。

【図９】ヒト型Ｌ－ＦＡＢＰ遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いた腎疾患モデル（アドレアマイシン誘発糸球体硬化症モデル）における蛋白尿とＮＡＧ排出量に対する薬物（ＭＣＣ－５５５）の作用を調べた結果を示した図。

【図１】

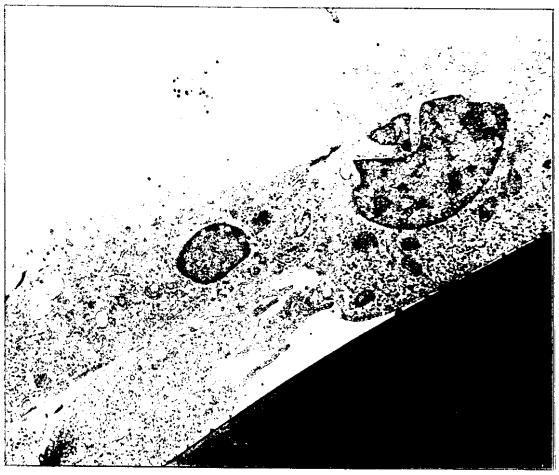


図１　マウス近位尿細管上皮細胞株Ｎｏ．１３（３７－１３）の電子顕微鏡写真

【図２】

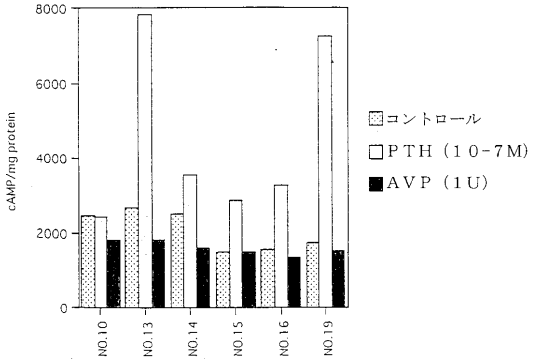


図２　マウス近位尿細管上皮細胞株のホルモン応答能

【図３】

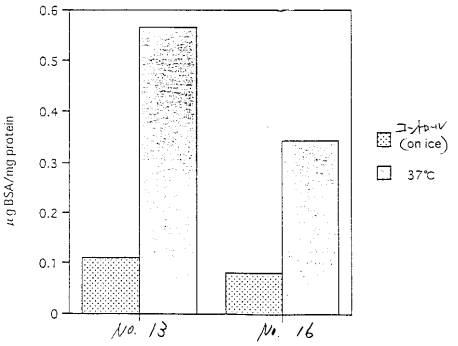


図３　マウス近位尿細管上皮細胞株のＢＳＡ取込み能

【図４】

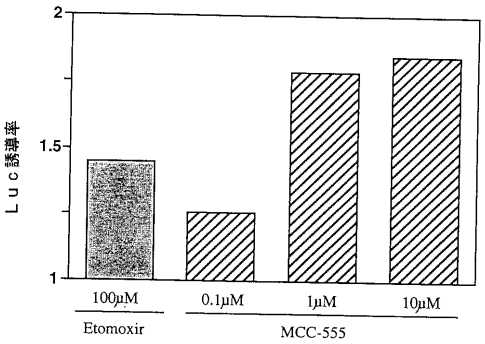
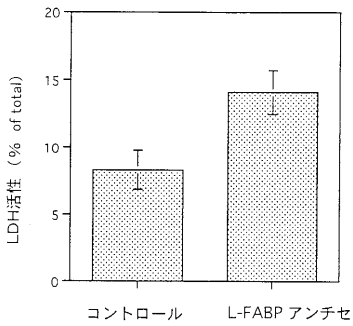
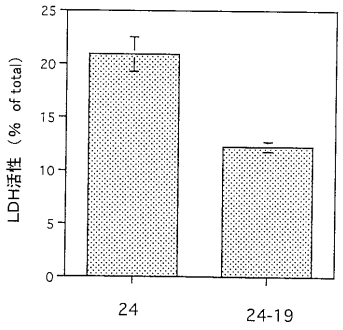


図４　マウス近位尿細管上皮細胞株を用いるＬ－ＦＡＢＰレポーターアッセイ

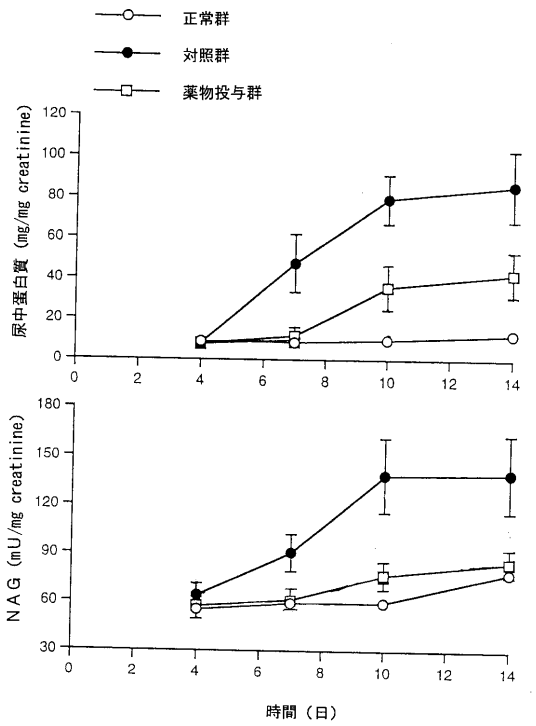
【図５】



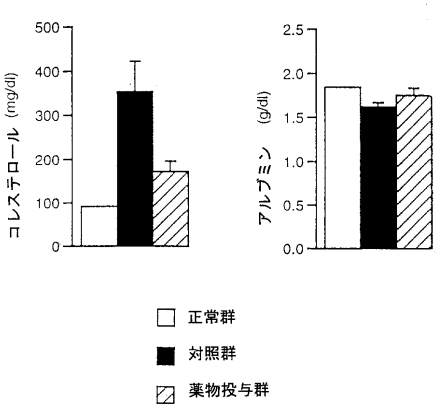
【図６】



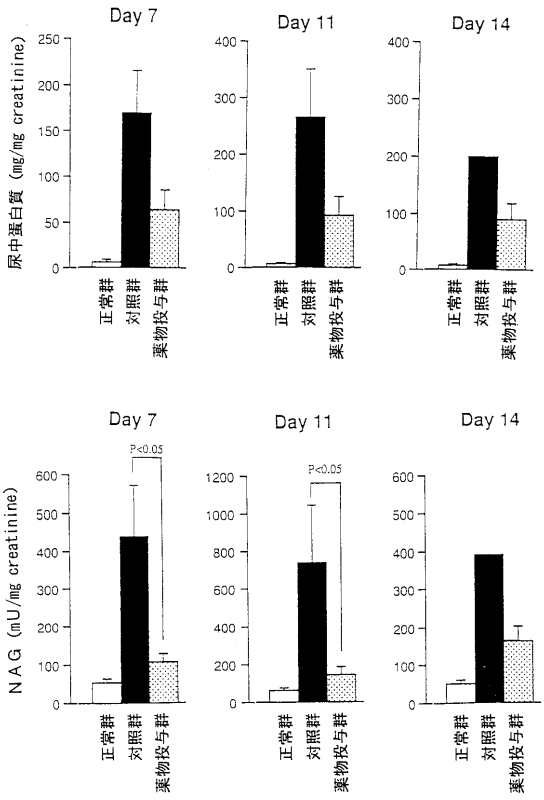
【図７】


正常群
対照群
薬物投与群
尿中蛋白質 (mg/mg creatinine)
NAG (mU/mg creatinine)
時間（日）

【図８】


コレステロール (mg/dl)
アルブミン (g/dl)
正常群
対照群
薬物投与群

【図９】


Day 7
Day 11
Day 14
尿中蛋白質 (mg/mg creatinine)
NAG (mU/mg creatinine)
P<0.05
正常群
対照群
薬物投与群

フロントページの続き

審査官　七條　里美

(56)参考文献　国際公開第９９／０２７３６３（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
C12N 15/09
C12Q 1/02
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed
JSTPlus(JOIS)