

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2012 年 4 月 26 日(26.04.2012)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2012/053622 A1

(51) 国際特許分類:

A01K 67/027 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2011/074228

(22) 国際出願日: 2011 年 10 月 20 日(20.10.2011)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2010-236891 2010 年 10 月 21 日(21.10.2010) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人広島大学(HIROSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7398511 広島県東広島市鏡山一丁目 3 番 2 号 Hiroshima (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 加藤 幸夫 (KATO Yukio) [JP/JP]; 〒7348553 広島県広島市南

区霞一丁目 2 番 3 号 国立大学法人広島大学大学院医歯薬学総合研究科内 Hiroshima (JP). 河本 健(KAWAMOTO Takeshi) [JP/JP]; 〒7348553 広島県広島市南区霞一丁目 2 番 3 号 国立大学法人広島大学大学院医歯薬学総合研究科内 Hiroshima (JP). 能城 光秀(NOSHIRO Mitsuhide) [JP/JP]; 〒7348553 広島県広島市南区霞一丁目 2 番 3 号 国立大学法人広島大学大学院医歯薬学総合研究科内 Hiroshima (JP). 中島 歩(NAKASHIMA Ayumu) [JP/JP]; 〒7348553 広島県広島市南区霞一丁目 2 番 3 号 国立大学法人広島大学大学院医歯薬学総合研究科内 Hiroshima (JP).

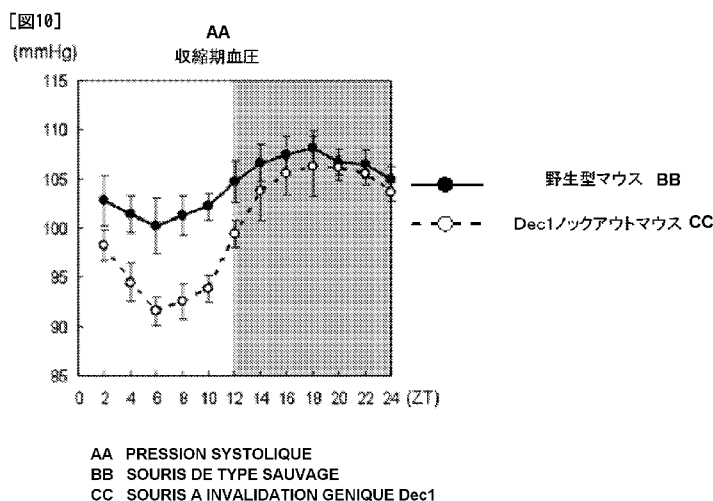
(74) 代理人: 木村 満(KIMURA Mitsuru); 〒1010054 東京都千代田区神田錦町二丁目 7 番地 協販ビル 2 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,

[続葉有]

(54) Title: NON-HUMAN ANIMAL, CELL, METHOD FOR EVALUATION OF BLOOD PRESSURE REGULATOR, METHOD FOR EVALUATION OF CONDITION FOR REGULATION OF BLOOD PRESSURE, AND METHOD FOR REGULATION OF BLOOD PRESSURE

(54) 発明の名称: 非ヒト動物、細胞、血圧調節物質の評価方法、血圧調節条件の評価方法および血圧の調節方法



(57) Abstract: Provided are: a genetically modified non-human animal and a genetically modified cell, in each of which the expression level of ATP1B1 is altered; a method for evaluating a blood pressure regulator and a method for evaluating a condition for regulation of a blood pressure, each of which utilizes the non-human animal or the cell; and a method for regulating a blood pressure, which utilizes the mechanism. Each of the non-human animal and the cell has a functional genetic modification in Dec1 or Dec2 gene and also has an increased or decreased ATP1B1 expression level. The method for evaluating a blood pressure regulator involves a step of administering a substance to be evaluated to the non-human animal. Alternatively, the method involves a step of bringing the cell into contact with a substance to be evaluated. The method for evaluating a condition for regulation of a blood pressure involves a step of placing the non-human animal or the cell under a condition to be evaluated. The method for regulating a blood pressure involves a step of enhancing or inhibiting the transcriptional activity of ATP1B1

gene by DEC1 or DEC2 and at least one substance selected from CLOCK, BMAL1, CRY1 and another clock transcriptional factor in the non-human animal.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2012/053622 A1



LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

A T P 1 B 1 の発現量を変化させる遺伝子改変非ヒト動物および細胞、当該非ヒト動物および細胞を利用した血圧調節物質の評価方法および血圧調節条件の評価方法、ならびに、当該機構を利用した血圧の調節方法を提供する。非ヒト動物および細胞は、D e c 1 または D e c 2 遺伝子に機能的な遺伝子改変を有し、かつ A T P 1 B 1 の発現量が増加または減少している。血圧調節物質の評価方法は、当該非ヒト動物に被験物質を投与する工程を含む。または、当該細胞に被験物質を接触させる工程を含む。血圧調節条件の評価方法は、当該非ヒト動物および細胞を、被験条件下におく工程を含む。血圧の調節方法は、非ヒト動物内において、D E C 1 または D E C 2、ならびに、C L O C K、B M A L 1、C R Y 1 およびその他の時計転写因子のうちの少なくとも一つによって、A T P 1 B 1 遺伝子の転写活性を促進または抑制させる工程を含む。

明 細 書

発明の名称：

非ヒト動物、細胞、血圧調節物質の評価方法、血圧調節条件の評価方法および血圧の調節方法

技術分野

[0001] 本発明は、ATP1B1の発現量を変化させる遺伝子を改変した非ヒト動物および細胞、当該非ヒト動物および細胞を利用した血圧調節物質の評価方法および血圧調節条件の評価方法、ならびに、当該機構を利用した血圧の調節方法に関する。

背景技術

[0002] 本態性高血圧または本態性低血圧は、生活習慣病のひとつであり、概念的で複雑かつ多因子性の病態である。血圧自体の自覚症状は何もないことが多い。しかし、虚血性心疾患、脳卒中または腎不全等の発症リスクとなる点で臨床的な意義は大きい。

[0003] 例えば、本態性高血圧に関連する因子として、非特許文献1には、（本態性）高血圧と $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ との関連性が記載されている。具体的には、 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ の阻害が、高血圧症に繋がり得るということが記載されている。 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ は、神経刺激伝達、栄養素もしくはイオンの吸収、または、細胞内の Ca^{2+} 濃度等に関連する、細胞内の Na^+ および K^+ 濃度を調節する基本的因子である。また、 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ は、 α subunit（以下、ATP1A1）と、 β subunit（以下、ATP1B1）とを含む構成となっている。

[0004] $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ の活性を制御するステロイドであるウアバイン（Ouabain）を投与すると血圧が上昇することと、多数の高血圧患者において内因性ウアバインの血中レベルが上昇していることが知られている。同様に、 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ の活性を制御する細胞骨格タンパク質であるアデュシン（Adducin）の変異でも、高血圧をもたらすこと

が知られている。

[0005] 一方、Dec1 遺伝子は、分化状態の軟骨細胞に特異的に発現する遺伝子である。特許文献1には、ジブチリルcAMPの存在下で軟骨細胞を培養することにより、軟骨細胞が分化状態で培養され、その後、分化した軟骨細胞と脱分化した軟骨細胞との間で発現に差異のある遺伝子の探索を行うことで、前者に特異的に発現している遺伝子を取得することができたことが記載されている。

[0006] さらに、DEC1、およびそれに類似するDEC2は、体内時計自体を制御する時計転写因子でもあり、全組織で概日リズムにおける発現をしていることも分かっている。特許文献2には、分子時計におけるDEC1およびDEC2の役割が詳細に記載されている。具体的には、塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス型転写因子であるDEC1またはDEC2を用いて概日リズムを調節する方法が記載されている。これらDEC1およびDEC2を用いることにより、E-boxエンハンサを通し、同様に分子時計として機能しているCLOCKおよびBMAL1の誘発する転写活性化を制御する方法についても記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開平11-75882号公報

特許文献2：特開2005-204501号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：John M. Hamlyn, Richard Ringel, et al., Nature 300, 650-652, 1982

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 前述したように、本態性高血圧または本態性低血圧は、概念的で複雑かつ多因子性の病態である。通常、血圧は昼に高く夜に低い。しかし、このよう

な血圧の日内変動に関連して影響する本態性高血圧または本態性低血圧も存在する。これら本態性高血圧または本態性低血圧の治療薬（または予防薬、診断薬等）の標的分子および関連する遺伝子は、十分に明らかになっているとは言い難い。

[0010] そのため、本態性高血圧または本態性低血圧の治療薬等の開発のために、未だ解明されていない、特に日内変動における、血圧上昇および血圧低下機構に関連する遺伝子およびタンパク質の解明が必要とされる。

[0011] 一方、前述したように、ATP1A1とATP1B1とを含む構成の $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ の活性変化は、高血圧または低血圧に繋がり得ることが知られている。すなわち、これらの発現量の変化機構に関連する遺伝子およびタンパク質は、血圧の日内運動に影響している可能性が高い。

[0012] 本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、ATP1B1の発現量を変化させる遺伝子改変非ヒト動物および細胞、当該非ヒト動物および細胞を利用した血圧調節物質の評価方法および血圧調節条件の評価方法、ならびに、当該機構を利用した血圧の調節方法の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らが鋭意研究を行った結果、DEC1またはCLOCKが、ATP1B1遺伝子上流プロモーター配列の二箇所のCACGTG E-boxに直接結合し、ATP1B1の発現を抑制または促進させることを解明した。また、DEC1はATP1B1の発現を抑制することで血圧を上昇させるため、Dec1遺伝子ノックアウトマウスは野生型マウスと比較して、特に休息期に血圧が低下する（低血圧となる）ことを解明した（実施例参照）。

[0014] そこで、本発明の第1の態様に係る非ヒト動物は、Dec1遺伝子またはDec2遺伝子に機能的な遺伝子改変を有し、かつATP1B1の発現量が増加または減少していることを特徴とする。

[0015] 好ましくは、前記非ヒト動物は、低血圧または高血圧であることを特徴とする。

[0016] さらに好ましくは、前記非ヒト動物は、Dec1遺伝子ノックアウト動物

またはD e c 2 遺伝子ノックアウト動物であり、前記A T P 1 B 1 の発現量が増加していることを特徴とする。

[0017] また、好ましくは、前記非ヒト動物は、D e c 1 遺伝子過剰発現動物またはD e c 2 遺伝子過剰発現動物であり、前記A T P 1 B 1 の発現量が減少していることを特徴とする。

[0018] 好ましくは、前記非ヒト動物は、マウスまたはラットであることを特徴とする。

[0019] 本発明の第2の態様に係る細胞は、D e c 1 遺伝子またはD e c 2 遺伝子に機能的な遺伝子改変を有し、かつA T P 1 B 1 の発現量が増加または減少していることを特徴とする。

[0020] 好ましくは、前記細胞は、D e c 1 遺伝子ノックアウト細胞またはD e c 2 遺伝子ノックアウト細胞であり、前記A T P 1 B 1 の発現量が増加していることを特徴とする。

[0021] また、好ましくは、前記細胞は、D e c 1 遺伝子過剰発現細胞またはD e c 2 遺伝子過剰発現細胞であり、前記A T P 1 B 1 の発現量が減少していることを特徴とする。

[0022] さらに好ましくは、前記細胞は、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞、腎臓尿細管細胞または心筋細胞のいずれかであることを特徴とする。

[0023] 本発明の第3の態様に係る血圧調節物質の評価方法は、D e c 1 遺伝子またはD e c 2 遺伝子に機能的な遺伝子改変を有し、かつA T P 1 B 1 の発現量が増加または減少している前記非ヒト動物、または前記細胞に、被験物質を投与する、または接触させる工程を含むことを特徴とする。

[0024] 好ましくは、前記非ヒト動物の血圧を測定する工程を含むことを特徴とする。

[0025] または、本発明の第3の態様に係る血圧調節物質の評価方法は、D e c 1 遺伝子またはD e c 2 遺伝子に機能的な遺伝子改変を有し、かつA T P 1 B 1 の発現量が増加または減少している細胞に、被験物質を接触させる工程を含むことを特徴とする。

[0026] 好ましくは、A T P 1 B 1 の発現量を測定する工程を含むことを特徴とする。

[0027] さらに、本発明の第3の態様に係る血圧調節物質の評価方法には、以下に示す野生型の非ヒト動物、野生型の細胞を用いる方法も含まれる。

すなわち、野生型の非ヒト動物に被験物質を投与する工程と、
前記被験物質の投与前と投与後の、前記野生型の非ヒト動物の、D E C 1
またはD E C 2 の発現量およびA T P 1 B 1 の発現量を測定する工程と、
を含むことを特徴とする、血圧調節物質の評価方法。

[0028] または、野生型の細胞に被験物質を接触させる工程と、
前記被験物質の接触前と接触後の、前記野生型の細胞の、D E C 1 または
D E C 2 の発現量およびA T P 1 B 1 の発現量を測定する工程と、
を含むことを特徴とする、血圧調節物質の評価方法。

[0029] 本発明の第4の態様に係る血圧調節条件の評価方法は、野生型の非ヒト動物、または、D e c 1 遺伝子またはD e c 2 遺伝子に機能的な遺伝子改変を有し、かつA T P 1 B 1 の発現量が増加または減少している非ヒト動物、あるいは、野生型の細胞、または、D e c 1 遺伝子またはD e c 2 遺伝子に機能的な遺伝子改変を有し、かつA T P 1 B 1 の発現量が増加または減少している細胞を、被験条件下におく工程を含むことを特徴とする。

[0030] 本発明の第5の態様に係る血圧の調節方法は、前記遺伝子改変、または野生型の非ヒト動物内において、D E C 1 またはD E C 2、ならびに、C L O C K、B M A L 1、C R Y 1 およびその他の時計転写因子のうちの少なくとも一つによって、A T P 1 B 1 遺伝子の転写活性を促進または抑制させる工程を含むことを特徴とする。

[0031] 好ましくは、前記その他の時計転写因子は、C R Y 2、P E R 1 - 3、N P A S 2、B M A L 2、R O R a l p h a、R O R b e t a、R O R g a m m a、R E V - E R B a l p h aもしくはR E V - E R B b e t a、または、これらの組み合わせであることを特徴とする。

発明の効果

[0032] 本発明の第1の態様に係る非ヒト動物および第2の態様に係る細胞によれば、ATP1B1の発現量を変化させることができる。第3の態様に係る血圧調節物質の評価方法によれば、血圧を調節する物質を評価することができる。第4の態様に係る血圧調節条件の評価方法によれば、血圧を調節する条件を評価することができる。第5の態様に係る血圧の調節方法によれば、非ヒト動物内において血圧を調節することができる。

図面の簡単な説明

[0033] [図1]実施例1に係るChIP assayにおけるアガロースゲル電気泳動の結果、ならびに、ATP1B1遺伝子およびDec1遺伝子のE-boxを示す図である。

[図2]実施例2に係るルシフェラーゼアッセイによる相対的ルシフェラーゼ活性の結果を示す図である。

[図3]実施例3に係るDec1遺伝子ノックアウトマウス胎児線維芽細胞のATP1B1 mRNA発現レベルの結果を示す図である。

[図4]実施例4に係るDec1アデノウイルスのMOI依存性によるATP1B1 mRNA発現レベルの結果を示す図である。

[図5]実施例5に係る野生型マウスおよびDec1遺伝子ノックアウトマウスの腎臓でのATP1B1 mRNA発現レベルの概日リズムの結果を示す図である。

[図6]実施例5に係る野生型マウスおよびDec1遺伝子ノックアウトマウスの腎臓でのATP1B1 mRNA発現レベルの概日リズムの結果を示す図である。

[図7]実施例6に係る野生型マウスおよびDec1遺伝子ノックアウトマウスの大動脈でのATP1B1 mRNA発現レベルの概日リズムの結果を示す図である。

[図8]実施例6に係る野生型マウスおよびDec1遺伝子ノックアウトマウスの大動脈でのATP1B1免疫染色の概日リズムの結果を示す図である。

[図9]実施例6に係る野生型マウスおよびDec1遺伝子ノックアウトマウス

の心臓でのA T P 1 B 1 m R N A発現レベルの概日リズムの結果を示す図である。

[図10]実施例7に係る野生型マウスおよびD e c 1 遺伝子ノックアウトマウスの収縮期血圧概日リズム結果を示す図である。

[図11]実施例7に係る野生型マウスおよびD e c 1 遺伝子ノックアウトマウスの拡張期血圧概日リズム結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0034] 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。本明細書において「有する」、「含む」または「含有する」といった表現は、「からなる」または「から構成される」という意味も含むものとする。

[0035] D e c 1 およびD e c 2 遺伝子は、前述したとおり、分化状態の軟骨細胞に特異的に発現する遺伝子（特許文献1 参照）である。さらに、概日リズムに関連する遺伝子として既知の遺伝子でもある（特許文献2 参照）。D e c 1 およびD e c 2 遺伝子は、例えば、ラットとマウスとのオーソログ遺伝子では、S H A R P とS t r a 1 3 として命名されている。しかし、本明細書では、便宜上動物種によらずD e c 1 およびD e c 2 遺伝子（D E C 1 またはD E C 2）の名称を使用するものとする。ヒトでも同様に、遺伝子記号はB H L H E 4 0 またはB H L H E 4 1 として命名されているが（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8553/> および<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/79365/> 参照）、D e c 1 およびD e c 2 遺伝子（D E C 1 またはD E C 2）の名称を使用するものとする。一例として、ヒト（H o m o s a p i e n s）のD e c 1 遺伝子のDNAの塩基配列を配列番号1 に、D e c 2 遺伝子のDNAの塩基配列を配列番号2 に示す。

[0036] （D e c 1 またはD e c 2 遺伝子改変非ヒト動物）

本発明の第1 の実施の形態は、D e c 1 またはD e c 2 遺伝子に機能的な遺伝子改変を有する非ヒト動物に関する。

[0037] なお、本明細書において「非ヒト動物」とは、ヒトを除く動物である限り

特に限定されない。好ましくは、（モデル動物とされる）哺乳動物である。哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ、イヌ、ネコ、サル、オランウータンまたはチンパンジー等が挙げられる。このうち最も好ましくは、マウスまたはラットである。

[0038] 本発明における、D e c 1 または D e c 2 遺伝子の機能的な遺伝子改変について説明する。例えば、ある非ヒト動物の D e c 1 または D e c 2 遺伝子の領域において、D e c 1 または D e c 2 遺伝子が全く発現しなくなる、過剰発現する、本来有する正常な機能が発揮できない程度にその発現量が低下する、本来有する正常な機能を大幅に越えて発揮する程度にその発現量が上昇する、その遺伝子産物の機能が完全に喪失する、本来有する正常な機能が発揮できない程度にその遺伝子産物の機能が低下する、または、本来有する正常な機能を大幅に越えて発揮する程度にその遺伝子産物の機能が上昇する等の、遺伝子改変が挙げられる。すなわち、D e c 1 もしくは D e c 2 遺伝子による機能に影響を与える遺伝子改変を意味する。

[0039] 本明細書において、「遺伝子改変」は、当該分野の当業者に公知である技術を用いて行う通常の意味の遺伝子の改変（例えば、遺伝子導入、欠失または欠損等）を意味する。このような遺伝子改変には、例えば、リン酸カルシウム共沈殿法、電気穿孔（エレクトロポレーション）法、リポフェクション法、凝集法、顕微注入（マイクロインジェクション）法、遺伝子銃（パーティクルガン）法または D E A E - デキストラン法等を挙げることができる。

[0040] D e c 1 または D e c 2 遺伝子による機能とは、A T P 1 B 1 の発現量の変化に繋がるものを意味する。好ましくは、それに伴う血圧の変化に繋がるものを意味する（非特許文献 1 参照）。この詳細については後の実施例において説明する。すなわち、本実施の形態に係る非ヒト動物は、A T P 1 B 1 の発現量が増加または減少しており、好ましくは低血圧または高血圧である。

[0041] 本明細書において、「A T P 1 B 1 の発現量が増加または減少」とは、特

に、遺伝子改変を有さない同胞および同齡等の野生型の非ヒト動物の A T P 1 B 1 の発現量を基準とし、増加しているか、または減少しているか否かを意味する。

[0042] さらに、本明細書において、「低血圧または高血圧」とは、遺伝子改変を有さない同胞および同齡等の野生型の非ヒト動物の血圧と比較して、遺伝子改変非ヒト動物の血圧（収縮期血圧および／または拡張期血圧）が、低下または上昇している状態を意味する。さらに好ましくは、概日リズムを有したまま、血圧が低下または上昇している状態を意味する。最も好ましくは、概日リズムを有したまま血圧が低下する場合において、特に当該非ヒト動物の休息期（就寝期間）に血圧が低下している状態を意味する。

[0043] 本第 1 の実施の形態に係る好ましい例として、A T P 1 B 1 の発現量が増加しており、低血圧である D e c 1 遺伝子ノックアウト非ヒト動物または D e c 2 遺伝子ノックアウト非ヒト動物が挙げられる。ノックアウト非ヒト動物は、ヘテロ接合体非ヒト動物またはホモ接合体非ヒト動物のいずれでも可能である。このような D e c 1 または D e c 2 遺伝子ノックアウト非ヒト動物の作製は、当該分野の当業者に公知である任意の方法のいずれを用いても構わない。

[0044] 一例を簡単に説明すると、まず、非ヒト哺乳動物の胚性幹細胞（E S 細胞）に、前述したような遺伝子導入法によって、D e c 1 または D e c 2 遺伝子を機能的に欠損させるよう構成したベクターを導入する。次に、当該ベクターによって安定して組み換えられたクローンを選択する。その後、当該 E S 細胞を胚盤胞に注入するか、あるいは E S 細胞塊と 8 細胞期胚とを凝集させ、キメラ非ヒト動物を作製する。当該キメラ非ヒト動物から、生殖系列に D e c 1 または D e c 2 遺伝子の機能的な欠損が伝達されたものを選択することにより、ヘテロ接合体 D e c 1 または D e c 2 遺伝子ノックアウト非ヒト動物（D e c 1 + / - または D e c 2 + / -）を得ることが可能である。さらに、D e c 1 + / - または D e c 2 + / - 非ヒト動物同士を交配させ、ホモ接合体 D e c 1 または D e c 2 遺伝子ノックアウト非ヒト動物（D e c

1-/-またはDec2-/-)を選択し、得ることも可能である。

[0045] 本第1の実施の形態に係るもう一つの好ましい例として、ATP1B1の発現量が減少しており、高血圧であるDec1遺伝子過剰発現非ヒト動物またはDec2遺伝子過剰発現非ヒト動物が挙げられる。このようなDec1遺伝子過剰発現非ヒト動物またはDec2遺伝子過剰発現非ヒト動物の作製は、当該分野の当業者に公知である任意の方法のいずれを用いても構わない。

[0046] 一例を簡単に説明する。まず、Dec1またはDec2遺伝子の過剰発現体作製用ベクターを作製する。次に、非ヒト動物の受精卵、未受精卵、精子またはその前駆細胞（始原生殖細胞、卵原細胞、卵母細胞、卵細胞、精原細胞、精母細胞もしくは精細胞等）等に、前述したような遺伝子導入法により過剰発現体作製用ベクターを用いて、DEC1またはDEC2をコードするDNAを導入し、作製する。好ましくは、受精卵の胚発生の初期段階（さらに好ましくは8細胞期以前）において、当該DNAを導入する。

[0047] このように、本第1の実施の形態に係るDec1またはDec2遺伝子改変非ヒト動物は、低血圧または高血圧（収縮期血圧および/または拡張期血圧において、血圧が低下または上昇している状態）という特徴を持っている。これらは、低血圧または高血圧モデル非ヒト動物として有用である。例えば、本態性低血圧（本態性高血圧）の診断方法、治療方法、診断薬もしくは治療薬の開発、または、本態性低血圧（本態性高血圧）の治療に影響する食事、生活習慣もしくは環境の研究に利用することができる。特に、本態性高血圧と比較し、本態性低血圧のモデル動物は少ない為、利用価値が高い。

[0048] （Dec1またはDec2遺伝子改変細胞）

本発明の第2の実施の形態は、Dec1またはDec2遺伝子に機能的な遺伝子改変を有する細胞に関する。

[0049] なお、本明細書において「細胞」とは、その細胞のゲノム構成にDec1またはDec2遺伝子を有する限り特に限定されない。例えば、ヒトおよび前述したような非ヒト動物等の哺乳動物の細胞が挙げられる。好ましくは、

ヒト、マウスまたはラットの細胞である。最も好ましくは、血圧に関連する、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞、腎臓尿細管細胞または心筋細胞等を挙げることができる。なお、当該細胞は、初代培養細胞または細胞株のいずれの細胞であってもよい。遺伝子改変（例えば、遺伝子導入、欠失または欠損等）の手段については、前述した第１の実施の形態で述べた手段と同様である。

[0050] また、本第２の実施の形態でのD e c 1またはD e c 2 遺伝子の機能的な遺伝子改変についても、第１の実施の形態において述べたものと同様の趣旨であり、A T P 1 B 1 の発現量の増加または減少に繋がるものを意味する。

[0051] 本第２の実施の形態に係る好ましい例として、A T P 1 B 1 の発現量が増加したD e c 1 遺伝子ノックアウト細胞またはD e c 2 遺伝子ノックアウト細胞が挙げられる。ノックアウト細胞は、ヘテロ接合体細胞またはホモ接合体細胞のいずれでも構わない。このようなD e c 1 またはD e c 2 遺伝子ノックアウト細胞の作製は、当該分野の当業者に公知である任意の方法のいずれを用いても構わない。

[0052] 一例を簡単に説明すると、まず、哺乳動物から血管平滑筋細胞等を採取する。次いで、前述したような遺伝子導入法を用い、D e c 1 またはD e c 2 遺伝子を機能的に欠損させるよう構成したベクターを導入する。その後、当該ベクターによって組み換えられたノックアウト細胞を選択する。他の方法としては、前述の第１の実施の形態に係るD e c 1 またはD e c 2 遺伝子ノックアウト非ヒト動物から直接細胞を採取しても構わない。

[0053] 本第２の実施の形態に係るもう一つの好ましい例として、A T P 1 B 1 の発現量が減少した、D e c 1 遺伝子過剰発現細胞またはD e c 2 遺伝子過剰発現細胞が挙げられる。このようなD e c 1 遺伝子過剰発現細胞またはD e c 2 遺伝子過剰発現細胞の作製は、当該分野の当業者に公知である任意の方法のいずれを用いても構わない。

[0054] 一例を簡単に説明すると、まず、D e c 1 またはD e c 2 遺伝子の過剰発現体作製用ベクターを作製する。次に、哺乳動物から血管平滑筋細胞等を採

取し、前述したような遺伝子導入法を用い、当該ベクターを使用してDEC1またはDEC2をコードするDNAを導入する。その結果、Dec1またはDec2遺伝子の過剰発現細胞が作製される。他の方法としては、前述の第1の実施の形態に係るDec1またはDec2遺伝子過剰発現非ヒト動物から直接細胞を採取しても構わない。

[0055] 本第2の実施の形態に係るDec1またはDec2遺伝子改変細胞は、ATP1B1の発現量が増加または減少するという特徴を持っている。また、ATP1B1の発現量の増加または減少は、低血圧または高血圧に繋がることも分かっている（非特許文献1参照）。すなわち、本第2の実施の形態に係る細胞は、本態性低血圧または本態性高血圧の診断方法、治療方法、診断薬もしくは治療薬の開発、または、本態性低血圧もしくは本態性高血圧の治療に影響する食事、生活習慣もしくは環境の研究に利用するモデル細胞として有用である。

[0056] （血圧調節物質の評価方法）

本発明の第3の実施の形態は、前述の第1の実施の形態に係るDec1またはDec2遺伝子改変非ヒト動物、および、第2の実施の形態に係るDec1またはDec2遺伝子改変細胞を利用する、血圧調節物質の評価方法に関する。なお、本第3の実施の形態に係る血圧調節物質の評価方法には、血圧調節物質のスクリーニング方法も含まれる。

[0057] まず、Dec1またはDec2遺伝子改変非ヒト動物を利用する血圧調節物質の評価方法について説明する。具体的には、当該評価方法は、Dec1またはDec2遺伝子改変非ヒト動物に被験物質を投与する工程を含む。好ましくは、当該非ヒト動物の血圧を測定する工程をさらに含む。

[0058] なお、本明細書において「被験物質」とは、血圧調節物質となるか否かの評価、およびスクリーニングの対象となり得る、あらゆる物質を意味する。例えば、低分子化合物、核酸またはポリペプチド等が挙げられる。低分子化合物、核酸またはポリペプチド等は、天然物から抽出および精製されたものであってもよく、人工的に合成されたものであってもよい。また、精製され

たものに限らず、未精製のものでも被験物質として使用することができる。
さらに、新規な物質および公知の物質のいずれでも構わない。例えば、既存
もしくは新規の血圧調節の治療薬もしくは予防薬、またはその誘導体をも含
み得る。

[0059] 当該非ヒト動物への被験物質の投与方法は、当該技術分野の当業者に公知
である非ヒト動物への投与手段であれば限定されない。例えば、経口投与、
皮下注射、筋肉注射、局所注入または腹腔内投与等が挙げられる。

[0060] 当該非ヒト動物の血圧の測定（評価）方法についても、当該技術分野の当
業者に公知である非ヒト動物の血圧の測定（評価）方法であれば限定されな
い。例えば、市販の血圧測定装置等による直接的な血圧の測定が挙げられる
。または、血圧変化により発現量が増減する物質の発現量の測定等のような
、間接的な血圧変動の測定（評価）でも構わない。さらには、ふらつきもし
しくは行動等での本態性低血圧の病状、または、動脈硬化等の本態性高血圧の
病状によって、被験物質を投与した D e c 1 または D e c 2 遺伝子改変非ヒ
ト動物を評価してもよい。

[0061] 当該血圧調節物質の評価、およびスクリーニング方法の一例を簡単に説明
する。予め、被験物質の投与前の D e c 1 または D e c 2 遺伝子改変非ヒト
動物の血圧を測定しておく。好ましくは、血圧の概日リズムを測定しておく
（例えば、特定時間毎の血圧を測定する）。次に、当該遺伝子改変非ヒト動
物に被験物質を経口投与し、同様に血圧を測定する。その後、投与前と投与
後との当該遺伝子改変非ヒト動物の血圧（収縮期血圧および／または拡張期
血圧）を比較し、その血圧の変化から、当該被験物質が本態性低血圧症（ま
たは本態性高血圧症）に対して血圧調節物質（例えば、低血圧または高血圧
の治療または予防剤）となるか否かを評価、およびスクリーニングする。な
お、血圧の比較対象は、投与前後の同じ遺伝子改変非ヒト動物でなくとも、
同胞および同齢の投与を行わない他の遺伝子改変非ヒト動物と、投与を行っ
た遺伝子改変非ヒト動物とでも構わない。

[0062] 次に、D e c 1 または D e c 2 遺伝子改変細胞を、本態性低血圧症または

本態性高血圧症のモデル細胞として利用する血圧調節物質の評価方法について説明する。具体的には、当該評価方法は、D e c 1 または D e c 2 遺伝子改変細胞に被験物質を接触させる工程を含む。

[0063] 当該遺伝子改変細胞に被験物質を接触させる方法は、当該遺伝子改変細胞に被験物質が接触している状態であれば、どのような方法でも構わない。例えば、当該遺伝子改変細胞の培養培地中において、前述したような被験物質を添加する等の方法が挙げられる。

[0064] 当該遺伝子改変細胞を利用する血圧調節物質の評価、およびスクリーニング方法では、前述の被験物質を接触させる工程と、さらには、血圧変化により増減する物質の当該遺伝子改変細胞中における発現量等を測定する工程とを含み得る。血圧変化により増減する物質等には、本発明に係る D E C 1 もしくは D E C 2、または、A T P 1 B 1、 Na^+/K^+ -A T P a s e 活性、内在性ウアバイン、アデューシン、細胞質カルシウム濃度もしくはミオシン軽鎖リン酸化酵素活性等を上げることができる。これらのうち、A T P 1 B 1 の発現量を測定する工程を含む方法が好ましい。

[0065] 細胞から発現量を測定する方法は、当該技術分野において公知である方法なら限定されない。例えば、転写産物の発現量は、細胞から調整した T o t a l R N A を用いての、R T - P C R または ノザンブロットング等により測定され得る。また、翻訳産物の発現量は、細胞から抽出液を調製し、免疫学的手法により測定され得る。免疫学的手法としては、放射性同位元素免疫測定法 (R I A 法)、E L I S A 法または蛍光抗体法等により測定され得る。例えば、細胞質カルシウム濃度については、カルシウムイオン濃度に対して変化する蛍光プローブ (F u r a 2 または F u r a 4 等) の励起波長変化を利用して測定され得る。ミオシン軽鎖リン酸化酵素活性については、リン酸化した同酵素に対する特異的抗体または ^{32}P -A T P を用いて測定され得る。

[0066] 当該血圧調節物質の評価、およびスクリーニング方法の一例を簡単に説明すると、まず、被験物質接触前の培養中の D e c 1 または D e c 2 遺伝子改

変細胞における、A T P 1 B 1 の発現量を R T - P C R により測定しておく。好ましくは、発現量の概日リズムを測定しておく（例えば、特定時間毎の発現量を測定する）。次に、当該遺伝子改変細胞の培養培地中に被験物質を添加し、その後同様に A T P 1 B 1 の発現量を測定する。添加前と添加後との当該遺伝子改変細胞の A T P 1 B 1 の発現量を比較し、その変化から当該被験物質が血圧調節物質（例えば、低血圧または高血圧の治療または予防剤）となるか否かを評価、およびスクリーニングする。

[0067] すなわち、当該遺伝子改変細胞が D e c 1 遺伝子ノックアウト細胞であった場合、A T P 1 B 1 の発現量が添加前より添加後の方が減少していれば、本態性低血圧の治療または予防物質となる可能性が高い。また、当該遺伝子改変細胞が D e c 1 遺伝子過剰発現細胞であった場合、A T P 1 B 1 の発現量が添加前より添加後の方が増加していれば、本態性高血圧の治療または予防物質となる可能性が高い。

[0068] このように、本第3の実施の形態に係る血圧調節物質の評価方法は、第1の実施の形態に係る D e c 1 または D e c 2 遺伝子改変非ヒト動物、および、第2の実施の形態に係る D e c 1 または D e c 2 遺伝子改変細胞を利用し、本態性低血圧または本態性高血圧の予防、診断もしくは治療に有効な物質を評価、およびスクリーニングすることができる。すなわち、本態性低血圧または本態性高血圧に関する薬剤の開発に繋がる。また、より患者に近い観点では、本態性低血圧または本態性高血圧の病態に影響する食事等の研究にも利用され得る。

[0069] さらに、例えば、現在本態性低血圧または本態性高血圧患者に処方されている、降圧剤、利尿剤、低血圧治療薬またはショック治療薬（ジギタリス）等が、本発明者らが発見した D E C / C L O C K - A T P 1 B 1 系に直接または間接的に影響しないかどうかは、これらの治療薬の使用方法にも影響する可能性があるため、臨床的に重要である。そこで、本第3の実施の形態に係る血圧調節物質の評価方法を利用すると、当該治療薬によるそのような影響、さらには当該治療薬の作用機序の解明にも繋がる。これは、今後開発さ

れる血圧調節剤についても同様である。

[0070] なお、本第3の実施の形態に係る血圧調節物質の評価方法は、野生型の非ヒト動物または細胞を用いても可能である。前述のとおり、本発明者らはDEC/CLOCK-ATP1B1系の血圧に関する機序を発見した。すなわち、これを利用し、野生型の非ヒト動物に被験物質を投与し、被験物質の投与前と投与後の、当該非ヒト動物の、DEC1またはDEC2の発現量およびATP1B1の発現量を測定する。DEC1またはDEC2の発現量が増加し、ATP1B1の発現量が減少していれば、当該被験物質は、本態性低血圧の治療または予防物質となる可能性が高い。逆に、DEC1またはDEC2の発現量が減少し、ATP1B1の発現量が増加していれば、当該被験物質は、本態性高血圧の治療または予防物質となる可能性が高い。野生型の細胞であっても同様である。野生型の細胞に被験物質を接触させ、被験物質の接触前と接触後の、当該細胞の、DEC1またはDEC2の発現量およびATP1B1の発現量を測定すればよい。このような方法であっても血圧調節物質の評価をすることができる。

[0071] (血圧調節条件の評価方法)

本発明の第4の実施の形態は、前述の第1の実施の形態に係るDec1またはDec2遺伝子改変非ヒト動物、および、第2の実施の形態に係るDec1またはDec2遺伝子改変細胞を利用する血圧調節条件の評価方法に関する。具体的には、当該遺伝子改変非ヒト動物、または、当該遺伝子改変細胞を、被験条件下におく工程を含む。

[0072] 本明細書において「条件」とは、音、光（明もしくは暗等）、温度、時間、行動（運動も含む）、生活習慣、環境、または、これらを組み合わせた様々な任意の状況もしくは状態等を意味するものとする。当該遺伝子改変非ヒト動物または当該遺伝子改変細胞を「被験条件下におく」とは、前述した様々な条件等に、動物または細胞のそれぞれを通常おかれ得る条件下におくことを意味する。

[0073] まず、第1の実施の形態に係るDec1またはDec2遺伝子改変非ヒト

動物を利用する、血圧調節条件の評価方法について説明する。好ましくは、当該評価方法では、当該遺伝子改変非ヒト動物の血圧を測定する工程を含む。なお、当該遺伝子改変非ヒト動物の血圧の測定（評価）方法については、前述した第3の実施の形態と同様である。

[0074] 当該血圧調節条件の評価方法の一例を簡単に説明すると、まず、被験条件下におく前のD e c 1またはD e c 2 遺伝子改変非ヒト動物の血圧を測定しておく。好ましくは、血圧の概日リズムを測定しておく（例えば、特定時間毎の血圧を測定する）。次に、当該遺伝子改変非ヒト動物を被験条件下におき、その後同様に血圧を測定する。被験条件下におく前後での当該遺伝子改変非ヒト動物の血圧（収縮期血圧および／または拡張期血圧）を比較し、その血圧の変化から当該被験条件が血圧調節条件となるか否か（例えば、低血圧または高血圧の治療または予防に有効か否か）を評価する。なお、血圧の比較対象は、被験条件下におく前後での当該遺伝子改変非ヒト動物でなくとも、通常条件下においた同胞および同齡等の他の遺伝子改変非ヒト動物と、被験条件下においた当該遺伝子改変非ヒト動物とでも構わない。

[0075] 次に、第2の実施の形態に係るD e c 1またはD e c 2 遺伝子改変細胞を利用する、血圧調節条件の評価方法について説明する。

[0076] 当該遺伝子改変細胞を利用する血圧調節条件の評価方法では、好ましくは、血圧変化により発現量が増減する物質の、当該遺伝子改変細胞中における発現量を測定する工程を含み得る。このような血圧変化により発現量が増減するものには、第3の実施の形態同様、本発明に係るD E C 1もしくはD E C 2、または、A T P 1 B 1、N a⁺/K⁺-A T P a s e 活性、内在性ウアバイン、アデューシン、細胞質カルシウム濃度もしくはミオシン軽鎖リン酸化酵素活性等を挙げることができる。好ましくは、これらのうちA T P 1 B 1の発現量を測定する工程を含む。細胞から発現量を測定する方法についても、前述の第3の実施の形態と同様である。

[0077] 当該血圧調節条件の評価方法の一例を簡単に説明すると、まず、被験条件下におく前の培養中のD e c 1またはD e c 2 遺伝子改変細胞における、A

ATP1B1の発現量をRT-PCRにより測定しておく。好ましくは、発現量の概日リズムを測定しておく（例えば、特定時間毎の血圧を測定する）。次に、当該遺伝子改変細胞の培養培地を被験条件下におき、その後同様にATP1B1の発現量を測定する。被験条件下におく前後での当該遺伝子改変細胞のATP1B1の発現量を比較し、その変化から当該被験条件が血圧調節条件となるか否か（例えば、低血圧または高血圧となり易いか否か）を評価する。他の例として、被験条件下においたDec1またはDec2遺伝子改変非ヒト動物から直接Dec1またはDec2遺伝子改変細胞を採取し、発現量を測定および比較しても構わない。

[0078] すなわち、この例において、当該遺伝子改変細胞がDec1遺伝子ノックアウト細胞であった場合、ATP1B1の発現量が被験条件下におく前より後の方が減少していれば、当該条件が本態性低血圧の治療または予防となる可能性が高い。また、当該遺伝子改変細胞がDec1遺伝子過剰発現細胞であった場合、ATP1B1の発現量が被験条件下におく前より後の方が増加していれば、当該条件が本態性高血圧の治療または予防となる可能性が高い。

[0079] このように、本第4の実施の形態に係る血圧調節条件の評価方法は、第1の実施の形態に係るDec1またはDec2遺伝子改変非ヒト動物、および、第2の実施の形態に係るDec1またはDec2遺伝子改変細胞を利用し、本態性低血圧または本態性高血圧の予防もしくは治療に有効な条件を評価することができる。

[0080] 前述の第3の実施の形態に係る血圧調節物質の評価方法と同様に、野生型の非ヒト動物または細胞を用いても、血圧調節条件の評価方法を行うことが可能である。野生型の非ヒト動物を被験条件下に置き、被験条件下に置く前と被験条件下に置いた後の、当該非ヒト動物の、DEC1またはDEC2の発現量およびATP1B1の発現量を測定する。DEC1またはDEC2の発現量が増加し、ATP1B1の発現量が減少していれば、当該被験条件は、本態性低血圧の治療条件または予防条件である可能性が高い。逆に、DE

C 1 または D E C 2 の発現量が減少し、A T P 1 B 1 の発現量が増加していれば、当該被験条件は、本態性高血圧の治療条件または予防条件である可能性が高い。野生型の細胞であっても同様である。野生型の細胞を被験条件下に置き、被験条件下に置く前と被験条件下に置いた後の、当該細胞の、D E C 1 または D E C 2 の発現量および A T P 1 B 1 の発現量を測定すればよい。このような方法であっても血圧調節条件の評価をすることができる。

[0081] (血圧の調節方法)

本発明の第 5 の実施の形態は、非ヒト動物内において、D E C 1 または D E C 2、ならびに、一つ以上の他の時計関連因子によって、A T P 1 B 1 遺伝子の転写活性を促進または抑制させる工程を含む血圧の調節方法に関する。

[0082] 具体的に、他の時計関連因子とは、例えば、C L O C K、B M A L 1、C R Y 1、C R Y 2、P E R 1-3、N P A S 2、B M A L 2、R O R α、R O R β、R O R γ、R E V-ERB α、R E V-ERB β等の、当該技術分野において公知である分子時計に関する因子および概日リズムに関連する因子を意味する（特許文献 2 参照）。好ましくは、C L O C K、B M A L 1 および／または C R Y 1 である。

[0083] 当該血圧の調節方法の一例を簡単に説明すると、まず、第 1 の実施の形態において前述したように、非ヒト動物の D e c 1 または D e c 2 遺伝子に機能的な遺伝子改変を持たせる。次に、当該 D e c 1 または D e c 2 遺伝子改変非ヒト動物の C l o c k、B m a l 1 および／または C r y 1 遺伝子において、再度同様に機能的な遺伝子改変を持たせる。このような工程を繰り返すことによって、A T P 1 B 1 遺伝子の転写活性を調節（促進または抑制）することができる。これに伴い、非ヒト動物内において、血圧を調節することができる。なお、このような遺伝子改変の繰り返しを、前述した第 2 の実施の形態の細胞において行うことにより、A T P 1 B 1 の発現量の調節を行うことも可能である。

実施例

[0084] 以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、実施例は本発明を限定するものではない。

[0085] (実施例1)

本実施例1では、抗DEC1抗体を用いたGenome-wide chromatin immunoprecipitation (ChIP)-on-chip assay (以下、ChIP-on-chip)、ならびに、抗DEC1抗体および抗CLOCK抗体を用いたChIP immunoprecipitation (以下、ChIP assay) について詳細に説明する。

[0086] まず、human embryonic kidney cell line (HEK293細胞)において、抗DEC1抗体を用いたChIP-on-chipを行った。これは、DEC1が時計遺伝子の転写調節領域であるE-box (CACGTG) に直接結合できる性質(特許文献2参照)を利用し、血圧制御器官である腎臓において、時計遺伝子が直接制御している遺伝子(時計関連遺伝子)を選定するためである。なお、ChIP-on-chipはクロマチン免疫沈降とDNAマイクロアレイとを一連に行う研究であり、免疫沈降したDNA断片がゲノム上のどの位置に相当するかを網羅的に解析する方法である。

[0087] ChIP-on-chipの解析結果から、可能性が高い107遺伝子について、遺伝子上流のプロモーター領域にE-boxが存在するか検索を行った。その結果、76遺伝子(71%)のプロモーター領域にE-boxが存在した。それらのプロモーター領域のうち、ATP1B1遺伝子上流のプロモーター領域には、ヒト、マウスおよびラット等の複数の種族間で保存されたE-boxが二箇所存在していた。そのことから、本発明者らは、この領域は時計エレメントとして機能している可能性が高いと考えた。

[0088] 次に、DEC1、および同様に時計関連因子であることが既知であるCLOCK(特許文献2参照)について、前述したATP1B1遺伝子上流のプ

ロモーター領域の二箇所のE-boxへの結合を確認するためのChIP assayを行った。

[0089] ChIP assayは、ChIP assay kit (Upstate)を用い、添付のプロトコールに従って行った。ChIP assay用のDNAサンプルは、培養細胞のヒト間葉系幹細胞 (BioWhittaker, Walkersville, MD) より採取した。使用した抗DEC1抗体のアミノ酸配列を、配列番号3に示す。抗CLOCK抗体は、Santa Cruz Biotechnology、カタログno. sc-6927のものを使用した。コントロールとしては、Santa Cruz Biotechnology、カタログno. sc-2027の抗IgG抗体を使用した。

[0090] 採取したDNAサンプルを、ATP1B1遺伝子上流のプロモーター配列にある二箇所のE-box (ATP1B1 E1-boxおよびATP1B1 E2-box) を含むよう、PCR法によって増幅した。コントロールには、Dec1 E-boxを含む様に増幅したDNAサンプルを用いた。それぞれにおいて使用したフォワードおよびリバースプライマーの塩基配列は、ATP1B1 E1-boxについては配列番号4および配列番号5に、ATP1B1 E2-boxについては配列番号6および配列番号7に、Dec1 E-boxについては配列番号8および配列番号9に示す。

[0091] 最後に、得られたPCR産物を、アガロースゲルを用いた電気泳動法によって検出した。図1は、実施例1に係るChIP assayにおけるアガロースゲル電気泳動の結果、ならびに、ATP1B1およびDec1のE-boxを示す図である。図1に示すように、DEC1およびCLOCKは、ATP1B1のプロモーター領域のATP1B1 E1-boxおよびATP1B1 E2-boxに直接結合することが示された。

[0092] (実施例2)

本実施例2では、DEC1、およびCLOCKを含む他の分子時計の関連因子による、ATP1B1プロモーター領域の二箇所のE-boxの転写活

性への影響について詳細に説明する。CLOCK等の他の分子時計、または概日リズムの関連因子の詳細については特許文献2を参照されたい。

[0093] 前述の実施例1においてDEC1およびCLOCKがATP1B1の二箇所のE-boxに直接結合することが示された。そこで、ルシフェラーゼアッセイ (Luciferase assay) によって、これらの二箇所のE-boxが時計エレメントとして機能しているか否かを調べた。具体的には、ATP1B1遺伝子上流のE-box配列を含むレポーターをそれぞれ作成し、分子時計の促進因子であるCLOCK/BMAL1、ならびに抑制因子であるDEC1およびCRY1による転写活性を検討した。

[0094] まず、hATP1B1 E1-boxと、6bpのフランキング配列を3つ横につなげた配列 (配列番号10に示す)、および、hATP1B1 E2-boxと、6bpのフランキング配列を3つ横につなげた配列 (配列番号11に示す) を含むPGL3-TKを作製した。hDec1 E-boxと6bpのフランキング配列を3つ横につなげた配列を含むPGL3-TK、ならびに、Clock、Bmal1、Dec1およびCry1遺伝子の発現ベクターは、「DEC1 modulates the circadian phase of clock gene expression.」 (Nakashima A, Kawamoto T, Honda KK, Ueshima T, Iwata T, Noshiro M, Fujimoto K, Kubo H, Honma S, Yorioka N, Kohn o N, Kato Y, Mol Cell Biol. 28, 4080-4092, 2008) に記載の方法と同様の方法を用いて作成した。

[0095] トランスフェクションの24時間前に、NIH3T3細胞を24well dish当たり 3×10^4 cellsにて播種した。その後、ルシフェラーゼレポータープラスミド (4 ng per well)、マウスClockおよびマウスBmal1の発現ベクター (75 ng per well)、Dec1もしくはCry1発現ベクター (10 ng per well)、または、emptyベクター (10 ng per well (pcDNA

3. 1/Zeo (Promega)) を Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いてトランスフェクションした。内標準として、pRL-SV40 (0.1 ng per well) を同時にトランスフェクションした (トランスフェクションに使用した DNA は、トータル 164.1 ng per well)。

[0096] 4 時間インキュベーションした後培地交換し、48 時間後にデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイシステム (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を計測した。ルシフェラーゼ活性は内標準の活性で補正した。

[0097] 図 2 は、実施例 2 に係るルシフェラーゼアッセイによる相対的ルシフェラーゼ活性の結果を示す図である。図 2 に示すように、ATP1B1 のプロモーター領域にある二箇所の E-box (ATP1B1 E1-box および ATP1B1 E2-box) の転写活性は、Clock+Bmal1 で上昇し、Dec1 または Cry1 によって抑制されていた。すなわち、実施例 1 および実施例 2 の結果から、DEC1 および CLOCK は ATP1B1 のプロモーター領域の二箇所の E-box に直接結合し、DEC1 は転写活性を抑制し、CLOCK は転写活性を促進することが示された。

[0098] (実施例 3)

本実施例 3 では、Dec1 遺伝子ノックアウトマウス (Dec1-/-) における ATP1B1 mRNA の発現量への影響について詳細に説明する。

[0099] Dec1 遺伝子ノックアウトマウスおよび同胞の野生型マウスの胎児線維芽細胞は、14.5 日齢目において採取した。Dec1 遺伝子ノックアウトマウスは、「DEC1 modulates the circadian phase of clock gene expression.」(Nakashima A, Kawamoto T, Honda KK, Ueshima T, Noshiro M, Iwata T, Fujimoto K, Kubo H, Honma S, Yorioka N, Kohno N, Kato Y, Mol Cell Biol. 28、4080-409

2、2008およびEpub、Apr. 14、2008）に記載されている作製方法と同様の方法を用いて作製した。採取したそれぞれの胎児線維芽細胞の3継代目を使用し、コンフルエントになった時点で、それぞれのATP1B1 mRNAを抽出した。Total RNAの抽出にはRNeasy Mini kit (Qiagen) を用いた。定量化RT-PCRにはABI Prism 7900 sequence detection system (Applied Biosystems) を使用した。定量に使用したフォワードおよびリバースプライマーの塩基配列を配列番号12および13に示す。また、プローブには5'-6-carboxyfluorescein (FAM)-TTCCCAGT-6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA)-3' (Mouse Universal Probe Library) を使用した。

[0100] 図3は、実施例3に係るDec1遺伝子ノックアウトマウス胎児線維芽細胞のATP1B1 mRNA発現レベルの結果を示す図である。同胞および同齢の野生型マウス胎児線維芽細胞のmRNA発現レベル(WT)を1.0として、Dec1遺伝子ノックアウトマウス胎児線維芽細胞のmRNA発現レベル(Dec1KO)の相対量を示している。図3に示すように、Dec1遺伝子ノックアウトマウス(Dec1-/-)線維芽細胞は、野生型マウス線維芽細胞よりもATP1B1 mRNAの発現量が有意に高値であった。

[0101] (実施例4)

前述の実施例3の結果から、Dec1遺伝子を過剰発現することによって、ATP1B1 mRNA発現レベルが減少することが示唆される。そこで、本実施例4では、Dec1遺伝子過剰発現細胞におけるATP1B1の発現への影響について詳細に説明する。

[0102] まず、ヒト大動脈平滑筋細胞(Cambrex Bio Science Walkersville Inc.)を6well dishに2×10⁵ cells/wellにて播種し、24時間後にアデノウイルスを用い

てDec1過剰発現を行った。コントロールにはLacZを過剰発現させたアデノウイルスを用いた（「DEC1 modulates the circadian phase of clock gene expression.」、Nakashima A, Kawamoto T, Honda KK, Ueshima T, Iwata T, Noshiro M, Fujimoto K, Kubo H, Honma S, Yorioka N, Kohno N, Kato Y、Mol Cell Biol. 28、4080-4092、2008参照）。

[0103] その後、培地交換を行い、24時間後にRNAを採取した。Total RNAの抽出には、RNeasy Mini kit (Qiagen) を用いた。また、定量化PCRには、ABI Prism 7900 sequence detection system (Applied Biosystems) を使用した。定量に使用したフォワードおよびリバースプライマーの塩基配列を配列番号14および15に示す。また、プローブには5'-6-carboxyfluorescein (FAM) -CTGGCTGG-6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) -3' (Human Universal Probe Library) を使用した。その結果、やはり、LacZ過剰発現ヒト大動脈平滑筋細胞のATP1B1 mRNA発現レベルと比較して、ATP1B1 mRNA発現レベルは減少していた。

[0104] 図4は、実施例4に係るDec1アデノウイルスのMOI依存性によるATP1B1 mRNA発現レベルの結果を示す図である。MOI (multiplicity of infection: 細胞1個に感染するウイルスの数) が0である時のATP1B1 mRNAの発現レベルを100とし、Dec1過剰発現ヒト大動脈平滑筋細胞のMOI依存性を示している。ATP1B1 mRNA発現レベルは、図4に示すように、Dec1アデノウイルスのMOIに依存し減少していた。

[0105] (実施例5)

本実施例5では、Dec1遺伝子ノックアウトマウス (Dec1^{-/-}) の腎臓における経時的なATP1B1 mRNAの発現量 (すなわち、Na⁺/K⁺-ATPase mRNAの発現量の示唆) について詳細に説明する。

[0106] 12時間明および12時間暗の明暗条件下で飼育したDec1遺伝子ノックアウトマウスおよび同胞かつ同齢の野生型マウスの腎臓を、6時間ごとにサンプリングした (n=3)。Total RNAの抽出および定量化RT-PCRについては、実施例3において前述した方法と同様の方法を用いて行った。mATP1B1 mRNAの定量に使用したフォワードおよびリバースプライマーの塩基配列、ならびにプローブについても同様である。

[0107] 図5は、実施例5に係る野生型マウスおよびDec1遺伝子ノックアウトマウスの腎臓でのATP1B1 mRNA発現レベルの概日リズムの結果を示す図である。同胞、かつ同齢の野生型マウスの24ZT (Zeitgeber time: ツァイトゲバー時刻、明暗サイクルの1周期を24ZTとする) でのATP1B1 mRNAの発現量を1として示している。

[0108] さらに、免疫組織染色においても腎臓でのATP1B1の概日リズムが見られるか否か、および発現量の変化が見られるか否かを調べた。まず、前述した条件と同条件において飼育し、サンプリングしたDec1遺伝子ノックアウトマウスおよび野生型マウスの腎臓を、4%パラホルムアルデヒドに4時間浸透させた。その後、パラフィン処理し、4μmにスライスした。次に、切片をキシレンおよびアルコールを用いて脱パラフィン化した。免疫染色性を高めるため、0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0、Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, CA, USA) に浸し、電子レンジ (500W) で5分間ずつ2回加熱した。

[0109] 加熱後PBS (pH7.6) で洗浄し、15分間0.3%のH₂O₂に浸した。その後、PBSで洗浄し、biotin blocking system (Dako Japan, Inc., Tokyo, Japan) を用いてビオチン活性をブロックした。さらに、PBSで洗浄した後、4000倍

に希釈した抗ATP1B1ラビットポリクローナル抗体 (Aviva System Biology Inc.) を使用し、4℃で24時間インキュベートした。その後、0.075%のブリッジ35を含有したPBS溶液で30分間洗浄した後、avidin-biotin-peroxidase complex kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) を用いてラビットIgGを発色させた。図6は、実施例5に係る野生型マウスおよびDec1遺伝子ノックアウトマウスの腎臓でのATP1B1免疫染色の概日リズムの結果を示す図である。

[0110] 図5に示すように、野生型マウスの腎臓では、ATP1B1 mRNA (すなわち、 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ mRNAの発現量の示唆) の発現量は24時間のリズム形成を示した。一方、Dec1遺伝子ノックアウトマウスの腎臓では、24時間のリズム形成は保たれていたが、ATP1B1 mRNA ($\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ mRNA) の発現量は上昇していた。図6に示すように、免疫染色においても同様にATP1B1 mRNA ($\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ mRNA) の発現量は日内変動を認め、DEC1遺伝子ノックアウトマウスではATP1B1 mRNA ($\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ mRNA) の発現量は上昇していた。

[0111] (実施例6)

血圧は、(心拍出数) × (末梢血管抵抗) で示される。そこで、本実施例6では、Dec1遺伝子ノックアウトマウス (Dec1^{-/-}) の大動脈および心臓における経時的なATP1B1 mRNAの発現量 (すなわち、 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ mRNAの発現量の示唆) について詳細に説明する。

[0112] 実験方法等については前述した実施例5と同様であるが、本実施例6ではマウスの大動脈および心臓をサンプリングした。図7は、実施例6に係る野生型マウスおよびDec1遺伝子ノックアウトマウスの大動脈でのATP1B1 mRNA発現レベルの概日リズムの結果を示す図である。図7では、

同胞、かつ同齡の野生型マウスの24 Z TでのA T P 1 B 1 m R N Aの発現量を1として示されている。図8は、実施例6に係る野生型マウスおよびD e c 1 遺伝子ノックアウトマウスの大動脈でのA T P 1 B 1 免疫染色の概日リズムの結果を示す図である。このように、大動脈においても前述の実施例5の腎臓と類似したA T P 1 B 1 m R N A、およびA T P 1 B 1 の免疫染色の経時的な日内変動が観察された。

[0113] 図9は、実施例6に係る野生型マウスおよびD e c 1 遺伝子ノックアウトマウスの心臓でのA T P 1 B 1 m R N A 発現レベルの概日リズムの結果を示す図である。図9では、同胞、かつ同齡の野生型マウスの24 Z TでのA T P 1 B 1 m R N A の発現量を1として示されている。やはり、心臓においても前述の腎臓および大動脈と類似したA T P 1 B 1 m R N A の経時的な日内変動が観察された。

[0114] (実施例7)

本実施例7では、D e c 1 遺伝子ノックアウトマウス (D e c 1 -/-) および同胞の野生型マウスの24時間血圧測定について詳細に説明する。

[0115] 前述の実施例5および実施例6と同様の方法で飼育したD e c 1 遺伝子ノックアウトマウス、および、野生型マウスについて、マウス非観血的血圧測定装置B P - 9 8 を用い、2時間毎に血圧 (収縮期血圧および拡張期血圧) を測定した (いずれも n = 1 0) 。

[0116] 図10は、実施例7に係る野生型マウスおよびD e c 1 遺伝子ノックアウトマウスの収縮期血圧概日リズム結果を示す図である。図11は、実施例7に係る野生型マウスおよびD e c 1 遺伝子ノックアウトマウスの拡張期血圧概日リズム結果を示す図である。図10および図11に示すように、野生型マウスの24時間の血圧は概日リズムを有し、夜間にピークを認めた。D e c 1 遺伝子ノックアウトマウスでも、24時間のリズム形成は保たれていたが、野生型マウスと比較し有意な血圧の低下を認めた。特に、D e c 1 遺伝子ノックアウトマウスでは、マウスが就寝する日中に血圧の低下が大きかった。

- [0117] これらの実施例の結果から、DEC1のATP1B1の発現抑制、すなわち $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ の発現抑制機能が示された。また、Dec1遺伝子ノックアウトマウスでの概日リズムを有する血圧低下も解明された。特に、就寝時（休息期）における過度な血圧低下が観察され、収縮期血圧、拡張期血圧および平均血圧のいずれもが顕著に低下することも示された。
- [0118] また、マウスだけでなく他の哺乳動物のヒト等においても、Dec1遺伝子に機能的な遺伝子変異を有する場合、低血圧または高血圧となることが十分に示唆される。例えば、ヒト低血圧症の場合、起床時や午前中のめまい、立ちくらみ、頭痛または全身倦怠感等の症状がでる。これに対し、低血圧治療薬（アメジウムメチル硫酸塩等）が処方される。ヒトにおいて早朝（休息期後半）に症状が出るということは、Dec1遺伝子ノックアウトマウスの血圧が日中（休息期）に過度に低下することと一致する。つまり、Dec1遺伝子ノックアウトマウスはヒト本態性低血圧と類似しており、当該Dec1遺伝子ノックアウトマウスを利用することでヒト本態性低血圧の治療等に利用可能であることが示唆される。
- [0119] さらに、Dec1遺伝子およびDec2遺伝子には異なる作用もあるが、E-boxを仲介する時計遺伝子としての作用は共通であり、類似している点も多い（特許文献1および特許文献2参照）。従って、Dec2遺伝子ノックアウトマウスも血圧低下等が観察されることは、十分に予想できる。またドミナント活性型Dec2遺伝子変異のヒト家系では、睡眠時間が短く早朝に起床することから（「The transcriptional repressor DEC2 regulates sleep length in mammals.」、He Y, Jones CR, Fujiki N, Xu Y, Guo B, Holder JL Jr, Rossner MJ, Nishino S, Fu YH、Science 2009 Aug. 14、325（5942）、866-870参照）、Dec2遺伝子も血圧の概日リズム異常に関連があることが示唆される。これは、血圧は通常起床後上がるためである。

[0120] さらに、本発明に係るDEC1またはDEC2単独の場合だけではなく、特許文献2に記載されているような、その他の時計関連因子（CLOCK、BMAL1またはCRY1等）と組み合わせ、血圧を調節する方法も可能であることも示唆される。これは、実施例2において、ATP1B1のプロモーター領域にある二箇所のE-boxの転写活性は、Clock+Bmal1で上昇し、Dec1またはCry1によって抑制されるという結果が示されているためである。特に、CLOCKについては、実施例1および実施例2において、ATP1B1のプロモーター領域のE-boxに直接結合し、その転写活性を促進することが新たに解明された。そのため、本発明に係るDec1遺伝子改変非ヒト動物等と同様の新規な発明が期待される。

[0121] 本発明は、上記発明の実施の形態および実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

[0122] 本明細書の中で明示した論文および公開特許公報等の内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

[0123] 本出願は、2010年10月21日に出願された日本国特許出願2010-236891号に基づく。本明細書中に、日本国特許出願2010-236891号の、明細書、特許請求の範囲、図面全体を参照として取り込むものとする。

産業上の利用可能性

[0124] 本発明者らは、DEC1が、高血圧に関連する $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ の小型サブユニットの $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}\beta 1$ （ATP1B1）の発現を抑制する転写因子であり、血圧制御器官（心臓、血管および腎臓等）においてATP1B1の発現を抑制することで血圧を上昇させることを解明した。さらに、Dec1遺伝子ノックアウトマウスでは、野生型マウスと比較して、概日リズムを保った状態で特に休息期において血圧が低下する（低血圧となる）ことも解明した。

[0125] そこで、本発明に係るDec1遺伝子およびDec2遺伝子改変非ヒト動

物および細胞によれば、血圧調節物質の評価・スクリーニング、血圧調節条件の評価または血圧の調節に利用することができる。さらに、本態性低血圧および本態性高血圧の診断方法、治療方法、診断薬もしくは治療薬の開発、または、現在処方されている治療薬もしくは今後開発される治療薬の作用機序の解明にも繋がる。また、治療に影響する食事、生活習慣または環境の研究にも利用することができる。

請求の範囲

- [請求項1] D e c 1 遺伝子またはD e c 2 遺伝子に機能的な遺伝子改変を有し、かつA T P 1 B 1 の発現量が増加または減少していることを特徴とする、非ヒト動物。
- [請求項2] 前記非ヒト動物は、低血圧または高血圧であることを特徴とする、請求項1に記載の非ヒト動物。
- [請求項3] 前記非ヒト動物は、D e c 1 遺伝子ノックアウト動物またはD e c 2 遺伝子ノックアウト動物であり、前記A T P 1 B 1 の発現量が増加していることを特徴とする、請求項1に記載の非ヒト動物。
- [請求項4] 前記非ヒト動物は、D e c 1 遺伝子過剰発現動物またはD e c 2 遺伝子過剰発現動物であり、前記A T P 1 B 1 の発現量が減少していることを特徴とする、請求項1に記載の非ヒト動物。
- [請求項5] 前記非ヒト動物は、マウスまたはラットであることを特徴とする、請求項1に記載の非ヒト動物。
- [請求項6] D e c 1 遺伝子またはD e c 2 遺伝子に機能的な遺伝子改変を有し、かつA T P 1 B 1 の発現量が増加または減少していることを特徴とする、細胞。
- [請求項7] 前記細胞は、D e c 1 遺伝子ノックアウト細胞またはD e c 2 遺伝子ノックアウト細胞であり、前記A T P 1 B 1 の発現量が増加していることを特徴とする、請求項6に記載の細胞。
- [請求項8] 前記細胞は、D e c 1 遺伝子過剰発現細胞またはD e c 2 遺伝子過剰発現細胞であり、前記A T P 1 B 1 の発現量が減少していることを特徴とする、請求項6に記載の細胞。
- [請求項9] 前記細胞は、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞、腎臓尿細管細胞または心筋細胞のいずれかであることを特徴とする、請求項6に記載の細胞。
- [請求項10] D e c 1 遺伝子またはD e c 2 遺伝子に機能的な遺伝子改変を有し、かつA T P 1 B 1 の発現量が増加または減少している非ヒト動物に

、被験物質を投与する工程を含むことを特徴とする、血圧調節物質の評価方法。

[請求項11] 前記非ヒト動物の血圧を測定する工程を含むことを特徴とする、請求項10に記載の血圧調節物質の評価方法。

[請求項12] D e c 1 遺伝子またはD e c 2 遺伝子に機能的な遺伝子改変を有し、かつA T P 1 B 1 の発現量が増加または減少している細胞に、被験物質を接触させる工程を含むことを特徴とする、血圧調節物質の評価方法。

[請求項13] A T P 1 B 1 の発現量を測定する工程を含むことを特徴とする、請求項10ないし12のいずれか1項に記載の血圧調節物質の評価方法。

[請求項14] 野生型の非ヒト動物に被験物質を投与する工程と、
前記被験物質の投与前と投与後の、前記野生型の非ヒト動物の、D E C 1 またはD E C 2 の発現量およびA T P 1 B 1 の発現量を測定する工程と、
を含むことを特徴とする、血圧調節物質の評価方法。

[請求項15] 野生型の細胞に被験物質を接触させる工程と、
前記被験物質の接触前と接触後の、前記野生型の細胞の、D E C 1 またはD E C 2 の発現量およびA T P 1 B 1 の発現量を測定する工程と、
を含むことを特徴とする、血圧調節物質の評価方法。

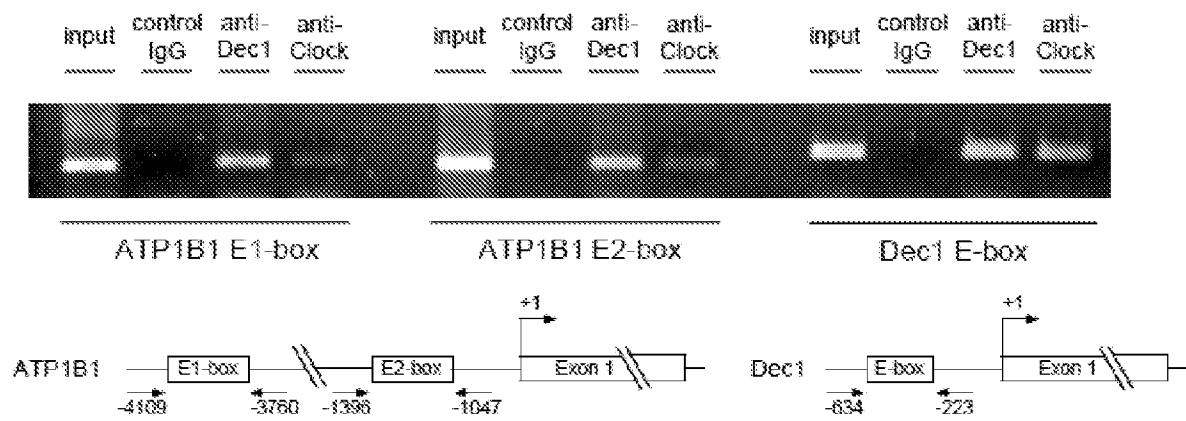
[請求項16] 野生型の非ヒト動物、または、D e c 1 遺伝子またはD e c 2 遺伝子に機能的な遺伝子改変を有し、かつA T P 1 B 1 の発現量が増加または減少している非ヒト動物、あるいは、野生型の細胞、または、D e c 1 遺伝子またはD e c 2 遺伝子に機能的な遺伝子改変を有し、かつA T P 1 B 1 の発現量が増加または減少している細胞を、被験条件下におく工程を含むことを特徴とする、血圧調節条件の評価方法。

[請求項17] 遺伝子改変、または野生型の非ヒト動物内において、D E C 1 また

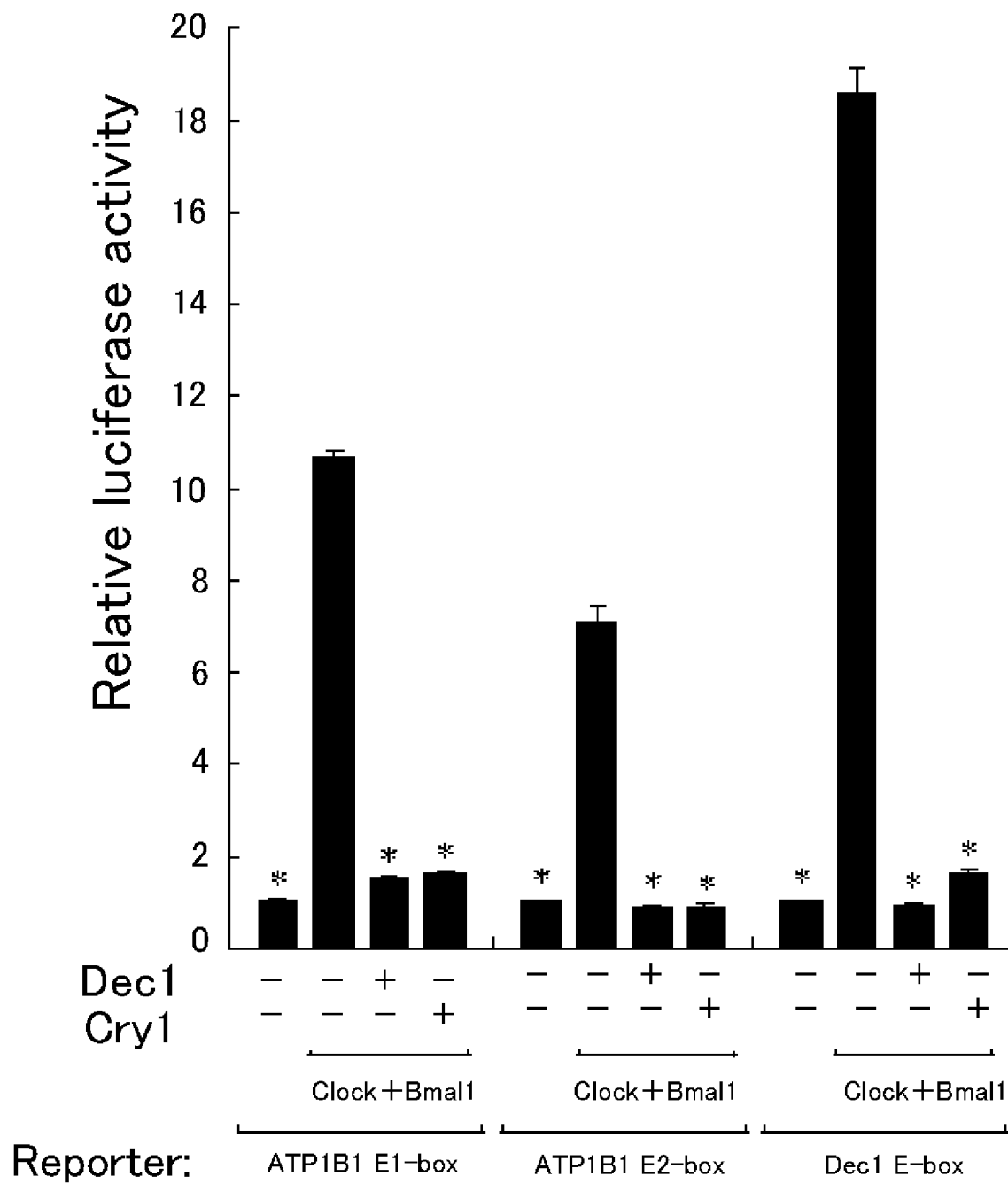
はDEC2、ならびに、CLOCK、BMAL1、CRY1およびその他の時計転写因子のうちの少なくとも一つによって、ATP1B1遺伝子の転写活性を促進または抑制させる工程を含むことを特徴とする、血圧の調節方法。

[請求項18] 前記その他の時計転写因子は、CRY2、PER1-3、NPAS2、BMAL2、ROR α 、ROR β 、ROR γ 、REV-ERB α もしくはREV-ERB β 、または、これらの組み合わせであることを特徴とする、請求項17に記載の血圧の調節方法。

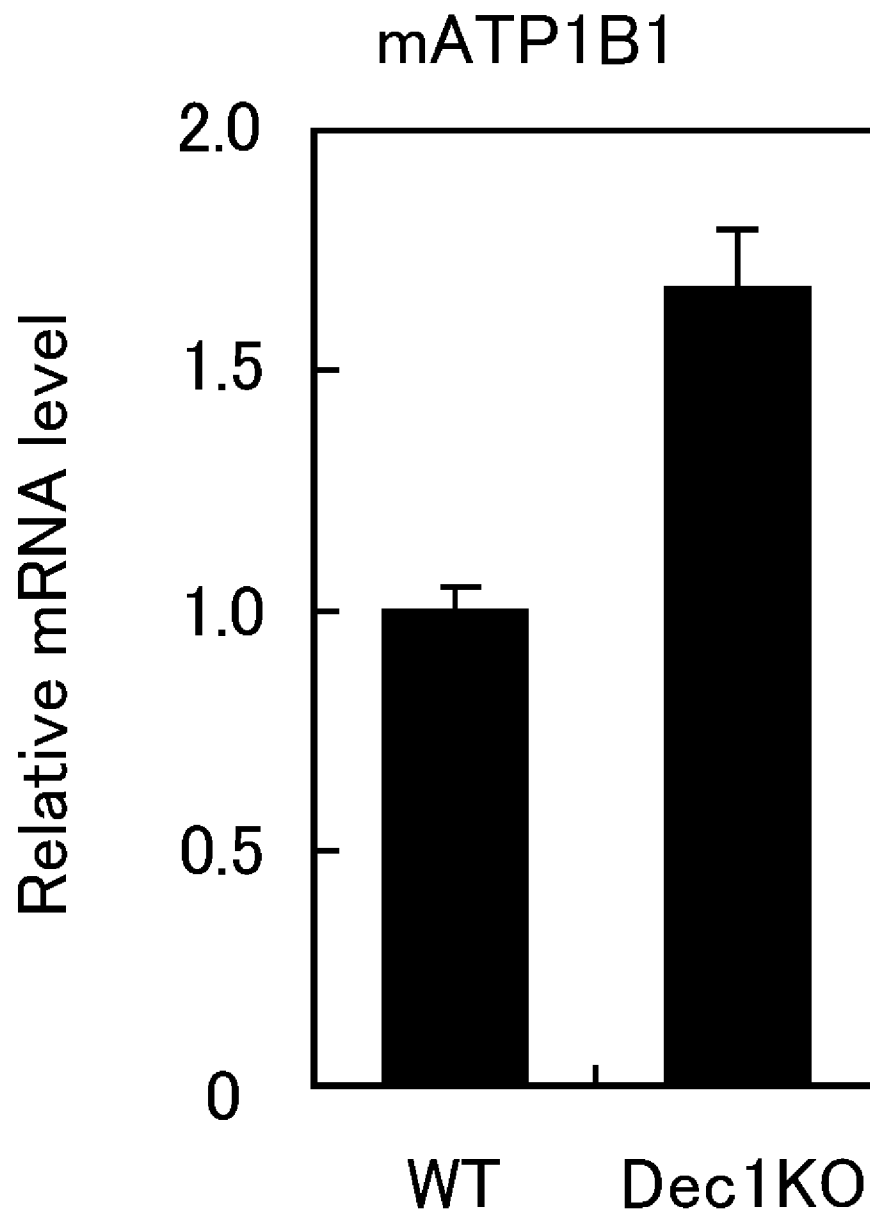
[図1]



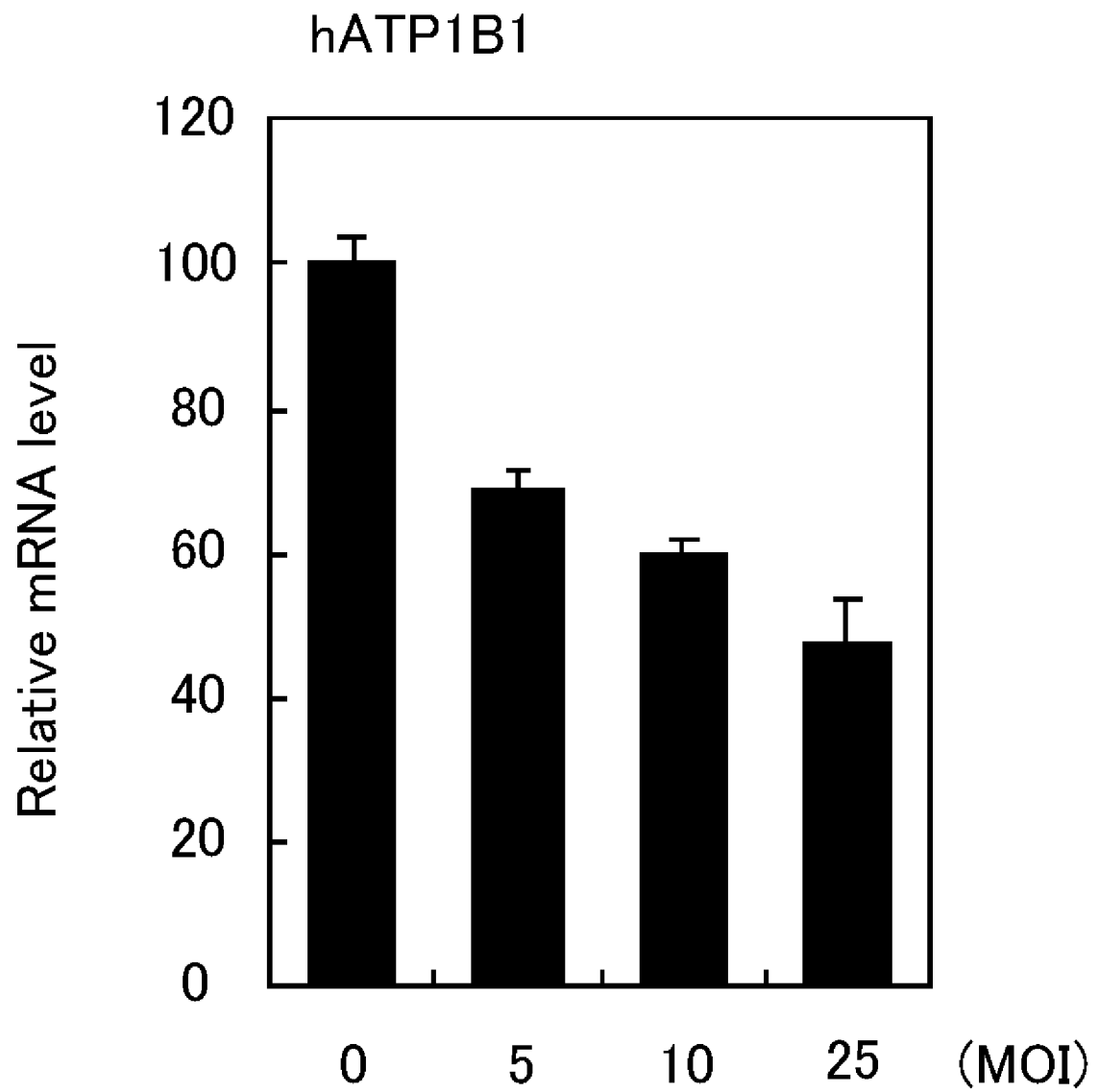
[図2]



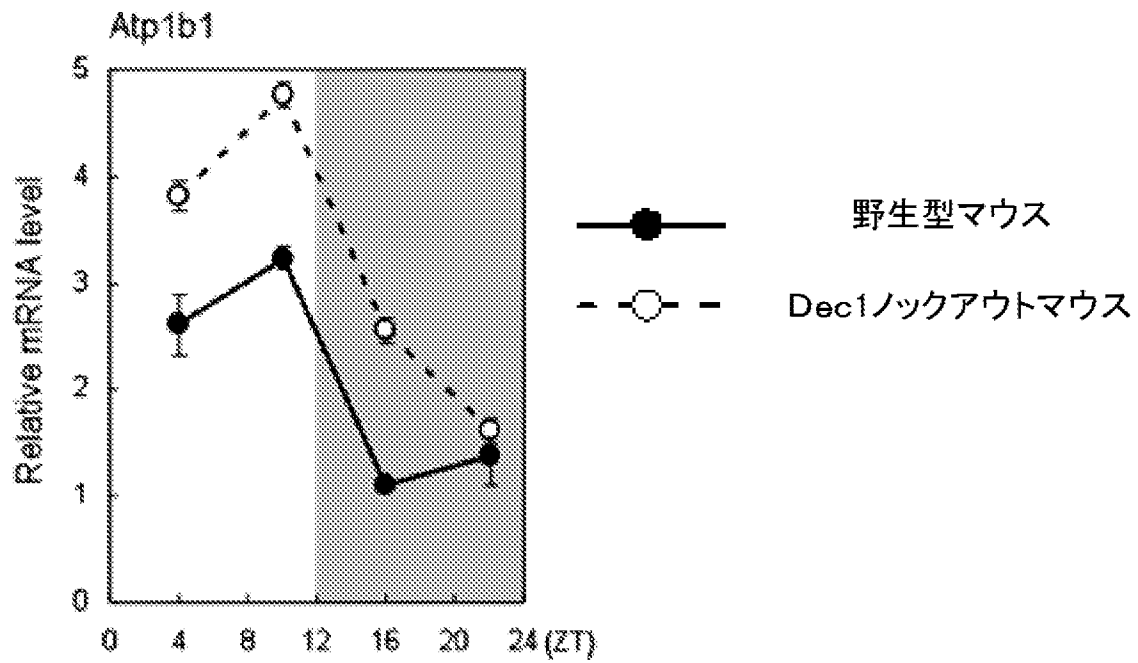
[図3]



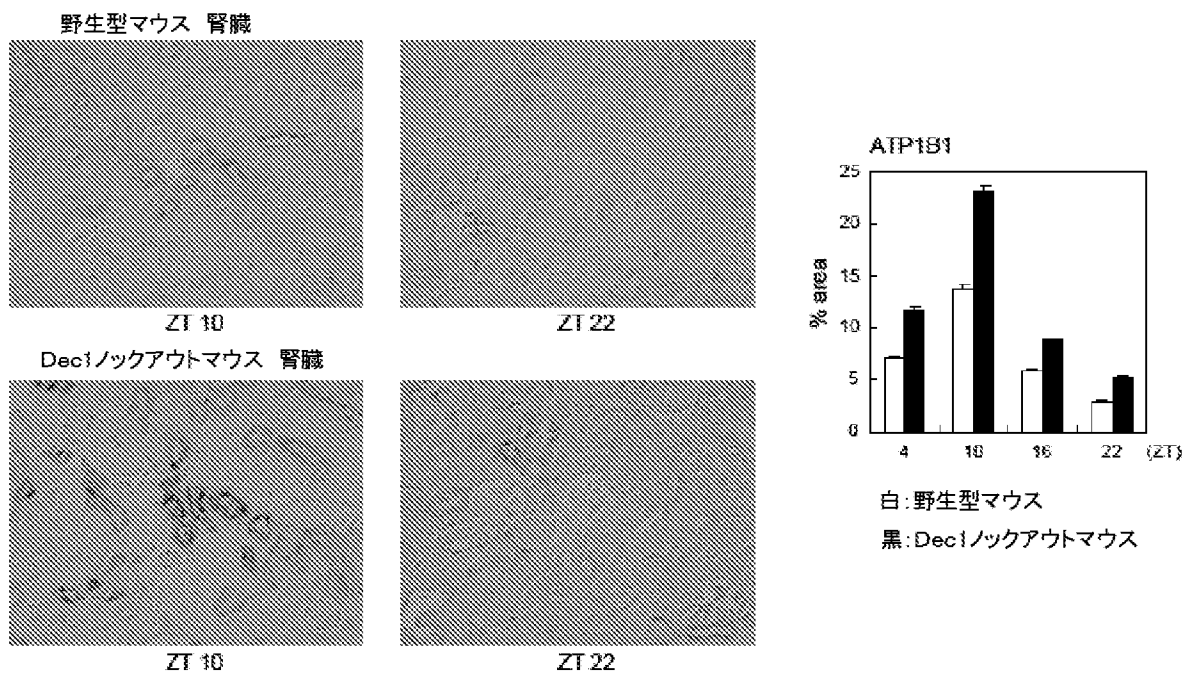
[図4]



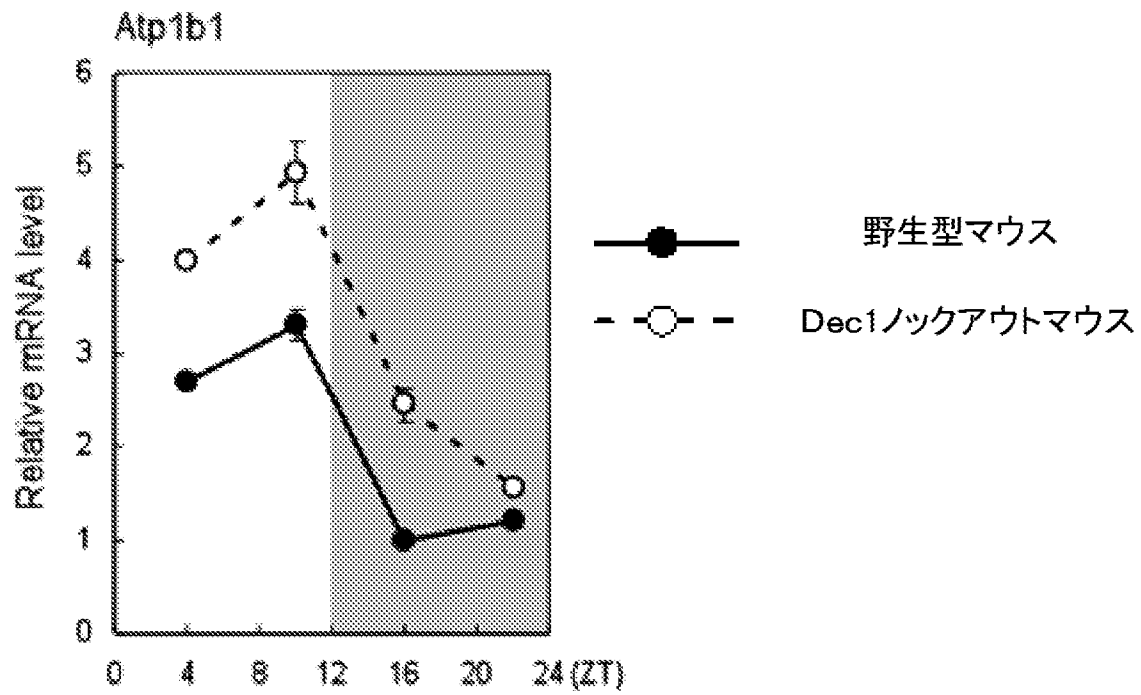
[図5]



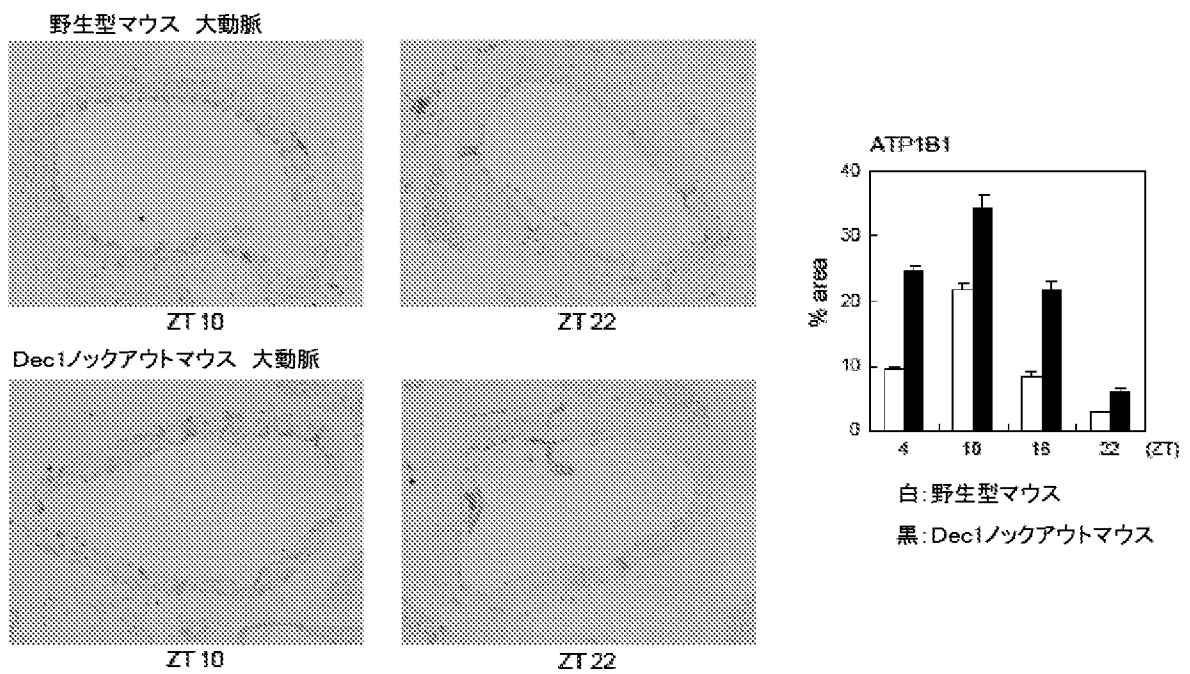
[図6]



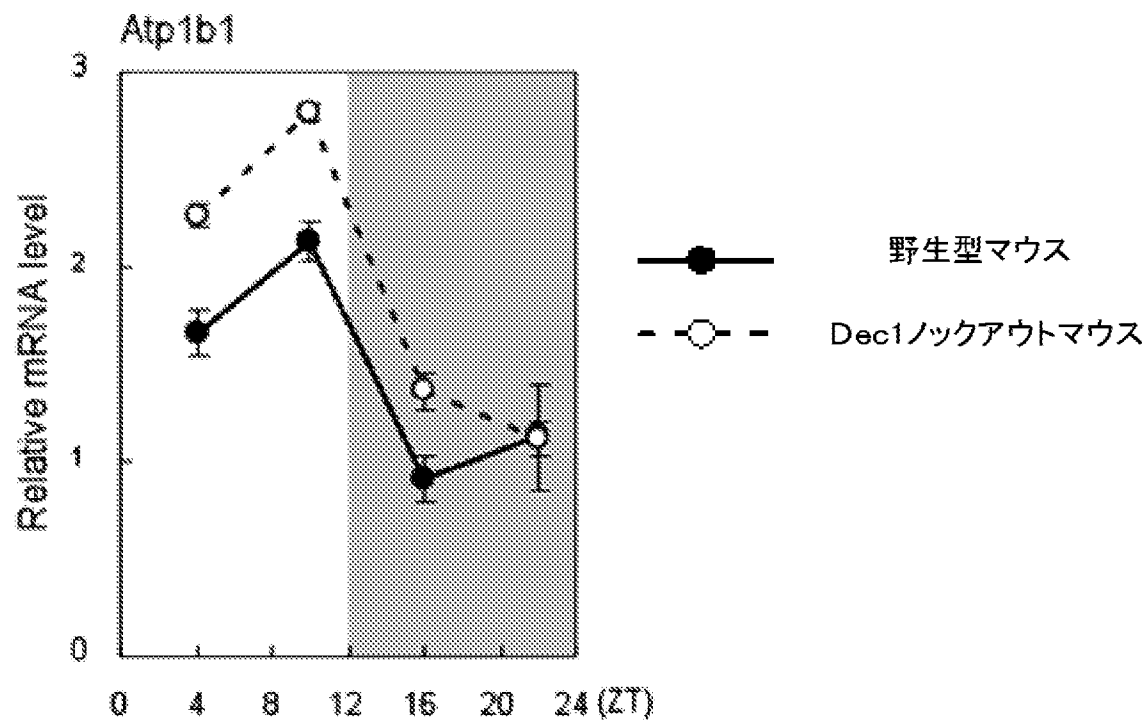
[図7]



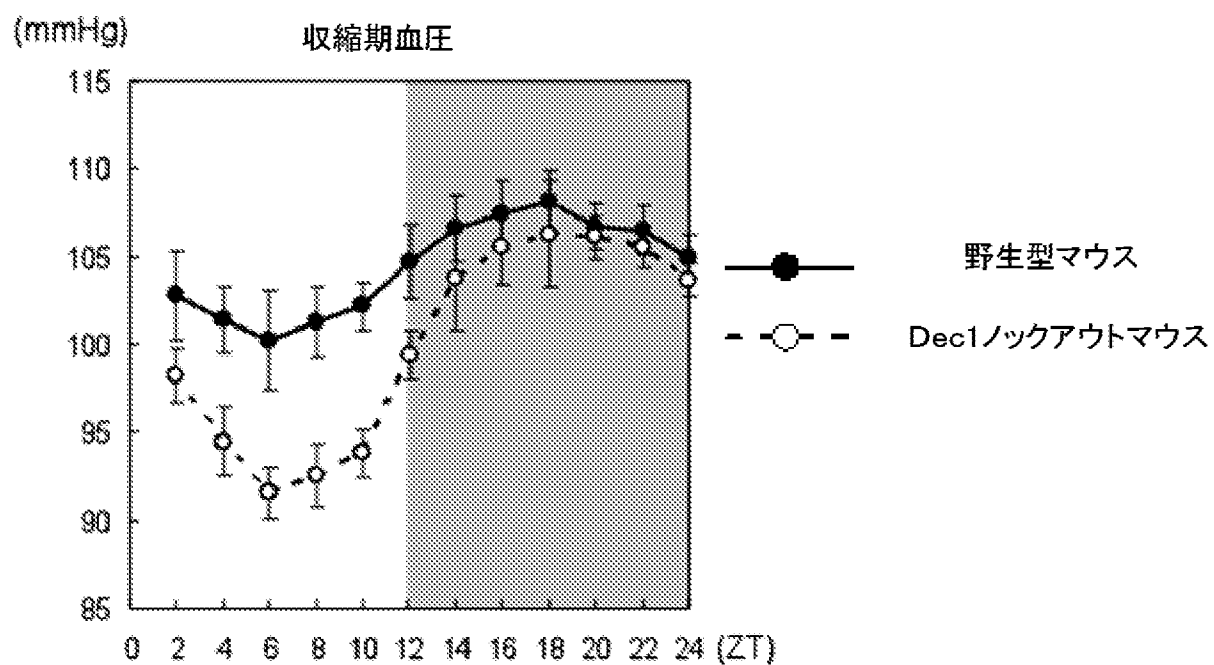
[図8]



[図9]



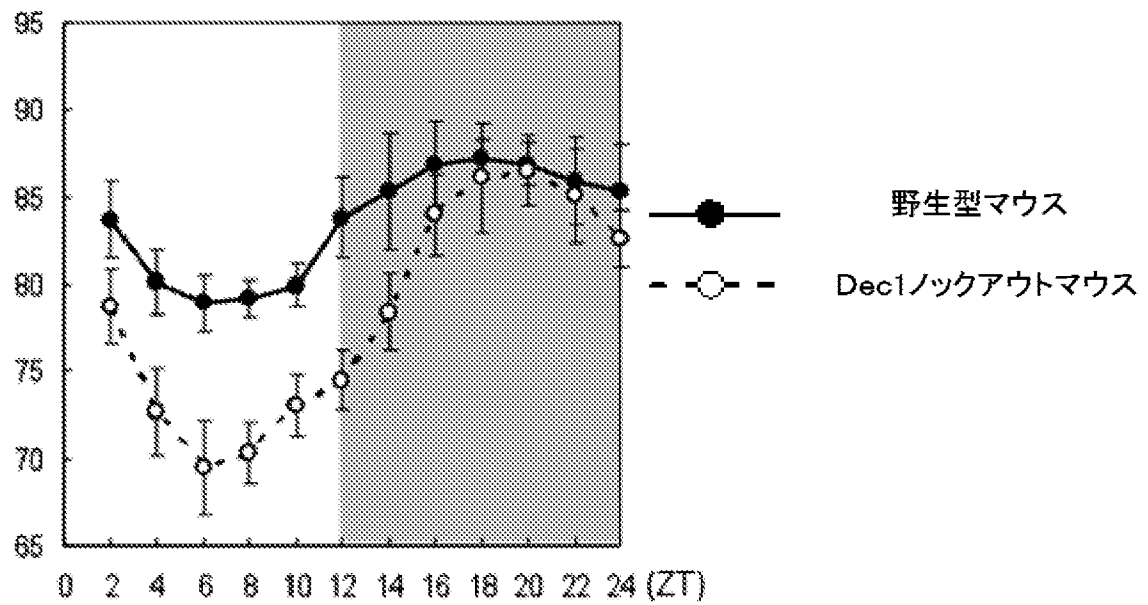
[図10]



[図11]

(mmHg)

拡張期血圧



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/074228

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01K67/027(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P9/12(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N1/00-7/08, A01K67/027, A61K38/00-48/00, A61P9/00-9/12, C12Q1/68, G01N33/00-33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), GenBank/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2009-11167 A (Hiroshima University), 22 January 2009 (22.01.2009), (Family: none)	1-3, 5-7, 9/ 17, 18
X/Y	SEIMIYA, M., et al., "Impaired lymphocyte development and function in Clast5/Stral3/ DEC1-transgenic mice" Eur.J.Immunol., 2004, Vol.34, p.1322-1332	1, 2, 4-6, 8, 9/ 17, 18
Y	Ken KAWAMOTO et al., "bHLH-gata Ten Inshi DEC1 Knockout Mouse ni Okeru Kodo Oyobi Idenshi Hatsugen no Gaijitsu Rhythm Kaiseki", Dai 26 Kai The Annual Meeting of the Japanese Society for Bone and Mineral Research: Program & Abstracts, 29 October 2008 (29.10.2008), page 235, P2-15	17, 18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 December, 2011 (12.12.11)

Date of mailing of the international search report

20 December, 2011 (20.12.11)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/074228

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Yukio KATO, "Shinki Enkisei Helix-Loop-Helix Tensha Inshi DEC1/DEC2 no Kino Domain no Kettei to Chusu Tokei Oyobi Massho Tokei ni Okeru DEC1/DEC2 no Yakuwari", Research Reports of Uehara Memorial Foundation, 26 December 2005 (26.12.2005), vol.19, pages 157 to 160	17,18
Y	ISHIDA, T., et al., "DEC1, a member of the fifth clock-gene family, is induced by Angiotensin II, growth factors, and hypoxia in vascular cells" Circulation, 2006, Vol.114, Abstract745	17,18
Y	TAKEDA, N. & Maemura, K. "Cardiovascular disease, chronopharmacotherapy, and molecular clock" Adv.Drug Delivery Reviews, 2010.05.06, Vol.62, p.956-966	17,18
A	XIAO, B., et al., "Association of ATP1B1 single-nucleotide polymorphisms with blood pressure and hypertension in a Chinese population" Clin.Chim.Acta, 2009, Vol.407, p. 47-50	1-18
A	TAUB, M., et al., "Targeting of renal proximal tubule Na, K-ATPase by salt-inducible kinase" Biochem.Biophys.Res.Comm., 2010.02.10, Vol. 393, p.339-344	1-18
A	TREMBLAY, A.T., et al., "Physiological genomics identifies estrogen-related receptor α as a regulator of renal sodium and potassium homeostasis and the rennin-angiotensin pathway" Mol.Endocrinol., 2009.11.09, Vol.24, No.1, p. 22-32	1-18
A	Yukio KATO, "Shinki Tensha Inshi DEC1 to DEC2 no Kozo to Kino Oyobi Nankotsu deno Yakuwari", Orthopaedic Surgery and Traumatology, 01 September 2002 (01.09.2002), vol.45, no.10, pages 956 to 957	1-18
A	NOSHIRO, M., et al., "Rhythmic expression of DEC1 and DEC2 in peripheral tissues: DEC2 is a potent suppressor for hepatic cytochrome P450s opposing DBP" Genes to Cells, 2004, Vol.9, p. 317-329	1-18

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A01K67/027(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P9/12(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N 1/00 - 7/08, A01K67/027, A61K38/00 - 48/00, A61P9/00 - 9/12, C12Q1/68, G01N33/00 - 33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 1 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 1 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 1 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)
 BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)
 GenBank/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y	JP 2009-11167 A (国立大学法人広島大学) 2009.01.22, (ファミリーなし)	1-3, 5-7, 9/17, 18
X/Y	SEIMIYA, M., et al., "Impaired lymphocyte development and function in Clast5/Stral3/DEC1-transgenic mice" Eur. J. Immunol., 2004, Vol. 34, p. 1322-1332	1, 2, 4-6, 8, 9/17, 18
Y	河本健 他 「bHLH 型転因子 DEC1 ノックアウトマウスにおける行動および遺伝子発現の概日リズム解析」 第 26 回日本骨代謝学会学術	17, 18

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 2 . 1 2 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

2 0 . 1 2 . 2 0 1 1

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

水落 登希子

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

3 5 4 1

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
	集会プログラム抄録集, 2008.10.29, p.235, P2-15	
Y	加藤幸夫 「新規塩基性ヘリックスルーパーヘリックス転写因子 DEC1/DEC2 の機能ドメインの決定と中枢時計および末梢時計における DEC1/DEC2 の役割」 上原記念生命科学財団研究報告集, 2005.12.26, Vol.19, p.157-160	17, 18
Y	ISHIDA, T., et al., "DEC1, a member of the fifth clock-gene family, is induced by Angiotensin II, growth factors, and hypoxia in vascular cells" Circulation, 2006, Vol.114, Abstract745	17, 18
Y	TAKEDA, N. & Maemura, K. "Cardiovascular disease, chronopharmacotherapy, and molecular clock" Adv. Drug Delivery Reviews, 2010.05.06, Vol.62, p.956-966	17, 18
A	XIAO, B., et al., "Association of ATP1B1 single-nucleotide polymorphisms with blood pressure and hypertension in a Chinese population" Clin. Chim. Acta, 2009, Vol.407, p.47-50	1-18
A	TAUB, M., et al., "Targeting of renal proximal tubule Na, K-ATPase by salt-inducible kinase" Biochem. Biophys. Res. Commun., 2010.02.10, Vol.393, p.339-344	1-18
A	TREMBLAY, A. T., et al., "Physiological genomics identifies estrogen-related receptor α as a regulator of renal sodium and potassium homeostasis and the rennin-angiotensin pathway" Mol. Endocrinol., 2009.11.09, Vol.24, No.1, p.22-32	1-18
A	加藤幸夫 「新規転写因子 DEC1 と DEC2 の構造と機能及び軟骨での役割」 整形・災害外科, 2002.09.01, Vol.45, No.10, p.956-957	1-18
A	NOSHIRO, M., et al., "Rhythmic expression of DEC1 and DEC2 in peripheral tissues: DEC2 is a potent suppressor for hepatic cytochrome P450s opposing DBP" Genes to Cells, 2004, Vol.9, p.317-329	1-18