

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6095889号
(P6095889)

(45) 発行日 平成29年3月15日(2017.3.15)

(24) 登録日 平成29年2月24日(2017.2.24)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/09	(2006.01)
A 61 K 31/7105	(2006.01)
A 61 K 45/00	(2006.01)
A 61 K 48/00	(2006.01)
A 61 P 3/10	(2006.01)
C 12 N	15/00
C 12 N	15/00
A 61 K	31/7105
A 61 K	45/00
A 61 K	48/00

請求項の数 7 (全 50 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-509791 (P2011-509791)
(86) (22) 出願日	平成21年5月18日 (2009.5.18)
(65) 公表番号	特表2011-523552 (P2011-523552A)
(43) 公表日	平成23年8月18日 (2011.8.18)
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/044356
(87) 国際公開番号	W02009/140679
(87) 国際公開日	平成21年11月19日 (2009.11.19)
審査請求日	平成24年5月17日 (2012.5.17)
審判番号	不服2015-8880 (P2015-8880/J1)
審判請求日	平成27年5月13日 (2015.5.13)
(31) 優先権主張番号	61/054,040
(32) 優先日	平成20年5月16日 (2008.5.16)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	301040958 ザ・チルドレン・ホスピタル・オブ・フィラデルフィア THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA アメリカ合衆国、ピーラー 19104、 フィラデルフィア、シビック センター ブルバード 3401
(74) 代理人	100104411 弁理士 矢口 太郎
(72) 発明者	ハコナルソン、ハコン アメリカ合衆国、19355 ペンシルベニア州、マルバーン、1877 カバード ブリッジ ロード

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】染色体21q、6q、および15qの遺伝子変異およびこれらを使用して1型糖尿病を診断および治療する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

1型糖尿病(T1D)の発症に対する感受性を評価するために患者から単離されたUBASH3A、GLIS3、RASGRP1、EDG7、またはBACH2をコードする核酸における少なくとも1つの一塩基多型(SNP)の有無を検出するための方法であって、前記方法は、

a) 患者サンプルからの標的核酸を提供する工程であって、前記標的核酸は正常集団における所定配列を有しているものである、前記提供する工程；及び、

b) T1D発症の感受性の増加或いは減少を示すSNPの存在を前記標的核酸で評価する工程、

を有し、前記SNPは、

1. 2.5×10^{-6} の有意に関連するP値を有するBACH2遺伝子内のrs3757247、

2. 3.3×10^{-8} の有意に関連するP値を有するUBASH3A遺伝子内のrs9976767、

2. 6.4×10^{-6} の有意に関連するP値を有するGLIS3遺伝子内のrs10758593、

3. 5.1×10^{-5} の有意に関連するP値を有するGLIS3遺伝子内のrs10758594、

1. 8.7×10^{-6} の有意に関連するP値を有するEDG7遺伝子内のrs198385

10

20

3、及び

3.92×10^{-6} の有意に関連する P 値を有する R A S G R P 1 遺伝子内の r s 8 0 3
5 9 5 7

の少なくとも 1 つを有するものである、方法。

【請求項 2】

請求項 1 の方法において、前記標的核酸は、サイズ解析、アレル特異的プローブのハイブリダイゼーション、アレル - 特異的プライマー伸展、オリゴマーライゲーション、D N A シークエンス、一本鎖高次構造多型分析、及び定量的 P C R から成る群から選択された方法を介して遺伝子変異を評価されるものである、方法。

【請求項 3】

請求項 1 の方法であって、さらに、表 1、2、4 及び 5 に記載された 1 若しくはそれ以上の S N P を検出する、方法。

【請求項 4】

請求項 1 の方法において、前記 S N P は、表 3 に記載された連鎖不均衡ブロックに存在するものである、方法。

【請求項 5】

請求項 1 の方法であって、さらに、15 番染色体上の R A S G R P 1 遺伝子内の 3 6 6
9 4 3 3 3 位に存在する r s 7 1 7 1 1 7 1 を検出する、方法。

【請求項 6】

T 1 D を診断するために、標的核酸における少なくとも 1 つの特異的ヌクレオチドの有無を決定するための方法であって、前記方法は、

a) 糖尿病と関連すると知られている染色体領域から単離された、検出可能な量の標的核酸ポリマーを提供する工程であって、前記領域は配列 I D 番号 1 の U B A S H 3 A 遺伝子、配列 I D 番号 2 の G L I S 3 遺伝子、配列 I D 番号 3 の R A S G R P 1 遺伝子、配列 I D 番号 4 の B A C H 2 遺伝子、または配列 I D 番号 5 の E D G 7 遺伝子を有するものである、前記提供する工程；

b) 前記検出可能な量の核酸ポリマーを、1 若しくはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーとハイブリダイゼーションする工程であって、各プライマーは標的核酸ポリマーにおける配列に対して相補的であるヌクレオチド配列を有しているものである、前記ハイブリダイゼーションする工程；

c) 少なくとも 1 つのデオキシヌクレオチドを含有する混合液において、前記ハイブリダイゼーションされた核酸ポリマーを重合剤へ曝露する工程であって、前記デオキシヌクレオチドは検出可能なレベルを有しているものである、前記曝露する工程；

d) 標識化デオキシヌクレオチドを含有するプライマー伸展産物の有無を、工程 (c) の重合化混合物で解析する工程であって、これによって定義部位での特異的ヌクレオチドの同定が決定されるものである、前記解析する工程；及び、

e) 前記少なくとも 1 つのシングルヌクレオチド座位での遺伝子変異の存在を前記標的核酸で評価する工程であって、多型の存在は T 1 D 発症の変化リスクと関連しているものであり、前記多型は、B A C H 2 遺伝子内の r s 3 7 5 7 2 4 7、U B A S H 3 A 遺伝子内の r s 9 9 7 6 7 6 7、G L I S 3 遺伝子内の r s 1 0 7 5 8 5 9 3、G L I S 3 遺伝子内の r s 1 0 7 5 8 5 9 4、E D G 7 遺伝子内の r s 1 9 8 3 8 5 3、R A S G R P 1 遺伝子内の r s 1 7 5 7 4 5 4 6、R A S G R P 1 遺伝子内の r s 7 1 7 1 1 7 1、及び R A S G R P 1 遺伝子内の r s 8 0 3 5 9 5 7 の少なくとも 1 つを有するものである、前記評価する工程、を有するものである、方法。

【請求項 7】

請求項 6 の方法を実行するためのキットであって、コードされた核酸の単離に適したプライマーであって、前記コードされた核酸は G e n e C h i p に固定された T 1 D の変更リスクに関連する一塩基多型 (S N P) を有する、前記プライマーと、容器および使用説明書とを有し、前記核酸は B A C H 2、U B A S H 3 A、G L I S 3、E D G 7、および R A S G R P 1 から成る群から選択される遺伝子によってコードされるものであり、前記

10

20

30

40

50

S N P は B A C H 2 S N P 、 U B A S H 3 A S N P 、 G L I S 3 S N P 、 E D G 7 S N P 、 および R A S G R P 1 S N P から成る群から選択されるものである、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2008年5月16日付け出願済み米国仮特許出願第61/054,040号（参照によりその全体を本明細書に組み込むものとする）の優先権を主張するものである。

【0002】

本発明は、糖尿病、特に1型糖尿病に関連するグルコース代謝、遺伝学、および病理学の分野に関する。より具体的にいうと、本発明は、これまでこの疾患に関連付けられてこなかった一塩基多型などの遺伝子変異を含む遺伝子パネルを提供する。これにより識別される配列を診断および治療措置のため使用する方法およびキットも提供され、また糖尿病を管理する治療薬の組成も提供される。

【背景技術】

【0003】

本発明の関連分野における技術水準について説明するため、本明細書の全体にわたり数件の刊行物および特許文献を引用している。これらの各引用文献については、参照によりその全体を記載したものとして本明細書に組み込むものとする。

【0004】

1型糖尿病（type 1 diabetes、略称T1D）は、自己免疫により膵細胞（膵ベータ細胞）が破壊される結果起こり、この過程は、複数の遺伝子および環境要因に強く影響されると考えられている。T1Dは欧米諸国で増えており、米国では過去30年で2倍を超える増加を呈している。この疾患は、強い家族性要因を示し、患者の第一度近親者がT1Dを発症するリスクは、一般集団から無作為に選択した者より15倍高く、一卵性双生児におけるT1Dの一一致率は約50%である。しかし、遺伝的証拠は強力である一方、後者のデータは、環境要因との相互作用もT1Dの転帰（アウトカム）に影響を及ぼす重要な役割を果たすことを示唆している。

【0005】

T1Dの家族集積性は、複数の遺伝子に影響される。T1Dの家族集積性は、4つの遺伝子座の変異により有意に高まることがすでにわかっている。その4つの遺伝子座としては、6p21の主要組織適合遺伝子複合体（major histocompatibility complex、略称MHC）領域（HLA-DRB1、-DQA1、および-DRQ1遺伝子を含む¹）と、11p15のインスリン/インスリン様成長因子2遺伝子複合体（INS-IGF2）²⁻⁴と、1p13のタンパク質チロシンホスファターゼ-22（PTPN22）遺伝子と⁵⁻⁶、2q31の細胞傷害性Tリンパ球抗原4（CTLA4）⁷⁻⁸をコードする遺伝子とがある。10p15のインターロイキン2受容体（CD25）遺伝子座⁹も、T1Dの発症機序において示唆されているが、依然として他の独立した研究での確認が待たれる。また、T1Dを自然発症するマウスモデルの研究では、複製研究で確認された他の多くの領域が示唆された¹⁰。T1Dのヒト関連解析では他のいくつかの遺伝子座も示唆されているが、これら示唆された遺伝子の作用は現在も盛んに議論されており、十分な標本サイズを利用した独立研究による確認が必要とされている。総合すると、これらの研究では、今後もより多くのT1D感受性遺伝子が発見されることが示唆されている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明によれば、T1D発症リスクの増加または減少を示すT1D関連S N P（一塩基多型）が特定された。これにより、一態様において、表1、表2、表4、および表5で特

10

20

30

40

50

定された少なくとも 1 つの遺伝子変異を有する核酸が提供される。そのような核酸と、それによりコードされたタンパク質とは、1 型糖尿病 (type 1 diabetes、略称 T1D) の診断および管理において実用性を有する。

【0007】

本発明の別の態様では、T1D 発症感受性を評価する方法が提供される。例示的な方法は、正常な集団において所定の配列を有する標的核酸を患者試料から提供する工程と、少なくとも 1 つの遺伝子変異、例えば T1D 発症リスクの増加または減少を示す一塩基多型の存在の有無について前記標的核酸を評価する工程とを伴う。そのような遺伝子変異としては、前記配列における少なくとも 1 つのヌクレオチドの逆位、欠失、重複、および挿入などがある（これに限定されるものではないが）。

10

【0008】

前記遺伝子変異は、UBASH3A、GLIS3、RASGRP1、BACH2、および EDG7 をコードする核酸と、それに関連する遺伝子領域に存在する一塩基多型であることが好ましい。そのような遺伝子領域には、表 3 に提供された連鎖不平衡ブロックが含まれ、前記方法は、そのようなブロック内で糖尿病に関連する任意の変異体を検出する工程を伴う。前記 SNP は、第 21 染色体の UBASH3A 遺伝子で座位 42709459 に存在する rs9976767、第 6 染色体の BACH2 遺伝子で座位 91014184 に存在する rs3757247、または第 15 染色体の RASGRP1 遺伝子で座位 36694333 に存在する rs7171171 であることが好ましい。

【0009】

20

本発明の方法には、T1D の診断用に表 1、2、4、または 5 に記載された一塩基多型を有する T1D 関連遺伝子変異のいずれかを検出する工程も含まれる。その代替態様または追加態様として、表 3 に記載された連鎖不平衡ブロックに存在する T1D 関連遺伝子変異を検出することができる。上記の方法を実施するためのキットおよびマイクロアレイも提供される。

【0010】

20

さらに別の実施形態では、T1D を管理する方法が提供され、この方法は、治療薬を必要とする患者に当該治療薬を投与する工程を伴う。前記治療薬は、小分子、抗体、タンパク質、オリゴヌクレオチド、または siRNA 分子であってよい。

【0011】

30

本発明の別の態様では、UBASH3A、GLIS3、RASGRP1、BACH2、および EDG7 を結合し、および / またはこれらの機能的活性を調節する薬剤を特定する方法と、生物学的に許容される基剤中に前記薬剤を有する医薬組成物とが提供される。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図 1】HapMap の欧州データに基づいた RASGRP1 SNP の LD プロット（連鎖不平衡マッピング）。頂部パネルは、29 の真獣類哺乳類の DNA 配列のアラインメントについて、制約された要素と保持スコア (conservation score) とを示している (Ensembl、ワールドワイドウェブ (ウェブサイト) ensemble.org)。Cooperら Genome Research 2005、15:901-913 を参照。この LD マップ（連鎖不平衡マッピング）は、ワールドワイドウェブ road.mit.edu/personal/jcbarrett/haploview から利用できる Haploview バージョン 4.0 ソフトウェアにより作製したものである。D' 値 (%) は各ボックス内に示されており、r² 値はグレースケールで表されている。赤い矢印は、この研究で遺伝子型が決定された SNP を示している。赤い円の内側は、実施例 I で説明している SNP である。

40

【発明を実施するための形態】

【0013】

1 型糖尿病 (type 1 diabetes、略称 T1D) は、一般的で遺伝性の強い疾患であり、ほとんどの場合、小児期に発症する。近年のゲノムワイド関連解析 (ge

50

n o m e - w i d e a s s o c i a t i o n、略称G W A)により、この疾患に関連する新たな遺伝子がいくつか明らかになった。我々は、新たなT 1 Dリスク遺伝子座を発見する試みとして、T 1 DのG W A解析に関する追跡調査戦略を実施した。これに際し、P値が少なくとも名目上有意な(ただし、主要組織適合遺伝子複合体領域内のものを除く)982の一塩基多型(single nucleotide polymorphism、略称S N P)を、Illumina Human Hap550 BeadChipを使って、563名のT 1 D発端者および1,146名の対照群、さらに祖先が同じである483組の完全なT 1 Dトリオ(患者とその父母)について生成したデータの組み合わせから選択した。次に、モントリオール(カナダ、ケベック州)のT 1 D核家族939組からなる独立したコホートと、Type 1 Diabetes Genetics Consortium(1型糖尿病遺伝学コンソーシアム)とにより、これらのS N Pの遺伝子型を決定した。次いで上記3つのコホート全体と、Wellcome Trust Case Control Consortium(ウェルカムトラストケースコントロールコンソーシアム)のT 1 Dに関するデータセットとを調べ、これまでに説明されておらず、かつ、全コホートにわたり名目上有意な遺伝子座におけるS N Pを特定した。さらに調査する対象として5つの遺伝子座を選択し、フィラデルフィア(米国ペンシルバニア州)の糖尿病に罹患していない者からなる独立した対応対照群データセット(1MおよびHuman Hap550K S N P BeadChipsでそれぞれ遺伝子型を決定済み)を使って、1,303名のT 1 D患者を含む、D C C T / E D I C研究のT 1 D発端者に問診を行なった。また、このコホートでは5つの変異体のうち2つ(rs9976767およびrs3757247)がT 1 Dに有意に関連していた。これらのS N Pは、自己免疫に生物学的に関連するU B A S H 3 A 遺伝子(オッズ比1.16、5つのコホートを合わせて $P = 2.33 \times 10^{-8}$)およびB A C H 2 遺伝子(オッズ比1.13、合わせて $P = 1.25 \times 10^{-6}$)にそれぞれ常駐する。結果を要約すると、欧洲人子孫からなる5つの異なるコホートにわたり、T 1 Dに関連する遺伝子座が新たに21qおよび6qに2つ特定された。
10

【0014】

本発明の理解を助けるため、以下の定義を提供する。

【0015】

本発明の目的上、冠詞「a」および「an」をつけて表記した実体は、1若しくはそれ以上の当該実体をいう。例えば「a c D N A」は、1若しくはそれ以上のc D N A(相補的D N A)または少なくとも1つのc D N Aを意味する。したがって、「1つの(aまたはa n)」、「1若しくはそれ以上の(o ne or more)」、および「少なくとも1つの(at least one)」という表現は、本明細書で同義的に使われる場合がある。また、「を有する(comprising)」、「を含む(including)」、および「を有する(having)」という表現も同義的に使われる場合があることに注意すべきである。さらに、「からなる群から選択される」化合物という表現は、それに続くリストに含まれる化合物のうち1若しくはそれ以上をいい、これには、当該化合物のうち2若しくはそれ以上の混合物(組み合わせ)が含まれる。本発明によれば、単離された分子または生物学的に純粋な分子とは、その本来の環境から取り出された化合物である。そのため、「単離された(単離した)」および「生物学的に純粋な」という表現は、必ずしも当該化合物の純度を反映したものではない。本発明の単離された化合物は、その自然源から得られたものであっても、研究室で合成技術を使って生成されたものであっても、またはそのようないかなる化学合成経路で生成されたものであってもよい。
30
40

【0016】

「一塩基多型」(single nucleotide polymorphism、略称S N P)とは、D N A内の单一塩基が、その位置における通常の塩基と異なっていることをいう。これら单一塩基の変化は、S N Pまたは「スニップ」と呼ばれる。これまで、数百万ものS N Pがヒト遺伝子カタログに収録されてきている。鎌状細胞を生じるS N Pなど、一部のS N Pは疾患の原因である。他のS N Pは、ゲノムの正常な変異による。
50

【0017】

本明細書における用語「遺伝子変異」は、1若しくはそれ以上の核酸分子の野生型または参照配列からの変化をいう。遺伝子変異としては、既知の配列の核酸分子における少なくとも1つのヌクレオチドの塩基対の置換、挿入、および欠失などがある（これに限定されるものではないが）。

【0018】

用語「1型糖尿病」（type 1 diabetes、略称T1D）とは、膵臓が血糖レベルを適切に調節する上で十分な量のインスリンを生成しない場合に生じる慢性的な（生涯にわたる）疾患をいう。T1Dは、若年性糖尿病またはインスリン依存性糖尿病と呼ばれることが多く、炭水化物（グルコースなどの糖を含む）、タンパク質、および脂肪の代謝が改変される結果起こる。1型糖尿病では、グルコースが体細胞に進入できるようになるホルモンであるインスリンを、膵臓の（ベータ）細胞がほとんど、またはまったく生成しない。細胞に入ったグルコースは、燃料として使用される。インスリンが不十分であると、グルコースは、細胞に入らず血流内に蓄積する。身体は、血流中のグルコースレベルが高いにもかかわらず、このグルコースを使ってエネルギーを生成することができないため、空腹感が高まる。また、血中のグルコースレベルが高い患者は排尿の頻度が高まり、過度の口渴を覚える。診断後5～10年以内に、膵臓のインスリン産生細胞は完全に破壊され、インスリンは生成されなくなってしまう。

10

【0019】

「T1D関連SNPまたはT1D特異的マーカー」とは、T1D発症リスクの増減に関連するSNPまたはマーカーのうち、T1Dに罹患していない正常な患者には見られないものをいう。そのようなマーカーとしては、核酸、それがコードするタンパク質、または他の小分子などがある（これに限定されるものではないが）。1型糖尿病はすべての年齢で発症する可能性があるが、通常は30歳未満で発症する。症状は、通常重篤で、急激に起こる。1型糖尿病の原因は、正確にはわかっていない。1型糖尿病は、毎年新たに発症する糖尿病のうち3%を占める。また、毎年7,000人の子どもに1件の割合で発症する。20歳を超えた成人に新たに発症することは、比較的少ない。

20

【0020】

本明細書における用語「固体マトリックス」とは、ビーズ、マイクロ粒子、マイクロアレイ、マイクロ滴定ウェルまたは試験管の表面、ディップスティック、またはフィルターなど、すべての形態をいう。マトリックスの材料は、ポリスチレン、セルロース、ラテックス、ニトロセルロース、ナイロン、ポリアクリルアミド、デキストラン、またはアガロースであってよい。「試料」、「患者試料」、または「生体試料」とは、一般に、特定の分子、好ましくは以下の表に示したマーカーなどT1Dに特異的なマーカー分子について、試験・検査の対象とできる試料をいう。試料としては、血液、血清、血漿、尿、唾液、涙、胸膜液などを含む細胞や体液などがある（これに限定されるものではないが）。

30

【0021】

特定のヌクレオチドまたはアミノ酸に言及した表現「から本質的に成る」は、所与のSEQ_ID_NO（配列ID番号）の特徴を有した配列を意味する。例えば、アミノ酸配列に関して使用する場合、この表現には、当該配列の機能的特徴および新規性のある特徴に影響を及ぼさない配列自体および分子修飾が含まれる。

40

【0022】

「連鎖」は、遺伝子、対立遺伝子（アレル）、遺伝子座、または遺伝子マーカーが、同じ染色体における各々の位置が原因となり、ともに継承される傾向をいう用語で、2つの遺伝子間、対立遺伝子間、遺伝子座間、または遺伝子マーカー間の組み換え率（別称「組み換え割合」または）により表現される。染色体上で物理的に近い2つの遺伝子座ほど、組み換え割合は低くなる。通常、病原遺伝子内の多形部位を疾患との連関について試験すると、組み換え割合はゼロになり、当該疾患および病原遺伝子は必ずともに受け継がることが示される。まれに、遺伝子が非常に大きなゲノム分節にわたり、遺伝子の一端で多形部位間の組み換えを、他端では疾患の原因となる突然変異を検出できる場合もある。

50

ただし、疾患の原因となる突然変異がその疾患との連鎖に関する試験対象の多型である場合、組み換えは見られないことになる。

【0023】

「センチモルガン」は、2つの遺伝子マーカー間、対立遺伝子間、遺伝子間、または遺伝子座間の連鎖を示す遺伝学的な距離の単位であり、1センチモルガンは、1回の減数分裂につき、2つのマーカー間または遺伝子座間で1%組み換えが起こる確率に対応する。

【0024】

「連鎖不平衡」または「対立遺伝子の関連」とは、一定の染色体位置付近において、特定の対立遺伝子、遺伝子座、遺伝子、または遺伝子マーカーと、特定の対立遺伝子、遺伝子座、遺伝子、または遺伝子マーカーとが、集団内の任意の特定対立遺伝子に期待される確率より高い頻度で選択的に関連することを意味する。10

【0025】

本明細書における「標的核酸」とは、複雑な核酸混合物に含まれている、これまでに定義済みの核酸領域をいい、その定義済みの野生型領域には、T1Dに関連する可能性があり、またはその可能性がない、少なくとも1つの既知のヌクレオチド変異が含まれる。その核酸分子は、cDNAクローニング、サブトラクティブハイブリダイゼーション、または手作業での合成により、自然源から単離することができる。前記核酸分子は、トリエステル合成法により、または自動DNA合成装置を使って、手作業で合成できる。

【0026】

本発明で使用する核酸に関しては、用語「単離された核酸（単離した核酸）」を使用する場合がある。DNAに対して使用する場合、この用語は、DNA分子源である生物の天然ゲノムにおいて（5'および3'の方向で）隣接している配列から分離したDNA分子をいう。例えば「単離された核酸」は、プラスミドベクターやウイルスベクターなどのベクターに挿入され、または原核生物や真核生物のゲノムDNAに統合されたDNA分子を有してもよい。「単離された核酸」分子は、cDNA分子を有してもよい。また本明細書において、単離された核酸分子をベクターに挿入したものを、組み換え核酸分子と呼ぶ場合もある。20

【0027】

RNA分子に関する場合、用語「単離された核酸」は、主に上記で定義済みの単離されたDNA分子でコードされたRNA分子をいう。あるいは、この用語は、RNA分子が「実質的に純粋な」形態で存在するよう、自然状態（細胞内または組織内）で関連している他のRNA分子から十分に分離されたRNA分子をいう場合もある。核酸に関する用語「濃縮された」は、特定のDNA配列またはRNA配列が、関心のある細胞中または溶液中に存在する全DNAまたは全RNAに対し、正常な細胞中または配列取得元の細胞中よりも有意に高い割合（2~5倍）を占めることを意味する。この状態は、存在する他のDNAまたはRNAの量を人が選択的に低減し、特定のDNA配列またはRNA配列の量を人が選択的に増加させ、またはこれら2つを組み合わせることにより、起こすことができる。ただし、「濃縮された」は、他のDNA配列またはRNA配列が存在しないことを示唆するわけではなく、関心のある配列の相対量が有意に高まったことを示唆するので注意すべきである。30

【0028】

また、目的によっては、ヌクレオチド配列が純化された形態であることが有利である。核酸に関する用語「純化された（純化した）」は、必ずしも絶対的な純度（均一な製剤などの）を要求するものではなく、代わりに当該配列が自然な環境より比較的純粋であることを示す（自然なレベルと比べ、このレベルは、例えばmg/m1単位で、少なくとも2~5倍高くなければならない）。cDNAライブラリーから単離した個々のクローンは、電気泳動による均一性まで純化されたものであってよい。これらのクローンから得られたDNA分子のうち本明細書の特許請求の範囲に記載されたものは、全DNAまたは全RNAから直接取得できる。cDNAクローンは自然発生するものではなく、部分的に純化された自然発生物（メッセンジャーRNA（略称mRNA））を操作して得られることが好40

ましい。mRNAからcDNAライブラリーを構築するには、合成物(cDNA)を生成する必要があり、純粋な各cDNAクローンは、cDNAライブラリーを含む細胞のクローン選択により合成ライブラリーから単離することができる。このように、mRNAからのcDNAライブラリー構築と、区別可能なcDNAクローンの単離とを含む工程により、ネイティブなメッセージ(自然状態の情報)を約 10^{-6} 倍に純化することが可能になる。そのため、少なくとも10倍増、好ましくは 10^2 倍増または 10^3 倍増、より好ましくは 10^4 倍増または 10^5 倍増の純化が、明示的に意図される。したがって、用語「実質的に純粋な」は、関心のある化合物(核酸やオリゴヌクレオチドなど)を少なくとも50~60重量%有する製剤を指している。この場合、製剤は関心のある化合物を少なくとも75重量%有することがより好ましく、90~99重量%有することが最も好ましい。純度は、関心のある各化合物に適した方法で測定される。

【0029】

用語「相補的」は、複数の好適な相互作用が可能な2つのヌクレオチドを説明する。例えば、アデニンはチミンに対し相補的であり、これら双方は2つの水素結合を形成する。同様に、グアニンとシトシンは互いに相補的で、3つの水素結合を形成する。そのため、ある核酸配列がチミン、アデニン、グアニン、およびシトシンの塩基配列をこの順で含む場合、この核酸分子の「補体」は、チミンの座位にアデニンを含み、アデニンの座位にチミンを含み、グアニンの座位にシトシンを含み、シトシンの座位にグアニンを含む分子である。補体は、親核酸分子と最適に相互作用する核酸配列を含むことができるため、そのような補体と、その親分子とは、高い親和性で結合できる。

【0030】

一本鎖核酸、特にオリゴヌクレオチドに関し、用語「特異的にハイブリダイズする」は、当該技術分野で一般に使用されており(「実質的に相補的」と呼ばれる場合もある)、所定の条件下で当該ハイブリダイゼーションを可能にする上での、十分に相補的な配列の2つの一本鎖ヌクレオチド分子間の関連をいう。特に、この用語は、オリゴヌクレオチドと、それに実質的に相補的な配列を有する本発明の一本鎖のDNA分子またはRNA分子内に含まれるものとのハイブリダイゼーションをいい、オリゴヌクレオチドと、それに相補的でない配列の一本鎖核酸とのハイブリダイゼーションは実質的に除外される。例えば、特異的なハイブリダイゼーションは、任意のT1Dに特異的なマーカー遺伝子または核酸にハイブリダイズしても、他のヒトヌクレオチドにはハイブリダイズしない配列を参照している。また、「特異的にハイブリダイズする」ポリヌクレオチドは、表1~3に示したT1D特異マーカーなど、T1Dに特異的なマーカーだけにハイブリダイズする種々の相補性を有する一本鎖核酸分子の特異的なハイブリダイゼーションを可能にする適切な条件は、当該技術分野でよく知られている。

【0031】

例えば、指定された配列相同性を有する核酸分子間でハイブリダイゼーションを起こすために必要なストリンジェンシー条件(条件の厳しさ)を計算する一般的な式の1つを次に示す(Sambrookら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1989))。

$$T_m = 81.5 + 16.6 \log [Na^+] + 0.41 (\%G+C) - 0.63 (\text{ホルムアミド\%}) - 600 / \text{二本鎖の塩基対数}$$

上式の例として、[Na⁺] = [0.368]および50%ホルムアミドを使って、G-C含有量42%および平均プローブサイズ200塩基とすると、T_mは57となる。DNA二本鎖のT_mは、相同性が1%下がると1~1.5下がる。そのため、配列同一性が約75%を超える標的であれば、42のハイブリダイゼーション温度で検出される。

【0032】

ハイブリダイゼーションおよび洗浄のストリンジェンシーは、主に溶液の塩濃度および温度に依存する。一般に、プローブとその標的のアニーリング率を最大限に伸ばすには、通常、算出されたハイブリッド温度T_mより20~25低い塩・温度条件でハイブリダイゼーションを行なう。洗浄条件は、標的用プローブの同一性の度合いに応じて、できる

だけ厳しくすべきである。一般に、洗浄条件は、ハイブリッドの T_m より約 12 ~ 20 低く選択される。本発明の核酸に関して、ストリンジエンシーが中程度のハイブリダイゼーションとは、6 X SSC、5 X Denhardt 溶液（デンハルト溶液）、0.5 % SDS、およびDNA 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の変性サケ精子中における 42 でのハイブリダイゼーションおよび 2 X SSC および 0.5 % SDS による 55 での 15 分間の洗浄と定義される。高ストリンジエンシーのハイブリダイゼーションとは、6 X SSC、5 X Denhardt 溶液、0.5 % SDS、およびDNA 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の変性サケ精子中における 42 でのハイブリダイゼーションおよび 1 X SSC および 0.5 % SDS による 65 での 15 分間の洗浄と定義される。非常に高ストリンジエンシーのハイブリダイゼーションとは、6 X SSC、5 X Denhardt 溶液、0.5 % SDS、およびDNA 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の変性サケ精子中における 42 でのハイブリダイゼーションおよび 0.1 X SSC および 0.5 % SDS による 65 での 15 分間の洗浄と定義される。
10

【0033】

本明細書における用語「オリゴヌクレオチド」または「オリゴ」とは、短い配列の DNA または DNA 誘導体を意味し、通常 8 ~ 35 ヌクレオチド長のプライマーまたはプローブである。オリゴヌクレオチドは、クローニングまたは増幅により合成して得ることができる。オリゴとは、2 若しくはそれ以上、好ましくは 3 つを超えるリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドから成る核酸分子と定義される。オリゴヌクレオチドの厳密なサイズは、種々の要因と、各オリゴヌクレオチドの用途とに依存する。用語「誘導体」については、上述した変異体のうち、通常これら分子の一部ではない化学的部分を追加で有するものをすべて含むよう意図している。これらの化学的部分は、溶解性・吸収性・生物学的半減期の改善、毒性の低減、および望ましくない副作用の排除または低減を含め、種々の目的を有したものであってよい。
20

【0034】

本明細書における用語「プローブ」とは、純化された制限酵素の分解生成物のように自然発生するか、合成されるかにかかわらず、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、または核酸（RNA または DNA）のうち、当該プローブに対し相補的な配列を伴った核酸とアニーリングでき、またはこれと特異的にハイブリダイズできるものをいう。プローブは、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。プローブの厳密な長さは、温度、プローブ源、および当該方法の用途を含む多くの要因に依存する。例えば、診断用途の場合、標的配列の複雑さに応じて、オリゴヌクレオチドプローブは、通常、15 ~ 25 若しくはそれ以上のヌクレオチドを含むが、より少数のヌクレオチドを含んでもよい。本明細書におけるプローブは、特定の標的核酸配列の種々の鎖に対し相補的であるよう選択される。これは、プローブが、一式の所定条件下で各々の標的鎖と「特異的にハイブリダイズ」し、またはこれとアニーリングするよう、十分に相補的でなければならないことを意味している。そのため、プローブ配列は、標的の厳密な相補配列を反映したものである必要はない。例えば、非相補的ヌクレオチド断片がプローブの 5' 端または 3' 端に結合し、そのプローブ配列の残りの部分が標的鎖に対し相補的であってもよい。あるいは、プローブ配列が標的核酸の配列に対し十分相補性があり特異的にアニーリングするのであれば、非相補的塩基またはより長い配列を当該プローブ内に散在させることもできる。
30
40

【0035】

本明細書における用語「プライマー」とは、オリゴヌクレオチドのうち、RNA または DNA であり、一本鎖または二本鎖であり、生体系から得られ、制限酵素分解により生成され、または合成されたものであり、適切な環境に置かれた場合、鑄型（テンプレート）に依存する核酸合成の開始剤として機能的に作用できるものをいう。適切な核酸鑄型、核酸の適切なヌクレオシド三リン酸前駆体、ポリメラーゼ酵素、適切な補因子、および適切な温度や pH などの条件が揃うと、ポリメラーゼ作用または類似活性により、プライマーの 3' 端にヌクレオチドが加わり、プライマー伸長生成物が得られる。プライマーの長さは、各用途の条件および要件に応じて異なる。例えば、診断用途の場合、オリゴヌクレオ
50

チドプライマーは、通常、15～25若しくはそれ以上の長さのヌクレオチドである。プライマーは、望ましい伸長生成物の合成を準備するよう、すなわちプライマーの3'ヒドロキシル部分を適切な並列状態で十分に提供してポリメラーゼまたは類似酵素での合成を開始できる態様で望ましい鋳型鎖とアニーリングできるよう、望ましい鋳型と十分な相補性がなければならない。プライマー配列は、望ましい鋳型の厳密な補体を提供する必要はない。例えば、非相補的なヌクレオチド配列であっても、相補的なプライマーの5'端に結合させることができる。あるいは、望ましい鋳型鎖の配列と十分な相補性がプライマー配列にあり、伸長生成物を合成するための鋳型-プライマー複合体を機能的に提供できるのであれば、オリゴヌクレオチドプライマー配列内に非相補的塩基を散在させることもできる。

10

【0036】

ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction、略称PCR) については、米国特許第4,683,195号、第4,800,195号、第4,965,188号に説明されており、これらの開示は参照によりその全体を本明細書に組み込むものとする。

【0037】

「siRNA」とは、標的遺伝子の配列との相同性を有する低分子干渉RNA (small interfering RNA、略称siRNA) を提供することによる、配列に特異的な転写後遺伝子サイレンシングまたは遺伝子ノックダウンのRNA干渉過程に係わる分子をいう。低分子干渉RNA (siRNA) は、生体外 (in vitro) で合成でき、またはより長いdsRNA (二本鎖RNA、double-stranded RNAの略称) のリボヌクレアーゼIIIによる開裂で生成でき、配列に特異的なmRNA分解のメディエーターである。本発明のsiRNAは、適切に保護されたリボヌクレオシドホスホラミダイトと、従来のDNA / RNA合成装置とを使って化学的に合成されることが好ましい。siRNAは、2つの別個の相補的RNA分子として、または2つの相補的領域を伴った単一RNA分子として合成することができる。合成RNA分子または合成試薬を市販する供給業者 (サプライヤ) としては、Applied Biosystems (米国カリフォルニア州Foster City)、Proligo (ドイツHamburg)、Dharmacon Research (米国コロラド州Lafayette)、Pierce Chemical (Perbio Scienceの一部門、米国イリノイ州Rockford)、Glen Research (米国バージニア州Sterling)、ChemGenes (米国マサチューセッツ州Ashland)、およびCruachem (英国Glasgow)などがある。UBASH3A、GLI3、RASGRP1、BACH2、およびEDG7 mRNAを阻害する特異的なsiRNAコンストラクトは、15～35ヌクレオチド長であってよく、より一般には、約21ヌクレオチド長であってよい。上記の遺伝子標的を下方制御 (ダウンレギュレーション) する例示的なsiRNA分子を、表6～10に示す。

20

【0038】

用語「ベクター」は、細胞に導入して感染させ、トランスフェクトし、またはこれを形質転換する一本鎖または二本鎖の環状核酸分子に関するもので、独立して、または宿主細胞ゲノム内で自己複製する。環状の二本鎖核酸分子は、制限酵素での治療時、切断して線状化することができる。各種ベクター、制限酵素、および制限酵素の標的であるヌクレオチド配列に関する知識は、当業者であれば容易に利用でき、これには、別の遺伝子配列または要素 (DNAまたはRNA) を結合させて結合させた配列または要素の複製を起こすことのできる、プラスミド、コスミド、バクミド、ファージ、またはウイルスなどの任意のレプリコンも含まれる。本発明の核酸分子は、制限酵素でベクターを切断しその2片をライゲーションすることにより、当該ベクターに挿入できる。

30

【0039】

当業者であれば、原核生物または真核生物に対し、発現コンストラクトによる形質転換、トランスフェクション、または形質導入を容易にする多くの技術が利用できる用語「形

40

50

質転換」、「トランスフェクション」、「形質導入」とは、核酸および／または発現コンストラクトを細胞または宿主生物に挿入する方法をいう。これらの方は、高濃度の塩、電場、または洗浄剤で細胞を処理して、関心のある核酸分子、マイクロインジェクション、ペプチドテザー、PEG（ポリエチレングリコール）融合などに対し、宿主細胞の外膜または細胞壁を透過性にするなど種々の技術を伴う。

【0040】

用語「プロモーター要素」とは、ベクターに組み込まれているヌクレオチド配列であつて、適切な細胞内に入ると転写因子の作用および／またはポリメラーゼ結合を促進したのち、当該ベクターDNAの一部がmRNAに容易に転写されるよう作用するものをいう。一実施形態において、本発明のプロモーター要素は、T1Dに特異的なマーカー核酸分子の5'端より前にあり、これにより前記マーカー核酸分子がmRNAに転写される。次いで、宿主細胞の機構がmRNAをポリペプチドに翻訳する。10

【0041】

当業者であれば、プロモーター要素とT1D特異マーカー遺伝子核酸分子と以外の核酸要素を核酸ベクターに含められることが理解できるであろう。それら他の核酸要素としては、複製起点、リボソーム結合部位、薬剤耐性酵素またはアミノ酸代謝酵素をコードする核酸配列、および分泌シグナルか局在化シグナルかポリペプチドの純化に有用なシグナルかをコードする核酸配列などがある（これに限定されるものではないが）。

【0042】

「レプリコン」とはすべての遺伝要素をいい、例えばプラスミド、コスミド、バクミド、色素体（プラスチド）、ファージ、またはウイルスのうち、おおむね自律的に複製できるものをいう。レプリコンは、RNAまたはDNAであってよく、一本鎖または二本鎖であってよい。20

【0043】

「発現オペロン」とは、核酸の一部であって、プロモーター、エンハンサー、翻訳開始シグナル（ATGコドンまたはAUGコドンなど）、ポリアデニル化シグナル、終止コドンなど、転写および翻訳の制御配列を有し、宿主細胞または宿主生物内でポリペプチドコード配列の発現を促進するものをいう。

【0044】

本明細書における用語「レポーター」、「レポーターシステム（レポーター系）」、「レポーター遺伝子」、または「レポーター遺伝子産物」とは、産物をコードする遺伝子を核酸が有する作用可能な遺伝システムであって、前記遺伝子が発現すると、バイオアッセイ、イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイなどにより、または比色法、蛍光検出法、化学発光法その他の方法で容易に測定できるレポーターシグナルを発するものを意味する。核酸は、RNAまたはDNAであり、線状または環状であり、一本鎖または二本鎖であり、アンチセンス極性またはセンス極性を有し、レポーター遺伝子産物の発現に必要な制御要素に作用可能に結合する。その必要な制御要素は、レポーターシステムの性質と、レポーター遺伝子の形態がDNAかRNAかに応じて異なるが、プロモーター、エンハンサー、翻訳制御配列、ポリア付加シグナル、転写終了シグナルなどの要素を含んでよい（これに限定されるものではないが）。3040

【0045】

導入された核酸は、受容細胞または受容生物の核酸に統合される（共有結合的に結合する）場合とそうでない場合がある。例えば細菌、酵母、植物、および哺乳類の細胞では、導入された核酸は、エピソーム要素として、またはプラスミドなどの独立したレプリコンとして維持される。あるいは、導入された核酸は、受容細胞または受容生物の核酸へと統合され、その細胞内または生物内で安定した状態で維持されて、さらに受け継がれ若しくは前記受容細胞または受容生物の子孫細胞または子孫生物へと継承される。最後に、導入された核酸は、受容細胞内または宿主生物内で、単に過渡的に存在することができる。

【0046】

用語「選択可能なマーカー遺伝子」とは、発現した場合、抗生物質に対する耐性などの50

選択可能な表現型を形質転換細胞にもたらす遺伝子をいう。

【0047】

用語「作用可能に結合される（結合する）」とは、コード配列が発現するよう、そのコード配列の発現に必要な調節配列が、当該DNA分子内でそのコード配列に対して適切な位置に配置されることを意味する。これと同じ定義が、発現ベクターにおいて、転写単位その他の転写制御要素（エンハンサーなど）の配置に適用される場合もある。

【0048】

用語「遺伝子組み換え生物」または「トランスジェニック生物」とは、遺伝子または核酸分子の新たな組み合わせを有する生物をいう。遺伝子または核酸分子の新たな組み合わせは、当業者が利用できる多様な核酸操作技術を使って生物に導入できる。用語「生物」（organism）は、少なくとも1つの細胞から成るすべての生物に関する。生物は、真核单細胞のように単純なものから、哺乳類のように複雑なものまである。そのため「遺伝子組み換え生物」という表現は、遺伝子組み換え細胞だけでなく、遺伝子を組み換えた真核生物および原核生物も包含する。10

【0049】

本明細書では、用語「単離された（単離した）タンパク質」または「単離および純化された（単離および純化した）タンパク質」を使用する場合がある。この用語は、主に本発明の単離された核酸分子の発現により生成されたタンパク質をいう。あるいは、この用語は、あるタンパク質を「実質的に純粋な」形態で存在させるため、自然状態で関連する他のタンパク質から十分に分離したものをいう。「単離された（単離した）」という用語は、他の化合物または材料（物質）との人工混合物または合成混合物を除外するよう意図したものではなく、また基本的な活性に干渉しない不純物であって、例えば不完全な純化、安定剤の付加、または免疫原性製剤や薬学的に許容される製剤などへの配合により存在しうる不純物の存在を除外するよう意図したものでもない。20

【0050】

「特異的結合ペア」は、特定の相互特異性を有し、通常条件では他の分子より優先的に相互結合する特異的結合メンバー（specific binding member、略称sbm）および結合パートナー（binding partner、略称bp）を含む。特異的結合ペアの例は、抗原および抗体、リガンドおよび受容体、互いに相補的なヌクレオチド配列などである。当業者であれば、他の例も多数認識しているであろう。さらに、用語「特異的結合ペア」は、特異的結合メンバーの一方または双方と、その結合パートナーとが、大分子の一部を有する場合にも適用される。特異的結合ペアが核酸配列を有する実施形態において、それらの核酸配列は、アッセイ条件下で互いにハイブリダイズする長さになり、好ましくは10ヌクレオチド長を超える、より好ましくは15ヌクレオチド長または20ヌクレオチド長を超える。「試料」、「患者試料」、または「生体試料」とは、一般に、特定の分子、好ましくは表1～4に示したマーカーなどT1Dに特異的なマーカー分子について、試験・検査の対象とできる試料をいう。試料としては、血液、血清、血漿、尿、唾液、涙、胸膜液などを含む細胞や体液などがある（これに限定されるものではないが）。

【0051】

用語「剤（薬剤）」（agent）および「試験化合物」は本明細書で同義的に使われ、化合物、化合物の混合物、生物高分子、あるいは生物材料（細菌、植物、菌類、または動物（特に哺乳類）の細胞や組織など）で生成された抽出物を示す。生物高分子としては、本明細書で説明するSNP含有核酸またはその各々がコードするタンパク質の活性を調節する能力を呈するsiRNA、shRNA（短鎖ヘアピンRNA。short hairpin RNAまたはsmall hairpin RNAの略称）、アンチセンスオリゴヌクレオチド、小分子、抗体、ペプチド、ペプチド/DNA複合体、および任意の核酸ベース分子（例えばオリゴ）などがある。薬剤は、本明細書で後述するスクリーニングアッセイに含めることにより、潜在的な生物活性について評価される。40

【0052】

50

20

30

40

50

本明細書における用語「調節する」(modulate)とは、増減させることをいう。例えば、用語「調節する」とは、化合物または試験薬剤(検査薬)が本発明の遺伝子またはタンパク質のシグナリングまたは活性と干渉する能力をいう。したがって、本明細書に開示する標的遺伝子(UBASH3A、GLIS3、RASGRP1、BACH2、およびEDG7)を介してシグナリングを調節するとは、これら遺伝子によりコードされたタンパク質の活性を、薬剤または化合物が阻害または増強することを意味する。これには、ナチュラルキラー細胞の活性を改変し、自己免疫細胞の破壊を防ぐことが含まれる。

【0053】

T1D関連SNPを使ってT1D検出アッセイを行なう方法

本発明によれば、表1～5に掲げたものを含む(これに限定されるものではないが)T1D SNP含有核酸は、種々の目的に使用できる。T1D関連SNPを含むDNA、RNA、またはそれらの断片は、T1D特異的マーカーの存在および/または発現を検出するプローブとして使用することができる。T1Dに特異的なマーカー核酸をそのようなアッセイのプローブとして利用できる方法としては、(1) *in situ*ハイブリダイゼーション、(2) サザンハイブリダイゼーション、(3) ノーザンハイブリダイゼーション、および(4) ポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction、略称PCR)などの各種增幅反応などがある(これに限定されないが)。

【0054】

さらに、T1D関連SNPを検出するアッセイは、体液(血液、尿、血清、胃洗浄液を含む)を含む(これに限定されるものではないが)全タイプの生体試料、全タイプの細胞(白血球、単核細胞など)、または体内組織について行なうことができる。

【0055】

上記の説明から、本発明のT1D関連SNP含有核酸と、これを発現するベクターと、T1D SNP含有マーカータンパク質と、抗T1D特異的マーカー抗体とを使用すると、体内組織、体細胞、または体液に含まれるT1D関連SNPを検出し、T1D SNP含有マーカーのタンパク質発現を改変することにより、T1Dに係わる遺伝的相互作用およびタンパク質の相互作用を評価できることがわかるであろう。

【0056】

T1D関連SNPをスクリーニングする実施形態の大半では、まず試料に含まれるT1D関連SNP含有核酸をPCRなどで増幅させて、その試料中に存在する他の配列と相対的に鑄型の量を増やす。これにより、標的配列が試料に含まれていれば、それを高い感度で検出できるようになる。この最初の工程を省略可能にするのが高感度アレイ技術で、高感度アレイ技術は当該技術分野でいっそう重要性を増している。あるいは、新たな検出技術でこの制限が克服され、合計でもわずか1μgのRNAしか含まない少量試料の分析が可能になることも考えられる。従来の蛍光技術と比べ、共鳴光散乱(Resonance Light Scattering、略称RLS)技術を使うと、ビオチンで標識しハイブリダイズさせた標的と抗ビオチン抗体とを使って少量のmRNAを複数のリード(読み枠)で検出できる。PCR増幅に代わるもう1つの態様では、平面導波路(planar wave guide、略称PWG)技術を使って信号対雑音比を高め、背景干渉を低減するどちらの技術もQiagen Inc.(米国)の市販製品で利用できる。

【0057】

このように、上述の技術のいずれを使っても、T1D関連SNPマーカーの発現を検出または定量化することができ、したがって患者のT1D発症感受性も検出することができる。

【0058】

キットおよび製造品

上記製品のいずれも、T1D関連SNP特異的マーカーポリヌクレオチドまたは1若しくはそれ以上の当該マーカーをGeneChipに固定したもの、オリゴヌクレオチド、ポリペプチド、ペプチド、抗体、標識、マーカー、またはレポーター、薬学的に許容される基剤、生理学的に許容される基剤、取扱説明書、容器、投与用管(vessel fo

10

20

30

40

50

r administration)、アッセイ用基板、またはこれらの任意の組み合わせを含めることのできるキットへの組み込みが可能である。

【0059】

T 1 D 関連 S N P を使って治療薬を開発する方法

本明細書で特定した S N P は T 1 D の病因に関連付けたものであるため、当該 S N P を含む遺伝子およびその各々がコードする産物の活性を調節する薬剤を特定する方法から、この疾患に伴う種々の障害を治療する有効な治療薬が生成されるはずである。

【0060】

染色体 21、6、15、9、および 1 は、これらの配列によりコードされたタンパク質の活性を調節する治療薬の合理的設計に適切な標的を提供する領域を含む。これらの領域に対応する小さい核酸分子またはペプチドは、コードされたタンパク質の活性を効果的に調節する治療薬を設計する上で、有利に使用することができる。10

【0061】

分子をモデル化すると、機能に必要な立体構造または重要なアミノ酸残基に基づき、S N P 含有核酸でコードされたタンパク質の活性部位に結合する能力のある特異的な有機分子を容易に特定できるはずである。コンビナトリアルケミストリーのアプローチを使って最も活性の高い分子を特定したのち、さらなるスクリーニングサイクル用にこれらの分子を反復させたものを開発することになる。特定の実施形態では、合成化合物または天然化合物の大規模なライブラリーから薬剤候補をスクリーニングすることができる。その一例は、ヒトに使用できる化合物の F D A (米国食品医薬品局) 承認ライブラリーである。また、化合物ライブラリーは、Maybridge Chemical Co. (英国 Cornwall、Trevillet)、Comgenex (米国ニュージャージー州 Princeton)、Microsource (米国コネチカット州 New Milford)、Aldrich (米国ウィスコンシン州 Milwaukee)、AKos Consulting and Solutions GmbH (スイス Basel)、Ambinter (フランス Paris)、Asinex (ロシア Moscow)、Aurora (オーストリア Graz)、BioFocus DPI (スイス)、Bionet (英国 Camelford)、ChemBridge (米国カリフォルニア州 San Diego)、Chemical Block Lt. (ロシア Moscow)、ChemStar (ロシア Moscow)、Exclusive Chemistry Ltd (ロシア Obninsk)、Enamine (ウクライナ Kiev)、Evotec (ドイツ Hamburg)、Indofine (米国ニュージャージー州 Hillsborough)、Interbioscreen (ロシア Moscow)、Interchim (フランス Montlucon)、Life Chemicals Inc. (米国コネチカット州 Orange)、Microchemistry Ltd. (ロシア Moscow)、Otava (カナダ、オンタリオ州 Toronto)、PharmEx Ltd. (ロシア Moscow)、Princeton Biomolecular (米国ニュージャージー州 Monmouth Junction)、Scientific Exchange (Center Ossipee、NH)、Specs (オランダ Delft)、TimTec (米国デラウェア州 Newark)、Toronto Research Corp. (カナダ、オンタリオ州 North York)、UkrOrgSynthesis (ウクライナ Kiev)、Vitas-M (ロシア Moscow)、Zelinsky Institute (ロシア Moscow)、および Bicoll (中国上海) を含む (これに限定されるものではないが) 数社から商業的に利用可能である。203040

【0062】

細菌抽出物、菌体抽出物、植物抽出物、および動物抽出物の形態をした天然化合物のライブラリーは、商業的に利用でき、または当該技術分野で周知の方法により容易に作成できる。葉、樹皮、海洋試料を含む、動物源、細菌源、菌類源、植物源などの自然源から単離した化合物を、潜在的に有用な薬剤 (pharmaceutical agent) を50

内在させる候補として化学分析することが提案されている。また、スクリーニングすべき薬剤は、化学組成物または人工化合物から誘導または合成したものであってもよいことが理解されるであろう。スクリーニングでは、商業的に利用可能ないいくつかのライブラリーを使用できる。

【0063】

薬物スクリーニング (drug screening) アッセイに使用されるポリペプチドまたは断片は、自由溶液の形態でも、固体支持物に固定した形態でも、細胞内にある形態でもよい。薬物スクリーニング法の1つでは、前記ポリペプチドまたは前記断片を発現する組み換えポリヌクレオチドにより安定した状態で形質転換された真核宿主細胞または原核宿主細胞を、好ましくは競合結合アッセイで利用する。あるいは、本明細書で説明するT1D関連SNPのマイナーアレルまたはメジャーアレルを発現するドナーから初代細胞を単離することもできる。そのような細胞は、生存細胞であっても固定細胞であっても標準的な結合アッセイに使用できる。例えば、前記ポリペプチドまたは断片と、被検薬剤との複合体形成について決定し、前記ポリペプチドまたは断片と、既知の基質との複合体形成が被検薬剤により妨げられる度合いを調べることが可能である。10

【0064】

別の薬物スクリーニング技術では、コードされたポリペプチドと適切な結合親和性を有した化合物のハイスループットスクリーニングを行なうことができ、この化合物については1984年9月13日付けで公開されたGeysenのPCT公開出願第WO84/03564号で詳述されている。簡潔に説明すると、上述のものを含む種々多数の小ペプチド試験化合物を、プラスチックピンその他の何らかの固体基板上で合成する。そのペプチド試験化合物を標的ポリペプチドと反応させて洗浄する。そして、結合したポリペプチドを、当該技術分野でよく知られた方法で検出する。20

【0065】

さらに別の薬物スクリーニング技術では、非機能的な若しくは改変したT1D関連遺伝子を有する真核細胞株または真核細胞（上述したものなど）を宿主として使用する。これらの宿主細胞株または宿主細胞は、ポリペプチドレベルで不完全である。これら宿主細胞株または宿主細胞を、薬物化合物の存在下で培養する。前記宿主細胞の細胞代謝率を測定して、当該化合物が欠損細胞で細胞代謝を調節できるか決定する。本発明での使用が意図されている宿主細胞としては、細菌細胞、真菌細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞、および植物細胞などがある（これに限定されるものではない）。T1D関連SNPをコードするDNA分子を、前記宿主細胞に単独で若しくは組み合わせて導入すると、その発現によりもたらされる細胞の表現型を評価することができる。あるいは、本明細書で説明する対立遺伝子を発現するドナー細胞を使用することもできる。また、DNA分子の導入方法は、当業者によく知られている。そのような方法は、Ausubelらの編によるCurrent Protocols in Molecular Biology、John Wiley&Sons、NY, N.Y.、1995に記載されている（参照によりその開示内容を本明細書に組み込むものとする）。30

【0066】

SNPをコードする核酸がグルコース代謝に及ぼす作用を調べる上で適した細胞および細胞株と、それを使用して創薬を行なう方法とが提供される。そのような細胞および細胞株は、すでにSNPを発現する状態であるか、または本明細書で説明するSNPをコードする核酸がトランスフェクトされて、グルカゴン分泌、インスリン分泌、および／または細胞アポトーシスへの作用を決定することが可能になる。また、そのような細胞および細胞株については、本明細書で提供されるsiRNA分子と接触させることにより、グルカゴン分泌、インスリン分泌、および／または細胞アポトーシスに及ぼす作用が評価される。siRNA分子は、単独で、および2つ、3つ、4つ、および5つのsiRNAの組み合わせで試験され、これにより少なくとも1つの標的遺伝子（UBASH3A、GLI3、RASGRP1、BACH2、EDG7など）の下方制御（ダウンレギュレーション）に最も有効な組み合わせが特定される。これらの目的に適した細胞としては、IN40
50

S細胞(ATCC CRL 11605)、PC12細胞(ATCC CRL 1721)、MIN6細胞、-TC6細胞、およびINS-1 832/13細胞(Fernandezら、J. of Proteome Res. 7: 400~411)などがある(これに限定されるものではないが)。膵島細胞は、Joseph, J.ら(J. Biol. Chem. (2004) 279: 51049)に説明されているように単離および培養することができる。Diaoら(J. Biol. Chem. (2005) 280: 33487-33496)は、本明細書で説明するSNPをコードする核酸および/またはsiRNAが、グルカゴン分泌およびインスリン分泌に及ぼす作用を評価する方法論を提供している。Park, J.ら(J. of Bioch. and Mol. Biol. (2007) 40: 1058-68)は、これらの核酸分子が、膵島細胞でグルコサミンにより誘発される細胞アポトーシスに及ぼす効果を評価する方法論を提供している。
10

【0067】

発現ベクターとしては、本発明の新規性のあるDNA配列またはRNA配列を発現するよう改変した多種多様なものが利用できる。本明細書に例示する具体的なベクターは、単に例示的なものであって、本発明の範囲を限定するよう意図されたものではない。発現方法は、SambrookらのMolecular Cloning: A Laboratory Manual or Current Protocols in Molecular Biology(分子クローニング: 分子生物学における研究室マニュアルまたは現行プロトコール)16.3-17.44(1989)に説明されている。また、サッカロミセス属(サッカロマイセス属)における発現方法は、Current Protocols in Molecular Biology(分子生物学における現行のプロトコール)(1989)に説明されている。
20

【0068】

本発明を実施するための使用に適したベクターとしては、pNHベクター(Stratagene Inc., 11099 N. Torrey Pines Rd., La Jolla, CA 92037)、pETベクター(Novogen Inc., 565 Science Dr., Madison, WI 53711)、およびpGEXベクター(Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ 08854)などの原核ベクターがある。本発明の実施に有用な真核ベクターの例としては、pRC/CMV、pRC/RSV、およびpREPベクター(Invitrogen, 11588 Sorrento Valley Rd., San Diego, CA 92121)、pcDNA3.1/V5&Hisベクター(Invitrogen)、pVL1392、pVL1393、またはpAC360(Invitrogen)などのバキュロウイルス用ベクター、YRP17、YIP5、およびYEP24(New England Biolabs、米国マサチューセッツ州Beverly)やpRS403およびpRS413(Stratagene Inc.)などの酵母用ベクター、pHIL-D1(Phillips Petroleum Co., Bartlesville, OK 74004)などのピチア属用ベクター、PLNCXおよびpLPCX(Clontech)などのレトロウイルス用ベクター、そしてアデノウイルス用ベクター、アデノ随伴ウイルス用ベクターなどのベクターがある。
30
40

【0069】

本発明の発現ベクターに使用するプロモーターとしては、原核細胞または真核細胞において作用可能なプロモーターなどがある。原核細胞で作用可能なプロモーターとしては、ラクトース(lac)制御要素、バクテリオファージ(p_L)制御要素、アラビノース制御要素、トリプトファン(trp)制御要素、バクテリオファージT7制御要素、およびこれらのハイブリッドなどがある。真核細胞で作用可能なプロモーターとしては、エプスタインバーウイルスプロモーター、アデノウイルスプロモーター、SV40プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、サイトメガロウイルス(cytomegalovirus、略称CMV)プロモーター、AcMNPVポリヘドリンプロモーターなどのバキュロウイルスプロモーター、アルコールオキシダーゼプロモーターなどのピチア属プロモーターなどがある。

モーター、Gal4誘導プロモーターなどのサッカロミセス属プロモーター、およびPGK構成的プロモーター、さらに神経細胞特異的血小板由来成長因子プロモーターおよびThy-1プロモーターなどがある。

【0070】

また、本発明のベクターには、形質転換する宿主細胞の選択を容易にする種々のマーカーをいずれか1つ含めることができる。そのようなマーカーとしては、温度感受性、薬剤耐性に関連する遺伝子、または宿主生物の表現型の特徴に関連する酵素などがある。

【0071】

本発明のT1D関連SNPを発現する宿主細胞またはその機能的断片は、T1Dの発症を調節する能力を有する可能性のある化合物または薬剤をスクリーニングするシステムを提供する。そのため、一実施形態では、本発明の核酸分子を使うと、糖尿病表現型の態様を調節する薬剤を特定するためのアッセイに使用する遺伝子組み換え細胞株を生成することができる。本明細書では、後述のSNP含有核酸によりコードされたタンパク質の機能を調節することのできる化合物をスクリーニングする方法も提供される。10

【0072】

別のアプローチでは、前記SNP含有核酸によりコードされたポリペプチドの断片をファージ表面に発現するよう設計されたファージディスプレイライブラリーを使用する。次に、そのようなライブラリーをコンビナトリアルケミカルライブラリーと接触させ、その際、発現したペプチドと前記ケミカルライブラリーの成分との結合親和性が検出可能であることを条件とする。米国特許第6,057,098号および第5,965,456号では、そのようなアッセイを行う方法および装置を提供している。20

【0073】

合理的ドラッグデザインの目標は、関心のある生物活性ポリペプチドの、またはそれらと相互作用する小分子（作用薬、拮抗薬、阻害剤など）の構造的類似体（アナログ）を生成して、薬物（医薬品）を構築することであり、その薬物とは、例えば、より高活性の若しくは安定した形態のポリペプチド、またはポリペプチドの機能をin vivo（生体内）で高め若しくは妨げるものである。その例としては、Hodgson、(1991) Bio/Technology 9:19-21を参照。上述したアプローチの1つでは、関心のあるタンパク質の3次元構造、または例えばタンパク質-基質複合体の3次元構造について調べる際、X線結晶解析、核磁気共鳴、コンピュータモデル化、または最も一般的には諸アプローチの組み合わせを用いる。それより頻度は落ちるが、相同タンパク質の構造に基づいたモデル化により、ポリペプチドの構造に関する有用な情報を得ることもできる。合理的ドラッグデザインの例は、HIV（ヒト免疫不全ウイルス、通称エイズウイルス）プロテアーゼ阻害剤の開発に見られる（Ericksonら、(1990) Science 249:527-533）。また、アラニンスキャンによりペプチドを分析することもできる（Wells、(1991) Meth. Enzym. 202:390-411）。この技術では、アミノ酸残基をAla（アラニン）で置換し、それが当該ペプチドの活性に及ぼす作用を決定する。このように前記ペプチドの各アミノ酸残基を分析して、そのペプチドの重要な領域を決定する。30

【0074】

また、標的に特異的な抗体を機能的アッセイで選択し、これを単離して、その結晶構造を解析することも可能である。原則として、このアプローチではファーマコフォア（薬理作用団）が得られ、これを基盤としてドラッグデザインを後続することができる。40

【0075】

機能的な薬理活性抗体に対する抗イディオタイプ抗体（anti-id）を生成すると、タンパク質の結晶解析をすべて不要にすることができる。anti-idの結合部位は、鏡像の鏡像として、元の分子の類似体であることが予測される。次に、そのanti-idを使って、化学的または生物学的に生成されたペプチドのバンクからペプチドを特定し、これを単離する。選択されたペプチドは、ファーマコフォアとして作用するであろう。50

【0076】

このように、ポリペプチドの活性または安定性が改善され、またはポリペプチド活性の阻害剤、作用薬、拮抗薬などとして作用する薬物（医薬品）を開発することができる。本明細書で説明する S N P 含有核酸配列が利用可能になると、X線結晶解析などの解析的研究を行う上で十分な量のコードされたポリペプチドを利用できるようになる。また、本明細書で提供するタンパク質配列の知識は、X線結晶解析の代わりに、またはそれに加えて、コンピュータモデル化技術を使用する者の指針となるであろう。

【0077】

別の実施形態では、T 1 D 関連 S N P 含有核酸が利用できることにより、本発明の T 1 D 関連 S N P を有する実験用マウス系統の生成が可能になる。できるようになる。本発明の T 1 D 関連 S N P を発現するトランスジェニックマウスは、T 1 D の発症において S N P 含有核酸によりコードされたタンパク質の役割を調べる際のモデルシステムを提供する。実験用マウスに遺伝子を導入する方法は、当業者に知られている。一般的な方法としては、（1）関心のある外来遺伝子をコードするレトロウイルスベクターの、初期胚への統合、（2）新たに受精させた卵の前核へのD N A 注入、および（3）遺伝子操作された胚性幹細胞の、初期胚への組み込みの 3 つがある。上述したトランスジェニックマウスを作製することにより、異常な脂質沈着、細胞代謝の改変、およびグルコース調節を含む種々の細胞代謝過程において標的タンパク質が果たす役割の分子的解明が容易になる。そのようなマウスは、動物全体のモデルで推定治療薬剤を研究する際の *in vivo* (生体内) スクリーニングツールを提供するものであり、本発明により包含される。

10

【0078】

本明細書において、用語「動物」は、ヒト以外の脊椎動物をすべて含むよう使用される。また、胚および胎児の段階を含め、発生・成長の全段階にある個々の動物も含む。「トランスジェニック動物」とは、標的組み換え、マイクロインジェクション、または遺伝子組み換えウイルスでの感染といった細胞内レベルの意図的な遺伝子操作により、直接的または間接的に改変され若しくは受容された遺伝情報を含有する細胞を 1 若しくはそれ以上含んだすべての動物をいう。用語「トランスジェニック動物」は、古典的な異種交配または体外受精を包含するよう意図したものではなく、組み換えD N A 分子により若しくはそれを受容することにより 1 若しくはそれ以上の細胞が改変された動物を包含するよう意図したものである。この分子は、定義された遺伝子座を特異的に標的としたものであっても、染色体内で無作為に統合したものであっても、または染色体外で複製するD N A であってもよい。用語「生殖細胞系列トランスジェニック動物」とは、生殖系列細胞に遺伝子変異または遺伝情報が導入されたことにより、遺伝情報を子孫に受け渡す能力が与えられたトランスジェニック動物をいう。そのような子孫が実際に変異または遺伝情報の一部または全部を所有する場合は、その子孫もトランスジェニック動物である。

20

【0079】

遺伝情報の変異は、受容動物が属する種にとって外来性のものであっても、特定の受容個体のみに外来性のものであっても、または受容動物がすでに有する遺伝情報であってもよい。上記最後のケースでは、改変または導入された遺伝子が、天然遺伝子と異なる態様で発現する可能性がある。そのような改変された若しくは外来性の遺伝情報は、T 1 D 関連 S N P 含有ヌクレオチド配列の導入も包含する。

30

【0080】

標的遺伝子の改変に使用するD N A は、ゲノム源からの単離、単離されたm R N A 鑄型からの c D N A 調製、直接的な合成、またはこれらの組み合わせを含む（これに限定されるものではないが）多種多様な技術により得られる。

40

【0081】

遺伝子導入に好適なタイプの標的細胞は、胚性幹細胞（*embryonal stem cell*、略称 E S 細胞）である。E S 細胞は、体外培養された着床前胚から得られる（Evansら、（1981）Nature 292：154-156。Bradleyら、（1984）Nature 309：255-258。Gosslerら、（198

50

6) Proc. Natl. Acad. Sci. 83 : 9065 - 9069)。導入遺伝子は、DNAトランスフェクションやレトロウイルスを介した形質導入などの標準的な技術により、ES細胞へ効率的に導入できる。その結果得られた形質転換ES細胞は、ヒト以外の動物の胚盤胞と組み合わせることができる。導入されたES細胞は、前記胚にコロニーを形成し、その結果もたらされるキメラ動物の生殖細胞系列に寄与する。

【0082】

個々の遺伝子と各々の発現産物の寄与を決定する問題へのアプローチの1つでは、単離したT1D関連SNP遺伝子を挿入カセットとして使って全能性ES細胞（上記のものなど）に含まれる野生型遺伝子を選択的に不活性化したのち、トランスジェニックマウスを作製する。遺伝子標的破壊（gene-targeted）トランスジェニックマウスの作製における遺伝子標的破壊ES細胞の使用については、他の文献で説明およびレビューされている（Frohmanら、(1989) Cell 56 : 145 - 147。Bradleyら、(1992) Bio/Technology 10 : 534 - 539）。

10

【0083】

標的相同組み換えを使って染色体の対立遺伝子に特異的变化を挿入することにより、任意の遺伝子領域を不活性化または改変して望ましい変異を生じさせる技術は、利用可能である。ただし、100%に近い頻度で起こる染色体外相同組み換えと比較し、プラスミド-染色体相同組み換えは、当初 10^{-6} ~ 10^{-3} の頻度で検出されると報告されていた。プラスミドと染色体との非相同相互作用は、それと同等の相同挿入の 10^5 倍~ 10^2 倍高いレベルでより頻繁に起こる。

20

【0084】

このようにマウスES細胞における標的組み換え率が低いという問題を克服するため、まれな相同組み換えを検出または選択する種々の戦略が開発されてきた。相同変異事象を検出するアプローチの1つでは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使って形質転換細胞のプールをスクリーニングし、相同挿入を検出したのち、個々のクローンをスクリーニングする。あるいは、正の遺伝子選択アプローチが開発されており、その場合、相同挿入が起こった場合のみ活性化してその組み換えが直接選択されるようにするマークー遺伝子が構築される。相同組み換え選択用に開発された最も強力なアプローチの1つとしては、直接的な変異選択が存在しない遺伝子用に開発されたポジティブ-ネガティブセレクション（positive-negative selection、略称PNS）法がある。このPNS法は、マークー遺伝子が独自のプロモーターを有するため、高レベルで発現しない遺伝子を標的とする場合に、より効率的である。非相同組み換え体の選択には、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（Herpes Simplex virus thymidine kinase、略称HSV-TK）遺伝子を使い、非相同挿入体として、ガンシクロビル（GANC）または（1-(2-デオキシ-2-フルオロ-Dアラビノフラノシリル）-5-ヨードウラシル（FIAU）などの効果的なヘルペス治療薬を選択する。この対抗選択により、生存する形質転換体における相同組み換え数を増やすことができる。T1D関連SNP含有核酸を標的挿入カセットとして利用すると、例えばT1D関連SNP核酸によりコードされたポリペプチドに対し免疫学的に特異的な抗体への免疫反応性の獲得により、良好な挿入を可視化して検出する手段が得られるため、望ましい遺伝子型を伴ったES細胞のスクリーニングまたは選択が容易になる。

30

【0085】

本明細書における「ノックイン動物」とは、例えば、内因性マウス遺伝子が、本発明のヒトT1D関連SNP含有遺伝子で置換されたものをいう。そのようなノックイン動物は、T1Dの発症を研究するための理想的なモデルシステムをもたらす。

40

【0086】

本明細書における「T1D関連SNP含有核酸の発現」、「その断片」、または「T1D関連SNP融合タンパク質」は、コードされたタンパク質の発現を特定の組織または細胞型において促進する調節配列（プロモーターおよび／またはエンハンサーなど）に、T1D関連SNPの全部または一部をコードする核酸配列を作用可能に結合したベクターを

50

使って、「組織に特異的な態様」または「細胞型に特異的な態様」で標的とすることができる。そのような調節因子は、*in vitro*（体外）および*in vivo*（体内）のどちらの応用でも有利に使用することができる。組織に特異的なタンパク質発現を指示するプロモーターは、当該技術分野でよく知られており、本明細書でも説明している。

【0087】

本発明のT1D関連SNPをコードする核酸配列は、多種多様なプロモーター配列と作用可能に結合して、トランスジェニック動物で発現させることができる。そのようなプロモーターとしては、ハムスターおよびマウスのプリオンプロモーター（MOPrP）などのプリオン遺伝子プロモーター（米国特許第5,877,399号およびBorcheltらのGenet. Anal. 13(6) (1996) ページ159~163で説明されている）、ラット神経特異的エノラーゼプロモーター（米国特許第5,612,486号および第5,387,742号）、血小板由来成長因子B遺伝子プロモーター（米国特許第5,811,633号）、脳特異的ジストロフィンプロモーター（米国特許第5,849,999号）、Thy-1プロモーター、PGKプロモーター、CMVプロモーター、神経特異的血小板由来成長因子B遺伝子プロモーター、およびグリア細胞での導入遺伝子発現に寄与するグリア纖維性酸性タンパク質（glial fibrillar acidic protein、略称GFP）プロモーターなどがある（これに限定されるものではないが）。

【0088】

本発明のトランスジェニックマウスを使用する方法についても、本明細書で提供する。T1D関連SNPまたはそのコードされたタンパク質を含んだ核酸を導入したトランスジェニックマウスは、例えばT1Dの発症を調節できる治療薬を特定するための治療薬スクリーニング方法を開発する上で有用である。

【0089】

医薬品及びペプチド治療法

本明細書に記載された細胞代謝におけるT1D関連SNPsによって担われる役割の解説は、T1Dの治療及び診断に有用な薬学的組成物の開発を容易にする。これらの組成物は、上述した物質の1つに加えて、薬学的に許容可能な賦形剤、担体、バッファー、安定剤、或いは本分野の当業者にはよく知られている他の物質を有する。そのような物質は、非毒性であるべきで、有効成分の有効性を妨害すべきでない。

【0090】

それが、個人へ投与される本発明に従ったポリペプチド、抗体、ペプチド、核酸分子、小分子或いは他の薬学的に有用な化合物のいずれであっても、「予防的に有効な量」或いは「薬学的に有効な量」（場合によっては、予防が治療法と見なされる）で投与されることが好ましく、これは個人に対して利益を示すのに十分な量である。

【0091】

現在理解されているように、RNA干渉は、多段階プロセスが関与している。二本鎖RNAsは、エンドヌクレアーゼダイサー（Dicer）によって切断され、ヌクレオチド断片（siRNA）を生じる。そのsiRNA二本鎖は、2つの一本鎖RNAsへ分解され、その一本鎖は、標的RNAの切断へと導くガイドRNAとして機能するタンパク質含有複合体へ取り込まれ（Schwarz et al., Mol. Cell. 10: 537-548 (2002), Zamore et al., Cell 101: 2533 (2000)）、特異的な遺伝的メッセージを発現抑制（silencing）する（Zeng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 9779 (2003)）を参照のこと）。

【0092】

本発明は、哺乳類におけるT1Dを治療する方法を含む。例示的な方法としては、UBASH3A（GenBank番号：NM_018961；配列ID番号：1）、GLIS3（GenBank番号：NM_001042413；配列ID番号：2）、RASGRP1（GenBank番号：NM_005739；配列ID番号：3）、BACH2（G

10

20

30

40

50

enBank 番号 : NM_021813 ; 配列ID番号 : 4)、及び EDG7 (GenBank Acc. 番号 : AY322547 ; 配列ID番号 : 5) からなる群から選択された遺伝子標的へ向けられた siRNA 分子の薬学的に有効な量を哺乳類へ投与する工程を必要とする。その siRNA は、上述した遺伝子の発現を阻害する。好ましくは、哺乳類はヒトである。本明細書で用いられたように、「患者」という用語はヒトを意味するものである。

【0093】

送達方法と同様に、UBASH3A、GLI3、RASGRP1、BACH2 及び EDG7 の発現を阻害するよう向けられた特異的 siRNA 調製は、T1D を治療するための新規治療法として提供される。表 6 から 10 を参照のこと。siRNA は、以下で議論するように、担体と共に全身性に或いは局所性に in vivo で患者へ送達され得る。本発明の組成物は、単独で、或いはその組成物の有効性を増強するような他の薬剤或いは遺伝子コード化タンパク質との組み合わせで使用される。

10

【0094】

「膜透過性ペプチド配列」とは、細胞膜を横切って siRNA が透過し移行するのを促進することができるペプチド配列を意味する。例示的なペプチドには、これに限定されることなく、本明細書で例示されたカポジ (Kaposi) 線維芽細胞増殖因子、HIV tat ペプチド (Vives et al., J. Biol. Chem., 272: 16010 - 16017, 1997)、プロタミンからの非毒性膜転位 (membrane translocation) ペプチド (Park et al., FASEB J. 19(11): 1555 - 7, 2005)、CHARIOT (登録商標) 導入試薬 (Active Motif; 米国特許第 6,841,535 号) 及び抗菌ペプチドBuforin 2 が含まれる。

20

【0095】

本発明の 1 実施形態において、siRNAs は治療的利益のために送達される。これに限定されるものではないが、ネイキッド siRNA 送達、siRNA 共役及び送達、リポソーム担体 - 仲介性送達、ポリマー担体送達、ナノ粒子組成物、プラスミド - ベース法、及びウイルスの使用を含む、T1D を治療するために本発明の siRNA を in vivo で投与するためのいくつかの方法がある。

30

【0096】

本発明の siRNA 組成物は、対象へ投与するためのリポソーム含む送達媒体、担体及び希釈剤、及びそれらの塩類を有するものである、及び / 若しくは薬学的に許容可能な処方で存在し得る。核酸分子を送達するための方法は、Akhtar et al., 1992, Trends Cell Biol., 2, 139; Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995, Maurer et al., 1999, Mol. Membr. Biol., 16, 129 - 140; Hofland and Huang, 1999, Handb. Exp. Pharmacol., 137, 165 - 192; 及び Lee et al., 2000, ACS Symp. Ser., 752, 184 - 192 において記載されており、Beigelman et al., 米国特許番号第 6,395,713 号及び Sullivan et al., 国際公報第 WO 94/02595 号ではさらに、核酸分子を送達するための一般的な方法が記載されている。これらのプロトコールは、実質的にあらゆる核酸分子を送達するのに利用され得る。

40

【0097】

患者への siRNA の投与の頻度はさらに、これに限定されるものではないが、治療される T1D のタイプ及び重症度、投与経路、個人の年齢と健康全般、siRNA の性質、及びそれらと同様のことを含むいくつかの因子に依存して変わるであろう。患者への siRNA の投与の頻度は、数ヶ月毎に約 1 回から 1 ヶ月に約 1 回、1 週間に約 1 回、1 日約 1 回、一日に数回と変えられることが考慮される。

50

【0098】

本発明の方法において有用な薬学的組成物は、非経口、経口固形及び液体処方、点眼、坐薬、エアロゾル、外用薬或いは他の類似処方で全身性に投与される。適切な siRNA に加えて、これらの薬学的組成物は、薬学的に許容可能な担体、及び薬剤投与を増強し促進すると知られている他の成分を含む。従ってそのような組成物は任意に、例えば、アルミニウム及び水酸化マグネシウムの水性懸濁液などのアジュバントのような他の構成成分、及び／若しくは生理食塩水などの他の薬学的に許容可能な担体を含む。ナノ粒子、リポソーム、再シール赤血球 (resealed erythrocytes)、及び免疫学的に基づいたシステムなどの他の可能な処方も、本発明の方法に従って、患者へ適切な siRNA を投与するために使用される。siRNA を送達するためのナノ粒子、さらには使用され得る細胞膜透過性ペプチド担体の使用は、Crombez et al., Biomedical Society Transactions v35: p44 (2007) に記載されている。10

【0099】

T1Dを治療するための本発明の方法は、薬学的組成物における少なくとも1つのUBASH3A、GLIS3、RASGRP1、BACH2及びEDG7のsiRNAの投与に関連している。そのsiRNAは、siRNA及び薬学的に許容可能な担体を有する薬学的組成物として個人へ投与される。薬学的に許容可能な担体は、本分野ではよく知られており、生理学的緩衝食塩水などの水性溶液、グリコール、グリセロール、オリーブオイルなどのオイル、若しくは注射可能な有機エステルなどの他の溶媒或いは媒体が含まれる。20

【0100】

薬学的に許容可能な担体は、例えば、siRNAを安定化する、或いは薬剤の吸収を増加するように作用する生理学的に許容可能な化合物が含まれ得る。そのような薬学的に許容可能な化合物には、例えば、グルコース、スクロース或いはデキストランなどの糖類、アスコルビン酸或いはグルタチオンなどの抗酸化剤、キレート剤、低分子量タンパク質、若しくは他の安定剤或いは賦形剤が含まれる。本分野の当業者は、生理学的に許容可能な化合物を含む薬学的に許容可能な担体の選択は、例えばsiRNAの投与の経路に依存していることを理解するものである。30

【0101】

本分野の当業者は、siRNAを有する薬学的組成物は、例えば静脈内 (i.v.)、筋肉内、皮下、眼窩内、関節内、腹腔内 (i.p.)、大槽内、気管内 (i.t.) 或いは関節内など、経口的或いは非経口的に様々な経路によって、若しくは受動的或いは促進性吸収によって、対象へ投与され得ることを理解する。投との同じ経路は、例えば、以上で議論されたような小分子、核酸分子、ペプチド、抗体及びポリペプチドなどの他の薬学的に有用な化合物でも使用され得る。30

【0102】

siRNA阻害剤を有する薬学的組成物も、必要に応じて、リポソーム、微粒子、微小気泡、或いは他のポリマーマトリックスへ取り込まれ得る (Gregoriadis, Liposome Technology, Vols. I to III, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton Fla. (1993))。例えば、リン脂質或いは他の脂質から成るリポソームは、製造し投与するのが比較的に単純である、非毒性で生理学的に許容可能で、代謝可能な担体である。40

【0103】

薬学的調合は、本明細書に記載された配列を含むSNPを標的にしたsiRNA、或いはsiRNAをコード化した発現ベクターを有する。そのような薬学的調合は、T1Dを治療するために患者へ投与され得る。

【0104】

siRNA分子の発現用の発現ベクターは好ましくは、構成的或いは制御された強力プロモーターを利用する。そのようなプロモーターは、本分野でよく知られており、これに50

限定されるものではないが、RNAポリメラーゼIIプロモーター、T7 RNAポリメラーゼプロモータ、及びRNAポリメラーゼIIIプロモーターU6及びH1が含まれる（例えば、Myslinski et al. (2001) Nucl. Acids Res., 29: 2502-09を参照のこと）。

【0105】

処方されたsiRNA組成物は、1若しくはそれ以上のsiRNA分子、或いは、1若しくはそれ以上のsiRNA分子をコード化したベクターを、単独で或いは陽イオン性脂質、中性脂質及び／若しくはポリエチレングリコール-ジアシルグリセロール(PEG-DAG)或いはPEG-コレステロール(PEG-Chol)共役体との組み合わせで有する組成物であり得る。限定されない発現ベクターの例としては、Paul et al. (2002), nature Biotechnology, 19, 505; Miyagishi ant Taira (2002), Nature Biotechnology, 19, 497; Lee et al. (2002), Nature Biotechnology, 19, 500-505に記載されている。
10

【0106】

脂質ナノ粒子組成物は、1若しくはそれ以上の生物学的活性分子を、単独で或いは陽イオン性脂質、中性脂質、及び／若しくはポリエチレングリコール-ジアシルグリセロール（すなわち、ポリエチレングリコールジアシルグリセロール(PEG-DAG)、PEG-コレステロール、或いはPEG-DMB)共役体との組み合わせで有する組成物である。1実施形態において、生物学的活性分子は、本発明の生物学的活性分子（すなわちsiRNA）を有する水性溶液を提供する工程、脂質ナノ粒子を有する有機溶液を提供する工程、2つの溶液を混合する工程、その溶液をインキュベートする工程、希釈し限外濾過する工程の結果として脂質ナノ粒子に被包され、その結果ナノ粒子組成物を產生するのに適した濃度を生じさせる。
20

【0107】

核酸分子は、生分解性ポリマー、ハイドロゲル、シクロデキストリン（例えば、Gonzalez et al. (1999), Bioconjugate Chem., 10, 1068-1074; Wang et al. (国際公報番号第WO 03/47518号及び第WO 03/46185号を参照のこと)）、生分解性ナノカプセル、及び生物接着性微粒子などの他の媒体への取り込みによって、若しくはタンパク質性ベクター(O'Hare and Normand、国際公報第WO 00/53722号)によって細胞へ投与され得る。
30

【0108】

陽イオン性脂質及びポリマーは、2つのクラスの非ウイルス性siRNA送達であり、これは負に電荷したsiRNAと複合体を形成できる。自己組織化PEG-化(ylated)ポリカチオンポリエチレンイミン(PEI)も、siRNAを縮合し保護するために使用されていた(Schiffelers et al. (2004), Nuc. Acids Res. 32: 141-110)。siRNA複合体は、ナノ粒子へ縮合され、エンドサイトーシスを通じてそのsiRNAの有効な取り込みが可能となる。さらに、プロタミンの核酸-縮合特性は、特異的抗体と組み合わされてsiRNAsを送達し、本発明において使用され得る(Song et al. (2005), Nat. Biotech. 23: 709-717)。
40

【0109】

T1Dを患った個人を治療し、疾患の徵候或いは症状を軽減するために、siRNAは、有効な用量で投与されなくてはならない。総治療用量は、単一用量で対象へ投与され得る、若しくは、分割された治療プロトコールを用いて投与され、ここにおいて複数回投与とは、例えば1日以上かけて1日投与量を投与するなどのより長期間かけて投与される、若しくは、望ましい期間以上で用量を投与するためにより長い期間をかけて投与されることである。本分野の当業者は、対象において有効な用量を得るために必要とされるsiRNAの量は、対象の年齢、体重及び健康全般、さらには投与の経路及び投与される治療数
50

を含む多くの因子に依存していることを理解しているものである。これらの因子を考慮して、当業者は、T1Dを患った個人を治療するのに有効な用量を得るように特定の用量を調節する。

【0110】

s i R N A の有効な用量は、投与のモード、及び治療される個人の体重に依存するであろう。本明細書に記載された投与量は一般的に平均成人に対する投与量であるが、小児の治療用に調節され得る。用量は一般的に、約0.001mg～約1000mgの範囲である。

【0111】

特定の処方におけるs i R N A の濃度は、投与のモード及び頻度に依存するであろう。
所定の1日投与量は、処方におけるs i R N A 濃度が望ましい1日投与量を満たす限り、
单一用量で或いは複数回用量で投与され得る。本分野の当業者は、処方におけるs i R N A の量を調節し、所定の期間でs i R N A の望ましい濃度を提供するような単一用量或いは複数回用量の投与が可能である。

10

【0112】

T1Dを患った個人において、特により重症型の疾患において、s i R N A の投与は、
例えばそのような疾患を治療するための従来の薬剤との組み合わせで投与された場合、
特に有用となり得る。当業者は、単独で或いは組み合わせでs i R N A を投与し、
膵ベータ細胞機能定量、放射線学的方法、免疫学的方法、或いは望ましい場合は病理組織学的方法
などの日常的な方法を用いてそのような治療の有効性をモニタリングする。糖尿病の治療
用の他の従来の薬剤には、インスリン投与、グルカゴン投与、若しくはこれらの2つの分子
のレベルを変える薬剤が含まれる。G l u c o p h a g e (登録商標)、A v a n d i a
(登録商標)、A c t o s (登録商標)、J a n u v i a (登録商標)及びG l u c o
v a n c e (登録商標)はそのような薬剤の一例である。

20

【0113】

薬学的調製の投与は、好ましくは個人に利益を示すのに十分である「有効な量」である。
この量は、患者におけるT1D症状の重症度を予防、軽減、寛解或いは減少させる。

【0114】

薬学的調製は、投与の容易さ及び投与量の均一性のために投与量単位形態で処方される。
本明細書で用いられたように、投与量単位形態とは、治療を受ける患者に適切な薬学的
調製の物理学的に分離した単位を意味する。各投与量は、選択された薬学的担体と関連した
望ましい効果を生じるように計算された有効成分の量を含むべきである。適切な投与量
単位を決定するための手順は、本分野の当業者にはよく知られている。

30

【0115】

投与量単位は、患者の体重に基づいて、比例して増加或いは減少される。特定の病態を
軽減するために適切な濃度は、本分野では既知である投与量濃度曲線計算によって決定さ
れる。

【0116】

以下に説明した方法は、本発明の実行を容易にするために提供される。

【0117】

40

シグナル蒸留 (S i g n a l d i s t i l l a t i o n)

本発明者らは、I l l u m i n a H u m a n H a p 5 5 0 B e a d C h i p を用いて、563のT1D発端者 (p r o b a n d s)、及び1,146のコントロール + 483の完全T1D家族トリオからの白人に対して作成された本発明者らのゲノムワイド遺伝子型データから、少なくとも名目上有意な組み合わせP - 値 (主要組織適合抗原領域は除外される)を有するS N P s を選択した。本発明者らは次に、モントリオールからの939の核T1D家族及び1型糖尿病遺伝子コンソーシアム (T1D G C) の独立したコホートにおいて、I l l u m i n a G o l d e n G a t e p l a t f o r m を用いて、これらのS N P s の遺伝子型を同定した。その後、本発明者らは、以前記載されていなく全コホートを通じて名目上有意であった、遺伝子座におけるS N P s をT1Dに対して同定

50

するために、全てのコホート + ワールドワイドウェブである w t c c c . o r g . u k¹
⁷ 上で公的に利用可能な Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC) データセットを検討した。本発明者らは、それぞれ Illumina 1M 及び Human Hap550K BeadChips 上に遺伝子型を同定された、フィラデルフィアからの独立マッチドコントロールデータセットを用いて D C C T / E D I C 研究から T 1 D 発端者においてクエリーし、更なる研究のために 5 つの遺伝子座を選択した。

【 0 1 1 8 】

対象

1. カナダからの 1 型糖尿病コホート :

カナダ人のコホートは、モントリオール、トロント、オタワ及びウィニペグにおける小児糖尿病クリニックで集められた、1,120 核家族トリオ（1人の患児と2人の親）及び 267 の独立した T 1 D ケースから構成されていた。発症時の年齢中央値は、4.6 歳と 11 歳の上位及び下位四分位点を伴った、8 歳であった。全ての患者は、18 歳未満で診断され、診断以来インスリンで治療されており、それ以降どんな理由でも治療をやめていない。疾患診断は、あらゆるラボテストではなく、これらの臨床判断基準に基づいていた。民族的背景は、フランス系カナダ人である最大単独サブセット（409 家族）を有する、ヨーロッパ人家系の混合であった。モントリオール小児病院及び他の参加センターの研究倫理委員によって研究が認可されており、文書によるインフォームドコンセントは全患者から得られていた。

10

【 0 1 1 9 】

2. 1 型糖尿病遺伝子コンソーシアムコホート :

1 型糖尿病遺伝子コンソーシアムコホートは、2005 年 7 月現在でデータが決定している、少なくとも 2 人の子供が糖尿病と診断され両親が応対できる 549 家族（2350 個人）から構成されていた。判断基準は、診断時に 35 歳未満で、診断の 6 ヶ月以内でインスリンによる治療が中断されていないこととした。35 歳以下で診断された発端者の同胞に対して、診断時の年齢制限は、彼らに傾向があり、抗体が陽性であった及び／若しくは診断時に低 C - ペプチドレベルであった場合、45 歳まで延長した。年齢中央値は、4 歳及び 13 歳の四分位点を伴った、8 歳であった。サンプルは、ヨーロッパ、北アメリカ及びオーストラリアで集め、ほとんどの対象は祖先がヨーロッパ人であった。自己抗体結果は利用可能ではあるが、上述したことを利用して診断を実証するためには使用しなかった。

20

【 0 1 2 0 】

3. フィラデルフィアからの 1 型糖尿病コホート :

T 1 D コホートは、2006 年 9 月からフィラデルフィア小児病院（C H O P）で集められた 103 人の小児から構成されていた。全ての患者は 18 歳以下で診断されていた。その内、49 人の T 1 D 患者（32 人の女性、17 人の男性）は、自己報告（発症の平均年齢は 7.07 歳；範囲は 9 ヶ月～14 歳）によって白人であり、彼らは解析に含まれた。全員、診断からインスリンで治療されており、それ以降どんな理由でも治療をやめていなかった。C H O P の研究倫理委員でその研究は認可されており、文書によるインフォームドコンセントが全患者から得られていた。

30

【 0 1 2 1 】

4. 糖尿病コントロール及び合併症の大規模臨床研究 / 糖尿病の疫学

合併症及び介入（D C C T / E D I C ）1 型糖尿病コホート :

D C C T は、1 型糖尿病を患った患者における網膜症及び腎症合併症の発症及び進行を軽減することに関わる、集中インスリン治療の効果を決定するための多施設ランダム化臨床治験であった¹⁹、²⁰。1 型糖尿病を患った総数 1,441 人の対象は、1983～1989 年の間に北アメリカ中の 29 のセンターから D C C T へ集められた；彼らは 13～39 歳の間であり、53 % が男性であった。彼らは 2 つのコホートへ分けられた：第一の予防コホートは、網膜症がなく、アルブミン排出速度が < 28 μg / 分であり、1～5

40

50

年間糖尿病を患っており、集中治療によって網膜症のない患者において糖尿病性網膜症の発症を予防したかどうか以前決定されていた、726人の対象から構成されていた；第二の介入コホートは、非増殖性網膜症を患っており、尿中アルブミン排泄速度が<140 μg / 分であり、1～15年間糖尿病を患っており、集中治療が初期網膜症の進行に影響を与えていたかどうか決定するためにテストされていた、715人の対象から構成されていた¹⁹。DCCCT / EDIC遺伝子研究に対する認可は、トロントの小児病院（the Hospital for Sick Children）の研究倫理委員によって提供されていた。

【0122】

Illumina 1Mアッセイによって、全ての利用可能な発端者に対して遺伝子型を同定した。大多数が自己報告による白人発端者からの集団層別化であるので、異常値を検出し除去するために、Eigenstrat²¹を使用し、系列分析によって発端者を選択した。異常値の排除後、T1Dの診断時の平均年齢が21歳（SD = 8、範囲が0～38）である1303のDCCCT / EDIC発端者（695人の男性、608人の女性）が存在した。

10

【0123】

5. フィラデルフィアからのコントロール対象：

コントロール群には、自己報告で白人である1,146人の小児で、平均年齢が9.42歳；53.05%が男性で46.95%が女性であり、糖尿病を患っていない或いはT1Dの第一度近親がいない小児が含まれた。1,100のDCCCT / EDIC T1D発端者と以前マッチしていたコントロール群には、自己報告で白人である2,024人の小児で、平均年齢8.82歳；50.83%が男性で49.17%が女性であり、糖尿病を患っていない或いはT1Dの第一度近親がいない小児が含まれた。これらの個人は、4つのプライマリケアクリニック、及び小児の来診がよくあるいくつかのグループ診察室及び外来診察室を含む、CHOPヘルスケアネットワーク内のCHOPの臨床医及び看護スタッフによって集められた。これらの2024人の個人の内、1673人は、上述のDCCCT / EDIC発端者（868人の男性、801人の女性、4人のあいまいな性別）と同様に、eigenstratからの集団層別化解析を用いて選択された。CHOPの研究倫理委員は本研究を認可しており、文書によるインフォームドコンセントは全患者から得られていた。

20

【0124】

遺伝子型同定

本研究の遺伝子型は、IlluminaからのInfinium及びGoldengateプラットフォームを用いて得た。本発明者らは、CHOPの応用ゲノムセンターにある、Illumina Infinium（商標）II HumanHap550 BeadChip技術^{1,2}（Illumina, ダンディエゴ）を用いて、高処理ゲノム-ワイドSNP遺伝子型同定を実行した。本発明者らは、製造者ガイドラインに従って、各サンプルの遺伝子型を同定するために750ngのゲノムDNAを用いた。DCCCT / EDICサンプルは、Immumin（サンディエゴ、カリフォルニア州）にてIllumina 1Mチップ上で遺伝子型を同定した。

30

【0125】

統計学

関連に対する全ての統計学的テストは、ソフトウェアパッケージplink²²を用いて実行した。ゲノム-ワイドデータに対する単一マーカー解析は、563ケース群及び1,146コントロール群の間のアレル数差異に対する²テストを用いて実行した。オッズ比及び一致する95%信頼区間は、関連解析を計算した。連鎖不均衡存続検定は、T1Dトリオ及び核家族における連鎖及び非連鎖アレル数の間の差異に対するP-値を計算するために使用した。発症した子孫に対するヘテロ接合性両親からの非連鎖及び連鎖アレルの数は、Haploviewソフトウェアパッケージ⁴に組込まれている標準連鎖不均衡存続検定を用いて決定した。本発明者らの3つの発見コホートにおけるケース-コントロ

40

50

ール及び家族 - ベース解析からの P - 値は、F i s h e r 法⁵を用いて組み合わせ、関連に対する総合的なエビデンスを定量化した。

【 0 1 2 6 】

以下の実施例は、本発明の特定の実施形態を説明するために提供されるものである。それらは、本発明を制限することを意図するものではない。

【 実施例 1 】

【 0 1 2 7 】

T 1 D に関連した遺伝子座位

1型糖尿病（T 1 D）は、臍臓 - 細胞の自己免疫破壊に由来する強力な遺伝要素を有する多因子疾患である。6 p 2 1¹上のH L A クラス I I 遺伝子にマッピングされ高度多型抗原 - 提示タンパク質をコード化する、主要な T 1 D 感受性座位は、T 1 D に対する遺伝子リスクのほぼ 5 0 % を占める。より中等度の影響があるいくつかの他の座位は、リスクの 1 0 ~ 2 0 % を占める²。これらには以下が含まれる：（1）インスリンの胸腺発現及び耐性を調節する、主要な T 1 D 抗原である⁴、⁵、インスリン（I N S）V N T R³；（2）T C R シグナリングのネガティブ制御因子の機能に影響を与える⁶、P T P N 2 2 でのA r g 6 2 0 T r p - 塩基多型（S N P）；（3）I L 2 受容体複合体（C D 2 5）の鎖をコード化し、免疫の受容な修飾因子であるI L 2 R A での非 - コーディングS N P s⁷ - ⁹；（4）C T L A 4 座位¹ ⁰における変異体であり、そのタンパク質産物は、T 細胞活性化を減弱化する阻害シグナルを伝達するものである。これら T 1 D 関連遺伝子の全てが免疫機能を有して細胞中に発現し、I N S 以外の全てが他の自己免疫疾患に関連していたということは何の意味もない。

【 0 1 2 8 】

高処理一塩基多型（S N P）遺伝子同定アレイ技術の最近の発展によって、本発明者ら¹ ¹や他の研究者ら¹ ²、¹ ³は、残存 T 1 D 座位の検索におけるゲノム - ワイド関連（G W A）研究が可能になった。T 1 D における最初の使用成功例は、1 2 , 0 0 0 の非同義S N P s のスクリーニングに関連しており、これは、r s 1 9 9 0 7 6 0 とのT 1 D 関連で発見され、I F I H 1 遺伝子（ヘリカーゼC ドメイン1で誘導されたインターフェロン）¹ ⁴上のA l a 9 4 6 T h r 置換に関連しているものである。本発明者らは最近、T 1 D に対する本発明者らのG W A の結果を報告し、そこにおいて本発明者らは、独立コホートにおけるT D T 複製試行の成功に続いて、ヨーロッパ人家系の大規模小児 T 1 D コホートを調べた。以前に同定された座位を確認することに加えて、本発明者らは、最近C - タイプレクチンドメインファミリー 1 6 メンバー A（C L E C 1 6 A）と新たに命名された遺伝子産物である、K I A A 0 3 5 0 との高度な有意関連を観察し；その後の本発明者らのフォローアップデータでも1 2 q 1 3¹ ⁶上の座位が明らかになった。The We ll c o m e T r u s t C a s e C o n t r o l C o n s o r t i u m¹ ⁷でも、1 2 q 2 4 及び 1 8 p 1 1 上の他の座位に沿って、その後フォローアップされ複製された¹ ⁸、1 6 p 1 3 及び 1 2 q 1 3 の同じ領域との関連が証明された。

【 0 1 2 9 】

本発明者らは、付加的な新規 T 1 D リスク座位を明らかにするためのフォローアップ戦略を実行した。本明細書では、本発明者らは、この過程の間で T 1 D に有意に関連した 2 つの座位を記載するものであり、その両者は、自己免疫と生物学的に関連のある遺伝子に属するものである。これらの遺伝子は、それぞれ、ユビキチン - 関連及びS H I I I ドメイン - 含有タンパク質 A（U B A S H 3 A）、及びB T B 及びC N C ホモロジー 2（B A C H 2）をコード化しており、その両者は T 細胞シグナリングに関連すると知られている。

【 0 1 3 0 】

T 1 D 発端者及びコントロール + 同じ祖先の T 1 D 家族トリオで作成された本発明者らの遺伝子同定データの組み合わせから、本発明者らは、主要組織適合複合体に属さず、T 1 D に少なくとも名目上有意に関連しているという 2 つの判断基準を満たす、9 8 2 のS N P s を選択した。次に本発明者らは、モントリオール及び T 1 D G C からの核 T 1 D 家

10

20

30

40

50

族の独立したコホートにおける付加的遺伝子同定へとこれらの S N P s を進めた。表 1 に示されたように、33 の一点 (single point) 関連が、この過程の発見ステージで利用した 4 コホート全てで、少なくとも名目上有意に存在した。しかしながら、それらの大部分は、以前に報告されており、従って新規ではない、すなわちそれらは十分確立された P T P N 2 2⁶、12q13^{1 6}、^{1 8}、K I A A 0 3 5 0^{1 5}、^{1 8}、I L 2 R A^{7 - 9}、C T L A 4^{1 0} 及び I F I H 1^{1 4} 座位に属しているものであった。しかしながら、5 つの座位に属している 6 個の S N P s は、更なる複製試行に対する本発明者らの判断基準を満たしていた。

【0131】

【表 1】

表 1 さらなる複製試行に対する候補座位の選択に利用されるコホートデータセット。太字で示された6つのSNPsは、さらなる研究に適していると見なされた新規関連を表している。
 マイナーアレル頻度、P-値及びオッズ比(OR)が示してある。3つの発見コホートに対する組み合わせP-値も、そのマーカーが属している遺伝子と共に示してある
 P-値はそれぞれの場合において両側で示してある。Affalleles freqは患者個人ににおけるアレル頻度；Ctrl alleles freqは非患者個人ににおけるアレル頻度；Transcripts是伝達アレルに対する伝達アレルの割合である。*遺伝子は以前T1Dと関連付けされていなかったものである。

Chr	SNP	on	T1D家族-モントリオール及びT1DGCC			ケース-コントロールコホート			T1D家族トリオ			組み合わせ			WTCCC			
			Transcripts			OR	TDT P-value	Aff allele freq	Ctrl allele freq	P	OR	Transcripts	OR	TDT P-value	Aff allele freq	Ctrl allele freq		
1	rs235894	114230984	398:287	2.22x10 ⁻⁶	1.387	0.232	0.175	7.11x10 ⁻⁵	1.426	181:127	1.425	0.0021	1.25x10 ⁻⁶	0.246	0.179	4.05x10 ⁻⁶	1.504	
1	rs14221851	114221851	492:379	1.298	1.28x10 ⁻⁴	0.288	0.237	9.50x10 ⁻⁴	0.0015	1.289	1.283	0.013	5.53x10 ⁻⁷	0.287	0.226	1.08x10 ⁻¹	1.377	
1	rs722353	114221885	474:354	1.339	3.04x10 ⁻⁶	0.284	0.242	9.75x10 ⁻⁴	0.0015	1.309	218:165	1.321	0.0058	5.47x10 ⁻⁶	0.287	0.227	2.63x10 ⁻¹	1.368
1	rs123061	113887113	456:331	1.378	8.36x10 ⁻⁶	0.267	0.216	8.75x10 ⁻⁴	0.0013	1.324	209:161	1.298	0.013	2.58x10 ⁻⁶	0.276	0.217	3.34x10 ⁻¹	1.371
1	rs1217407	114195271	505:395	1.278	2.46x10 ⁻⁴	0.258	0.244	7.42x10 ⁻⁴	0.0002	1.316	226:168	1.339	0.004	1.79x10 ⁻⁷	0.258	0.240	1.70x10 ⁻⁶	1.344
1	rs4635335	114035394	482:354	1.362	9.56x10 ⁻⁶	0.3	0.25	6.00x10 ⁻⁴	0.0002	1.285	224:172	1.322	0.009	4.56x10 ⁻⁸	0.289	0.241	2.81x10 ⁻⁶	1.339
12	rs10876864	54687352	631:528	1.195	0.0026	0.458	0.388	8.35x10 ⁻⁵	0.0002	1.336	265:188	1.41	0.97x10 ⁻⁴	1.86x10 ⁻⁴	0.475	0.414	2.04x10 ⁻⁹	1.283
12	rs1701704	54698754	549:425	1.292	7.09x10 ⁻⁵	0.379	0.303	9.88x10 ⁻⁴	0.0002	1.402	245:180	1.361	0.0016	4.61x10 ⁻¹⁰	0.397	0.339	5.91x10 ⁻⁸	1.282
16	rs2041670	11082153	384:444	0.865	0.037	0.265	0.265	2.01x10 ⁻⁴	0.0002	0.682	172:233	0.738	0.0024	5.00x10 ⁻⁸	0.284	0.316	7.05x10 ⁻⁸	0.781
16	rs728613	11077184	397:465	0.854	0.021	0.3	0.3	3.09x10 ⁻⁷	0.0002	0.672	178:248	0.718	0.0024	1.70x10 ⁻⁷	0.282	0.340	3.90x10 ⁻⁸	0.797
12	rs11717110	54685345	464:574	0.808	6.40x10 ⁻⁴	0.405	0.405	0.462	0.0016	0.792	197:244	0.807	0.025	4.32x10 ⁻⁶	0.404	0.452	2.40x10 ⁻⁸	0.821
10	rs7072793	61462727	574:507	1.132	0.042	0.486	0.41	2.98x10 ⁻⁵	0.0017	1.386	268:200	1.34	0.0017	4.54x10 ⁻⁷	0.455	0.409	6.24x10 ⁻⁸	1.207
10	rs7073236	6146558	566:464	1.22	0.0015	0.487	0.414	5.67x10 ⁻⁵	0.0015	1.345	284:196	1.347	0.0015	3.62x10 ⁻⁶	0.455	0.409	7.31x10 ⁻⁸	1.205
10	rs3118470	6141719	504:431	1.169	0.017	0.385	0.306	4.62x10 ⁻⁴	0.0002	1.308	240:181	1.326	0.004	5.26x10 ⁻⁶	0.361	0.319	1.320x10 ⁻⁵	1.208
16	rs1035686	10955851	517:451	1.146	0.034	0.48	0.42	8.25x10 ⁻⁵	0.0002	1.277	265:212	1.25	0.015	5.25x10 ⁻⁶	0.482	0.337	2.58x10 ⁻⁵	1.190
2	rs231726	204449111	502:427	1.176	0.014	0.358	0.321	0.028	0.002	1.184	228:177	1.288	0.011	4.00x10 ⁻⁴	0.372	0.332	5.10x10 ⁻⁵	1.191
2	rs1990760	162832297	422:518	0.815	0.0017	0.398	0.434	0.048	0.004	0.864	203:251	0.809	0.024	2.00x10 ⁻⁴	0.350	0.388	6.73x10 ⁻⁵	0.845
10	rs708779	6138890	424:506	0.838	0.0072	0.425	0.482	2.60x10 ⁻⁴	0.002	0.764	185:257	0.772	0.16x10 ⁻⁴	2.68x10 ⁻⁴	0.419	0.458	0.852	1.2R
2	rs826169	204430997	521:459	1.135	0.048	0.426	0.38	4.62x10 ⁻⁴	0.0002	1.212	236:191	1.236	0.029	5.28x10 ⁻⁶	0.361	0.319	1.320x10 ⁻⁵	1.167
2	rs1024161	534:462	1.156	0.023	0.439	0.439	0.425	8.25x10 ⁻⁵	0.0002	1.277	265:212	1.25	0.015	5.25x10 ⁻⁶	0.482	0.337	2.58x10 ⁻⁵	1.166
16	rs1353041	109858309	291:345	0.844	0.032	0.172	0.246	1.01x10 ⁻⁶	0.0002	0.637	145:183	0.792	0.036	2.72x10 ⁻⁷	0.175	0.204	0.00028	0.825
16	rs17673553	11149407	319:387	0.824	0.01	0.202	0.202	0.279	0.0002	0.685	146:203	0.719	0.0023	9.88x10 ⁻⁸	0.217	0.249	KIAAO	
2	rs2111485	162816762	417:500	0.834	0.0061	0.393	0.483	0.027	0.002	0.849	210:254	0.827	0.041	6.00x10 ⁻⁴	0.359	0.384	0.00034	0.856
1	rs1202954	114328503	222:172	1.291	0.012	0.136	0.105	0.008	0.0002	1.343	120:80	1.5	0.0047	5.42x10 ⁻⁸	0.130	0.109	0.00018	1.218
21	rs8976767	427094599	571:504	1.13	0.041	0.474	0.437	0.038	0.002	1.184	260:203	1.283	0.014	5.00x10 ⁻⁷	0.441	0.403	0.00024	1.135
9	rs10758583	4283083	538:462	1.17	0.015	0.492	0.426	2.97x10 ⁻⁴	0.0002	1.303	254:209	1.215	0.037	4.40x10 ⁻⁷	0.440	0.410	1.129	GLS
9	rs10758584	4283583	535:456	1.17	0.012	0.513	0.451	6.68x10 ⁻⁴	0.0002	1.282	263:209	1.211	0.041	4.17x10 ⁻⁴	0.427	0.404	1.127	GLS
1	rs752020	114328516	211:169	1.249	0.031	0.136	0.107	0.013	0.002	1.315	124:82	1.512	0.0034	1.00x10 ⁻⁴	0.134	0.115	0.00042	1.195
16	rs12331878	10949895	362:446	0.812	0.0031	0.16	0.225	1.01x10 ⁻⁵	0.0002	0.657	126:162	0.79	0.046	3.30x10 ⁻⁷	0.158	0.178	0.00088	0.865
16	rs8035657	366325556	423:342	1.24	0.0034	0.304	0.263	0.011	0.002	1.226	204:162	1.259	0.026	1.00x10 ⁻⁴	0.292	0.268	0.01	RASGF
6	rs3757247	91014184	545:482	1.13	0.049	0.504	0.455	0.0075	0.002	1.216	211:162	1.211	0.041	0.511	0.489	0.333	1.092	BAC
1	rs1983553	85093780	202:254	0.8	0.015	0.121	0.151	0.021	0.002	0.779	105:136	0.772	0.046	0.901	0.122	0.137	0.036	EDG
11	rs1004446	2126719	376:514	0.735	5.27x10 ⁻³	0.254	0.354	4.33x10 ⁻⁴	0.002	0.622	160:228	0.7018	0.56x10 ⁻¹	1.02x10 ⁻⁴	0.443	0.464	0.047	0.921

D C C T / E D I C コホートを参照すると、ユピキチン - 関連及びS H 3 ドメイン - 含有タンパク質 A (U B A S H 3 A)、及びB T B 及びC N C ホモロジー 2 (B A C H 2) をコード化した遺伝子におけるシグナルは、この 5 つの独立したコホートにおいて複製されており（表 2 ）、P - 値は、実行された 6 つのテストで補正後、有意であった。以前記載された関連と比較して、明らかにリスクは相対的に中程度であり、本発明者らの処理能力でこのサンプルサイズで行った場合にのみ、本発明者らは独立した複製を介して真の陽性としてこれらのシグナルを検出し確立することができたが；表 3 では、利用した 5 つのコホート全部を組み合わせた場合、実は $r s 9 9 7 6 7 6 7$ はゲノム - ワイドレベルで有意である、すなわち $P = 2 . 3 3 \times 1 0 ^ { - 8 }$ と示していた。

【 0 1 3 3 】

10

【 表 2 】

表 2

Chr	SNP	Position	Gene	Aff allele freq	Ctrl allele freq	OR [95% CI]	P
21	rs9976767	42709459	<i>UBASH3A</i>	0.474	0.436	1.165 [1.051-1.292]	0.0036
9	rs10758593	4282083	<i>GLIS3</i>	0.429	0.426	1.013 [0.913-1.124]	0.81
9	rs10758594	4285583	<i>GLIS3</i>	0.434	0.443	0.963 [0.869-1.068]	0.48
15	rs8035957	36625556	<i>RASGRP1</i>	0.270	0.261	1.047 [0.932-1.176]	0.44
6	rs3757247	91014184	<i>BACH2</i>	0.497	0.463	1.144 [1.033-1.268]	0.010
1	rs1983853	85083780	<i>EDG7</i>	0.132	0.153	0.842 [0.726-0.976]	0.022

DCCT／EDIC T1D発端者及びCHOPコントロールにおける発見工程から選択された目的の6つのSNPsに対する複製結果。複製に成功した2つのSNPsは太字で示してある。マイナーアレル頻度、P-値及びオッズ比(OR)は、そのマーカーが属している或いは隣接している遺伝子と共に示してある。P-値はそれぞれの場合において両側で示してある。
Aff allele freqは患者個人におけるアレル頻度; Chrは染色体; CIは信頼区間; Ctrl all ele freqは非患者個人におけるアレル頻度である。

【 0 1 3 4 】

30

表 2 に提供された、シグナルを有する連鎖不均衡 (L D) ブロックに対するコーディネート (t h e c o - o r d i n a t e s) は、以下に説明した。本発明は、T 1 D のリスク増加に関連したこれらのブロックを有するあらゆる S N P を含むものである。

【 0 1 3 5 】

【 表 3 】

表 3

GENE	CHR	B36 Start	B36 End
UBASH3A	21	42689693	42725106
GLIS3A	9	4267839	4290501
RASGRP1	15	36601669	36728371
BACH2	6	90944672	91078212
EDG7	1	85002281	85127151

【 0 1 3 6 】

2006年3月に集められた36のヒトゲノムの確立に関する詳細は、g e n o m e

50

. u c s c . e d u / c g i - b i n / h g G a t e w a y のワールドワイドウェブを参照のこと。

【0137】

【表4】

表4

5つのコホートのメタ解析。マイナーアレル頻度、P-値及びオッズ比(OR)は、6つのSNPsのそれぞれに対する関連アレルと共に示してある。

SNP	Allele	Gene	OR [95% CI]	P	10
rs9976767	C	UBASH3A	1.155 (1.098, 1.215)	2.33x10 ⁻⁸	
rs10758593	A	GLIS3	1.131 (1.074, 1.190)	2.64x10 ⁻⁶	
rs10758594	A	GLIS3	1.114 (1.058, 1.172)	3.51x10 ⁻⁵	
rs8035957	C	RASGRP1	1.144 (1.080, 1.211)	3.92x10 ⁻⁶	
rs3757247	A	BACH2	1.134 (1.078, 1.193)	1.25x10 ⁻⁶	
rs1983853	A	EDG7	0.833 (0.773, 0.898)	1.87x10 ⁻⁶	

【0138】

U B A S H 3 A は、連鎖不均衡のこの領域における唯一の遺伝子であった。S t s 2 (U B A S H 3 A に対するマウスホモログ) を欠如したマウスでは、T - 細胞機能を含む全ての観点において正常であることが示されていた^{2 3}。S t s 1 及び S t s 2 の両者を欠如したマウスは、脾細胞数が増加し、T - 細胞受容体刺激に対して反応性亢進を示した。S T S 1 及び S T S 2 は T - 細胞活性化を調節するシグナリング経路の重要な調節因子であることが示唆された^{2 3}。

【0139】

B A C H 2 も、この座位の唯一の遺伝子であった。遺伝子産物は、ヘテロ二量体化することで転写活性化因子或いは抑制因子として機能する、基礎領域ロイシンジッパータンパク質であるスマールM a f ファミリーのメンバーである。M u t o ら^{2 4} は、B a c h 2 - / - マウスは、血清I g M のレベルが相対的に高いが、I g A 及び I g G サブクラスのレベルは低かったことを見出した。B a c h 2 - / - マウスはさらに、T 細胞 - 非依存性及びT 細胞 - 依存性I g G 反応の欠損も示したことが報告され、これによって著者らにB A C H 2 が抗体反応の調節因子であったと結論付けていた^{2 4}。

【0140】

さらに、r s 1 9 8 3 8 5 3 は、全てのコホートにおいてT 1 D と名目上有意に関連していたが、トロントデータセットでの最終複製試行における複数テストに対する補正では残存しなかったことにも注意すべきである。このS N P は、胚移植のメカニズムに結びつけられていた、内皮分化遺伝子7 (E D G 7 ; 以前はL P A 3) に属していた^{2 5}。

【0141】

参考文献

1. Todd, J. A., Bell, J. I. & McDevitt, H. O. H L A - D Q beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 329, 599 - 604 (1987).
2. Risch, N. Assessing the role of H L A - linked and unlinked determinants of disease. *Am J Hum Genet* 40, 1 - 14 (1987).
3. Barratt, B. J. et al. Remapping the insulin gene / I D D M 2 locus in type 1 diabetes

20

30

40

50

- . Diabetes 53, 1884-9 (2004).
4. Pugliese, A. et al. The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. Nat Genet 15, 293-7 (1997).
5. Vafiadis, P. et al. Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNT alleles at the IDDM2 locus. Nat Genet 15, 289-92 (1997). 10
6. Bottini, N., Vang, T., Cucca, F. & Muttlein, T. Role of PTPN22 in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. Seminars in Immunology 18, 207-213 (2006).
7. Vella, A. et al. Localization of a type 1 diabetes locus in the IL2RA/CD25 region by use of tag single-nucleotide polymorphisms. Am J Hum Genet 76, 773-9 (2005). 20
8. Qu, H.Q., Montpetit, A., Ge, B., Hudson, T.J. & Polychronakos, C. Toward further mapping of the association between the IL2RA locus and type 1 diabetes. Diabetes 56, 1174-6 (2007).
9. Lowe, C.E. et al. Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. Nat Genet 39, 1074-1082 (2007). 30
10. Ueda, H. et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. Nature 423, 506-11 (2003).
11. Hakonarson, H. et al. A genome-wide association study identifies KIAA0350 as a type 1 diabetes gene. Nature 448, 591-4 (2007).
12. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. Nature 447, 661-678 (2007). 40
13. Todd, J.A. et al. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. Nat Genet 39, 857-864 (2007).
14. Smyth, D.J. et al. A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the in 50

- terferon-induced helicase (IFIH1) region. *Nat Genet* 38, 617-619 (2006).
15. Hakonarson, H. et al. A genome-wide association study identifies KIAA0350 as a type 1 diabetes gene. *Nature* 448, 591-594 (2007).
16. Hakonarson, H. et al. A novel susceptibility locus for type 1 diabetes on Chr 12q13 identified by a genome-wide association study. *Diabetes* 57, 1143-6 (2008). 10
17. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447, 661-78 (2007).
18. Todd, J.A. et al. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet* 39, 857-64 (2007).
19. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med* 329, 977-86 (1993). 20
20. The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). Design and methodologic considerations for the feasibility phase. The DCCT Research Group. *Diabetes* 35, 530-45 (1986).
21. Price, A.L. et al. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nat Genet* 38, 904-9 (2006).
22. Purcell, S. et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 81, 559-75 (2007). 40
23. Carpino, N. et al. Regulation of ZAP-70 activation and TCR signaling by two related proteins, Sts-1 and Sts-2. *Immunity* 20, 37-46 (2004).
24. Muto, A. et al. Identification of Bach2 as a B-cell-specific partner for small maf proteins that negatively regulate the immunoglobulin heavy chain gene 3' enhancer. *Embo J* 17, 5734-43 (1998). 50

25. Ye, X. et al. LPA3-mediated lysophosphatidic acid signaling in embryo implantation and spacing. *Nature* 435, 104-8 (2005).

【実施例2】

【0142】

RASGRP1座位及びT1D

上述したように、本発明者らは、T1Dに関連したRASGRP1座位において、rs8035957というSNPを以前同定した。本発明者ら及びthe Wellcome Trust Case-Control Consortium(WTCCC)によって発表された2つのゲノム・ワイド関連研究は、多数の新規座位を明らかにした。

【0143】

付加的な研究において、本発明者らは、2つの供給源：1) 1,046カナダ人ケース-親トリオ、及び1型糖尿病遺伝子コンソーシアム(T1DGC)からの929人の患者子孫を有する538の多重家族から成る2つのステージの総サンプルサイズを有する、以前刊行された本発明者らの第二ステージ研究；2) WTCCC結果において1型糖尿病に対して最も高い統計学的有意差を有する1,536マーカーに関して、2,059人の患者個人（大部分は同胞ペア）を含む、1,062の非重複家族からの4,417人の個人の遺伝子型を同定した、T1DGCのRR2プロジェクト、からのデータを解析した。

【0144】

chr15q14でLDブロックにマッピングしている1つの座位は、お互いに完全連鎖不均衡(LD)($r^2 = 1$)における2つのマーカー(rs17574546及びrs7171171)からの結果を組み合わせることによって統計学的に有意であった。本発明者らは、 1.3×10^{-6} の共同(joint)P値を得て、これは本発明者らの研究においてテストされた1,536のSNPsを補正することによって得られた 3.26×10^{-5} の保存的閾値を一桁超えるものである。オリジナルWTCCCゲノム・ワイドデータでのメタ解析では、 5.83×10^{-9} のP値が算出された。

【0145】

これらの研究は、RASGRP1遺伝子に関連した新規1型糖尿病座位を同定した実施例1に見られた結果を確認するものである。この遺伝子は、胸腺細胞分化、及びRasシグナリング経路を活性化することによるTCRシグナリングにおいて重要な役割を担っていると知られている。

【0146】

以下の物質及び方法は、実施例1に記載されたものと類似しており、実施例2の実施を容易にするために提供されるものである。

【0147】

1. T1DGC RR2研究は、WTCCC結果において1型糖尿病に対して最も高い統計学的有意差を有した1,536のマーカーに関して、2,059の患者同胞及び彼らの両親を含む、1,062の1型糖尿病家族から4,417人の個人を遺伝子型同定した。遺伝子型同定は、 Illumina Golden Gate プラットフォームに対して Sanger Institute で実行した。大部分の対象は、ヨーロッパ系祖先であり、発症時の年齢中央値は10歳（6歳と15.5歳の下位及び上位四分位点）であった。

【0148】

2. 本発明者らの研究において、本発明者らは、モントリオール、トロント、オタワ及びウィニペグにおける小児糖尿病クリニックで集めた、1,046の1型糖尿病ケース-親トリオを遺伝子型同定した。発症時の年齢中央値は8.4歳であり、5.0歳と11.8歳の下位及び上位四分位点を有していた。民族バックグラウンドは、最大の単一サブセット(40%)がフランス系カナダ人である、混合ヨーロッパ系家系であった。モントリオール小児病院及び他の参加センターの研究倫理委員によって、この研究は認可されてお

10

20

30

40

50

り、文書によるインフォームドコンセントは全対象から得られていた。加えて、本発明者らは、1型糖尿病を患った少なくとも1人の子供及び両親（946人の総患者）を含む549の家族を遺伝子型同定した。発症時の年齢中央値は8歳であり、4歳と13歳の四分位点を有していた。サンプルは、ヨーロッパ、北アメリカ及びオーストラリアで集め、大部分の対象はヨーロッパ系祖先であった。RR2研究にも含まれた11の重複家族からの遺伝子型同定したデータは、解析から除去した。本発明者らが以前に記載したように、本発明者らは、TDT及び本発明者らのオリジナルGWA Sのケース・コントロール相の両者において $p < 0.05$ を有する、982のマーカーを遺伝子型同定するために Illumina Golden gateアレイを使用した。加えて、本発明者らの2つのGWAコホートの両者において $p < 0.1$ 及びWTCCCにおいて $p < 0.01$ を示した15の一塩基多型（SNP）は、Sequenom iPLEXプラットフォームに対して質量分析を用いることで遺伝子型同定した。
10

【0149】

3. 統計学

1型糖尿病関連は、ワールドワイドウェブのbiostat.habard.edu/~fbat/fbat.htm⁸で利用可能なFamily Based Association Test (FBAT) ソフトウェアによってテストした。大部分のT1D GC家族が複数の同胞を有していることを考慮すると、遺伝子関連の不偏テスト以外は左右されないことを可能にするために、実験分散の選択肢をFBAT統計学で使用した。1,536のSNPsがRR2研究においてテストされたように、本発明者らは、 3.26×10^{-5} の、多重比較で補正された保存された有意閾値を用いた。
20

【0150】

結果

最近、2つの独立した研究で、UBASH3A及びBACH2の1型糖尿病関連が確認された^{2,3}。更なる研究によって、RASGRP1座位も重要な1型糖尿病座位であることが確認された。2つのプロジェクトで選択されたマーカーにおけるオーバーラップは、SNPsの同一性によって、或いは物理的に近接している(<1Mb)場合、LD(r^2 値>0.8)によって決定された。既知1型糖尿病座位を排除した後、両プロジェクトにおいて1つの座位のみが名目上有意($P < 0.05$)であった。これは、SNPのrs17574546($P = 3.41 \times 10^{-3}$)としてRR2コホートにおいて、及びrs7171171($P = 8.40 \times 10^{-5}$ 、表5)として本発明者らのセットにおいて評価された座位を含む。
30

【0151】

【表5】

表5 R A S G R P 1 及び 1型糖尿病の間の関連解析

コホート (頻度)	マイナーアレル	ハーディ ・ワイン ペルグ p	有効家族数*	Z (P value)	
T 1 D G C RR 2 コホート					
rs17574546 C (0.225)	0.931	302	2.93 ($P = 3.41 \times 10^{-3}$)		10
カナダ人コホート及び余分なT 1 D G C サンプル†					
rs7171171 G (0.207)	0.873	665	3.93 ($P = 8.40 \times 10^{-5}$)		
組み合わせ - (0.209) 解析					
	1.000	967	4.84 ($P = 1.30 \times 10^{-6}$)		

* F B A T 解析 (へのノンゼロ寄与) に有効な家族の数

† T 1 D G C RR 2 コホートでは余分なサンプルはない

【0152】

R R 2 サンプルにおける rs 1 7 5 7 4 5 4 6 の遺伝子型同定コールレート (c a l l i n g r a t e) は 9 9 . 8 % であり、本発明者ら自身のサンプルにおける rs 7 1 7 1 1 7 1 では 9 9 . 9 % であった。メンデル遺伝エラーは両者で見出されなかった。これら S N P s は完全 L D (r 2 = 1) であるので、本発明者らは、 $P = 1 . 3 0 \times 1 0 ^{-6}$ を示した、直接組み合わせ解析を実行した。これは、補正有意差レベルの一桁以上を超えた。組み合わせ家族データセットで推定された O R (9 5 % C I) は、 1 . 2 2 (1 . 1 2 , 1 . 3 3) であり、一方 W T C C C ケース - コントロールセットセットにおける O R (9 5 % C I) は、 1 . 2 1 (1 . 0 9 , 1 . 3 3) ($P = 2 . 6 7 \times 1 0 ^{-4}$) であった。これら 2 つの結果のメタ解析は、 O R (9 5 % C I) = 1 . 2 1 (1 . 1 4 , 1 . 3 0) 及び $P = 5 . 8 3 \times 1 0 ^{-9}$ であり、これはゲノム - ワイド研究では許容される有意差レベルであった。これらの結果に基づいて、本発明者らは、 R A S G R P 1 座位は 1 型糖尿病と関連していると結論付けることができた。R s 1 7 5 7 4 5 4 6 及び r s 7 1 7 1 1 7 1 の両者は、実施例 1 に記載した r s 8 0 3 5 9 5 7 と共に、 D ' = 0 . 9 0 2 及び r 2 = 0 . 5 5 3 を有していることに言及するのは興味深い。

【0153】

この新規 1 型糖尿病関連シグナルは、 R A S G R P 1 遺伝子の転写開始部位の 1 3 k b 上流である、 C h r 1 5 q 1 4 での L D ブロックへマッピングされており、あらゆる既知 1 型糖尿病座位との L D を有していないかった。図 1 を参照のこと。1 型糖尿病は脾臓 - 細胞の自己免疫破壊によって引き起こされるので、 R A S G R P 1 遺伝子が重要な免疫機能を有しているのは興味深い。R A S G R P 1 (N C B I 遺伝子 I D : 1 0 1 2 5) は、カルシウム及び D A G - 調節性 R A S グアニル放出タンパク質 1 (R a s G R P 1) をコード化している⁹。R a s G R P 1 は、胸腺細胞分化、及び R a s シグナリング経路を活性化することによる T C R シグナリングにおいて重要な役割を担っている。R a s G R p 1 - ヌル変異マウスは、成熟なシングルポジティブ (C D 4 + C D 8 - 及び C D 4 - C D 8 +) 胸腺細胞の著明な欠損を除いて、ほぼ正常な数の未成熟胸腺細胞を有していた¹⁰。R a s G R P 1 の遺伝子導入発現では、ダブルネガティブ胸腺細胞の成熟が誘導され、

10

20

30

40

50

CD4⁻CD8⁺胸腺細胞の産生が増強された^{1 1}。加えて、RasGRP1は、CD4⁺CD25⁺調節性T細胞(T_{reg})の発生及び機能に対して劇的な効果を有している。RasGRP1の欠如において、胸腺におけるCD4⁺CD25⁺T_{reg}の発生は著しく障害されており、一方CD4⁺CD25⁺T_{reg}の末梢増殖及び機能は著しく増加した^{1 2}。CD4⁺CD25⁺T_{reg}は、免疫ホメオスタシスを維持し、1型糖尿病及び他の自己免疫疾患の自己免疫反応を阻害するのに重要な役割を担っている^{1 3}。CD4⁺CD25⁺CD4⁺CD25⁺T_{reg}細胞の移植は、レシピエントNODマウスにおける1型糖尿病を予防することができるので^{1 4}、1型糖尿病におけるこのサブセットの産生に関連した遺伝子の役割を知ることは、予防介入の開発において重要な役割を担うであろう。

10

【0154】

参考文献

1. Hakonarson H, Grant SF, Bradfield JP, Marchand L, Kim CE, Glessner JT, Grabs R, Casalunovo T, Taback SP, Frackelton EC, Lawson ML, Robinson LJ, Skraban R, Lu Y, Chiavacci RM, Stanley CA, Kirsch SE, Rappaport EF, Orange JS, Monos DS, Devoto M, Qu HQ, Polychronakos C. A genome-wide association study identifies KIAA0350 as a type 1 diabetes gene. *Nature* 2007; 448: 591-4.
2. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007; 447: 661-678.
3. Todd JA, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, Plagnol V, Bailey R, Nejentsev S, Field SF, Payne F, Lowe CE, Szczeszkiewicz JS, Hafler JP, Zeitels L, Yang JHM, Vella A, Nutland S, Stevens HE, Schuilenburg H, Coleman G, Maisuria M, Meadows W, Smink LJ, Healy B, Burren OS, Lam AAC, Ovington NR, Allen J, Adlem E, Leung H-T, Wallace C, Howson JMM, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Simmonds MJ, Heward JM, Gough SCL, Dunger DB, Wicker LS, Clayton DG. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet* 2007; 39: 857-864.
4. Grant SF, Qu HQ, Bradfield JP, Marchand L, Kim CE, Glessner JT, Grabs R, Taback SP, Frackelton EC, Eckert AW, Annaiah K, Lawson ML, Otieno FG, Santa E, Shaner JL, Smith RM, Skraban R, Imielinski M, Chiavacci RM, Grundmeier RW, Stanley CA, Kirsch SE, Waggott D, Paterson AD, Monos DS, Polychronakos C, Hakonarson H. Fol 30 40 50

- low-up analysis of genome-wide association data identifies novel loci for type 1 diabetes. *Diabetes* 2009; 58: 290-5.
5. Cooper JD, Smyth DJ, Smiles AM, Plagnol V, Walker NM, Allen JE, Downes K, Barratt JC, Healy BC, Mychaleckyj JC, Warram JH, Todd JA. Meta-analysis of genome-wide association study data identifies additional type 1 diabetes risk loci. *Nat Genet* 2008; 40: 1399-401. 10
6. Concannon P, Onengut-Gumuscu S, Todd JA, Smyth DJ, Pociot F, Bergholdt R, Akolkar B, Erlich HA, Hilner JE, Julier C, Morahan G, Nerup J, Nierras CR, Chen WM, Rich SS. A human type 1 diabetes susceptibility locus maps to chromosome 21q22.3. *Diabetes* 2008; 57: 2858-61.
7. Rich SS, Concannon P, Erlich H, Julier C, Morahan G, Nerup J, Pociot F, Todd JA. The Type 1 Diabetes Genetics Consortium. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1079: 1-8. 20
8. Horvath S, Xu X, Laird NM. The family based association test method: strategies for studying general genotype-phenotype associations. *Eur J Hum Genet* 2001; 9: 301-6.
9. Ebinu JO, Bottorff DA, Chan EY, Stang SL, Dunn RJ, Stone JC. RasGRP, a Ras guanyl nucleotide-releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science* 1998; 280: 1082-6. 30
10. Dower NA, Stang SL, Bottorff DA, Ebinu JO, Dickie P, Ostergaard HL, Stone JC. RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. *Nature Immunology* 2000; 1: 317-321.
11. Norment AM, Bogatzki LY, Klinger M, Ojala EW, Bevan MJ, Kay RJ. Transgenic expression of RasGRP1 induces the maturation of double-negative thymocytes and enhances the production of CD8 single-positive thymocytes. *J Immunol* 2003; 170: 1141-9. 40
12. Chen X, Priatel JJ, Chow MT, Teh H-S. Preferential Development of CD4 and CD8 T Regulatory Cells in RasGRP1-Deficient Mice. *J Immunol* 2008; 180: 5973-5982.
13. Shevach EM. Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells. *J Exp Med* 2001; 193: F41-6. 50

14. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA. B7/CD28 Costimulation Is Essential for the Homeostasis of the CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells that Control Autoimmune Diabetes. *Immunity* 2000; 12: 431.

【実施例3】

【0155】

T1Dの診断方法及びT1Dの治療に対して有用な薬剤を同定するためのスクリーニングアッセイ

10

【0156】

本明細書の上記情報は、T1Dの発症に対する増加した感受性を診断するために、及び治療介入のために患者へ臨床的に適用可能である。本発明の好ましい実施形態は、患者への本明細書に記載した情報の臨床適用を有するものである。マイクロアレイを含む診断組成物及び方法は、T1D発症に対する感受性を評価するために、患者からの核酸における本明細書に記載された遺伝子変異を同定するために設計され得る。これは患者がクリニックに到着した後に起こることであり；患者が採血を受け、本明細書に記載された診断法を用いて、臨床医は本明細書に記載された21、15、6、9及び1番染色体の領域におけるSNPを検出することができる。スクリーニングされる患者の典型的な年齢範囲は、9から12歳の間である。評価する前に任意に増幅され得る、患者サンプルから得られる情報は、T1D発症の感受性が増加した或いは減少した患者を診断するために使用されるであろう。本発明の診断方法を実行するためのキットも、本明細書で提供される。そのようなキットは、本明細書で提供されたSNPsの少なくとも1つを有するマイクロアレイ、及び上述されたように患者サンプルを評価するための必要試薬を有しているものである。

20

【0157】

T1D - 関連遺伝子及び患者結果の同定は、どの変異が存在するかを示し、T1D発症の変化リスクを有している患者を同定するであろう。本明細書で提供された情報は、以前可能であった疾患進行における初期期間での治療介入を可能にする。本明細書でも上述したように、UBASH3A、GLIS3、RASGRP1、BACH2及びEDG7は、T1Dの治療に対して有効な新しい薬剤の開発のための新規標的を提供する。特に、疾患を発症する傾向をより有している患者においてこれらの遺伝子の発現を阻止することが望ましい。この点において、本明細書に記載された治療用siRNAsは、患者シグナルに基づいた遺伝子産物の発現を阻止し、それによりT1Dで起こる臍臓 - 細胞破壊を阻害するために使用され得る。

30

【0158】

本発明において使用される候補siRNA組成物は、表6～10に提供されている。表6～10における配列は、いくつかのsiRNAs（すなわち、標的領域に対するセンス配列）を含む。本分野の当業者は、センス鎖の開示に基づいてアンチセンスsiRNA鎖の配列を決定することができ、それぞれRNA及びDNA分子に一致する、配列におけるあらゆる「U」及び「T」記号の間の違いを理解するであろう。さらに、T1Dを治療するためにUBASH3A、GLIS3、RASGRP1、BACH2及びEDG7の既知阻害剤を使用する方法も、提供される。加えて、shRNAコンストラクトは、表4～8に提供されたセンス鎖に基づいて設計され、UBASH3A、GLIS3、RASGRP1、BACH2及びEDG7を阻害するのに有效である。それぞれの標的に対して表6～10のセンス鎖を利用したshRNAコンストラクトには、センス配列に対するヘアピンループ3'が含まれ（例えば、これに限定されるものではないが、適切なヘアピンには：TCAAGAG、TTCAAGAGA、GAAGCTTG及びTTCGが含まれる）、その後に表6～10に提供されたセンス鎖からの対応するアンチセンス配列が続く。

40

【0159】

【表6】

表6 候補U B A S H 3 s i RNA分子(センス)

GCATTAACTGGAGGAAC Ttt	SEQ ID NO: 6
CAAGAGTTCTGGAGAGAGAtt	SEQ ID NO: 7
GAACAGAGCTCATGAGGT Ctt	SEQ ID NO: 8
AATCAAGATA CGAGTGGAA tt	SEQ ID NO: 9
GGATCGAGCCAGTGAGTCTtt	SEQ ID NO: 10
CGGCGAGCATGGTGCAAATtt	SEQ ID NO: 11
GGA ACTGGATCTCAGGCAAtt	SEQ ID NO: 12
GTGGATGAGCTGACGCTAAtt	SEQ ID NO: 13
GAAAATGGGAGTTGGTGAAtt	SEQ ID NO: 14
ACGCCAAGGTCTCCAACAAAtt	SEQ ID NO: 15
GGACATGGCCCTAACCTGAtt	SEQ ID NO: 16
GGGAGAGAGTGGATCAGATtt	SEQ ID NO: 17
CCAAACTCATCCTGGAAAGAtt	SEQ ID NO: 18
GAGTCTGACACGTGGGTGAtt	SEQ ID NO: 19
GGAGAGAGAGCAAGCGCCAtt	SEQ ID NO: 20
GAAGAGAGCTGGAGACAGGtt	SEQ ID NO: 21
GGGAATTCGCCATGACCTTtt	SEQ ID NO: 22
GGCCCTAACCTGAGGCTGAtt	SEQ ID NO: 23
CGTGAAGCCTTGCACCAAAtt	SEQ ID NO: 24
GGAAAATGGGAGTTGGTGAAtt	SEQ ID NO: 25
GGGCGAACGCAGCATTAAAtt	SEQ ID NO: 26
AGTTCTGGAGAGAGAGCAAtt	SEQ ID NO: 27
GTGAAGACCAGAACGGTGGAtt	SEQ ID NO: 28
AGGCTGAGCAATTAACTAtt	SEQ ID NO: 29
CAGCAGATGCAGCGGGGAA tt	SEQ ID NO: 30
GGACAGTGGTATCAGAACATtt	SEQ ID NO: 31
AGACGCAGCTCTACGCCAAtt	SEQ ID NO: 32
AGGCATGGCTGCAGCAATGtt	SEQ ID NO: 33
TGGAAGAACTCAAACCTGGAtt	SEQ ID NO: 34
CTGAAGAGAGCTGGAGACAtt	SEQ ID NO: 35
AACCTGAGGCTGAGCAATTtt	SEQ ID NO: 36
GCACCAAACAGCTGCATCTtt	SEQ ID NO: 37
GCAC TCTACTCCCGAGACAtt	SEQ ID NO: 38
GGGTGAAGCACAGGATGTAtt	SEQ ID NO: 39
CCACAAACGGCAAGGAGTCtt	SEQ ID NO: 40
CAAACGGCAAGGAGTCTTAtt	SEQ ID NO: 41
GGTGAAGCCAGCAGCAGATtt	SEQ ID NO: 42
CAAATGGGAAGCTGGCAAtt	SEQ ID NO: 43
GCCTGGAAGAGCTGAAAGAtt	SEQ ID NO: 44
AAGAGCTGAAAGAGGCCAAtt	SEQ ID NO: 45
CGGTGAAGACCCCTGACCCAtt	SEQ ID NO: 46
GAGCCCTATTCCAGTACAAtt	SEQ ID NO: 47
GCAAGGGAGTCTTAGCAGCTtt	SEQ ID NO: 48
CCATTATCATCGTGTGGCAAtt	SEQ ID NO: 49
GGAAGAGCTGAAAGAGGCCAAtt	SEQ ID NO: 50

CAACATTGACACTGATTACtt	SEQ ID NO: 51
GAAAATAAAGAGGAAGGAAtt	SEQ ID NO: 52
CTTCAAGAGTTCTGGAGAGtt	SEQ ID NO: 53
CCGGAAAACCTACACGGATCtt	SEQ ID NO: 54
GTGAAGCACAGGATGTACAtt	SEQ ID NO: 55

【 0 1 6 0 】

【表7】

表7 候補GLIS3 siRNA分子(センス)

GCACAGAGCTCCATCCAGAtt	SEQ ID NO: 56
GCTATAAACTGCTGATCCAtt	SEQ ID NO: 57
TCACATACTTTAAGGCCAAtt	SEQ ID NO: 58
GGGCAGCACCGTAGACCTAtt	SEQ ID NO: 59
GGTCAGTGGTCATCACATTt	SEQ ID NO: 60
ACGCAGGAGCTGAGAGGTTtt	SEQ ID NO: 61
CCTATCAGCCAGAACAAAtt	SEQ ID NO: 62
TCAGAATGGCCTTGATCTAtt	SEQ ID NO: 63
GGAAAAGGCAGCTGCAACAtt	SEQ ID NO: 64
GGGCAATGAATGCAGCCAtt	SEQ ID NO: 65
AGGAGTGGTCCCAGGGCTAtt	SEQ ID NO: 66
CCGAACGCCTGGAGGAGTTtt	SEQ ID NO: 67
GAGCAACAAGCAAGGAAAAtt	SEQ ID NO: 68
GGAGACAAATGCTCACCAAtt	SEQ ID NO: 69
CCAGATCAGTCCTAGCTTAtt	SEQ ID NO: 70
GAATATACCTCCTTCAGATtt	SEQ ID NO: 71
GTTCGAAGGTTGCGAGAAGAtt	SEQ ID NO: 72
GGACGCATCTGGACACCAAtt	SEQ ID NO: 73
AGAGCAACAAGCAAGGAAAAtt	SEQ ID NO: 74
AGCCAAGCAGCAGGAGTTtt	SEQ ID NO: 75
GCTTGGGCCTCAGTGCAAtt	SEQ ID NO: 76
TATTCAAGCCGAAGTGGAAAtt	SEQ ID NO: 77
CTTCAATACTGCAAAGAACtt	SEQ ID NO: 78
CTAACAAACCTCCATCTCAAtt	SEQ ID NO: 79
GCAACAATCTAGTGGTCACtt	SEQ ID NO: 80
CCTCAAGCATGAAGCAGGAtt	SEQ ID NO: 81
GGATGGCTCCTCAGAACAAAtt	SEQ ID NO: 82
ACCTTGAGTCTGACGGAAAtt	SEQ ID NO: 83
GTACCAAACGCTACACAGAtt	SEQ ID NO: 84
CTGTCTACACCGAAGGCTAtt	SEQ ID NO: 85
TGTCTACACCGAAGGCTAAtt	SEQ ID NO: 86
GCATGAAGCAGGAGTGGTCtt	SEQ ID NO: 87
CCAAAGAGCAACAAGCAAGAtt	SEQ ID NO: 88
TAGAGATGCTGCTGCTGAAtt	SEQ ID NO: 89
AGCAATTATTCAAGCCGAAtt	SEQ ID NO: 90
TCAGATACCAGGTCCCTTAtt	SEQ ID NO: 91
CCTAGCTTACAGAGGGCAAtt	SEQ ID NO: 92
TTGTCAAATTCCAGGATGTtt	SEQ ID NO: 93
ACCCAAGTTCCCTAACGAAAtt	SEQ ID NO: 94
CCTAAGAAAGCATGTGAAGtt	SEQ ID NO: 95
TCCTCCAAATCCTGGGAAAtt	SEQ ID NO: 96
CCTTATTCGCGTGAGTCTtt	SEQ ID NO: 97
CAGTCGGCCTCAAGCATGAtt	SEQ ID NO: 98
ACACAGGCAGAGAACCGTAtt	SEQ ID NO: 99
CACCAAACCTTATGCTTGTtt	SEQ ID NO: 100
ACCTTATGCTTGTCAAATTtt	SEQ ID NO: 101

CAGCAATTATTCAAGCCGAtt	SEQ ID NO: 102
CCACAGAGCCTTCTCGACTtt	SEQ ID NO: 103
CCAATGGGAAGCCGCGATTtt	SEQ ID NO: 104
GGAAAGGGGCTTGGCTTtt	SEQ ID NO: 105

【 0 1 6 1 】

【表8】

表8 候補R A S G R P 1 s i RNA分子(センス)

AAGCAAGACTAGAGGCAAAtt	SEQ ID NO: 106
GAAACTTACTCAAAGGATAtt	SEQ ID NO: 107
CCAGAAACTACGACAATTAtt	SEQ ID NO: 108
TGAAATATGCACAGAAGAAtt	SEQ ID NO: 109
CCACAGAGCTCCACCACTAtt	SEQ ID NO: 110
GGAAAGTGAACGTCCATAAtt	SEQ ID NO: 111
GCAAACACGTCCAGAGGATtt	SEQ ID NO: 112
GGATGAAATCTATGAGCTTtt	SEQ ID NO: 113
CCTAAAGATCCAAGTGAAAtt	SEQ ID NO: 114
ACAAGGATATCGATGTAAAtt	SEQ ID NO: 115
GGATATCGTTCTCTGATTAtt	SEQ ID NO: 116
AAACAAGGATATCGATGTAtt	SEQ ID NO: 117
TGGTTGTGTTGAGTGTAAAtt	SEQ ID NO: 118
TGGTGAAGCTAACGGGTGAtt	SEQ ID NO: 119
GCAAAGATCTGGTTGTGTTtt	SEQ ID NO: 120
TTGTCAAGTGGGAGAATAAtt	SEQ ID NO: 121
GCACAGAAGAAAATAGAATtt	SEQ ID NO: 122
TCAATAAGGTTCTCGGTGAtt	SEQ ID NO: 123
CGACCAGGATGGATACATTtt	SEQ ID NO: 124
CGGGATGAAGTCACAAAtt	SEQ ID NO: 125
GCCCAGTCTGGTCAGAAAtt	SEQ ID NO: 126
AGGAAGTGGAAAGCTAACAtt	SEQ ID NO: 127
GCTCCATGCACCTGAGGAAAtt	SEQ ID NO: 128
GAATAAAGACTCCCTCATAtt	SEQ ID NO: 129
AGGTATTGGATAACAGAAATTt	SEQ ID NO: 130
AAGCTAAGGGTGAGGAGTTtt	SEQ ID NO: 131
ACACTGAGGATGAAATCTAtt	SEQ ID NO: 132
TGACAAGTGTGCTGGATTtt	SEQ ID NO: 133
GGATATCGATGTAAAGACTtt	SEQ ID NO: 134
AATAAAGACTCCCTCATAAtt	SEQ ID NO: 135
GATGGAAACCTGTGTCGAAAtt	SEQ ID NO: 136
GAGAGAGGCTCCGCCGAAAtt	SEQ ID NO: 137
GGGTACAAGTGTGCTGGTTCTtt	SEQ ID NO: 138
GGGATGAGATCACAGCCTAtt	SEQ ID NO: 139
GTAAGAAGCGAGCCAAGAAAtt	SEQ ID NO: 140
ATAAAGACTCCCTCATAAAtt	SEQ ID NO: 141
GAAATATGCACAGAAGAAAtt	SEQ ID NO: 142
GGAAACCTGTGTCGAAGTAtt	SEQ ID NO: 143
GGTATTGGATAACAGAAATTt	SEQ ID NO: 144
AGCTAAGGGTGAGGAGTTAtt	SEQ ID NO: 145
TGACACAACCAAATCAATTt	SEQ ID NO: 146
CAGAAGAGCTATCCGAGCAtt	SEQ ID NO: 147
CCTTCTGTGATGGACAAAtt	SEQ ID NO: 148
CCTCACAACTTCCAAGAGAtt	SEQ ID NO: 149
GAGTGATCAAACAAGGATAtt	SEQ ID NO: 150

GATCAAACAAGGATATCGAtt	SEQ ID NO: 151
AGGAAGACAGCCCAGGATAtt	SEQ ID NO: 152
CCAAGAACTGGAACAGGAAAtt	SEQ ID NO: 153
AAGAACTGGAACAGGAAATtt	SEQ ID NO: 154
CCCTAAAGATCCAACGTGAAtt	SEQ ID NO: 155

【 0 1 6 2 】

【表9】

表9 候補B A C H 2 s i R N A 分子 (センス)

GAAGATAACTCTAGCAACAtt	SEQ ID NO:156
GTGAAGAGAATGAGGAAGAtt	SEQ ID NO: 157
CAAATTGGTGTGTGAGAAAtt	SEQ ID NO: 158
CAGGAGAGGAGGAGGATGAtt	SEQ ID NO: 159
AGAATGAGGAAGAGAGCATtt	SEQ ID NO: 160
CAGAACAGTTAGAGTTATt	SEQ ID NO: 161
GGAAATGACTGATAAGTGTtt	SEQ ID NO: 162
CTTGATCGTGGAGAGGAAtt	SEQ ID NO: 163
GAGAGGAGGAGGATGAAGAtt	SEQ ID NO: 164
GTACCAAGAATGTCTATAAtt	SEQ ID NO: 165
GAGATGAGCCTGACGCCAAtt	SEQ ID NO: 167
GAGAAACTGTTGTCAGAGAtt	SEQ ID NO: 168
AGAGAGGAATCAACTGAAAtt	SEQ ID NO: 169
CAGTGAAGAGAATGAGGAAtt	SEQ ID NO: 170
GGTGTGTGAGAAAGAGAAAtt	SEQ ID NO: 171
GAGGAGGAGACGATGGATTt	SEQ ID NO: 172
GGGAAGATAACTCTAGCAAtt	SEQ ID NO: 173
AAAGGAAACTGGACTGTATt	SEQ ID NO: 174
GCAAATTGGTGTGTGAGAAAtt	SEQ ID NO: 175
AAGAGAAACTGTTGTCAGAtt	SEQ ID NO: 176
ATGAAGAGGAGGAGACGATtt	SEQ ID NO: 177
GGTGGAGGCTCTGTAAAtt	SEQ ID NO: 178
CAGCAACACCTCCGAGAATtt	SEQ ID NO: 179
AAACAGTGACCGTGGACTTt	SEQ ID NO: 180
GAACAGCCCAGGAAAGATTt	SEQ ID NO: 181
CCTCAGAACAGTTAGAGTTt	SEQ ID NO: 182
GTGCTGAGTTCCCTGCGCATt	SEQ ID NO: 183
GCGAGAACTCTGCAGGAGAtt	SEQ ID NO: 184
CTGCAGGAGAGGAGGGAGGAtt	SEQ ID NO: 185
CCGTAGCAGAGAAGGAAGAtt	SEQ ID NO: 186
GCCAGAAGGAGGTGTCCAAtt	SEQ ID NO: 187
GGGTGAGCAGTTGGACAAtt	SEQ ID NO: 188
CCAGGAAAGATTATACCTAtt	SEQ ID NO: 189
CCTCAATGACCAGCGGAAAtt	SEQ ID NO: 190
CTGTTACTCAGCAGAGAAAtt	SEQ ID NO: 191
GCCAGGAAATGACTGATAAtt	SEQ ID NO: 192
AGAAGGAGGTGTCCAACTTt	SEQ ID NO: 193
CCAAATTAAATGTGAGCAGtt	SEQ ID NO: 194
AGGAATCAACTGAAAGCATtt	SEQ ID NO: 195
CAGGAAGTTGCCGAGACAtt	SEQ ID NO: 196
AGGAGGAGGATGAAGAGGAGAtt	SEQ ID NO: 197
AGGAGGATGAAGAGGAGGAGAtt	SEQ ID NO: 198
ACCAAGGAGAGCTCAGAAAtt	SEQ ID NO: 199
TCACAGGAAATTATGGACAtt	SEQ ID NO: 200
GTTGGAGGCTCTGTAAAtt	SEQ ID NO: 201

GAGACCAGGACCAGGACTTtt	SEQ ID NO: 202
CCACAGAACATCAGGAACCtt	SEQ ID NO: 203
TTAAATGTGAGCAGTCTTAtt	SEQ ID NO: 204
TCTCGGAAGCAGACAGTGAtt	SEQ ID NO: 205
CTTGAACCCAGGAGCCAAAtt	SEQ ID NO: 206

【 0 1 6 3 】

【表 10】

表 10 候補 EDG7 si RNA 分子 (センス)

CCTACAAGGACGAGGCACATtt	SEQ ID NO: 207
TCTACTACCTGTTGGCTAAtt	SEQ ID NO: 208
TCATCATGGTTGTGGTGTAtt	SEQ ID NO: 209
GTACATAGAGGATAGTATTtt	SEQ ID NO: 210
GTCGATGACTGGACAGGAAtt	SEQ ID NO: 211
GTGGAGAGGCACATGTCAAtt	SEQ ID NO: 212
GGATGCGGGTCCATAGCAAtt	SEQ ID NO: 213
CCATGAAGCTAATGAAGACtt	SEQ ID NO: 214
AATAGGAGCAACACTGATAtt	SEQ ID NO: 215
AGTACATAGAGGATAGTATtt	SEQ ID NO: 216
CAATAAAAGCACTTCCTAAtt	SEQ ID NO: 217
ATGACAAGCACATGGACTTtt	SEQ ID NO: 218
GTGTACGTCAAGAGGAAAAtt	SEQ ID NO: 219
AAGCTAATGAAGACGGTGAtt	SEQ ID NO: 220
GCACCATGAAGAACGATGATtt	SEQ ID NO: 221
AGAGGATAGTATTAGCCAAtt	SEQ ID NO: 222
CCGATTCTCGCTGGAATtt	SEQ ID NO: 223
ACACAGGCCAGTTCAAAtt	SEQ ID NO: 224
CCATTACAGCAGGAGTTAtt	SEQ ID NO: 225
GGACACCCATGAAGCTAATtt	SEQ ID NO: 226
ACAAGGACGAGGACATGTAtt	SEQ ID NO: 227
TGTCCAACCTCATGGCCTTtt	SEQ ID NO: 228
CCTCAGCAGGAGTGACACAtt	SEQ ID NO: 229
GCCAGTACATAGAGGATAGtt	SEQ ID NO: 230
TAATTAGCTGCTGCCGATtt	SEQ ID NO: 231
CCTATGTATTCCGTGATGTTtt	SEQ ID NO: 232
TAACACAGGCCAGTTCAAtt	SEQ ID NO: 233
CCCATGAAGCTAATGAAGAtt	SEQ ID NO: 234
CAGCCAGTACATAGAGGATtt	SEQ ID NO: 235
GAGGATAGTATTAGCCAAGtt	SEQ ID NO: 236
CTGGAATTGCCTATGTATTtt	SEQ ID NO: 237
TGGAGAGGCACATGTCAATtt	SEQ ID NO: 238
CATAGCAACCTGACCAAAAtt	SEQ ID NO: 239
AGGACACCCATGAAGCTAAtt	SEQ ID NO: 240
TGGCGTGCAGCATGTGAAAtt	SEQ ID NO: 241
ACACTGATACTGTCGATGAtt	SEQ ID NO: 242
GGATAGTATTAGCCAAGGTtt	SEQ ID NO: 243
CGATTCTCGCTGGAATTtt	SEQ ID NO: 244
CGATGACTGGACAGGAACAtt	SEQ ID NO: 245
CATACAAGTGGGTCCATCAtt	SEQ ID NO: 246
TAGTATTAGCCAAGGTGCAAtt	SEQ ID NO: 247
TCATCGCGGCAGTGATCAAtt	SEQ ID NO: 248
TGAAGACGGTGATGACTGTtt	SEQ ID NO: 249
CTGGACAGGAACAAAGCTTtt	SEQ ID NO: 250
GGTCATCGCGGCAGTGATCtt	SEQ ID NO: 251

GGAGCAACACTGATACTGTtt	SEQ ID NO: 252
CTTCTGGACAGTAGCTTGAtt	SEQ ID NO: 253
GAGAGGCACATGTCAATCAtt	SEQ ID NO: 254
TGACAAGCACATGGACTTTtt	SEQ ID NO: 255
CCCATTACAGCAGGAGTTtt	SEQ ID NO: 256

【 0 1 6 4 】

特定の本発明の好ましい実施形態が記載され、特に上に例示されたが、これは本発明をそのような実施形態に制限することを意図するものではない。本分野の当業者にとって、様々な変化及び修飾は、以下の請求項に説明されたように、本発明の観点から逸脱することなく、なされ得ることを理解するであろう。

10

【 図 1 】

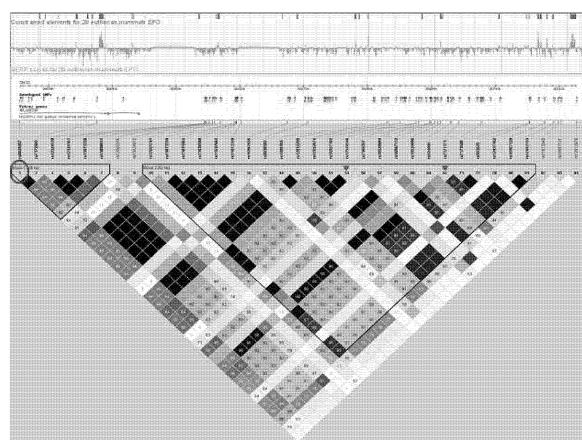


Fig.1.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
C 12 Q 1/68 (2006.01)	A 6 1 P 3/10
G 01 N 33/53 (2006.01)	C 12 Q 1/68 A
G 01 N 37/00 (2006.01)	G 01 N 33/53 M
	G 01 N 37/00 102

(72)発明者 グラント、ストルアン

アメリカ合衆国、19104 ペンシルバニア州、フィラデルフィア、3604 ハミルトン ストリート

(72)発明者 ブラッドフィールド、ジョナサン

アメリカ合衆国、19103 ペンシルバニア州、フィラデルフィア、266 サウス 23 アールディー ストリート

(72)発明者 ポリクロナコス、コンスタンティン

カナダ国、エイチ4エックス 1ピー7、ケベック、コート セイント リュック、604 ウエストルーク

(72)発明者 チュー、フェイ - チ

カナダ国、エイチ4エー 3ジェイ6、ケベック、モントリオール、3845 デカリ - アパートメント16

合議体

審判長 田村 明照

審判官 松田 芳子

審判官 高堀 栄二

(56)参考文献 特表2004-535822(JP,A)

特表2006-507841(JP,A)

特開2004-267200(JP,A)

Nature (2007) vol. 448, no. 7153, p. 591-594

Nat. Genet. (2007) vol. 39, no. 7, p. 857-864

Reference SNP(refSNP) Cluster Report: rs9976767 [online], <URL:

Reference SNP(refSNP) Cluster Report: rs3757247 [online], <URL:

Nat. Genet. (2006) vol. 38, no. 6, p. 617-619

Nat. Genet. (2007) vol. 39, no. 9, p. 1074-1082

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 N 15 / 00 - 15 / 90

C 12 Q 1 / 68

PubMed

BIOSIS/MEDLINE/WPIIDS/WPIX(STN)

JST Plus(JDreamIII)