

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 515318

(P2003 - 515318A)

(43)公表日 平成15年5月7日(2003.5.7)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/7088	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088		48/00	4 B 0 2 4
48/00		A 6 1 P 9/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 9/00		9/10	4 C 0 8 4
9/10		19/02	4 C 0 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 30数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 525389(P2001 - 525389)

(86)(22)出願日 平成12年9月20日(2000.9.20)

(85)翻訳文提出日 平成14年3月22日(2002.3.22)

(86)国際出願番号 PCT/FR00/02607

(87)国際公開番号 W001/021831

(87)国際公開日 平成13年3月29日(2001.3.29)

(31)優先権主張番号 99/11790

(32)優先日 平成11年9月21日(1999.9.21)

(33)優先権主張国 フランス(FR)

(71)出願人 アル - マーモード , サルマン
フランス, エフ - 75014 パリ, スクワ
ール アリス, 2

(72)発明者 アル - マーモード , サルマン
フランス, エフ - 75014 パリ, スクワ
ール アリス, 2

(74)代理人 弁理士 安達 光雄 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 血管新生の調節に関わる新規遺伝子を同定するための方法、かかる遺伝子の試験及び治療目的のためのそれらの使用

(57)【要約】

本発明は、次の工程を含むことを特徴とする、血管新生の調節に関わる細胞成分をコードする新規遺伝子の同定方法に関する： a) 4種類の異なる条件に従った、細胞外基質蛋白質上での内皮細胞の培養：標準条件、血管新生促進条件、血管新生阻害条件、対照条件、 b) 種々の条件に従って培養した細胞から誘導されるメッセンジャーRNAの分離、 c) 血管新生の調節に関わる細胞成分をコードする遺伝子に対応する、血管新生を刺激する条件下及び/又は阻害する条件下での細胞培養から独占的に誘導される又は特に高い量で誘導されるメッセンジャーRNAを同定するための、メッセンジャーRNAの種々の個体群の定性的及び/又は定量的比較。本発明はまた、上記の方法を実施するためのキットに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 血管新生の調節に関わる細胞成分をコードする遺伝子を同定するための方法であって、

a) 以下の4種類の異なる条件に従って、細胞外基質蛋白質上で内皮細胞を培養する工程と、

標準条件

血管新生を促進する条件

血管新生を阻害する条件

対照条件

b) 種々の条件に従って培養した細胞から誘導されるメッセンジャーRNAを分離する工程と、

c) 血管新生の調節に関わる細胞成分をコードする遺伝子に対応する、血管新生を刺激する及び/又は阻害する条件下での細胞培養から独占的に誘導される又は特に高い量で誘導されるメッセンジャーRNAを同定するために、メッセンジャーRNAの種々の個体群を定性的及び/又は定量的に比較する工程とを含むことを特徴とする、血管新生の調節に関わる細胞成分をコードする遺伝子を同定するための方法。

【請求項2】 工程(c)で同定されたメッセンジャーRNAを分離し、それらを増幅して精製する工程と、

上記工程で得られた核酸分子をクローニングして配列決定する工程と、

分離した核酸分子に対応する1つ又はそれ以上の遺伝子を同定する工程とをさらに含むことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 標準条件(CR)下で培養する細胞は刺激せず、

血管新生促進条件(CPA)で培養する細胞は血管新生因子によって刺激し、

血管新生阻害条件(CIA)で培養する細胞は血管新生因子によって刺激して、1つ又はそれ以上の抗血管新生因子と共にインキュベートし、

対照条件(CC)下で培養する細胞は抗血管新生因子と共にインキュベートすることを特徴とする、請求項1又は2のいずれかに記載の方法。

【請求項4】 細胞外基質がフィブリン、コラーゲン、ラミニン、マトリゲル (Matrigel)、フィブロネクチン又は細胞外基質蛋白質ファミリーに属する他の何らかの蛋白質であることを特徴とする、請求項1乃至3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】 工程(a)で使用する血管新生促進因子が：

線維芽細胞増殖因子1 15 (FGF1 FGF15)

表皮細胞増殖因子 (EGF)

血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)

肝細胞増殖因子 (HGF)

血小板由来増殖因子 (PDGF)

インターロイキン8 (IL 8)

アンジオゲニン

トランスフォーミング増殖因子 (TGF)

ニューロカインミドカイン (neurokine midkine)

プレイオトロピン

又は血管新生を誘導する蛋白質性の他の何らかの因子から選択されることを特徴とする、請求項1乃至4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】 本発明における方法の工程(a)で使用する血管新生阻害因子が：

トロンボスポンジン

アンジオスタチン

エンドスタチン

血小板第4因子

インターロイキン10 (IL 10)

インターロイキン12 (IL 12)

キミオキングロ 及び

ヒト軟骨細胞由来阻害因子

白血病阻害因子

腫瘍壊死因子 (TNF)

又は血管新生を阻害する蛋白質性の他の何らかの因子から選択されることを特徴とする、請求項1乃至5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】 血管新生を刺激する又は阻害することができる1つ又はそれ以上の因子を、細胞培養において1つ又はそれ以上の因子の合成を可能にするように構築された発現ベクターの形態で培養中の細胞に加えることを特徴とする、請求項1乃至6のいずれかに記載の方法。

【請求項8】 メッセンジャーRNAの種々の個体群の分析を、
メッセンジャーRNAを逆転写する工程と、
逆転写によって得られたDNA分子を電気泳動によって分離する工程と、
対象とするDNA分子を検出して、その後電気泳動の支持体から切り出す工程と、
対象DNAを精製する工程と、
精製したDNAを場合によってプローブとして使用する工程と、
精製したDNAを場合によってサブクローニングして配列決定する工程とを含むディファレンシャルディスプレイ法によって実施することを特徴とする、請求項1乃至7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】 メッセンジャーRNAの種々の個体群の分析をサブトラクションハイブリダイゼーションによって実施することを特徴とする、請求項1乃至8のいずれかに記載の方法。

【請求項10】 血管新生に関連する疾患の診断及び/又は治療を意図した製薬組成物における、請求項1乃至9のいずれかに記載の方法を用いて同定される遺伝子の使用。

【請求項11】 血管新生に関連する疾患の診断及び/又は治療を意図した検査キットであって、請求項1乃至9のいずれかに記載の方法を実施することができる1つ又はそれ以上の血管新生因子又は抗血管新生因子と組み合わせて、細胞外基質蛋白質上で内皮細胞の培養を行うために有用な物質と試薬を含むことを特徴とするキット。

【請求項12】 血管新生因子及び抗血管新生因子のうちの1つ又はそれ以上の因子を患者の血清に置き換えることができることを特徴とする、請求項11

に記載の診断を意図した検査キット。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、血管新生の調節に関わる細胞成分をコードする新規遺伝子の同定を対象とする。本発明は特に、これらの遺伝子の同定を可能にする方法に関する。本発明はまた、同定された遺伝子によってコードされる因子の、血管新生の過程についての臨床試験のため、この過程に関連する疾患の診断及び治療のため、ならびに薬理的、薬理ゲノム学的又は薬理信号伝達学的試験のための使用に関する。

【0002】

血管新生は新しい血管が形成される基本的なプロセスである。このプロセスは生殖、発生、またさらには癒痕化のようないくつかの正常な生理現象において重要である。これらの正常な生物学的現象においては、血管新生は厳密な制御下にある、すなわち数日間の短い期間中に開始され、その後完全に抑制される。しかし、一部の疾患は侵襲的で制御されない血管新生に結びつく。例えば、関節炎は侵襲性の新生血管による軟骨の損傷に起因する疾患である。糖尿病性網膜症では、新生血管による網膜の侵襲が患者の失明を導く、すなわち眼装置の新生血管形成は失明の主要な原因であり、この新生血管形成は20にも上る眼疾患を支配している。最後に、腫瘍の成長と転移は新生血管形成に直接結びついており、血管新生に依存する。腫瘍は自らの成長のために新生血管の増殖を刺激する。さらに、これらの新生血管は、血液循環に連結して、肝臓や肺又は骨といった離れた部位での転移を引き起こすための腫瘍の漏出経路を備えている。

【0003】

心臓血管疾患、末梢動脈疾患、脈管又は脳病変のような他の疾病においては、血管新生は重要な治療基盤を提供しうる。実際に、損傷された領域における血管新生の促進は、血液を供給する、そしてその結果として酸素及び関係組織の生存に必要な他の栄養素と生物学的因子を供給する、損傷血管に代わる側方新生血管の形成を導くことができる。

【0004】

内皮細胞による新生血管の形成は、内皮細胞の移動、増殖及び分化を含む。こ

これらの生物学的現象の調節は遺伝子発現に直接結びついている。血管新生に関しては、絶え間なく増え続ける数の試験が、血管新生が内皮細胞に直接作用する因子間の平衡を通して行われることを明らかにしている。これらの因子は、一方ではVEGF、FGF、IL 8、HGF/SF、PDGF、等々のような刺激因子であると考えられる。また他方では、IL 10、IL 12、グロ及び、血小板第4因子、アンジオスタチン、ヒト軟骨細胞由来阻害因子、トロンボスポンジン、白血病阻害因子、等々のような阻害因子でありうる (Jensen, Surg. Neural., 1998, 49, 189-195; Tamataniら、Carcinogenesis, 1999, 20, 957-962; Tanakaら、Cancer Res., 1998, 58, 3362-3369; Gheら、Cancer Res., 1997, 57, 3733-3740; Kawaharaら、Hepatology, 1998, 28, 1512-1517; Chandhuriら、Cancer Res., 1997, 57, 1814-1819; JendraschakとSage, Semin. Cancer Biol., 1996, 7, 139-146; Majewskiら、J. Invest. Dermatol., 1996, 106, 1114-1119)。

【0005】

血管新生の制御は、それ故、血管新生に結びつく多くの病理現象について我々の理解を高めるための基礎研究の1つの戦略基軸であるのみならず、血管新生に関連する疾患を治療することを意図した新しい治療法の開発のための基盤でもある。

【0006】

血管新生を制御するために、いくつかの製薬グループが、血管新生を促進する又は阻害するための作用物質として、パラクリンシグナルである刺激因子及び阻害因子の使用に直接基づく治療戦略を開発した。これらの戦略は基本的に、血管新生の刺激因子及び阻害因子としてこれらの因子を蛋白質形態で使用すること、あるいはより最近では選択された因子をコードする発現ベクターの形態で使用することに基づいている。

【0007】

試験管内で実験を行うことを可能にする試験モデルが使用できれば、血管新生に関連する疾患の治療において有用な有効成分として使用しうる新規分子の発見がより容易になるであろう。

【0008】

内皮細胞は培養することができる。培養の最初の方法は、培養フラスコの平底に細胞を付着させて培地中に液浸し、その後集密な細胞層が得られるまでインキュベートすることから成る。培養の他の方法は、細胞外基質蛋白質と称される蛋白質ファミリーに属する蛋白質の層であらかじめ被覆しておいた培養フラスコの平底に内皮細胞を付着させることを特徴とする。さらに別の方法では、それぞれコラーゲン及びフィブリンの格子を形成する、コラーゲン又はフィブリンのようなこのファミリーの蛋白質を収縮させる (retractant) ことによって得られる格子で内皮細胞を被覆する。

【0009】

内皮細胞の培養においては、使用する手法に関わらず、一定時間のインキュベーション後均質な細胞個体群の単層が得られる。それにもかかわらず、このようにして得られた各々の個体群は、新生血管を形成する分化された内皮細胞の機構とは関係のない構造を有する。

【0010】

コラーゲン又はフィブリン格子下での内皮細胞培養では、血管新生を促進するパラクリンシグナルの1つによる内皮細胞層の刺激後、毛細管を形成する分化した内皮細胞が得られることが既に明らかにされている (Montesanoら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83, 7297-7301)。刺激された内皮細胞によって試験管内で形成されたこれらの毛細管は、血管新生の際に生体内で同じ細胞型によって形成される新生血管に類似する。それ故、これらは血管新生の調節に関与する新しい因子の研究に適したモデルを構成する。

【0011】

血管新生の調節は、刺激因子の作用と阻害因子の作用の平衡を通して行われる。それ自体が遺伝子発現の産物であるこれらの因子は有糸分裂促進性である。そ

れらは、血管新生の調節に関与し、また他の生理的あるいは病理的過程にも関わると考えられるいくつかの遺伝子の発現を制御する。2つの遺伝子ファミリーが血管新生の調節に関与する。一方は、刺激因子又は阻害因子をコードする第一世代の遺伝子ファミリーである。他方は、細胞レセプタ、細胞外基質蛋白質、ドッキング蛋白質(「docking proteins」)、架橋蛋白質(「アダプター蛋白質(adaptator proteins)」)、キナーゼ、ホスファターゼ、プロテアーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、等々のような血管新生の調節に密接に関わる細胞成分をコードする遺伝子ファミリーである。この遺伝子ファミリーは、それ故、「血管新生の第二世代遺伝子ファミリー」を構成する。

【0012】

本発明は、血管新生の調節に密接に関与する細胞成分をコードし、血管新生の第二世代遺伝子ファミリーに属する遺伝子の同定方法に関する。細胞成分とは、第二世代ファミリーの遺伝子によってコードされる産物について下記に定義される種類の蛋白質、蛋白質群又は蛋白質の集合を意味する。当該過程を刺激する又は阻害する因子は、血管新生の増大又は抑制に関わる遺伝子の発現を制御する。それ故、2種類の遺伝子発現プロファイルを検討しなければならない。まず最初は血管新生の促進条件下に置かれた細胞のプロファイルであり、2番目は血管新生の阻害条件下に置かれた細胞に相当する。

【0013】

血管新生の阻害条件下にある細胞と刺激されない内皮細胞の生理的状态は似通っているが、2つの場合における遺伝子発現を識別することが重要である。実際に、例えばFGF1のような血管新生を促進する因子で刺激して、血管新生阻害因子と共にインキュベートした内皮細胞は、新生血管を形成することができない。さらに、血管新生を阻害するいくつかの因子は有糸分裂促進因子であり、IL10、IL12、グロ及び、等々のように遺伝子発現に影響を及ぼす。従って内皮細胞は、刺激を受けない内皮細胞の遺伝子発現とは異なる血管新生阻害条件下で遺伝子発現を示しうる。それ故、細胞を種々の培養条件下に置いたとき、すなわち血管新生刺激条件下と阻害条件下に置いたときの細胞の遺伝子発現プ

ロフィールドを、厳密に定義された標準培養条件と比較することが重要である。

【0014】

本発明に従った方法により、血管新生の調節に関わる細胞成分をコードする遺伝子の同定が可能となる。この方法は以下の工程を含む：

a) 4種類の異なる条件に従った、細胞外基蛋白質上での内皮細胞の培養：標準条件、血管新生促進条件、血管新生阻害条件、対照条件、

b) 種々の条件に従って培養した細胞から誘導されるメッセンジャーRNAの分離、

c) 血管新生の調節に関わる細胞成分をコードする遺伝子に対応する、血管新生を刺激する条件下及び/又は阻害する条件下での細胞培養から独占的に誘導される又は特に高い量で誘導されるメッセンジャーRNAを同定するための、メッセンジャーRNAの種々の個体群の定性的及び/又は定量的な比較、

d) 場合によって、工程(c)で同定されたメッセンジャーRNAの分離、それらの増幅及び精製、

e) 場合によって、上記の工程で得られた核酸分子のクローニング及び配列決定、

f) 場合によって、適切な系における上記遺伝子の発現及びそのようにして産生された蛋白質の血管新生調節における特性についての試験を含む、分離した核酸分子に対応する1つ又はそれ以上の遺伝子の同定。

【0015】

血管新生の調節に関わる遺伝子の第二世代ファミリーの成員を同定するため、発明者は内皮細胞培養の4種類の実験条件を決定した：

標準条件(CR)下で培養する細胞は刺激しない。

血管新生促進条件(CPA)で培養する細胞は血管新生因子によって刺激する。血管新生因子は、例えばFGF1、FGF2、HGF、PDGF、等々でありうる。

血管新生阻害条件(CIA)で培養する細胞は血管新生因子によって刺激し、1つ又はそれ以上の抗血管新生因子と共にインキュベートする。刺激因子はFGF2であり、阻害因子は、例えばIL10、IL12、ケモカインのグ

ロ 又は、等々の中から選択されうる。

対照条件（CC）下で培養する細胞は抗血管新生因子と共にインキュベートする。抗血管新生因子は、例えばIL 10、IL 12、ケモカインのグロ又は、等々でありうる。

【0016】

これらの実験培養条件は、当業者に既知の方法のいずれかに従って培養される内皮細胞に適用される。細胞外蛋白質基質は、特に、フィブリン、コラーゲン、ラミニン、マトリゲル（Matrigel）、フィブロネクチン又は細胞外基質蛋白質ファミリーに属する他の何らかの蛋白質によって構成されうる。

【0017】

血管新生を刺激する又は阻害することができる因子は、血管新生のプロセスに対する作用が明らかにされている因子の中から選択される（Jensen, Surg. Neural., 1998, 49, 189-195; Tamataniら、Carcinogenesis, 1999, 20, 957-962; Tanakaら、Cancer Res., 1998, 58, 3362-3369; Gheら、Cancer Res., 1997, 57, 3733-3740; Kawaharaら、Hepatology, 1998, 28, 1512-1517; Chandhuriら、Cancer Res., 1997, 57, 1814-1819; JendraschakとSage, Semin. Cancer Biol., 1996, 7, 139-146; Majewskiら、J. Invest. Dermatol., 1996, 106, 1114-1119）。

【0018】

本発明に従った方法の工程（a）で使用される血管新生刺激因子は次の中から選択される：

線維芽細胞増殖因子1-15（FGF1-FGF15）

表皮細胞増殖因子（EGF）

血管内皮細胞増殖因子（VEGF）

肝細胞増殖因子（HGF）

血小板由来増殖因子（PDGF）

インターロイキン8 (I L 8)
アンジオゲニン
トランスフォーミング増殖因子 (T G F)
ニューロカインミドカイン (n e u r o k i n e m i d k i n e)
プレイオトロピン

又は血管新生を誘導する蛋白質性の他の何らかの因子。

【0019】

本発明に従った方法の工程 (a) で使用される血管新生阻害因子は次の中から選択される：

トロンボスポンジン
アンジオスタチン
エンドスタチン
血小板第4因子
インターロイキン10 (I L 10)
インターロイキン12 (I L 12)
キモキングロ 及び
ヒト軟骨細胞由来阻害因子
白血病阻害因子
腫瘍壊死因子 (T N F)

又は血管新生を阻害する蛋白質性の他の何らかの因子。

【0020】

血管新生を調節する種々の因子を当業者に周知の方法に従って細胞培養に加える (M o n t e s a n o ら、 P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 1986, 83, 7297-7301)。種々の因子の各々について使用すべき有効濃度は、有利には次のとおりである：1 ng/ml - 200 ng/ml。

【0021】

本発明に従った方法では、血管新生を刺激する又は阻害することができる1つ又はそれ以上の因子を、細胞培養において1つ又はそれ以上の因子の合成を可能にするように構築された発現ベクターの形態で培養中の細胞に加える。そのよう

なベクターの例はTanakaら(Cancer Res., 1998, 58, 3362-3369)の中で引用されている。

【0022】

本発明に従った方法は、工程(c)において、血管新生の刺激又は阻害条件下での細胞の遺伝子発現プロファイルの分析を含む。この分析は、標準条件下及び対照条件下での細胞のメッセンジャーRNAと比較した、血管新生刺激又は阻害条件下での内皮細胞のメッセンジャーRNAの試験に基づく。これらのメッセンジャーRNAは、他の細胞成分からRNAを分離することができる古典的手法によって細胞から抽出される(Vancopoulosら、1990、「真核生物遺伝子のクローニングと分析のための方法(Methods for cloning and analysis of eucaryotic genes)」より、p. 823、JonesとBartlett編集、Boston)。メッセンジャーRNAは、例えばそれらの末端にあるポリA配列の存在を利用して他のRNAから分離される。

【0023】

メッセンジャーRNAの種々の個体群の分析は、次の工程を含むディファレンシャルディスプレイ法によって実施することができる：

メッセンジャーRNAを逆転写する

逆転写によって得られたDNA分子を電気泳動によって分離する

対象とするDNA分子を検出して、その後電気泳動の支持体から切り出す

対象DNAを精製する

精製したDNAは、cDNAライブラリーをスクリーニングするためのプローブとして使用することができ、また直接サブクローニングして配列決定することもできる。

【0024】

精製したDNAは、特にcDNAライブラリーをスクリーニングするため、又はノーザンブロット法によって相補的核酸配列を検出するためのプローブとして使用することができる。

【0025】

ディファレンシャルディスプレイ法は、識別的に発現される2つの群の遺伝子の同時検出、例えば(a)の中から選択される血管新生因子に関連する一部の遺伝子と、(b)の中から選択される抗血管新生因子に関連する別の遺伝子の同時検出を可能にする。ディファレンシャルディスプレイの手法はまた、まれなmRNAを検出することができ、重複と偽陽性クローンを最小限に抑えることができる。

【0026】

本発明に従った方法では、メッセンジャーRNAの種々の個体群の分析をサブトラクションハイブリダイゼーションによって実施することもできる。

【0027】

サブトラクションハイブリダイゼーションは、mRNAの分離、mRNAの逆転写、cDNAライブラリーの構築、サブトラクション、及びディファレンシャルハイブリダイゼーションによるスクリーニングを含む。

【0028】

これら2つの方法は補完的であり、血管新生に対応するmRNAを同定するために使用される。

【0029】

本発明に従った方法は、それ故、血管形成性と抗血管形成性の2種類のパラクリンシグナルの作用下で、血管新生の定性的及び定量的評価を可能にするという点で卓越している。

【0030】

その上に、この方法は、パラクリンシグナルと組み合わせた細胞外基質としての種々の蛋白質(フィブリン、コラーゲン、ラミニン、マトリゲル、フィブロネクチン、等々)の作用を試験することができる。さらに、かかる方法は内皮細胞に加えて他の細胞型を含むように容易に修正することができる。

【0031】

本発明のもう1つの局面は、当該方法を用いて同定された因子を血管新生に関連する疾患、例えば関節炎、糖尿病性網膜症、癌又は心臓血管疾患のような疾患の診断及び/又は治療を意図した製薬組成物において使用することから成る。本

発明に従った方法を用いて同定される因子はまた、薬理的、薬理ゲノム学的又は薬理信号伝達学的試験のために使用することができる。

【0032】

本発明の補足的な局面は、本発明の対象である方法を実施するための検査キットから成る。そのようなキットは、1つ又はそれ以上の血管新生因子又は抗血管新生因子と組み合わせて、細胞外基質蛋白質上で内皮細胞の培養を行うために有用な物質と試薬を含む。有利には、診断を意図した検査キットの場合には、血管新生因子及び抗血管新生因子のうちの1つ又はそれ以上の因子を患者の血清に置き換えることができる。

【0033】

本発明の他の利点及び特徴は、図1を参照しながら非制限的な例として示す下記の実施例を読めば明らかになるであろう。

【0034】

実施例1：ディファレンシャルディスプレイ：

図1は、血管新生に関わる遺伝子のディファレンシャルディスプレイの方法を図式的に示す。

【0035】

mRNAは、オリゴ(dT)プライマー、T12MN[式中、MはG、A又はCでありうる；NはG、A、T又はCでありうる]の4つの縮重群の各々を使用して特異的に抽出し、逆転写する。

【0036】

プライマーの各々の群は、(M)位置における縮退と共に、3'(N)末端の塩基によって定義される。例えば、N=Gであるプライマーの群は下記によって構成される：

5' TTTTTTTTTTTTTTGG 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTAG 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTCG 3'

【0037】

ゲルのダイアグラムは、3つの実験条件下での内皮細胞に関する第一世代群だ

けの使用結果を図式化したものである：C R = 標準条件（刺激なしでの培養内皮細胞）、C P A = 血管新生促進条件（F G F 2のような、(a)の中から選択される血管新生因子によって刺激した内皮細胞）、C I A = 血管新生阻害条件（(a)からの血管新生因子と(b)からの抗血管新生因子によって同時に刺激した内皮細胞）、C C = 対照条件（(b)の中から選択される抗血管新生因子によって刺激した内皮細胞）。

【0038】

図1の点線はRNAを表わし、実線はDNAを表わす。T 1 2 M Nはオリゴ(d T)の縮重プライマーである；MはA、G又はG（縮重位置）でありうる；NはA、C、G又はTでありうる。

【0039】

実施例2：サブトラクションハイブリダイゼーション

図2は、c DNAのサブトラクションハイブリダイゼーションの方法を図式的に表わしたものである。

【0040】

種々の操作条件下に置いた細胞において発現されるRNAの配列を表わす一本鎖c DNAを得るために、上記細胞からm RNAを抽出し、逆転写する。

【0041】

ある操作条件、例えば血管新生刺激条件下に置いた細胞に由来する一本鎖c DNAを、他の操作条件、例えば標準条件下に置いた細胞に由来する過剰のRNAとハイブリダイズする。そのようなハイブリダイゼーション反応では、2つの操作条件において発現される配列に対応するc DNAはRNAとのハイブリッドを形成する。逆に、RNAにおいて表わされないc DNAは一本鎖c DNAの形態で残る。

【0042】

好都合には、ハイブリダイゼーション反応において使用するm RNAの量を制限することにより、この方法はまた、所与の操作条件、例えば血管新生刺激条件下に置いた細胞において過剰発現される1つ又はそれ以上のm RNAを表わすc DNA配列を分離するためにも使用できる。

【0043】

二本鎖cDNAと一本鎖cDNAは、特にヒドロキシアパタイトカラムでのクロマトグラフィーによって分離することができる。このようにして分離した一本鎖cDNAは、特定の培養条件下に置いた細胞において特異的に存在する又は過剰発現されるmRNAに対応する。このcDNAは、対応する遺伝子を同定し、分離してクローニングするためにcDNAライブラリーをスクリーニングするのに使用できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

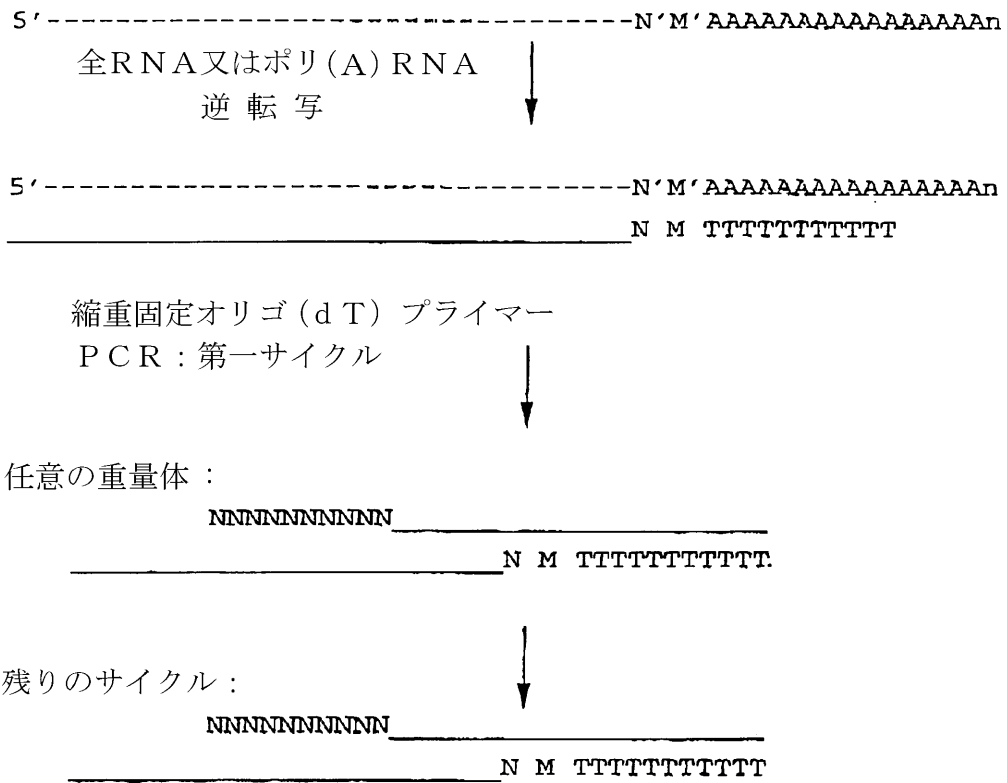
血管新生に関わる遺伝子のディファレンシャルディスプレイの方法を図式的に示す。

【図2】

cDNAのサブトラクションハイブリダイゼーションの方法を図式的に表わしたものである。

【図1A】

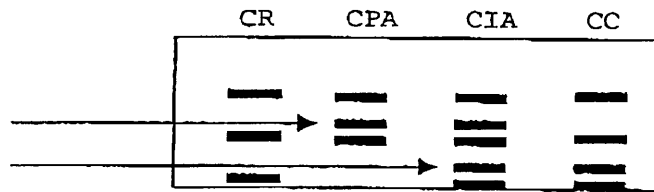
Fig.1 A



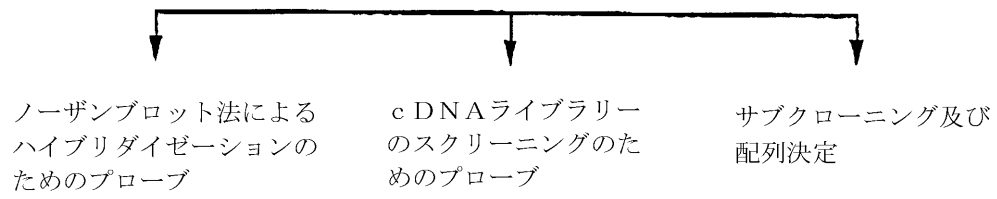
【図1B】

Fig.1 B

変性電気泳動：



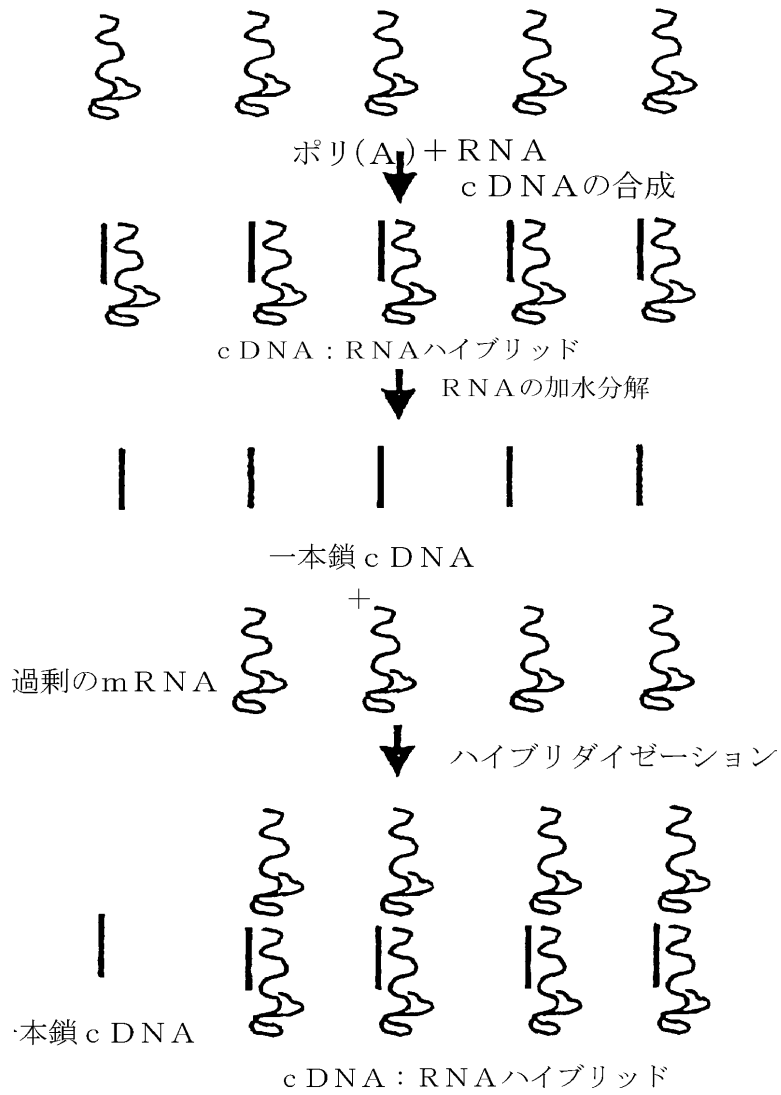
対象とするバンドの 切り出し



【図2A】

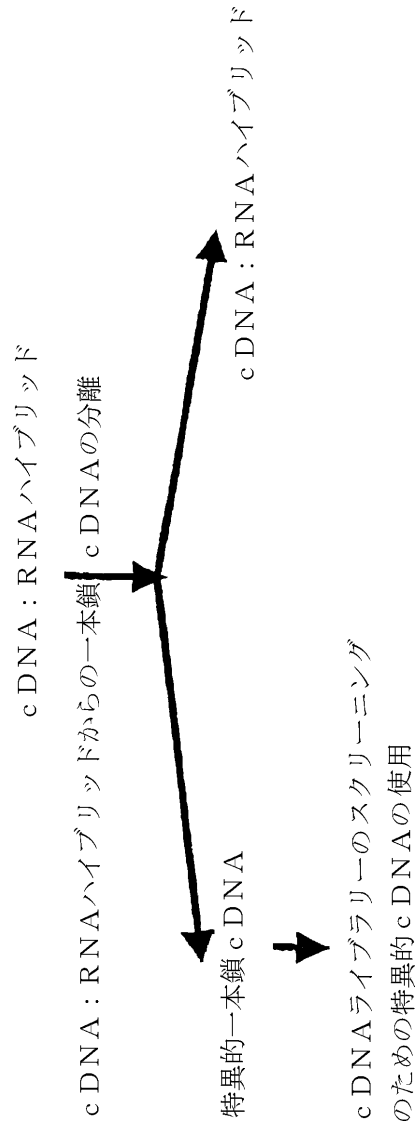
Fig.2 A

図式的表示



【図2B】

Fig.2 B



【**手続補正書**】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【**提出日**】平成13年10月8日(2001.10.8)

【**手続補正1**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】特許請求の範囲

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**特許請求の範囲**】

【**請求項1**】 血管新生の調節に関わる細胞成分をコードする遺伝子を同定するための方法であって、

a) 以下の4種類の異なる条件に従って、細胞外基質蛋白質上で内皮細胞を培養する工程と、

標準条件

血管新生を促進する条件

血管新生を阻害する条件

対照条件

b) 種々の条件に従って培養した細胞から誘導されるメッセンジャーRNAを分離する工程と、

c) 血管新生の調節に関わる細胞成分をコードする遺伝子に対応する、血管新生を刺激する及び/又は阻害する条件下での細胞培養から独占的に誘導される又は特に高い量で誘導されるメッセンジャーRNAを同定するために、メッセンジャーRNAの種々の個体群を定性的及び/又は定量的に比較する工程とを含むことを特徴とする、血管新生の調節に関わる細胞成分をコードする遺伝子を同定するための方法。

【**請求項2**】 工程(c)で同定されたメッセンジャーRNAを分離し、それらを増幅して精製する工程と、

上記の工程で得られた核酸分子をクローニングして配列決定する工程と、

分離した核酸分子に対応する1つ又はそれ以上の遺伝子を同定する工程と

をさらに含むことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 標準条件(CR)下で培養する細胞は刺激せず、
血管新生促進条件(CPA)で培養する細胞は血管新生因子によって刺激し、

血管新生阻害条件(CIA)で培養する細胞は血管新生因子によって刺激して、1つ又はそれ以上の抗血管新生因子と共にインキュベートし、

対照条件(CC)下で培養する細胞は抗血管新生因子と共にインキュベートすることを特徴とする、請求項1又は2のいずれかに記載の方法。

【請求項4】 細胞外基質がフィブリン、コラーゲン、ラミニン、マトリゲル(Matrigel)、フィブロネクチン又は細胞外基質蛋白質ファミリーに属する他の何らかの蛋白質であることを特徴とする、請求項1乃至3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】 工程(a)で使用する血管新生促進因子が：

線維芽細胞増殖因子1 15 (FGF1 FGF15)

表皮細胞増殖因子(EGF)

血管内皮細胞増殖因子(VEGF)

肝細胞増殖因子(HGF)

血小板由来増殖因子(PDGF)

インターロイキン8(IL 8)

アンジオゲニン

トランスフォーミング増殖因子(TGF)

ニューロカインミドカイン(neurokine midkine)

プレイオトロピン

又は血管新生を誘導する蛋白質性の他の何らかの因子から選択されることを特徴とする、請求項1乃至4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】 本発明に従った方法の工程(a)で使用する血管新生阻害因子が：

トロンボスポンジン

アンジオスタチン

エンドスタチン

血小板第4因子

インターロイキン10 (I L 10)

インターロイキン12 (I L 12)

キミオキングロ 及び

ヒト軟骨細胞由来阻害因子

白血病阻害因子

腫瘍壊死因子 (T N F)

又は血管新生を阻害する蛋白質性の他の何らかの因子から選択されることを特徴とする、請求項1乃至5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】 血管新生を刺激する又は阻害することができる1つ又はそれ以上の因子を、細胞培養において1つ又はそれ以上の因子の合成を可能にするように構築された発現ベクターの形態で培養中の細胞に加えることを特徴とする、請求項1乃至6のいずれかに記載の方法。

【請求項8】 メッセンジャーRNAの種々の個体群の分析を、
メッセンジャーRNAを逆転写する工程と、
逆転写によって得られたDNA分子を電気泳動によって分離する工程と、
対象とするDNA分子を検出して、その後電気泳動の支持体から切り出す工程と、

対象DNAを精製する工程と、
精製したDNAを場合によってプローブとして使用する工程と、
精製したDNAを場合によってサブクロニングして配列決定する工程とを含むディファレンシャルディスプレイ法によって実施することを特徴とする、請求項1乃至7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】 メッセンジャーRNAの種々の個体群の分析をサブトラクションハイブリダイゼーションによって実施することを特徴とする、請求項1乃至8のいずれかに記載の方法。

【請求項10】 請求項1乃至9のいずれかに記載の方法を用いて同定される血管新生の調節に関わる遺伝子の、血管新生に関連する疾患の診断及び/又は治療を意図した製薬組成物における使用。

【請求項11】 血管新生に関連する疾患の診断及び/又は治療を意図した検査キットであって、請求項1乃至9のいずれかに記載の方法を実施することができる1つ又はそれ以上の血管新生因子又は抗血管新生因子と組み合わせて、細胞外基質蛋白質上で内皮細胞の培養を行うために有用な物質と試薬を含むことを特徴とするキット。

【請求項12】 血管新生因子及び抗血管新生因子のうちの1つ又はそれ以上の因子が患者の血清に置き換えられていることを特徴とする、請求項11に記載の診断を意図した検査キット。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		Internal / Application No PCT/FR 00/02607
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68		
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) IPC 7 C12Q C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PRÔLS F ET AL.: "Differential expression of osteopontin, PC4, and CEC5, a novel mRNA species, during in vitro angiogenesis" EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, vol. 239, 1998, pages 1-10, XP000949306 the whole document	1-5,7,8, 10-12
Y	GHO Y S ET AL.: "Development of antiangiogenin peptide using a phage-displayed peptide library" CANCER RESEARCH, vol. 57, 1997, pages 3733-3740, XP002148992 cited in the application the whole document	1-5,7,8, 11,12
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 9 January 2001		Date of mailing of the international search report 16/01/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Knehr, M

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No. PCT/FR 00/02607
--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 95 23968 A (UNIV AUSTRALIAN ;PARISH CHRISTOPHER RICHARD (AU); BROWN KATHRYN JO) 8 September 1995 (1995-09-08) the whole document	1-5,8, 10-12
Y	ZIMRIN A B ET AL: "AN ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDE TO THE NOTCH LIGAND JAGGED ENHANCES FIBROBLAST GROWTH FACTOR-INDUCED ANGIOGENESIS IN VITRO*" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,US,AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, vol. 271, no. 51, 20 December 1996 (1996-12-20), pages 32499-32502, XP002913174 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-5,8, 11,12
Y	MONTESANO R ET AL.: "Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES USA, vol. 83, 1986, pages 7297-7301, XP002148993 cited in the application the whole document	1-5,8, 11,12
Y	SHIMA D T ET AL.: "Alterations in gene expression associated with changes in the state of endothelial differentiation" DIFFERENTIATION, vol. 58, 1995, pages 217-226, XP000949305 the whole document	1-3,8
Y	CHOUDHURI R ET AL: "An angiogenic role for the neurokinins mickine and pleiotrophin in tumorigenesis" CANCER RESEARCH,US,AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, vol. 57, 1 May 1997 (1997-05-01), pages 1814-1819, XP002122390 ISSN: 0008-5472 cited in the application the whole document	1,5,7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No. PCT/FR 00/02607
--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TANAKA T ET AL: "VIRAL VECTOR-TARGETED ANTIANGIOGENIC GENE THERAPY UTILIZING AN ANGIOSTATIN COMPLEMENTARY DNA" CANCER RESEARCH, US, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, vol. 58, no. 15, 1 August 1998 (1998-08-01), pages 3362-3369, XP000857409 ISSN: 0008-5472 cited in the application the whole document ---	1,6,7
Y	MAJEWSKI S ET AL.: "Interleukin-12 inhibits angiogenesis induced by tumor cell lines in vivo" JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 106, 1996, pages 1114-1118, XP000949299 cited in the application the whole document -----	1,6

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 00/02607

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9523968 A	08-09-1995	AU 679340 B	26-06-1997
		AU 1750095 A	18-09-1995
		CA 2184705 A	08-09-1995
		EP 0804727 A	05-11-1997
		IL 112844 A	06-12-1998
		JP 9509829 T	07-10-1997
		US 5976782 A	02-11-1999
		ZA 9501778 A	25-01-1996

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト' (参考)
A 6 1 P	19/02	A 6 1 P	
	27/02		
	35/00		
C 1 2 Q	1/68	C 1 2 Q	A
G 0 1 N	33/50	G 0 1 N	P
	33/53		D
			M
	33/566		
		33/566	
		C 1 2 N	Z N A A
		15/00	
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y ,		
	D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I		
	T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J		
	, C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L ,		
	M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K		
	E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G		
	, Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D ,		
	R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T ,		
	A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C		
	A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M		
	, D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H ,		
	G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K		
	E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S		
	, L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N ,		
	M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R		
	U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M		
	, T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N ,		
	Y U , Z A , Z W		
Fターム(参考)	2G045 AA25 BB03 BB50 DA12 DA13		
	DA36 FB02		
	4B024 AA01 AA11 BA01 CA01 GA11		
	HA12		
	4B063 QA19 QQ08 QQ53 QR08 QR32		
	QR42 QR55 QR62 QS25 QS34		
	QS36 QX01		
	4C084 AA13 NA14 ZA332 ZA362		
	ZA962 ZB262		
	4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 NA14		
	ZA33 ZA36 ZA96 ZB26		

专利名称(译)	用于鉴定参与血管生成调节的新基因的方法，这些基因的测试及其用于治疗目的的用途		
公开(公告)号	JP2003515318A	公开(公告)日	2003-05-07
申请号	JP2001525389	申请日	2000-09-20
[标]申请(专利权)人(译)	Almer模式萨尔曼		
申请(专利权)人(译)	艾尔 - Mamodo, 萨尔曼		
[标]发明人	アルマーモードサルマン		
发明人	アル-マーモード, サルマン		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K38/18 A61K48/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P19/02 A61P27/02 A61P35/00 C12N5/02 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6809 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/00 A61K48/00 A61P19/02 A61P27/02 C12Q1/6809		
FI分类号	A61K31/7088 A61K48/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P19/02 A61P27/02 A61P35/00 C12Q1/68.A G01N33/50.P G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/BB03 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA01 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZA332 4C084/ZA362 4C084/ZA962 4C084/ZB262 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/NA14 4C086/ZA33 4C086/ZA36 4C086/ZA96 4C086/ZB26		
优先权	1999011790 1999-09-21 FR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种鉴定编码涉及调节血管生成的细胞成分的新基因的方法，其包括以下步骤：a) 根据四种不同条件在细胞外基质蛋白上 内皮细胞培养：标准条件，促进血管生成的条件，抑制血管生成的条件，控制条件，b) 分离根据各种条件培养的细胞衍生的信使RNA，c) 参与调节血管生成的细胞成分 用于识别信使RNA的信使RNA，该信使RNA在刺激和/或抑制血管生成的条件下，从细胞培养物中专门或特别是高度诱导，对应于编码信使的基因 不同RNA群体的定性和/或定量比较。 本发明还涉及用于执行上述方法的试剂盒。

