

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-536186

(P2005-536186A)

(43) 公表日 平成17年12月2日(2005.12.2)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 B O 6 3
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 6 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 157 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-578393 (P2003-578393)	(71) 出願人	501142928
(86) (22) 出願日	平成15年3月7日(2003.3.7)		ルードビッヒ、インスティテュート、フォー
(85) 翻訳文提出日	平成16年11月5日(2004.11.5)		ー、キャンサー、リサーチ
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/006900		LUDWIG INSTITUTE FO
(87) 国際公開番号	W02003/080640		R CANCER RESEARCH
(87) 国際公開日	平成15年10月2日(2003.10.2)		アメリカ合衆国ニューヨーク州、ニューヨ
(31) 優先権主張番号	60/363,019		ーク、サーティサード、フロアー、サード
(32) 優先日	平成14年3月7日(2002.3.7)		、アベニュー、605
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(71) 出願人	501129435
			ライセンティア・リミテッド
			フィンランド 00130 ヘルシンキ
			エロッタヤンカトゥ 19 ビー 5
		(74) 代理人	100075812
			弁理士 吉武 賢次
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 リンパ管および血管内皮細胞遺伝子

(57) 【要約】

本発明は、リンパ管内皮細胞と血管内皮細胞において示差的に発現されるポリヌクレオチドおよび遺伝子を提供する。これらの遺伝子はリンパ水腫などのリンパ管の病気、種々の炎症性疾患、およびリンパ系を通じた癌転移を治療するための有用な標的である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血管内皮細胞（BEC）またはリンパ管内皮細胞（LEC）の増殖または分化を示差的に調節する方法であって、

内皮細胞を、血管またはリンパ管内皮細胞を示差的に調節する薬剤を含んでなる組成物と接触させることを含んでなり、

該薬剤が、

（a） BECポリペプチドもしくはLECポリペプチドのアミノ酸配列を含んでなる、ポリペプチド、または該ポリペプチドの活性断片；

（b） （a）のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる、ポリヌクレオチド； 10

（c） （a）のポリペプチドと特異的に結合する、抗体；

（d） （c）の抗体のフラグメントを含んでなる、ポリペプチド（ここで、このフラグメントおよび抗体は該ポリペプチドと結合する）；

（e） （a）のポリペプチドをコードするヒト遺伝子またはmRNAに対する、アンチセンス核酸；

（f） （a）のポリペプチドをコードするヒト遺伝子またはmRNAに対する、干渉RNA（RNAi）

からなる群より選択される、方法。

【請求項 2】

20

内皮細胞が組成物とex vivoで接触される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

組成物が、医薬上許容される希釈剤、アジュバント、または担体を含んでなり、かつ、接触工程が、哺乳類被験体に組成物を投与して、哺乳類被験体においてBECまたはLECを示差的に調節することを含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

LECの過剰増殖を特徴とする疾患を有するヒト被験者を同定し；かつ

そのヒト被験者に組成物を投与し、ここで、この薬剤はBECの増殖と比べてLECの増殖を示差的に阻害する

ことを含んでなる、請求項 3 に記載の方法。 30

【請求項 5】

LECの過剰増殖を特徴とする疾患を有するヒト被験者を同定し；

被験者のLECをスクリーニングして、表 3 に示されるポリペプチドの過剰発現を同定し；かつ

そのヒト被験者に組成物を投与し、ここで、この薬剤は、スクリーニング工程によって同定されたポリペプチドの発現を阻害することにより、BECの増殖と比べてLECの増殖を示差的に阻害する

ことを含んでなる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

ヒト被験者においてリンパ管内皮細胞の増殖を調節する、請求項 3 に記載の方法であって、 40

過少増殖性のリンパ管疾患を有するヒト被験者を同定し；

被験者をスクリーニングして、表 3 に示されるLECポリペプチド（該タンパク質は表 1 または 2 に示されるものではない）の発現不足または活性不足を同定し；

そのヒト被験者に組成物を投与する（ここで、この薬剤はスクリーニング工程によって同定されたLECポリペプチド（a）、もしくは該ポリペプチドの活性断片を含んでなるか、またはそのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド（b）を含んでなる）

ことを含んでなる、方法。

【請求項 7】

50

血管内皮細胞（BEC）またはリンパ管内皮細胞（LEC）の増殖または分化を示差的に調節するための薬物の製造を目的とした薬剤の使用であって、

該薬剤が、

（a） BECポリペプチドもしくはLECポリペプチドのアミノ酸配列を含んでなる、ポリペプチド、または該ポリペプチドの活性断片；

（b） （a）のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる、ポリヌクレオチド；

（c） （a）のポリペプチドと特異的に結合する、抗体；

（d） （c）の抗体のフラグメントを含んでなる、ポリペプチド（ここで、このフラグメントおよび抗体は該ポリペプチドと結合する）；

（e） （a）のポリペプチドをコードするヒト遺伝子またはmRNAに対する、アンチセンス核酸；

（f） （a）のポリペプチドをコードするヒト遺伝子またはmRNAに対する、干渉RNA（RNAi）

からなる群より選択される、使用。

【請求項8】

ポリペプチドが、表3に示されるLECポリペプチド群から選択されるLECポリペプチドであり、かつ、薬剤がBECの増殖または分化よりもLECの増殖または分化を示差的に調節する、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法または使用。

【請求項9】

ポリペプチドが、表4に示されるBECポリペプチド群から選択されるBECポリペプチドであり、かつ、薬剤がLECの増殖または分化よりもBECの増殖または分化を示差的に調節する、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法または使用。

【請求項10】

ポリペプチドが表1または2に示されるものではない、請求項8または9に記載の方法または使用。

【請求項11】

LECポリペプチドが、配列番号81、187、207、211、221、235、241、293および391からなる群より選択されるアミノ酸を含んでなる、請求項8に記載の方法または使用。

【請求項12】

LECポリペプチドが、配列番号31～34、46および48からなる群より選択されるアミノ酸を含んでなる、請求項8に記載の方法または使用。

【請求項13】

薬剤が（c）の抗体または（d）のポリペプチドを含んでなる、請求項12に記載の方法または使用。

【請求項14】

薬剤が（a）のポリペプチドの細胞外ドメイン断片、または該細胞外ドメイン断片をコードするポリヌクレオチドを含んでなる、請求項12に記載の方法。

【請求項15】

薬剤がアンチセンス分子を含んでなる、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法または使用。

【請求項16】

遺伝性リンパ水腫を治療する方法であって、

リンパ水腫を有し、かつ、表3に示されるLECタンパク質をコードする遺伝子の少なくとも一つの対立遺伝子における突然変異を有するヒト被験者を同定し、ここで、この突然変異はヒト被験者におけるリンパ水腫と関係があり、ただし、該LECタンパク質はVEGFR-3ではなく；かつ

該被験者に、VEGF-Cポリペプチド、VEGF-Dポリペプチド、VEGF-Cポリヌクレオチド、およびVEGF-Dポリヌクレオチドからなる群より選択されるリンパ

10

20

30

40

50

増殖剤を含んでなる組成物を投与することを含んでなる、方法。

【請求項 17】

表 3 に示される L E C 遺伝子における突然変異から起こる遺伝性リンパ水腫の治療のための薬物の製造における、V E G F - C ポリペプチド、V E G F - D ポリペプチド、V E G F - C ポリヌクレオチド、および V E G F - D ポリヌクレオチドからなる群より選択されるリンパ増殖剤の使用（ただし、L E C 遺伝子は V E G F R - 3 ではない）。

【請求項 18】

内皮細胞疾患または該疾患に対する疾病素因をスクリーニングする方法であって、ヒト被験者から内皮細胞 m R N A を含む生体サンプルを得；かつ

10

B E C または L E C 遺伝子から転写されたサンプル中の m R N A の量から B E C または L E C 遺伝子の発現を測定する（ここで、この B E C または L E C 遺伝子は表 3 または 4 に示されるポリペプチドをコードしてなる）

ことを含んでなる、方法。

【請求項 19】

内皮細胞に対する薬物の効力または毒性をモニタリングする方法であって、

哺乳類被験体に薬物を投与する前および投与した後、その被験体の内皮細胞における少なくとも一つの B E C または L E C 遺伝子の発現を測定する工程（ここで、この少なくとも一つの B E C または L E C 遺伝子は表 3 または表 4 に示されるポリペプチドをコードし、かつ、B E C または L E C 遺伝子の発現の変化は内皮細胞に対する薬物の効力または毒

20

性と相関する）

を含んでなる、方法。

【請求項 20】

内皮細胞の増殖を調節する化合物を同定する方法であって、

化合物の存在下および不在下で内皮細胞を培養し；かつ

その細胞において少なくとも一つの B E C または L E C 遺伝子の発現を測定する（ここで、B E C または L E C 遺伝子は表 3 および表 4 に示されるポリペプチドをコードする遺伝子から選択され、化合物の不在下と比べて存在下での少なくとも一つの B E C 遺伝子の発現に変化があれば、その化合物は B E C 増殖のモジュレーターであると同定され、また化合物の不在下と比べて存在下での少なくとも一つの L E C 遺伝子の発現に変化があれば

30

、その化合物は L E C 増殖のモジュレーターであると同定される）

ことを含んでなる、方法。

【請求項 21】

B E C または L E C の増殖または分化を選択的に調節する化合物をスクリーニングする、請求項 20 に記載の方法であって、

前記測定工程が、細胞において少なくとも一つの B E C 遺伝子および少なくとも一つの L E C 遺伝子の発現を測定することを含んでなり、かつ、

少なくとも一つの L E C 遺伝子の発現に比べて少なくとも一つの B E C 遺伝子の発現を示差的に調節する化合物を選択することにより、B E C または L E C の増殖または分化を選択的に調節する化合物に関してスクリーニングすることを含んでなる、方法。

40

【請求項 22】

配列番号 31 ~ 44、46、48、50、52、81、187、207、211、221、235、241、293 および 391 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドをコードする核酸配列を含んでなる、単離されたポリヌクレオチドと

、医薬上許容される希釈剤、担体またはアジュバントとを含んでなる、組成物。

【請求項 23】

配列番号 14 ~ 30、45、47、49、51、82、93、111、188、208、212、222、236、242、294 および 392 からなる群より選択されるヌク

50

レオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド、またはそのポリペプチドをコードするその断片を含んでなる、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

配列番号 3 1 ~ 4 4、4 6、4 8、5 0、5 2、8 1、1 8 7、2 0 7、2 1 1、2 2 1、2 3 5、2 4 1、2 9 3 および 3 9 1 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドと、機能的に連結された発現制御配列を含んでなる、発現ベクター。

【請求項 2 5】

該ポリヌクレオチドを含む複製欠陥アデノウイルスまたはアデノ随伴ウイルスである、請求項 2 4 に記載の発現ベクター。

【請求項 2 6】

請求項 2 4 または 2 5 に記載の発現ベクターと、医薬上許容される希釈剤、担体またはアジュバントとを含んでなる、組成物。

【請求項 2 7】

哺乳類被験体のリンパ系を調節するために該被験体に組成物を投与するためのプロトコールとともにパッケージングされた、請求項 2 2、2 3 または 2 6 のいずれか一項に記載の組成物を含んでなる、キット。

【請求項 2 8】

請求項 2 4 に記載の発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた、宿主細胞。

【請求項 2 9】

LEC ポリペプチドを生産する方法であって、細胞がポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを発現する条件下で請求項 2 8 に記載の宿主細胞を増殖させる工程を含んでなる、方法。

【請求項 3 0】

配列番号 3 1 ~ 4 4、4 6、4 8、5 0、5 2、8 1、1 8 7、2 0 7、2 1 1、2 2 1、2 3 5、2 4 1、2 9 3 および 3 9 1 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなる、精製および単離されたポリペプチド。

【請求項 3 1】

(a) 配列番号 3 1 ~ 3 4、4 6、4 8、2 0 7、6 7 6、8 5 9 および 8 6 1 ;
(b) (a) のアミノ酸配列のうち少なくとも 1 0 個のアミノ酸からなる細胞外ドメイン断片からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなる、精製および単離されたポリペプチド。

【請求項 3 2】

配列番号 3 1 ~ 3 4、4 6、4 8、2 0 7、6 7 6、8 5 9 および 8 6 1 からなる群より選択されるアミノ酸配列の細胞外ドメイン断片を含んでなり、ポリペプチドがトランスメンブランダメインを欠いている、請求項 3 1 に記載の精製および単離された可溶性ポリペプチド。

【請求項 3 3】

細胞内ドメインを欠いている、請求項 3 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 3 4】

免疫グロブリン定常領域を含んでなる免疫グロブリン断片と融合した、請求項 3 2 または 3 3 に記載のポリペプチドを含んでなる、融合タンパク質。

【請求項 3 5】

請求項 3 0 ~ 3 4 のいずれか一項に記載のポリペプチドまたはタンパク質と、医薬上許容される希釈剤、担体またはアジュバントとを含んでなる、組成物。

【請求項 3 6】

請求項 3 5 に記載の組成物と、哺乳類被験体のリンパ系を調節するために該被験体に該医薬組成物を投与するためのプロトコールとを含んでなる、キット。

10

20

30

40

50

【請求項 37】

請求項 30 ~ 34 のいずれか一項に記載のポリペプチドと特異的に結合する、抗体。

【請求項 38】

ヒト化抗体である、請求項 37 に記載の抗体。

【請求項 39】

請求項 30 ~ 34 のいずれか一項に記載のポリペプチドと特異的に結合する抗体の抗原結合ドメインを含んでなるタンパク質であって、該ポリペプチドと特異的に結合する、タンパク質。

【請求項 40】

LEC 核酸を同定する方法であって、

(a) 候補 LEC 核酸を含む生体サンプルを、配列番号 1 ~ 30、45、47、49、51、82、93、111、188、208、212、236、242、294 および 392 からなる群より選択される配列の少なくとも 14 の連続するヌクレオチドからなる断片を含んでなるポリヌクレオチド、またはその相補体と、下記のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件：

(i) 50%ホルムアミド、5×SSPE、5×デンハート溶液、0.1%SDS および 0.1mg/ml 変性サケ精子DNA を含有する溶液中、42℃にて20時間のハイブリダイゼーション、および

(ii) 1×SSC、0.1%SDS 中、65℃にて30分間の洗浄

の下で接触させ；かつ

(b) 該候補 LEC 核酸と該ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションを検出し、それにより LEC 核酸を同定することを含んでなる、方法。

【請求項 41】

LEC タンパク質を同定する方法であって、

(a) 候補 LEC タンパク質を含む生体サンプルを、請求項 37 に記載の抗体または請求項 39 に記載のタンパク質からなる群より選択される LEC タンパク質結合相手と、それらの間の結合に適した条件下で接触させ；かつ

(b) 該候補 LEC タンパク質と該 LEC 結合相手の間の結合を検出し、それにより LEC タンパク質を同定することを含んでなる、方法。

【請求項 42】

LEC を同定する方法であって、

(a) 細胞を含む生体サンプルを LEC 結合相手と、それらの間の結合に適した条件下で接触させ（ここで、該 LEC 結合相手は配列番号 31 ~ 34、46、48、207、676、859 および 861 からなる群より選択される配列を含んでなるポリペプチドと結合する抗体を含んでなるか、または該抗体の抗原結合フラグメントを含んでなり；かつ

(b) 細胞と LEC 結合相手との間の結合を検出することにより LEC を同定し、ここで、LEC 結合相手と細胞が結合していれば、LEC であると確認されることを含んでなる、方法。

【請求項 43】

遺伝性リンパ水腫の発症リスクをアッセイする方法であって、

(a) 遺伝性リンパ水腫の表現型と関連があり、かつ、ヒト被験者の少なくとも一つの対立遺伝子のコードされているアミノ酸配列が、対応する野生型対立遺伝子によりコードされているポリペプチドのアミノ酸配列と比べた場合に変更されている突然変異に関してヒト被験者の核酸をアッセイし、ここで、この野生型ポリペプチドは表 3 に示されているポリペプチドである

ことを含んでなる、方法。

【請求項 44】

遺伝性リンパ水腫の発症リスクをアッセイする方法であって、

10

20

30

40

50

(a) 遺伝性リンパ水腫の表現型と関連があり、かつ、ヒト被験者の少なくとも一つの対立遺伝子のコードされているアミノ酸配列が、対応する野生型対立遺伝子によりコードされているポリペプチドのアミノ酸配列と比べた場合に変更されている突然変異に関してヒト被験者の核酸をアッセイし、ここで、この野生型ポリペプチドは配列番号31~44、46、48、52、54、207、676、859および861からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなり；かつ

(b) 核酸における該突然変異の有無と、遺伝性リンパ水腫の発症リスクを相関させ、ここで、核酸に該突然変異が存在する場合を遺伝性リンパ水腫の発症の高いリスクがあることと関連づけ、核酸に該突然変異が不在である場合を遺伝性リンパ水腫の発症の高いリスクがないことと関連づけることを含んでなる、方法。

10

【請求項45】

遺伝性リンパ水腫の発症リスクをアッセイする方法であって、

(a) ヒト被験者の少なくとも一つの転写因子対立遺伝子のコードされているアミノ酸配列、および、その対立遺伝子によりコードされている転写因子ポリペプチドの転写調節活性が、野生型対立遺伝子によりコードされている転写因子ポリペプチドの転写調節活性と比べた場合に変更されている突然変異に関してヒト被験者の核酸をアッセイし、ここで、この野生型転写因子ポリペプチドは配列番号81、配列番号211、配列番号241、および表5の配列によりコードされている転写因子からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなり；かつ

20

(b) 核酸における該突然変異の有無と、遺伝性リンパ水腫の発症リスクを相関させ、ここで、核酸に該突然変異が存在する場合を遺伝性リンパ水腫の発症の高いリスクがあることと関連づけ、核酸に該突然変異が不在である場合を遺伝性リンパ水腫の発症の高いリスクがないことと関連づけることを含んでなる、方法。

【請求項46】

野生型転写因子対立遺伝子が、配列番号54で示されるSox18アミノ酸配列を含んでなる、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

アッセイにより、Sox18対立遺伝子によりコードされるタンパク質のトランス活性化またはDNA結合ドメインのアミノ酸配列を変更する突然変異が確認される、請求項46に記載の方法。

30

【請求項48】

該突然変異が、野生型SOX18による該遺伝子の転写の活性化と比べてSOX18応答性遺伝子の転写活性化を低下させる、請求項46に記載の方法。

【請求項49】

遺伝性リンパ水腫の発症リスクをアッセイする方法であって、

(a) ヒト被験者の少なくとも一つのLEC対立遺伝子のコードされているアミノ酸配列が、また、そのLEC対立遺伝子によりコードされている接着ポリペプチドの結合親和性が、野生型対立遺伝子によりコードされている接着ポリペプチドの結合親和性と比べた場合に変更されている突然変異に関するヒト被験者の核酸をアッセイし、ここで、この野生型接着ポリペプチドは配列番号31~34、46、207、676、859および861からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなり；かつ

40

(b) 核酸における該突然変異の有無と、遺伝性リンパ水腫の発症リスクを相関させ、ここで、核酸に該突然変異が存在する場合を遺伝性リンパ水腫の発症の高いリスクがあることと関連づけ、核酸に該突然変異が不在である場合を遺伝性リンパ水腫の発症の高いリスクがないことと関連づけることを含んでなる、方法。

【請求項50】

アッセイにより突然変異の存在が確認され、相関工程によりその患者の遺伝性リンパ水

50

腫の発症の高いリスクが確認される、請求項 43 ~ 49 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 51】

遺伝性リンパ水腫の発症の高いリスクがあるかどうかヒト被験者をスクリーニングする方法であって、表 3 のアミノ酸配列を含んでなる少なくとも一つのポリペプチドのコードされているアミノ酸配列を変更する突然変異に関してヒト被験者の核酸をアッセイすることを含んでなる、方法。

【請求項 52】

ポリペプチドが、遺伝性リンパ水腫の発症リスクと相関する様式で、配列番号 31 ~ 44、46、48、50、52 および 54、207、676、859 および 861 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなる、請求項 51 に記載の方法。

10

【請求項 53】

ポリペプチドが配列番号 54 に示される SOX18 アミノ酸配列を含んでなる、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

(a) ヒト被験者の少なくとも一つのポリヌクレオチドの少なくとも一つのコドンのヌクレオチド配列を決定すること；

(b) ヒト被験者由来の核酸が 1 以上の参照配列と同じヌクレオチド配列を有するか、異なるヌクレオチド配列を有するかを決定するためにハイブリダイゼーションアッセイを行うこと；

(c) ヒト被験者由来の核酸が 1 以上の参照配列と同じヌクレオチド配列を有するか、異なるヌクレオチド配列を有するかを決定するためにポリヌクレオチド移動アッセイを行うこと；

20

(d) ヒト被験者由来の核酸が 1 以上の参照配列と同じヌクレオチド配列を有するか、異なるヌクレオチド配列を有するかを決定するために制限エンドヌクレアーゼ消化を行うこと

からなる群より選択される少なくとも一つの手順を含んでなる、請求項 43 ~ 53 に記載の方法。

【請求項 55】

該 LEC ポリヌクレオチドのコード配列を含んでなる核酸を増幅するためにポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行うこと、および増幅された核酸のヌクレオチド配列を決定することを含んでなる、請求項 43 ~ 53 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 56】

ヒト被験者において遺伝性リンパ水腫の遺伝子をスクリーニングする方法であって、

(a) 該被験者由来の核酸を含んでなる生体サンプルを準備し；かつ

(b) 該核酸を、ヒト被験者において少なくとも一つの遺伝子の少なくとも一つの対立遺伝子のコードされているアミノ酸配列を、配列番号 31 ~ 44、46、48、50、52、54、207、676、859 および 861 からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードするヒト遺伝子と比べて変更する突然変異が存在するかどうか分析し、ここで、ヒト被験者に、コードされるアミノ酸配列を、ヒト被験者のリンパ水腫と相関する様式で変更する突然変異が存在していれば、遺伝性リンパ水腫の遺伝子型と確認されることを含んでなる、方法。

40

【請求項 57】

該生体サンプルが細胞サンプルである、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

該分析が該核酸の一部を配列決定することを含んでなる、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 59】

ヒト被験者が本スクリーニング方法により同定される遺伝性リンパ水腫の遺伝子型を有する、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 60】

少なくとも一つの遺伝子が、配列番号 54 で示されるアミノ酸配列をコードするヒト S

50

o x 1 8 遺伝子に相当する、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

リンパ管形成を阻害する方法であって、被験体に L E C トランスメンブランポリペプチドの阻害剤を投与することを含んでなり、ここで、この L E C トランスメンブランポリペプチドが配列番号 3 1 ~ 3 4、4 6、4 8、2 0 7、6 7 6、8 5 9 および 8 6 1 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなり、かつ、

この阻害剤が

- (a) L E C トランスメンブランポリペプチドの可溶性細胞外ドメイン断片；
- (b) L E C トランスメンブランポリペプチドの細胞外ドメインと結合する抗体；
- (c) (b) の抗体の抗原結合ドメインを含んでなるポリペプチド；および
- (d) L E C トランスメンブランポリペプチドまたはその相補体をコードする核酸と

10

相補的なアンチセンス核酸

からなる群より選択される、方法。

【請求項 6 2】

阻害剤が L E C ポリペプチドの細胞外ドメイン断片を含んでなるポリペプチドであり、該細胞外ドメインの配列が配列番号 3 1 のアミノ酸 1 ~ 1 5 2、配列番号 3 2 のアミノ酸 1 ~ 6 9 5 および配列番号 3 3 のアミノ酸 1 ~ 2 4 8 からなる群より選択される、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

該被験体が腫瘍を含むヒトである、請求項 6 1 または 6 2 に記載の方法。

20

【請求項 6 4】

哺乳類被験体においてリンパ管形成を調節する方法であって、

リンパ管形成の調節を必要とする哺乳類被験体に、L E C ポリヌクレオチド（この L E C ポリヌクレオチドは配列番号 1 4 ~ 3 0、4 5、4 7、4 9 および 5 1、2 0 8、6 7 7、8 6 0 および 8 6 2 からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含んでなる）に対するアンチセンス分子を、L E C ポリヌクレオチドによりコードされているポリペプチドの転写または翻訳を阻害するのに有効な量で投与することを含んでなる、方法。

【請求項 6 5】

遺伝性リンパ水腫を治療する方法であって、

(a) 遺伝性リンパ水腫を有し、かつ、ヒト被験者の少なくとも一つのポリペプチドのコードされているアミノ酸配列を、配列番号 3 1 ~ 4 4、4 6、4 8、5 0、5 2、5 4、2 0 7、6 7 6、8 5 9 および 8 6 1 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドのアミノ酸配列と比べて変更する突然変異を有するヒト被験者を同定し；かつ

30

(b) 該被験者に、V E G F - C ポリヌクレオチド、V E G F - C ポリペプチド、V E G F - D ポリヌクレオチドおよび V E G F - D ポリペプチドからなる群より選択されるリンパ増殖因子を投与することを含んでなる、方法。

【請求項 6 6】

内皮細胞または内皮前駆細胞の増殖を調節する方法であって、内皮細胞または内皮前駆細胞を、細胞において p r o x - 1 の転写調節を調節する薬剤を含んでなる組成物と接触させることを含んでなり、その薬剤が

40

- (a) p r o x - 1 ポリペプチド；
- (b) p r o x - 1 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；
- (c) p r o x - 1 に対するアンチセンス分子；

からなる群より選択される、方法。

【請求項 6 7】

細胞が培養内皮細胞または内皮前駆細胞を含み、接触が ex vivo で行われる、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

50

接触が培養培地に薬剤を含めることを含んでなる、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 69】

細胞が内皮前駆細胞を含む、請求項 66 ~ 68 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 70】

細胞が、接触工程の後に哺乳類被験体に導入される、請求項 66 ~ 69 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 71】

被験体がヒトである、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 72】

ヒト被験者が LEC 疾患を有する、請求項 71 に記載の方法。

10

【請求項 73】

ヒト被験者において LEC 機能を増強する方法であって、

ヒト被験者から内皮細胞または内皮前駆細胞を単離し；

内皮細胞を、prox-1 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトして LEC の分化および増殖を促進し；かつ

形質転換またはトランスフェクション工程の後にその LEC 細胞をヒト被験者に投与することを含んでなる、方法。

【請求項 74】

単離工程と投与工程のヒト被験者が同一である、請求項 73 に記載の方法。

20

【請求項 75】

ヒト被験者がリンパ水腫を有する、請求項 73 または 74 に記載の方法。

【請求項 76】

ベクターおよび形質転換またはトランスフェクション方法が prox-1 の一時的発現向けに選択される、請求項 73 ~ 75 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 77】

発現ベクターが複製欠陥アデノウイルスベクターを含んでなる、請求項 73 ~ 75 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 78】

配列番号 31 のアミノ酸 61 ~ 127 と少なくとも 95% 同一なアミノ酸配列を含んでなる、単離されたポリペプチド。

30

【請求項 79】

配列番号 31 のアミノ酸 30 ~ 152 と少なくとも 95% 同一なアミノ酸配列を含んでなる、請求項 78 に記載のポリペプチド。

【請求項 80】

配列番号 31 で示されるアミノ酸配列の断片を含んでなる可溶性ポリペプチドであって、該断片が配列番号 31 のトランスメンブランおよび細胞内アミノ酸を欠いている、可溶性ポリペプチド。

【請求項 81】

配列番号 32 の少なくとも一つのロイシン豊富な領域を含んでなる、単離されたポリペプチド。

40

【請求項 82】

配列番号 32 のトランスメンブランアミノ酸を欠いている、請求項 81 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 83】

配列番号 33 の少なくとも一つのロイシン豊富な領域を含んでなる、単離されたポリペプチド。

【請求項 84】

配列番号 33 のトランスメンブランアミノ酸を欠いている、請求項 81 に記載の単離さ

50

れたポリペプチド。

【請求項 85】

配列番号 111 で示されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドの断片であって、少なくとも一つの I 型 トロンボスポンジンリピート配列を含む断片と、少なくとも 95% 同一なアミノ酸配列を含んでなる、単離されたポリペプチド。

【請求項 86】

該断片が配列番号 111 の 6 つの I 型 トロンボスポンジンリピート配列を含む、請求項 85 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 87】

配列番号 111 で示されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドの断片であって、少なくとも一つの C-2 型免疫グロブリンドメインを含む断片と、少なくとも 95% 同一なアミノ酸配列を含んでなる、単離されたポリペプチド。

10

【請求項 88】

該断片が配列番号 111 の 3 つの C-2 型免疫グロブリンドメイン配列を含む、請求項 85 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 89】

請求項 78 ~ 88 のいずれか一項に記載のポリペプチドと異種ポリペプチドを含んでなる、融合タンパク質。

【請求項 90】

請求項 78 ~ 88 のいずれか一項に記載のポリペプチドと特異的に結合する、抗体。

20

【請求項 91】

請求項 78 ~ 89 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド。

【請求項 92】

発現制御配列と機能的に連結された請求項 91 に記載のポリヌクレオチドを含んでなる、発現ベクター。

【請求項 93】

複製欠陥アデノウイルスベクターである、請求項 92 に記載の発現ベクター。

【発明の詳細な説明】

【発明の背景】

30

【0001】

発明の分野

本発明は、リンパ管内皮細胞において特異的に発現されるポリヌクレオチドおよびタンパク質に関する。

【0002】

関連技術

リンパ管内皮増殖因子と癌のリンパ管内増殖および転移との関連に関する最近の証拠から (Mandriota, et al., EMBO J. 20:672-682頁 (2001); Skobe, et al., Nat. Med. 7:192-198頁 (2001); Stacker, et al., Nat. Med. 7:186-191頁 (2001); Karpanen, et al., Cancer Res. 61:1786-1790頁 (2001))、腫瘍治療のさらなる標的としてリンパ管を利用することができるという希望が見えてきた。癌細胞は、周辺組織への直接浸潤、体腔への拡散、血管系への浸潤 (血行性転移)、ならびにリンパ系を通じた拡散 (リンパ行性転移) によって体内に広がる。局所リンパ節播種はいくつかの頻度の高い癌の転移における第一段階であり、疾病の予後と大いに関係している。腫瘍領域からの組織液の排出に関するリンパ節はセンチネル節と呼ばれ、これらのリンパ節を発見し、また、転移が疑われる場合はそれらを除去するための診断尺度である。しかしながら、その臨床的妥当性にもかかわらず、血流を通じてまたはリンパ管を通じて転移に至る機構についてはほとんど分かっていない。

40

【0003】

最近まで、リンパ管は医学におけるそれらの重要性にもかかわらず、血管ほど注目され

50

ていなかった。リンパ管は大部分の組織の間質腔からタンパク質を豊富に含む液体と白血球を集め、それらを白濁流体、リンパ液、として血液循環内に輸送する。小リンパ管が合流し、リンパ液を胸管を通して頸部に大静脈に注ぎ込む大きな管になる。リンパ節はリンパ管に沿って濾過ステーションとしての機能を果たし、リンパ液は集合リンパ管周囲の平滑筋の収縮により、また身体の動きにより流れ、その流れる方向は静脈内では弁により保証されている。毛細リンパ管は内皮細胞で覆われており、この内皮細胞はいくつもの大きな内皮間ギャップと異なる部分で連絡している。毛細リンパ管はまた、連続した基底膜がなく、周皮細胞を欠いている。アンカーリングフィラメント(Anchoring filament)はリンパ管内皮細胞の管外側の面を血管周囲の細胞外基質と繋ぎ、組織に浮腫が存在する場合に血管の開通性を維持するよう協力する。通常、感染、外科処置、または放射線治療、および、まれに、遺伝的欠陥の結果であるリンパ管の欠如または閉塞により、組織においてタンパク質を豊富に含む(protein-rich)液体の貯留、リンパ水腫が起こる。リンパ系はまた、腸管からの脂肪吸収および免疫応答においても重要である。細菌、ウイルス、およびその他の異物はリンパ管に取り込まれ、リンパ節(ここで、異物は免疫細胞に提示され、かつ、樹状細胞はリンパ管を通して遊走する)に輸送される。リンパ管を操作する能力の理解は遅々として進んでいない。

10

【0004】

リンパ管ECの発生または機能異常によりリンパ管腫またはリンパ管拡張症などのリンパ管の腫瘍または奇形を引き起こすことがある。Witte, et al., Regulation of Angiogenesis (Goldber, I.D. & Rosen, E.M.編) 65-112頁 (Birkhauser, Basel, Switzerland, 1997)。VEGFR-3チロシンキナーゼ受容体は正常なリンパ管内皮細胞において発現され、カポジ肉腫をはじめとする種々の血管腫瘍においてアップレギュレートされる。Jussila, et al., Cancer Res 58, 1955-1604頁 (1998); Partanen, et al., Cancer 86:2406-2412頁 (1999)。感染、外科処置、放射線治療からまたは遺伝的欠陥から起こる可能性のあるリンパ管の欠如または機能異常が、組織におけるタンパク質を豊富に含む液体の慢性的な貯留によって腫脹をもたらすリンパ水腫を引き起こす。外観を損ない、障害を引き起こす四肢の腫脹をもたらす皮膚リンパ管の形成不全を特徴とする疾病、家族性リンパ水腫の遺伝学においては、リンパ管形成に関するVEGFR-3によるシグナル伝達の重要性が明らかにされた。Witte, et al., Regulation of Angiogenesis (Goldber, I.D. & Rosen, E.M.編) 65-112頁 (Birkhauser, Basel, Switzerland, 1997); Rockson, S.G., Am. J. Med. 110, 288-295頁 (2001)。リンパ浮腫を有する家族の何人かが、不活性受容体タンパク質を生じさせるチロシンキナーゼドメインをコードするVEGFR3エクソンのミスセンス変異のために異型接合性である。Karkkainen, et al., Nature Genet. 25:153-159頁 (2000); Irrthum, et al., Am. J. Hum. Genet. 67:295-301頁 (2000)。

20

30

【0005】

内皮細胞の多様性を制御する転写プログラムに関する情報および血管形成およびリンパ管形成の機構への情報が当技術分野において必要とされている。また、腫瘍転移をはじめとする数多くのリンパ管の病気の研究において有用な標的として用い得る新しい血管マーカーも当技術分野において必要とされている。

【発明の概要】

40

【0006】

本発明の組成物としては、単離されたポリヌクレオチド、特に、リンパ管内皮遺伝子、ポリペプチド、これらのポリヌクレオチドによりコードされている単離されたポリペプチド、組換えDNA分子、クローニングされた遺伝子またはその変性変異体、とりわけ、変異型対立遺伝子などの天然に存在する変異体、およびこのようなポリペプチドに存在する一つ以上のエピトープを特異的に認識する抗体が挙げられる。

【0007】

本発明の組成物としては、さらに、本発明のポリヌクレオチド、このようなポリヌクレオチドを含むように遺伝子操作されている細胞およびこのようなポリヌクレオチドを発現するように遺伝子操作されている細胞を含む発現ベクターをはじめとするベクターを含む

50

【0008】

限定した態様では、本発明のこのような単離されたポリヌクレオチドは、記載する、例えば、配列番号1～30のいずれかの配列で示されるヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドを意味する。

【0009】

本発明のポリヌクレオチドとしてはまた、限定されるものではないが、高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号1～30のヌクレオチド配列の相補体とハイブリダイズするポリヌクレオチド；中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号1～30のヌクレオチド配列の相補体とハイブリダイズするポリヌクレオチド；上記ポリヌクレオチドの変異型対立遺伝子であるポリヌクレオチド；上記タンパク質の種間相同物をコードするポリヌクレオチド；配列番号1～30のいずれか一つによりコードされているポリペプチドの特定のドメインまたは末端切断部分を含んでなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも挙げられる。典型的な高いストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件下は50%ホルムアミド、5×SSPE、5×デンハート溶液、0.1%SDSおよび0.1mg/ml変性サケ精子DNAを含有する溶液中、42℃にて20時間のハイブリダイゼーション、および1×SSC、0.1%SDS中、65℃にて30分間の洗浄である。

10

【0010】

本発明の別の態様では、上記ポリヌクレオチドによりコードされているポリペプチドをはじめとするLECおよびBECポリペプチドが意図される。いくつかの態様では、ポリペプチドは本発明のポリペプチドの成熟型である。配列番号31～44、46、48、50、52、81、187、207、211、221、235、241、293および391からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる精製および単離されたポリペプチド；ならびに(a)配列番号31～34、46、48、207、676、859および861；および(b)(a)のアミノ酸配列のうち少なくとも10個のアミノ酸からなる細胞外ドメイン断片からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる精製および単離されたポリペプチドが明確に意図される。さらに、本発明のこの態様は、配列番号31～34、46、48、207、676、859および861からなる群から選択されるアミノ酸配列の細胞外ドメイン断片を含んでなる、すぐ上に記載したような、精製および単離された可溶性ポリペプチド(ただし、このポリペプチドはトランスメンブランドメインを欠いている)を包含する。このようなポリペプチドは細胞内ドメインをさらに欠いている。また、本発明は、免疫グロブリン定常領域を含んでなる免疫グロブリン断片と融合した、上記のようなポリペプチドを含んでなる融合タンパク質も意図する。

20

30

【0011】

関連する態様では、本発明は、上記のようなポリペプチドまたはタンパク質と医薬上許容される希釈剤、担体またはアジュバントを含んでなる組成物を提供する。本発明のポリペプチド組成物は親水性などの許容される担体、例えば、医薬上許容される担体を含んでなるとよい。さらに、このような組成物と、哺乳類被験体のリンパ系を調節するために該被験体に該医薬組成物を投与するためのプロトコールを含んでなるキットが提供される。本発明はまた、上記のようなポリペプチドと特異的に結合する抗体、また、いくつかの態様では、ヒト化抗体である抗体を提供する。さらに、本発明は、以上に記載したようなポリペプチドと特異的に結合する抗体の抗原結合ドメインを含んでなるタンパク質であって、該ポリペプチドと特異的に結合するタンパク質を提供する。

40

【0012】

本発明はまた、ポリペプチドを生産する方法であって、好適な培養培地で本発明の細胞の培養物を増殖させること、およびその培養物から、または細胞抽出物からタンパク質を精製することを含んでなる方法に関する。特に、本発明は、LECポリペプチドを生産する方法であって、細胞がポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを発現する条件下で、本明細書に記載するような発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされ

50

た宿主細胞を増殖させる工程を含んでなる方法を意図する。

【0013】

本明細書に記載する生成物および組成物を同定する方法もまた、本発明により提供される。特に、本発明は、LEC核酸を同定する方法であって、(a)候補LEC核酸を含む生体サンプルを、配列番号1~30、45、47、49、51、82、93、111、188、208、212、236、242、294および392からなる群から選択される配列の少なくとも14の連続するヌクレオチドからなる断片を含んでなるポリヌクレオチド、またはその相補体と、下記のストリンジентなハイブリダイゼーション条件：(i)50%ホルムアミド、5×SSPE、5×デンハート溶液、0.1%SDSおよび0.1mg/ml変性サケ精子DNAを含有する溶液中、42にて20時間のハイブリダイゼーション、および(ii)1×SSC、0.1%SDS中、65にて30分間の洗浄の下で接触させること；および(b)該候補LEC核酸と該ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションを検出し、それによりLEC核酸を同定することを含んでなる方法を提供する。

10

【0014】

本発明はまた、LECタンパク質を同定する方法であって、(a)候補LECタンパク質を含む生体サンプルを、本明細書に記載するような抗体または本明細書に記載するようなタンパク質もしくはポリペプチドからなる群から選択されるLECタンパク質結合相手と、それらの間の結合に適した条件下で接触させること；および(b)該候補LECタンパク質と該LEC結合相手の間の結合を検出し、それによりLECタンパク質を同定することを含んでなる方法を提供する。

20

【0015】

本発明の別の関連する態様は、LECを同定する方法であって、(a)細胞を含む生体サンプルをLEC結合相手と、それらの間の結合に適した条件下で接触させること(ここで、該LEC結合相手は配列番号31~34、46、48、207、676、859および861からなる群から選択される配列を含んでなるポリペプチドと結合する抗体を含んでなるか、または該抗体の抗原結合フラグメントを含んでなる)；および(b)細胞とLEC結合相手との間の結合を検出することによりLECを同定すること(ここで、LEC結合相手と細胞が結合していれば、LECであると確認される)を含んでなる方法である。

30

【0016】

本発明のポリヌクレオチドは、分子生物学の分野のスキルを有する人には公知の種々の技術において数多くの用途がある。これらの技術としては、ハイブリダイゼーションプローブとしての使用、PCRでのプライマーとしての使用、染色体および遺伝子マッピングでの使用、タンパク質の組換え生産における使用、およびアンチセンスDNAもしくはRNA、それらの化学的類似体などの作製における使用が挙げられる。例えば、mRNAの発現がリンパ管内皮細胞などの特定の細胞または組織種のみ限定される場合、例えば、in situ ハイブリダイゼーションを利用して、サンプル中の特定の細胞または組織のmRNAの存在を検出するためにハイブリダイゼーションプローブとして本発明のポリヌクレオチドを使用することができる。

40

【0017】

別の態様では、本発明は、配列番号31~44、46、48、50、52、81、187、207、211、221、235、241、293および391からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドをコードする核酸配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド；および医薬上許容される希釈剤、担体またはアジュバントを含んでなる組成物を提供する。いくつかの態様では、組成物が配列番号14~30、45、47、49、51、82、93、111、188、208、212、222、236、242、294および392からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド、またはそのポリペプチドをコードするその断片を含んでなる。

【0018】

50

本発明のさらに別の態様は、配列番号 31 ~ 44、46、48、50、52、81、187、207、211、221、235、241、293 および 391 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドと機能的に連結された発現制御配列を含んでなる発現ベクターである。いくつかの態様では、発現ベクターが該ポリヌクレオチドを含む複製欠陥アデノウイルスまたはアデノ随伴ウイルスである。本発明の関連する態様は、上記のような発現ベクターと医薬上許容される希釈剤、担体またはアジュバントを含んでなる組成物である。さらに、本発明は、哺乳類被験体のリンパ系を調節するために該被験体に組成物を投与するためのプロトコールとともにパッケージングされた、上記のポリヌクレオチドまたはベクターのいずれかと医薬上許容される希釈剤、担体またはアジュバントを含む組成物を含んでなるキットを提供する。 10

【0019】

本発明はさらに、上記のような発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞を提供する。

【0020】

他のタンパク質に現在適用されている従来の種々の手順および方法において本発明のポリペプチドを使用することができる。さらに、そのポリペプチドと特異的に結合する抗体を作製するために本発明のポリペプチドを使用してもよい。

【0021】

本発明の一つの態様では、血管内皮細胞 (BEC) またはリンパ管内皮細胞 (LEC) の増殖または分化を示差的に調節する方法であって、内皮細胞を、血管またはリンパ管内皮細胞を示差的に調節する薬剤を含んでなる組成物と接触させることを含んでなり、該薬剤が、(a) BEC ポリペプチドもしくは LEC ポリペプチドのアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド、または該ポリペプチドの活性断片；(b) (a) のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド；(c) (a) のポリペプチドと特異的に結合する抗体；(d) (c) の抗体のフラグメントを含んでなるポリペプチド（なお、このフラグメントおよび抗体は該ポリペプチドと結合する）；(e) (a) のポリペプチドをコードするヒト遺伝子または mRNA に対するアンチセンス核酸；(f) (a) のポリペプチドをコードするヒト遺伝子または mRNA に対する干渉 RNA (RNAi) からなる群から選択される方法を提供する。本方法は、内皮細胞の組成物との *ex vivo* または *in vivo* での接触を含んでよい。組成物が医薬上許容される希釈剤、アジュバント、または担体を含んでなり、かつ、接触工程が哺乳類被験体に組成物を投与して、哺乳類被験体において BEC または LEC を示差的に調節することを含んでなってもよい。 20 30

【0022】

さらに、本方法は、LEC の過剰増殖を特徴とする疾患を有するヒト被験者を同定すること；およびそのヒト被験者に組成物を投与すること（なお、この薬剤は BEC の増殖と比べて LEC の増殖を示差的に阻害する）を含んでなってもよい；あるいは、本方法は、LEC の過剰増殖を特徴とする疾患を有するヒト被験者を同定すること；表 3 に示されるポリペプチドの過剰発現を同定するために被験者の LEC をスクリーニングすること；およびそのヒト被験者に組成物を投与すること（なお、この薬剤は、スクリーニング工程によって同定されたポリペプチドの発現を阻害することにより、BEC の増殖と比べて LEC の増殖を示差的に阻害する）を含んでなってもよい。 40

【0023】

本発明のこの態様はまた、ヒト被験者においてリンパ管内皮細胞の増殖を調節する方法であって、過少増殖性のリンパ管疾患を有するヒト被験者を同定すること；表 3 に示される LEC ポリペプチド（該タンパク質は表 1 または 2 に示されるものではない）の発現不足または活性不足を同定するために被験者をスクリーニングすること；そのヒト被験者に組成物を投与すること（なお、この薬剤はスクリーニング工程によって同定された LEC ポリペプチド (a)、もしくは該ポリペプチドの活性断片を含んでなるか、またはそのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド (b) を含んで 50

なる)工程を含んでなる方法を意図する。

【0024】

本発明の関連する態様では、血管内皮細胞(BEC)またはリンパ管内皮細胞(LEC)の増殖または分化を示差的に調節するための薬物の製造を目的とした薬剤の使用であって、該薬剤が、(a)BECポリペプチドもしくはLECポリペプチドのアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド、または該ポリペプチドの活性断片；(b)(a)のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド；(c)(a)のポリペプチドと特異的に結合する抗体；(d)(c)の抗体のフラグメントを含んでなるポリペプチド(ここで、このフラグメントおよび抗体は該ポリペプチドと結合する)；(e)(a)のポリペプチドをコードするヒト遺伝子またはmRNAに対するアンチセンス核酸；

10

【0025】

別の態様では、本発明は、内皮細胞の増殖を調節する化合物を同定する方法であって、化合物の存在下および不在下で内皮細胞を培養すること；およびその細胞において少なくとも一つのBECまたはLEC遺伝子の発現を測定すること(ここで、BECまたはLEC遺伝子は表3および表4に示されるポリペプチドをコードする遺伝子から選択され、化合物の不在下と比べて存在下での少なくとも一つのBEC遺伝子の発現に変化があれば、その化合物はBEC増殖のモジュレーターであると同定され、また化合物の不在下と比べて存在下での少なくとも一つのLEC遺伝子の発現に変化があれば、その化合物はLEC増殖のモジュレーターであると同定される)を含んでなる方法を提供する。本方法を利用して、BECまたはLECの増殖または分化を選択的に調節する化合物に関してスクリーニングしてもよい(ここで、測定工程は細胞において少なくとも一つのBEC遺伝子および少なくとも一つのLEC遺伝子の発現を測定することを含んでなり、かつ、本方法は少なくとも一つのLEC遺伝子の発現に比べて少なくとも一つのBEC遺伝子の発現を示差的に調節する化合物を選択することにより、BECまたはLECの増殖または分化を選択的に調節する化合物に関してスクリーニングすることを含んでなる)。

20

【0026】

さらに、本発明は、ポリペプチドが、表3に示されるLECポリペプチド群から選択されるLECポリペプチドであり、かつ、薬剤がBECの増殖または分化よりもLECの増殖または分化を示差的に調節する、上記の本発明の態様の方法または使用を包含する。いくつかの態様では、LECポリペプチドが配列番号81、187、207、211、221、235、241、293および391からなる群から選択されるアミノ酸を含んでなり；その他の態様では、LECポリペプチドが配列番号31~34、46および48からなる群から選択されるアミノ酸を含んでなる。これらの態様では、薬剤は上記のようなLECポリペプチドと特異的に結合する抗体、またはこのような抗体のペプチド断片であってよい。さらに、その薬剤は上記ポリペプチドの細胞外ドメイン、細胞外ドメインをコードするポリヌクレオチド、またはアンチセンス分子もしくは核酸であってよい。あるいは、ポリペプチドが、表4に示されるBECポリペプチド群から選択されるBECポリペプチドであり、かつ、薬剤がLECの増殖または分化よりもBECの増殖または分化を示差的に調節する。好ましくは、ポリペプチドが表1または2に示されるものではない。

30

40

【0027】

本発明の方法はさらに、サンプル中の本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの存在を検出する方法に関する。このような方法は、例えば、上記のような疾患の予後および診断評価の一環として、また、このような状態に対する素因を示す被験体の同定に利用することができる。さらに、本発明は、薬物の効力を評価し、リンパ管内皮細胞の疾患の治療に向けた臨床試験に参加している患者の進捗状況をモニタリングする方法を提供する。

【0028】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドの発現を調節す

50

る化合物を同定する方法を提供する。このような方法は、例えば、上記のような配列番号 1 ~ 30 のいずれか一つによりコードされているタンパク質の発現に関連した疾患の症状を改善することができる化合物の同定に利用することができる。このような方法としては、限定されるものではないが、本発明のポリペプチドと相互作用する（例えば、結合する）化合物およびその他の物質を同定するアッセイが挙げられる。

【0029】

さらに、本発明は、遺伝性リンパ水腫の発症リスクをアッセイする方法であって、(a) 遺伝性リンパ水腫の表現型と関連があり、かつ、ヒト被験者の少なくとも一つの対立遺伝子のコードされているアミノ酸配列が、対応する野生型対立遺伝子によりコードされているポリペプチドのアミノ酸配列と比べた場合に変更されている突然変異に関してヒト被験者の核酸をアッセイすること（なお、この野生型ポリペプチドは表3に示されているポリペプチドである）を含んでなる方法を提供する。また、遺伝性リンパ水腫の発症リスクに関してアッセイする方法は、(a) 遺伝性リンパ水腫の表現型と関連があり、かつ、ヒト被験者の少なくとも一つの対立遺伝子のコードされているアミノ酸配列が、対応する野生型対立遺伝子によりコードされているポリペプチドのアミノ酸配列と比べた場合に変更されている突然変異に関してヒト被験者の核酸をアッセイすること（なお、この野生型ポリペプチドは配列番号31~44、46、48、52、54、207、676、859および861からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる）；(b) 核酸における該突然変異の有無と遺伝性リンパ水腫の発症リスクを相関させること（ここで、核酸に該突然変異が存在する場合を遺伝性リンパ水腫の発症の高いリスクがあることと関連づけ、核酸に該突然変異が不在である場合を遺伝性リンパ水腫の発症の高いリスクがないことと関連づける）を含んでなる。

10

20

【0030】

遺伝性リンパ水腫の発症リスクをアッセイする別の方法では、その工程が、(a) ヒト被験者の少なくとも一つの転写因子対立遺伝子のコードされているアミノ酸配列が、また、その対立遺伝子によりコードされている転写因子ポリペプチドの転写調節活性が、野生型対立遺伝子によりコードされている転写因子ポリペプチドの転写調節活性と比べた場合に変更されている突然変異に関してヒト被験者の核酸をアッセイすること（なお、この野生型転写因子ポリペプチドは配列番号81、配列番号211、配列番号241、および表5の配列によりコードされている転写因子からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる）；および(b) 核酸における該突然変異の有無と遺伝性リンパ水腫の発症リスクを相関させること（ここで、核酸に該突然変異が存在する場合を遺伝性リンパ水腫の発症の高いリスクがあることと関連づけ、核酸に該突然変異が不在である場合を遺伝性リンパ水腫の発症の高いリスクがないことと関連づける）を含んでなる。本方法では、該野生型転写因子対立遺伝子が配列番号54で示されるSox18アミノ酸配列を含んでなってよい。本方法のいくつかの態様では、アッセイにより、Sox18対立遺伝子によりコードされるタンパク質のトランス活性化またはDNA結合ドメインのアミノ酸配列を変更する突然変異が確認され；本方法の他のいくつかの態様では、該突然変異が野生型SOX18による該遺伝子の転写の活性化と比べてSOX18応答性遺伝子の転写活性化を低下させる。

30

40

【0031】

関連する態様では、本発明は、遺伝性リンパ水腫の発症リスクに関してアッセイする方法であって、(a) ヒト被験者の少なくとも一つのLEC対立遺伝子のコードされているアミノ酸配列が、また、そのLEC対立遺伝子によりコードされている接着ポリペプチドの結合親和性が、野生型対立遺伝子によりコードされている接着ポリペプチドの結合親和性と比べた場合に変更されている突然変異に関してヒト被験者の核酸をアッセイすること（なお、この野生型接着ポリペプチドは配列番号31~34、46、207、676、859および861からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる）；および(b) 核酸における該突然変異の有無と遺伝性リンパ水腫の発症リスクを相関させること（ここで、核酸に該突然変異が存在する場合を遺伝性リンパ水腫の発症の高いリスクがあること

50

と関連づけ、核酸に該突然変異が不在である場合を遺伝性リンパ水腫の発症の高いリスクがないことと関連づける)を含んでなる方法を提供する。本方法のいくつかの態様では、少なくとも一つの遺伝子が、配列番号54で示されるアミノ酸配列をコードするヒトSOX18遺伝子に相当する。

【0032】

遺伝性リンパ水腫の発症リスクをアッセイする本発明の方法では、アッセイにより突然変異の存在が確認され、相関工程によりその患者の遺伝性リンパ水腫の発症の高いリスクが確認される。

【0033】

本発明の関連する方法は、遺伝性リンパ水腫の発症の高いリスクがあるかどうかヒト被験者をスクリーニングする方法であって、表3のアミノ酸配列を含んでなる少なくとも一つのポリペプチドのコードされているアミノ酸配列を変更する突然変異に関してヒト被験者の核酸をアッセイすることを含んでなる方法である。本方法のいくつかの態様では、ポリペプチドが、遺伝性リンパ水腫の発症リスクと相関する様式で、配列番号31~44、46、48、50、52および54、207、676、859および861からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなり、また、ポリペプチドが配列番号54に示されるSOX18アミノ酸配列を含んでなることが明確に意図される。

【0034】

本発明の関連する態様では、上記のような、遺伝性リンパ水腫の発症リスクをアッセイまたはスクリーニングする方法であって、(a)ヒト被験者の少なくとも一つのポリヌクレオチドの少なくとも一つのコドンのヌクレオチド配列を決定すること；(b)ヒト被験者由来の核酸が1以上の参照配列と同じヌクレオチド配列を有するか、異なるヌクレオチド配列を有するかを決定するためにハイブリダイゼーションアッセイを行うこと；(c)ヒト被験者由来の核酸が1以上の参照配列と同じヌクレオチド配列を有するか、異なるヌクレオチド配列を有するかを決定するためにポリヌクレオチド移動アッセイを行うこと；および(d)ヒト被験者由来の核酸が1以上の参照配列と同じヌクレオチド配列を有するか、異なるヌクレオチド配列を有するかを決定するために制限エンドヌクレアーゼ消化を行うことからなる群から選択される少なくとも一つの手順を含んでなる方法が意図される。

【0035】

本発明の関連する態様では、上記のような、遺伝性リンパ水腫の発症リスクをアッセイまたはスクリーニングする方法であって、該LECポリヌクレオチドのコード配列を含んでなる核酸を増幅するためにポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うこと、および増幅された核酸のヌクレオチド配列を決定することを含んでなる方法を提供する。

【0036】

さらに、本発明により、ヒト被験者において遺伝性リンパ水腫の遺伝子型に関してスクリーニングする方法であって、(a)該被験者由来の核酸を含んでなる生体サンプルを準備すること；および(b)該核酸を、ヒト被験者において少なくとも一つの遺伝子の少なくとも一つの対立遺伝子のコードされているアミノ酸配列を、配列番号31~44、46、48、50、52、54、207、676、859および861からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードするヒト遺伝子と比べて変更する突然変異が存在するかどうか分析すること(ここで、ヒト被験者に、コードされるアミノ酸配列を、ヒト被験者のリンパ水腫と相関する様式で変更する突然変異が存在していれば、遺伝性リンパ水腫の遺伝子型と確認される)を含んでなる方法が提供される。本方法のいくつかの態様では、該生体サンプルが細胞サンプルである。本方法のその他の態様では、該分析が該核酸の一部を配列決定することを含んでなる。本方法のさらなる態様では、ヒト被験者が本スクリーニング方法により同定される遺伝性リンパ水腫の遺伝子型を有する。

【0037】

本発明の別の態様では、リンパ管形成を阻害する方法であって、被験体にLECトランスメンブランポリペプチドの阻害剤を投与することを含んでなり、このLECトランス

10

20

30

40

50

ンブランポリペプチドが配列番号31~34、46、48、207、676、859および861からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなり、かつ、この阻害剤が(a)LECトランスメンブランポリペプチドの可溶性細胞外ドメイン断片；(b)LECトランスメンブランポリペプチドの細胞外ドメインと結合する抗体；(c)(b)の抗体の抗原結合ドメインを含んでなるポリペプチド；および(d)LECトランスメンブランポリペプチドまたはその相補体をコードする核酸と相補的なアンチセンス核酸からなる群から選択される方法を提供する。本方法のいくつかの態様では、阻害剤がLECポリペプチドの細胞外ドメイン断片を含んでなるポリペプチドであり、該細胞外ドメインの配列が配列番号31のアミノ酸1~152、配列番号32のアミノ酸1~695および配列番号33のアミノ酸1~248からなる群から選択される。本方法のいくつかの態様では、該被験体が腫瘍を含むヒトである。

10

【0038】

関連する態様では、本発明は、哺乳類被験体においてリンパ管形成を調節する方法であって、リンパ管形成の調節を必要とする哺乳類被験体に、LECポリヌクレオチド(このLECポリヌクレオチドは配列番号14~30、45、47、49および51、208、677、860および862からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなる)に対するアンチセンス分子を、LECポリヌクレオチドによりコードされているポリペプチドの転写または翻訳を阻害するのに有効な量で投与することを含んでなる方法を提供する。

【0039】

20

また、本発明の方法として、上記のようなリンパ管内皮細胞の疾患を治療する方法であって、このような疾患に関係のある症状または傾向を示す個体にこのような化合物を投与することを含む方法も挙げられる。

【0040】

別の態様では、本発明は、遺伝性リンパ水腫を治療する方法であって、(a)遺伝性リンパ水腫を有し、かつ、ヒト被験者の少なくとも一つのポリペプチドのコードされているアミノ酸配列を、配列番号31~44、46、48、50、52、54、207、676、859および861からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドのアミノ酸配列と比べて変更する突然変異を有するヒト被験者を同定すること；および(b)該被験者に、VEGF-Cポリヌクレオチド、VEGF-Cポリペプチド、VEGF-DポリヌクレオチドおよびVEGF-Dポリペプチドからなる群から選択されるリンパ増殖因子を投与することを含んでなる方法を提供する。

30

【0041】

本発明はまた、遺伝性リンパ水腫を治療する方法であって、リンパ水腫を有し、かつ、表3に示されるLECタンパク質をコードする遺伝子の少なくとも一つの対立遺伝子における突然変異を有するヒト被験者を同定すること(この突然変異はヒト被験者におけるリンパ水腫と関係があり、また、該LECタンパク質はVEGFR-3ではない)；および該被験者に、VEGF-Cポリペプチド、VEGF-Dポリペプチド、VEGF-Cポリヌクレオチド、およびVEGF-Dポリヌクレオチドからなる群から選択されるリンパ増殖剤を含んでなる組成物を投与することを含んでなる方法を提供する。本発明はまた、表3に示されるLEC遺伝子における突然変異から起こる遺伝性リンパ水腫の治療のための薬物の製造における、VEGF-Cポリペプチド、VEGF-Dポリペプチド、VEGF-Cポリヌクレオチド、およびVEGF-Dポリヌクレオチドからなる群から選択されるリンパ増殖剤の使用(ただし、この遺伝子はVEGFR-3ではない)を包含する。

40

【0042】

さらに、本発明は標的とする遺伝子産物の全活性を調節する化合物およびその他の物質を投与することによって、このような疾病または疾患を治療する方法を包含する。化合物およびその他の物質は標的とする遺伝子の発現レベルまたは標的とするタンパク質の活性レベルのいずれかでこのような調節をなし得る。これらの治療方法は、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを内皮細胞、例えば、LECおよび/またはBECに投与す

50

ること、またはヒト患者などの生物に投与することを含む。本発明のこの態様での典型的な方法は、少なくとも一つの本発明のポリヌクレオチドの発現を調節することができるアンチセンスポリヌクレオチド、本発明のポリペプチド、本発明のポリヌクレオチド、本発明のポリペプチドを特異的に認識する抗体または抗体フラグメント、V E G F - C ポリヌクレオチド、V E G F - C ポリペプチド、V E G F - D ポリヌクレオチド、V E G F - D ポリペプチドおよび可溶性V E G F R - 3 ポリペプチドからなる群から選択される治療用物質を投与することである。

【0043】

別の態様では、本発明は、内皮細胞疾患または該疾患に対する疾病素因に関してスクリーニングする方法であって、ヒト被験者から内皮細胞mRNAを含む生体サンプルを得ること；および該遺伝子から転写されたサンプル中のmRNAの量からB E CまたはL E C遺伝子の発現を測定すること（ここで、このB E CまたはL E C遺伝子は表3または4に示されるポリペプチドをコードする）を含んでなる方法を提供する。

10

【0044】

本発明は、リンパ管内皮細胞の増殖を阻害する方法であって、その細胞を、増殖を阻害することができる薬剤と結合した少なくとも一つの抗体を含んでなる組成物と接触させること（ここで、薬剤が細胞傷害性薬剤および細胞増殖抑制剤からなる群から選択され、かつ、抗体が配列番号14～17、45、47、860および862からなる群から選択される配列を含んでなるポリヌクレオチドによりコードされているポリペプチドと特異的に結合する）を含んでなる方法に関する。本方法の特定の態様では、ポリペプチドは配列番号31～34、46、48、859および861からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる。

20

【0045】

本発明はさらに、リンパ管内皮細胞を検出する方法であって、その細胞を、蛍光分子または放射性標識化分子などの検出可能な薬剤と結合した少なくとも一つの抗体を含んでなる組成物と接触させることを含んでなる方法に関する。特定の態様では、抗体は配列番号14～17、45、47、860および862からなる群から選択される配列を含んでなるポリヌクレオチドによりコードされているポリペプチドと特異的に結合する。本方法のさらなる特定の態様では、ポリペプチドは配列番号31～34、46、48、859および861からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる。

30

【0046】

本発明はさらに、リンパ管内皮細胞を単離する方法であって、その細胞をその細胞の細胞膜のトランスメンブラン型タンパク質と結合することができる少なくとも一つの抗体を含んでなる固体マトリックスと接触させること、およびその抗体マトリックスと特異的に結合する細胞を単離することを含んでなる方法に関する。特定の態様では、抗体は配列番号14～17、45、47、860および862からなる群から選択される配列を含んでなるポリヌクレオチドによりコードされているポリペプチドと特異的に結合する。本方法のさらなる特定の態様では、ポリペプチドは配列番号31～34、46、48、859および861からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる。

【0047】

本発明はまた、アゴニストまたはアンタゴニストのリンパ管内皮細胞への投与であって、リンパ管内皮細胞特異的タンパク質と特異的に結合することができる抗体、ペプチドまたは小分子量化合物（ここで、抗体、ペプチドまたは小分子量化合物が増殖因子受容体、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、または造血系受容体に対するアゴニストまたはアンタゴニストである）を選択すること、および抗体、ペプチドまたは小分子量化合物を増殖刺激または抑制を必要とするリンパ管内皮細胞と接触させることを含んでなる投与に関する。特定の態様では、このようなリンパ管内皮細胞はリンパ水腫、リンパ管腫、リンパ管骨髄腫、リンパ管腫症、リンパ管拡張症、リンパ肉腫、およびリンパ管硬化症に関与している。

40

【0048】

50

本発明はまた、細胞傷害性薬剤または細胞増殖抑制剤のリンパ管内皮細胞への投与であって、リンパ管内皮細胞特異的タンパク質と特異的に結合することができる抗体、ペプチドまたは小分子量化合物（ここで、抗体、ペプチドまたは小分子量化合物が細胞傷害性薬剤または細胞増殖抑制剤と複合体化されている）を選択することを含んでなる投与に関する。特定の態様では、リンパ系を通じて転移拡散する傾向にある悪性腫瘍疾患の治療においてこのような複合体の投与が有用である。

【0049】

本発明はまた、内皮細胞に対する薬物の効力または毒性をモニタリングする方法であって、哺乳類被験体に薬物を投与する前および投与した後、その被験体の内皮細胞において少なくとも一つのBECまたはLEC遺伝子の発現を測定する工程（ここで、この少なくとも一つのBECまたはLEC遺伝子は表3または表4に示されるポリペプチドをコードし、かつ、BECまたはLEC遺伝子の発現の変化は内皮細胞に対する薬物の効力または毒性と相関する）を含んでなる方法を提供する。

10

【0050】

本発明は、配列番号14～17からなる群から選択されるポリヌクレオチドによりコードされているポリペプチド；およびストリンジентな条件下で配列番号14～17のいずれか一つとハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドを含んでなるリンパ管内皮細胞マーカータンパク質に関する。特定の態様では、リンパ管内皮細胞マーカータンパク質は配列番号31～34からなる群から選択されるポリペプチドを含んでなる。

【0051】

本発明はまた、配列番号31～34からなる群から選択されるポリペプチドを含んでなるリンパ管内皮細胞マーカータンパク質と特異的に結合することができる抗体に関する。

20

【0052】

本発明はさらに、リンパ管内皮細胞を検出する方法であって、その細胞を検出可能なように標識した抗体と接触させることを含んでなる方法に関する。

【0053】

本発明はさらに、リンパ管内皮細胞の少なくとも一つの生物活性を阻害する方法であって、その細胞を、配列番号14～17、45、47、860および862のいずれか一つによりコードされている少なくとも一つのポリペプチドと結合することができる薬剤と接触させること（ここで、薬剤と接触させていないポリペプチドの活性と比べてポリペプチドの活性を低下させる）を含んでなる方法に関する。

30

【0054】

本発明はまた、リンパ管内皮細胞の増殖を阻害する方法であって、その細胞を、配列番号1～30、45、47、860および862からなる群から選択される少なくとも一つのポリヌクレオチドと特異的に結合することができるアンチセンスオリゴヌクレオチドと接触させることを含んでなる方法に関する。特定の態様では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは配列番号1～30、45、47、860および862のいずれか一つの約12～約25の連続するヌクレオチドから本質的になる。

【0055】

本発明のさらなる特徴および変形は本願の全てから当業者には分かるであろう。また、このような特徴の全てを本発明の態様とする。

40

【発明の詳細な説明】**【0056】**

リンパ管構造の主要な役割は、毛細血管から常に漏れ出る過剰な、タンパク質を豊富に含む間質液を除去すること、およびそれを血液循環に戻すことである(Witte, M.H., et al., *Microsc. Res. Tech.* 55:122-145頁, 2001; Karpanen, T., et al., *J. Exp. Med.* 194:F37-F42頁, 2001; Karkkainen, M.J., et al., *Trends Mol. Med.* 7:18-22頁, 2001)。さらに、リンパ系はリンパ液およびその抗原を一連のリンパ節で濾過することにより恒常的な免疫監視機構を提供し、また、腸管から脂質を吸収するための主要な経路の一つとしての役割も果たす。種々の癌ではリンパ管が腫瘍転移の主要な経路を提供し、局所リン

50

関節播種が疾病の進行と関係していることは長年知られていた。遺伝性リンパ水腫、術後の二次的なリンパ水腫およびフィラリア症におけるリンパ管閉塞は全て、外観を損ない、障害を引き起こす、リンパ管の機能不全または閉塞と関係がある患部の腫脹を特徴とする。Witte, M.J., et al., *Microsc. Res. Tech* 55:122-145頁 (2001)。

【0057】

医学においてリンパ管が重要であるにもかかわらず、脈管系のこの部分についての細胞生物学は最近までほとんど注目されていなかった。過去4年間の研究で受容体チロシンキナーゼ VEGFR-3 に対するリガンドとしての機能を果たすリンパ管特異的血管内皮細胞増殖因子 VEGF-C および VEGF-D の存在が発見され、リンパ管の正常な発生にとってのそれらの重要性が立証された (Jeltsch, M., et al., *Science* 276:1423-1425頁 (1997); Veikkola, T., et al., *EMBO J.* 20:1223-1231頁 (2001); Makinen, T., et al., *Nat. Med.* 7:199-205頁 (2001) を参照)。これらの分子はまた、リンパ水腫の発症およびリンパ行性転移に関与しているようにも思われる (Karpanen, T., et al., *J. Exp. Med.* 194:F37-F42頁 (2001); Karkkainen, M.J., et al., *Trends Mol. Med.* 7:18-22頁 (2001))。

10

【0058】

増殖因子、血管内皮細胞増殖因子 C (VEGF-C)、ならびに VEGF-C、および VEGF-C 変異体および類似体をコードする、天然ヒト、非ヒト哺乳類、および鳥類ポリヌクレオチド配列については、1998年2月2日に出版され、国際公開番号 WO 98/33917 として 1998年8月6日に公開された国際特許出願番号 PCT/US98/01973; Joukov et al., *J. Biol. Chem.*, 273(12): 6599-6602頁 (1998); および Joukov et al., *EMBO J.*, 16(13): 3898-3911頁 (1997) (これらの全ては全開示内容が引用することにより本明細書の一部とされる) で詳細に記載されている。そこで詳細に説明されているように、ヒト VEGF-C (配列番号 863) は、419個のアミノ酸からなるプレプロ-VEGF-C ポリペプチドとして、ヒト細胞において最初に作製されたものである。ヒト VEGF-C (配列番号 864) をコードする cDNA は、ブダペスト条約の規定によって、American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 (USA) に寄託されている (寄託日 1995年7月24日、ATCC 受託番号 97231)。その他の種由来の VEGF-C 配列もまた、報告されている。例えば、引用することにより本明細書の一部とされる Genbank 受託番号 MMU73620 (ハツカネズミ); および CCY15837 (ウズラ) を参照。

20

30

【0059】

プレプロ-VEGF-C ポリペプチドは、多段階でプロセッシングを受けて、還元条件下での SDS-PAGE による評価されるように約 21 ~ 23 kD の成熟した、最も活性化されている VEGF-C ポリペプチド (配列番号 863) を生み出す。このようなプロセッシングとしては、シグナルペプチド (残基 1 ~ 31) の切断; 約 29 kD の部分的にプロセッシングを受けた形態を生み出すカルボキシル末端ペプチド (およそアミノ酸 228 ~ 419 に相当し、バルビア二環3タンパク質 (BR3P) 配列によく似たシステイン残基の間隔パターンを有する [Dignam et al., *Gene*, 88:133-40頁 (1990); Paulsson et al., *J. Mol. Biol.*, 211:331-49頁 (1990)]) の切断; および約 21 ~ 23 kD の完全にプロセッシングを受けた成熟形態を生み出すアミノ末端ペプチド (およそアミノ酸 32 ~ 103 に相当する) の (明らかに細胞外での) 切断が挙げられる。部分的にプロセッシングを受けた形態の VEGF-C (例えば、29 kD 型) は VEGFR-3 (Flt4 受容体) と結合することができるのに対し、VEGFR-2 との高い親和性での結合は完全にプロセッシングを受けた形態の VEGF-C でしか起こらないことが実験的証拠により立証された。VEGF-C ポリペプチドは非ジスルフィド結合した二量体として自然に結合しているものと思われる。

40

【0060】

VEGF-C のアミノ酸 103 ~ 227 は、その全てが VEGF-C 機能の維持に必要というわけではないことが示されてきた。アミノ酸 113 ~ 213 (なお、残基 103 ~

50

112および214～227を欠いている)からなるポリペプチドはVEGF-C受容体と結合し、それを刺激する能力を保持しているが、およそ残基131～およそ残基211にわたるポリペプチドがVEGF-C生物活性を保持していると推測される。156位のシステイン残基はVEGFR-2結合能力にとって重要であることが分かってきた。しかしながら、VEGF-C C₁₅₆ポリペプチド(すなわち、欠失または置換によりこのシステインを欠いている類似体)はVEGFR-3の有力なアクチベーターであり続ける。VEGF-Cポリペプチドの165位のシステインはいずれの受容体との結合にも必須であるが、83または137位のシステインを欠いている類似体は両受容体との結合において天然VEGF-Cと競争し、両受容体を刺激する。

【0061】

VEGF-DはVEGF-Cと構造および機能的に最も密接な関係がある[引用することにより本明細書の一部とされる米国特許第6,235,713号および国際特許公開WO98/07832を参照]。VEGF-Dのポリヌクレオチド配列は配列番号866を参照;コードされているアミノ酸配列は配列番号865で示される。VEGF-Cと同様に、VEGF-Dは最初に、N末端およびC末端のタンパク質分解プロセッシングを受け、非共有的に結合した二量体を形成するプレプロ-ペプチドとして発現される。VEGF-Dは*in vitro*で内皮細胞の細胞分裂誘起反応を刺激する。胚形成時に、VEGF-Dは複雑な時間的および空間的パターンで発現され、その発現は成人の心臓、肺、および骨格筋内にとどまる。VEGF-D NCと呼ばれる、生物学的に活性なVEGF-D断片の単離については、引用することにより本明細書の一部とされる国際特許公開WO98/07832に記載されている。VEGF-D NCはアフィニティータグペプチド FLAG(商標)、またはその他の配列と機能的に連結されたVEGF-Dのアミノ酸残基93～201(配列番号26)からなる。

【0062】

プレプロ-VEGF-Dポリペプチドは21個のアミノ酸からなる推定シグナルペプチドを有し、プレプロ-VEGF-Cのプロセッシングと類似した様式でタンパク質分解プロセッシングを明らかに受ける。残基1～92および202～354を欠いている「組換えにより成熟した」VEGF-Dは受容体VEGFR-2およびVEGFR-3を活性化する能力を保持し、非共有的に結合した二量体として結合していると思われる。よって、好ましいVEGF-Dポリヌクレオチドとしては、アミノ酸93～201をコードするヌクレオチド配列を含んでなるこれらのポリヌクレオチドが挙げられる。機能温存修飾をVEGF-Cポリペプチドに導入するための上記指針はまた、機能温存修飾をVEGF-Dポリペプチドに導入するのにも好適である。本発明の別の態様として、VEGF-Cポリペプチドの代わりにVEGF-Dポリペプチドを使用する本発明の方法の実施が意図されている。

【0063】

血管内皮細胞と比べて、リンパ管内皮細胞は特定の形態的および分子的特徴を示す。例えば、毛細リンパ管は毛細血管よりも大きく、赤血球を含まない不揃い、の、または崩れた内腔、細胞間結合部複合体をオーバーラップする不連続な基底膜、およびリンパ管内皮細胞を細胞外基質と繋ぐアンカーリングフィラメントを有する(Witte, M.H., et al., *Microsc. Res. Tech.* 55:122-145頁(2001))。毛細血管とは異なり、毛細リンパ管は周皮細胞の被覆がない。分子レベルでは、VEGFR-3、Prox-1転写因子、ヒアルロン酸受容体 LYVE-1、膜ムコタンパク質ポドプラニン、ケモカイン受容体 D6、細胞骨格タンパク質デスモプラキンIおよびIIならびにマクロファージマンノース受容体Iといったいくつかのリンパ管特異的マーカーが同定されている(Wigle, J.T. & Oliver, G., *Cell* 98:769-778頁(1999); Banerji, S., et al., *J. Cell Biol.* 144:789-801頁(1999); Breiteneder-Geleff, S., et al., *Am. J. Pathol.* 154:385-394頁(1999); Nibbs, R.J., et al., *Am. J. Pathol.* 158:867-877頁(2001); Ebata, N., et al., *Microvasc. Res.* 61:40-48頁(2001); Irljala, H., et al., *J. Exp. Med.* 194:1033-1041頁(2001))。本発明は遺伝子プロファイリングアプローチを利用した毛細リンパ管内皮

10

20

30

40

50

細胞と血管内皮細胞の遺伝的同一性に関する。

【0064】

「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」または「ストリンジェントな条件」とは、オリゴヌクレオチドなどの核酸がその標的配列と特異的にハイブリダイズする条件を指す。ストリンジェントな条件は配列依存的であり、さまざまな状況により異なる。長い核酸は短い配列よりも高温で特異的にハイブリダイズする。一般に、ストリンジェントな条件は、特定の配列の規定のイオン強度およびpHでの融解点(T_m)よりも約5低いように選択される。 T_m は平衡状態で標的配列と相補的な核酸の50%が標的配列とハイブリダイズしている温度(規定のイオン強度、pHおよび核酸濃度条件下)である。「相補的な」とは、2つの核酸分子のヌクレオチド間の標準的なワトソン・クリック塩基対合を指す。通常、ストリンジェントな条件は、pH7.0~8.3にて、かつ、短いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチド(例えば、10~50ヌクレオチド)の場合、少なくとも約30であり、長いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチドの場合、少なくとも約60である温度にて、塩濃度が約1.0M未満のナトリウムイオン、通常、約0.01~1.0Mナトリウムイオン(または他の塩)であるものである。ストリンジェントな条件はまた、当技術分野では公知のように、ホルムアミドなどの脱安定化剤の添加により達成してもよい。典型的なストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は50%ホルムアミド、5×SSPE、5×デンハート溶液、0.1%SDSおよび0.1mg/ml変性サケ精子DNAを含有する溶液中、42にて20時間のハイブリダイゼーション、および1×SSC、0.1%SDS中、65にて30分間の洗浄である。

10

20

【0065】

本発明によれば、血管およびリンパ管内皮細胞で異なる遺伝子発現プロファイルが発見された。これらの結果は内皮細胞の表現型多様性を理解する上での新たな手掛かりとなり、血管形成またはリンパ管形成異常を特徴とする疾病の治療法に重要な標的を提供する可能性のある新たなリンパ管内皮分子候補を明確にしている。

【0066】

炎症プロセス、ならびに細胞-細胞および細胞-基質相互作用が介在するプロセスに関わるタンパク質をコードする遺伝子の発現における違いを発見した。さらに、内皮細胞生物学において、これまで知られていなかった、2つの細胞系統において示差的に発現されるいくつかの遺伝子を同定した。シナプスの高分子の取り込み、ならびにシナプス形成および再構築(ニューロンのペントラキシンIおよびII(Kirkpatrick, L.L., et al., J. Biol. Chem. 275:17786-17792頁, 2000)、シナプス小胞のトラフィック(NA P-22(Yamamoto, Y., et al., Neurosci. Lett. 224:127-130頁, 1997)、ピッコロ(Fenster, S.D., et al., Neuron 25:203-214頁(2000))、ならびに軸索成長および軸索誘導(Nr-CAM(Grumet, M., Cell Tissue Res. 290:423-428頁(1997)、リーリン(Rice, D.S. & Curran, T., Annu. Rev. Neurosci. 24:1005-1039頁(2001))に關与する遺伝子をはじめとするこれらの遺伝子のいくつかのものは、当初、神経組織からクローニングしていた。

30

【0067】

さらに、LECはとりわけ、当初、神経組織でクローニングされ、その組織で高く発現した、数多くのまだ同定されていない遺伝子を発現した(KIAA遺伝子(Kikuno, R., et al., Nucleic Acids Res. 30:166-168頁, 2002)。それゆえ、本明細書において開示する遺伝子発現プロファイリングデータは、神経系細胞のポジショニング制御、軸索成長円錐のそれらの特定の標的への誘導およびシナプス形成に関わる同じ分子機構が、脈管系の発生およびBECとLECの同定においても一般的に使用し得るという見方を裏づけている。神経系の発生において最初に記載される他のシグナル伝達分子は脈管構造の発生にすでに關与しており、またその逆もそうである(Shima and Mailhos, Curr. Opin. Genet. Dev. 10:536-542頁(2000); Oosthuyse, et al., Nat. Genet. 28:131-138頁(2001); Sondell, et al., Eur. J. Neurosci. 12:4243-4254頁(2000))。

40

50

【0068】

LECでは、平滑筋細胞(SMC)および周皮細胞で発現することがこれまでに分かっている、マトリックス Gla、血管および組織石灰化の阻害に関わるミネラル結合細胞外基質タンパク質(Luo, G., et al., Nature 386:78-81頁 (1997))、モノアミンオキシダーゼA、モノアミンホルモンおよび神経伝達物質の主要な分解酵素(Rodriguez, M.J., et al., Cell Tissue Res. 304:215-220頁 (2001))、インテグリン 9 (Palmer, E.L., et al., J. Cell Biol. 123:1289-1297頁 (1993))およびアポリポタンパク質D (Hu, C.Y., et al., J. Neurocytol. 30:209-218頁 (2001))などの数種類の遺伝子の発現が見られた。LECおよびSMC間の遺伝子発現パターンの類似は、毛細リンパ管周囲のSMCが欠如していることといくぶん関係している。それどころか、LECはそれ自身でSMCの機能をいくらか果たしていることがある。例えば、リンパ流はLECが本来持っている血管SMCの収縮能力によく似た収縮性により維持されている(Witte, M.H., et al., Microsc. Res. Tech. 55:122-145頁 (2001))。

10

【0069】

リンパ管および血管の分子識別は血管および/またはリンパ管の病気の研究に、また、このような病気の標的治療には必須である。今日までに、いくつかのリンパ管内皮特異的なマーカーを同定したが、それらの中にはリンパ管のサブセットでのみ発現されるものもあれば、いくつかの血管内皮細胞または他の細胞種で起こるものもあり、また、それらの発現パターンは病的状態において変化する可能性がある(例えば、VEGFR-3 (Valtola, R., et al., Am. J. Pathol. 154:1381-1390頁, 1999))。本発明の新たな血管マーカーの同定は、病的状況にある血管およびリンパ管のより信頼度の高い解析を、最終的にはよりよい診断および治療を提供するはずである。さらに、血管形成および/またはリンパ管形成の調節に関わる特定の分子の機能の阻害により腫瘍増殖および転移を予防することが知られているが、病的状態によっては血管またはリンパ管の増殖の促進が有益であることも分かってきた。よって、本発明により同定されるBECおよびLEC特異的な分子レギュレーターは血管形成およびリンパ管形成異常を特徴とする疾病の治療に新たな標的を提供するであろう。

20

【0070】

新たなLEC遺伝子のうちいくつかのものはリンパ管内皮細胞に対して特異的な分子マーカーであるトランスメンブラン型タンパク質をコードする(表6)。これらの遺伝子およびコードされるタンパク質はリンパ管の病気の標的治療に有用である。また、LEC特異的なタンパク質に対する抗体を病的および生理学的状況にある血管とリンパ管を区別するのに用いることができるため、これらも抗体の作製に有用である。抗体はまた、リンパ管内皮細胞の単離にも有用である。これらのタンパク質はまた、リンパ管形成の調節でも役割を果たし、リンパ水腫などのリンパ管の病気に関する新たな候補遺伝子を提供することができる。

30

【0071】

リンパ管内皮細胞特異的な表面分子は、増殖因子受容体、サイトカインおよびケモカイン受容体、およびヘモポイエチン受容体のシグナル伝達、細胞接着ならびに細胞外基質または他の細胞表面分子との細胞相互作用に対するアゴニストまたはアンタゴニストとして作用し得る抗体、ペプチドおよび小分子量化合物を用いた分子薬剤ターゲティングに用いることができる。このような分子はまた、細胞傷害性薬剤または細胞増殖抑制剤のリンパ管内皮細胞へのターゲティングに、また、リンパ管と関わりのある疾病の過程をイメージングするための電子密度の高い、放射線不透過性のまたは放射性的なマーカーの結合に用いることもできる。このような疾病としては、リンパ水腫、リンパ管腫、リンパ管筋腫、リンパ管腫症、リンパ管拡張症、リンパ肉腫およびリンパ管硬化症が挙げられる。

40

【0072】

リンパ管内皮細胞表面分子は、例えば、抗体でコーティングしたリポソーム(カーゴとしてタンパク質または遺伝子を含む)による遺伝子治療またはウイルス性形質導入ベクター、例えば、キャプシド/外膜タンパク質を改変したアデノウイルス、アデノ随伴ウ

50

イルスまたはレンチウイルスによる遺伝子治療のターゲティングに用いてもよい。リンパ管内皮細胞特異的な分子の取扱いは、リンパ管壁を流れる液体輸送の増加による、例えば、内皮細胞 - 細胞または細胞 - 基質相互作用の調節による、または経内皮輸送の促進を介する組織の浮腫と関わりのある疾病の過程の治療に適用できる。リンパ管内皮細胞の、例えば、細胞傷害性または細胞増殖抑制性化合物を用いるターゲティングは、リンパ系を通じて転移拡散する傾向にある悪性腫瘍疾患において有益であると考えられる。

【0073】

リンパ管内皮細胞分子は、リンパ管内皮細胞の *in vitro* 増殖、ならびに術後やささまざまなリンパ水腫などでリンパ管が損傷を受けている疾病で用いるリンパ管の *in vitro* 組織工学の向上も可能にし得る。細胞表面タンパク質のリガンドはさらに、例えば、バイオインプラントの細胞接着に向けた種々の高分子基質のコーティングにも適用し得る。

10

【0074】

リンパ管内皮細胞特異的な分子、例えば、表面分子は、白血球遊走および免疫認識、ならびに二次的免疫応答の誘導に關与する炎症、自己免疫および感染プロセスの調節のための重要なツールを提供することができる。このようなプロセスとしては、抗原提示細胞の、リンパ節をはじめとするリンパ系への遊走、ならびにリンパ球および他の白血球サブクラスの経内皮細胞トラフィックおよびあらゆる種類の白血球のホーミング、生存および機能が挙げられる。

【0075】

これらの分子は腸管からの脂肪酸 / カイロミクロン (chylomicron) 吸収および種々の器官内の脂肪組織、例えば、皮下組織および動脈壁における脂肪蓄積の調節をはじめとする脂肪酸の代謝の調節を可能にする。

20

【0076】

リンパ管内皮細胞特異的な分子はさらに、腸管からの脂肪酸 / カイロミクロン吸収および種々の器官内の脂肪組織、例えば皮膚の皮下組織および動脈壁における脂肪蓄積の調節をはじめとする脂肪酸の代謝の調節を可能にする。

【0077】

リンパ管細胞特異的なトランスメンブラン型タンパク質は、細胞接着 (例えば、リンパ管内皮細胞 - リンパ管内皮細胞間、リンパ管内皮細胞 - 平滑筋細胞間、リンパ管内皮細胞 - 免疫系細胞 (例えば、リンパ球または樹状細胞) 間の接着)、細胞 - 細胞外基質接触において、または受容体、例えば、増殖因子、サイトカイン、ケモカインもしくは微生物受容体もしくはイオンチャネルとして作用すると思われる。トランスメンブラン型タンパク質は細胞増殖、細胞移動、細胞アポトーシス、細胞分化もしくは細胞接着または内皮細胞に特異的な他の細胞機能、例えば、白血球に対する接着受容体の発現、一酸化窒素の放出、抗凝固タンパク質、周辺組織からの液体およびタンパク質の取り込みおよび腸管または脂肪組織から脂肪の取り込みを誘導し得る細胞内分子と連結している。短い細胞内ドメインを有する T M タンパク質は他の T M タンパク質との複合して補助受容体の役割を果たすことができる。

30

【0078】

トランスメンブラン型タンパク質およびそれらの細胞内結合相手分子は正常状態および病気の状態にあるリンパ管内皮細胞の分子マーカーとして用いることができるし、また、病的および生理学的状況にある血管とリンパ管を区別するのに用いることができる。

40

【0079】

リンパ管特異的なトランスメンブラン型タンパク質に対する抗体、ならびにペプチドおよび小分子化合物のリンパ管特異的な T M タンパク質の細胞外ドメインとの結合を、リンパ管と関わりのある疾病の過程をイメージングするための電子密度の高い、放射線不透性のまたは放射線のマーカーの結合に用いることもできる。このような疾病としては、リンパ水腫、リンパ管腫、リンパ管筋腫、リンパ管腫症、リンパ管拡張症、リンパ肉腫およびリンパ管硬化症が挙げられる。同様に、例えば、リンパ水腫においてなど、リンパ管の増殖不全を患う患者の治療中、あるいは、例えば、腫瘍におけるリンパ管の増殖の阻止を目

50

的とした治療中にリンパ管を視覚化し、その結果、本発明の治療法のモニタリングを容易にすることができる。

【0080】

LEC特異的なTMタンパク質に対する抗体はリンパ管内皮細胞の単離に有用であると思われる。

【0081】

リンパ管特異的なトランスメンブラン型タンパク質に対する抗体、またはペプチドもしくは小分子化合物のリンパ管特異的なTMタンパク質の細胞外ドメインとの結合は、リンパ管内皮細胞への、例えば、抗体、ペプチドまたは小分子化合物を細胞傷害性または細胞増殖抑制性化合物と結合させることによる、薬剤送達ターゲティングにおいても有用であると思われる。このように結合する化合物は、リンパ系を通じて転移拡散する傾向にある悪性腫瘍疾患の治療において、さらに、このような疾病に関係のある症状の改善において治療用物質として有用である。抗体、ペプチドまたは小分子化合物はまた、増殖因子、サイトカインおよびケモカインなどの刺激リンパ管内皮分子と結合して刺激を促進することもできる。

10

【0082】

さらに、リンパ管特異的なTMタンパク質に対する抗体、ペプチド、または小分子化合物のリンパ管特異的なTMタンパク質の細胞外ドメインとの結合は、例えば、抗体でコーティングしたリポソーム（カーゴとしてタンパク質、遺伝子または他の分子を含有する）による遺伝子治療またはウイルス性形質導入ベクター、例えば、キャプシド/外膜タンパク質を改変したアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルスなどによる遺伝子治療のターゲティングに用いてもよい。リンパ管内皮細胞特異的な分子の取扱いは、リンパ管壁を流れる液体輸送の増加による、例えば、内皮細胞-細胞または細胞-基質相互作用の調節による、または経内皮輸送の促進による感染、外科処置、放射線治療または遺伝的欠陥から起こる可能性のあるリンパ管の相対的な欠如、または相対的な機能異常という要因を背景とした組織の浮腫と関わりのある疾病の過程の治療に適用できるとと思われる。

20

【0083】

リンパ管内皮細胞分子は、リンパ管内皮細胞のin vitro増殖、ならびに術後やささまざまなリンパ水腫などでリンパ管が損傷を受けている疾患または疾病の治療に、また、本明細書に記載するような他の用途に用いるリンパ管のin vitro組織工学を向上させるとと思われる。細胞表面タンパク質のリガンドはさらに、例えば、バイオインプラントの細胞接着に向けた種々の高分子基質へのコーティングとしても適用し得る。

30

【0084】

白血球遊走および免疫認識に關与する炎症、自己免疫および感染プロセス、例えば、抗原提示細胞の、リンパ節をはじめとするリンパ系への遊走、ならびにリンパ球および他の白血球サブクラスの経内皮細胞トラフィックおよびあらゆる種類の白血球のホーミング、生存および機能は、これらの細胞接着プロセスを媒介している内皮細胞特異的なTMタンパク質をターゲティングすることにより調節することができる。

【0085】

リンパ管特異的な遺伝子の、例えば、癌におけるアップレギュレーションは診断マーカーとして有用であると考えられ、このようにアップレギュレートされた発現の、リンパ管内皮細胞特異的なタンパク質に対する抗体を用いた、例えば、組織の免疫染色によるまたはリンパ管内皮細胞特異的なmRNAと、例えば、本明細書に記載するようなストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得るプローブを用いることによるモニタリングが意図される。

40

【0086】

リンパ管内皮細胞特異的な転写因子は、胚幹細胞、内皮前駆細胞、または血管内皮細胞からのリンパ管内皮細胞の分化に有用であると思われる。

【0087】

50

リンパ管内皮転写因子は、リンパ管内皮細胞の *in vitro* 増殖を向上させ、さらに術後やささまざまなリンパ水腫などでリンパ管が損傷を受けている疾患または疾病の治療に、また、本明細書にて開示する他の用途に用いるリンパ管の *in vitro* 組織工学を促進すると思われる。

【0088】

リンパ管内皮細胞増殖、分化、アポトーシス、移動または接着を調節するシグナル伝達経路に参与している細胞内シグナル伝達タンパク質は、これらのシグナル伝達事象、およびこのようなシグナル伝達に依存した細胞機能を阻害する小分子化合物の有用な標的であると思われる。シグナル伝達タンパク質はまた、VEGFR-3シグナル伝達経路にも関与していると考えられ、VEGFR-3シグナル伝達により少なくとも部分的に制御される細胞の活動、例えば、リンパ管形成を調節するのに有用であると思われる。

10

【0089】

リンパ管内皮細胞分子は、リンパ管内皮細胞の *in vitro* 増殖、ならびに術後やささまざまなリンパ水腫などでリンパ管が損傷を受けている疾患または疾病の治療に、また、本明細書に記載するような他の用途に用いるリンパ管の *in vitro* 組織工学を向上させるとと思われる。

【0090】

リンパ管特異的な転写因子はまた、例えば、血管内皮細胞または内皮前駆細胞において他のリンパ管特異的な遺伝子の発現を誘導するように内皮細胞における遺伝子発現を調節するのに有用であると思われる。

20

【0091】

リンパ管特異的な遺伝子転写物は、RNA干渉 (RNAi) による発現阻止に向けた有用な標的を提供すると思われる。RNAi技術は、本発明の方法、例えば、過剰増殖性および過少増殖性の内皮細胞関連疾病および疾患を治療するのに有効な治療法、ならびに、このような疾病または疾患の症状を改善する方法において有用であると思われる。RNAi方法論は当技術分野では公知であり、知られているRNAi技術は本発明の種々の態様において有用であると考えられる。その各々が引用することにより本明細書の一部とされる Fire et al., Nature 391:806-811頁. (1998) および Sharp, P., Genes and Dev. 13:139-141頁. (1999) を参照。RNAi化合物は発現の所望の標的のコード領域の一部または全てに相当する二本鎖RNA分子であることが好ましい。

30

【0092】

記載したように、新規LEC遺伝子のいくつかのものは、細胞の運命を制御し得 (イロクオイ (iroquois) 関連ホメオボックス遺伝子)、リンパ管内皮細胞の分化において重要な役割を有し得る転写因子をコードしている。本明細書にて開示する転写因子は、例えば、リンパ管内皮細胞の増殖に関与する遺伝子の転写を制御し得、リンパ管の増殖の重要な分子レギュレーターであり得る (表5)。リンパ管内皮細胞特異的な転写因子は、胚幹細胞、内皮前駆細胞、または血管内皮細胞からのリンパ管内皮細胞の分化に用いることができる。

【0093】

リンパ管内皮転写因子は、リンパ管内皮細胞の *in vitro* 増殖、ならびに術後やささまざまなリンパ水腫などでリンパ管が損傷を受けている疾病で用いるリンパ管の *in vitro* 組織工学の向上も可能にし得る。

40

【0094】

本発明のポリヌクレオチド

一般に、本発明の単離されたポリヌクレオチドとしては、示差的発現を示す、表3、4、14、15および16に示されたLECおよびBECポリヌクレオチドが挙げられる。これらのポリヌクレオチドの配列を、該当する場合には、これらの既知のデータベース受託番号とともに表16に示している。表14および15では、これらの受託番号は固有の配列識別子に対応しているため、引用された配列識別子により受託番号の確認が可能である。ポリヌクレオチド配列はコード領域を含んでよく、また、当業者ならば容易に確認で

50

きる非コードフランキンク配列を含んでもよい。本発明は、フランキンク領域、例えば、ポリA配列、5'非コード配列などを含んでも含まなくてもよいコード領域の一部または全てを含んでなるポリヌクレオチドを意図する。本発明のポリヌクレオチドとしてはまた、限定されるものではないが、高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号1~30、45、47、49および51のいずれか一つのヌクレオチド配列の相補体とハイブリダイズするポリヌクレオチド；中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号1~30、45、47、49および51のいずれか一つのヌクレオチド配列の相補体とハイブリダイズするポリヌクレオチド；上記ポリヌクレオチドの変異型対立遺伝子であるポリヌクレオチド；上記タンパク質の種間相同物をコードするポリヌクレオチド；または配列番号31~44、46、48、50および52のいずれか一つポリペプチドの特定のドメインまたは末端切断部分を含んでなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも挙げられる。このようなポリヌクレオチドは上記の条件下で配列番号1~30、45、47、49および51のいずれか一つの相補体と、または配列番号1~30、45、47、49および51のいずれか一つの断片（ここで、断片は少なくとも約10bpより大きく、また、代わりの態様では、約20~約50bpであり、または、必要に応じて、約100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、または800bpより大きい）とハイブリダイズする。

10

【0095】

本発明のポリヌクレオチドはまた、上記ポリヌクレオチドの変異体であるポリヌクレオチドを提供する。通常、このような変異配列は本明細書に記載したものの一つと約20%異なっているに過ぎない、すなわち、対応する参照配列と比べた際の類似配列中のヌクレオチドの置換、付加、および/または欠失数を変異配列中の全ヌクレオチド数で除すと約0.2以下である。このような配列を、記載した配列と80%配列同一性を有するという。このような変異配列は上述のアルゴリズムの適用により慣例的に確認することができる。

20

【0096】

一つの態様では、本発明の変異ポリヌクレオチド配列は記載した配列と10%異なっているに過ぎない、すなわち、対応する参照配列と比べた際の変異配列中のヌクレオチドの置換、付加、および/または欠失数を変異配列中の全ヌクレオチド数で除すと約0.1以下である。このような配列を、記載した配列と90%配列同一性を有するという。このよ

30

【0097】

代わりの態様では、本発明の変異配列は記載した配列と5%異なっているに過ぎない、すなわち、対応する参照配列と比べた際の変異配列中のヌクレオチドの置換、付加、および/または欠失数を変異配列中の全ヌクレオチド数で除すと約0.05以下である。このような配列を、記載した配列と95%配列同一性を有するという。このような変異配列は上述のアルゴリズムの適用により慣例的に確認することができる。

【0098】

さらにもう一つの代わりの態様では、本発明の変異配列は記載した配列と2%異なっているに過ぎない、すなわち、対応する参照配列と比べた際の変異配列中のヌクレオチドの置換、付加、および/または欠失数を変異配列中の全ヌクレオチド数で除すと約0.02以下である。このような配列を、記載した配列と98%配列同一性を有するという。このよ

40

【0099】

本発明のポリヌクレオチドを種々の他のヌクレオチド配列と十分に確立された組換えDNA技術により連結してもよい(Sambrook J et al. (第二版; 1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NYを参照)。ポリペプチドとの連結に有用なヌクレオチド配列としては、当技術分野では周知のベクター、例えば、プラスミド、コスミド、ファージ誘導体、ファージミドなどの取り合わせが挙げられる。よって、本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含むベクター

50

およびそのポリヌクレオチドを含む宿主細胞を提供する。一般に、ベクターは少なくとも一種の生物において機能的な複製起点、便宜な制限エンドヌクレアーゼ部位、および宿主細胞の選択マーカを含む。本発明のベクターとしては、発現ベクター、複製ベクター、プロンプ生成ベクター、配列決定ベクター、およびレトロウイルスベクターが挙げられる。本発明の宿主細胞は原核細胞または真核細胞であってよく、また、単細胞生物または多細胞生物の一部であってよい。当業者ならば多数の好適なベクターおよびプロモーターを知っており、本発明の組換え構築物を作製する際にはこれらは商業的に入手可能である。

【0100】

本発明の範囲にある配列は本明細書にて記載した特定の配列に限定されないだけでなく、その変異型対立遺伝子も包含する。変異型対立遺伝子は、配列番号1~30、45、47、49および51のいずれか一つで示される配列、その典型中間断片、または配列番号1~30、45、47、49および51のいずれか一つと少なくとも99.9%同一なヌクレオチド配列を、同一種の別の単離物の配列と比較することにより慣例的に決定することができる。さらに、コドンの変化に対応するように、本発明は本明細書にて開示する特定のオープンリーディングフレーム(ORF)の場合のように、同一アミノ酸配列をコードする核酸分子を包含する。言い換えると、ORFのコード領域において、一つのコドンが同一アミノ酸をコードする別のものと置換されていることが明確に意図される。

10

【0101】

本明細書に別途規定のない限り、全ての用語は当技術分野で公知であるように、例えば、引用することにより本明細書の一部とされる米国特許第6,350,447号で使用されているように定義される。

20

【0102】

また、本発明のLECまたはBECポリヌクレオチドの配列に基づくアンチセンスポリヌクレオチドも意図される。このようなアンチセンスポリヌクレオチドは、表3、4、14~16に記載の配列で、また、本開示内容を通じて示される、LECおよびBECにおいて示差的に発現される本発明のポリヌクレオチド、またはその断片の配列と実質的に相補的であり(例えば、少なくとも90%相補性)、好ましくは、完全に相補的である。これらのポリヌクレオチド配列としては、配列番号1~30、45、47、49および51のいずれか、または少なくとも10の連続するヌクレオチドを含んでなるその断片が挙げられる。アンチセンス核酸はタンパク質をコードする「センス」核酸と相補的である(例えば、二本鎖cDNA分子のコード鎖と相補的であるか、またはmRNA配列と相補的である)ヌクレオチド配列を含んでなる。アンチセンスヌクレオチドの設計および最適化に関する方法については、Lima et al., (J Biol Chem, ;272:626-38頁, 1997)およびKurreck et al., (Nucleic Acids Res., ;30:1911-8頁, 2002)で記載されている。一つの態様では、少なくとも約10、25、50、100、250または500のヌクレオチドまたは全コード鎖と相補的である配列を含んでなるアンチセンス核酸分子が提供される。本発明のアンチセンス核酸は、当技術分野では公知の手順を用いる化学合成または酵素的ライゲーション反応により構築することができる。

30

【0103】

一つの態様では、アンチセンス核酸分子は、本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「コード領域」に対してアンチセンスである。「コード領域」とは、アミノ酸残基へと翻訳されるコドンを含んでなるヌクレオチド配列の領域を指す。別の態様では、アンチセンス核酸分子は、ポリヌクレオチドをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「コンシーディング(conceding)領域」に対してアンチセンスである。「コンシーディング領域」とは、アミノ酸へと翻訳されないコード領域にフランキングする5'および3'配列(すなわち、5'および3'非翻訳領域ともいう)を指す。

40

【0104】

本発明のアンチセンス核酸は、ワトソンとクリックまたはホーホステーン(Hoogsteen)の塩基対合ルールに従い、設計することができる。アンチセンス核酸分子は、本発明のポリヌクレオチドのmRNAの全コード領域と相補的であり得るが、より好ましくは、mR

50

N A のコード領域または非コード領域の一部に対してのみアンチセンスオリゴヌクレオチドである。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約 5、10、15、20、25、30、35、40、45、または 50 ヌクレオチド長である。本発明のアンチセンス核酸は、当技術分野では公知の手順を用いる化学合成または酵素的ライゲーション反応により構築することができる。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然ヌクレオチドまたは分子の生物学的安定性を高めるように、またはアンチセンス核酸とセンス核酸との間に形成される二本鎖（例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジンで置換したヌクレオチドを用いてもよい）の物理学的安定性を高めるように設計された、種々に改変されたヌクレオチドを用いて化学合成することができる。

10

【0105】

本発明のアンチセンス核酸分子は、それらが相補ポリヌクレオチドをコードする細胞の mRNA および / またはゲノム DNA とハイブリダイズするか、または結合することにより、（例えば、転写および / または翻訳を阻止することによって）タンパク質の発現を阻害するように、通常、被験体に投与されるか、または *in situ* で生成される。ハイブリダイゼーションは従来のヌクレオチド相補性を反映し、安定した二本鎖を形成する、または、例えば、DNA 二本鎖と結合するアンチセンス核酸分子の場合では二重らせんの主溝における特定の相互作用による。

【0106】

本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例としては、組織部位への直接注入が挙げられる。また、アンチセンス核酸分子は、選択される細胞をターゲティングするように改変した後、全身投与してもよい。例えば、全身投与では、アンチセンス分子を、それらが選択された細胞の表面で発現される受容体または抗原と特異的に（例えば、アンチセンス核酸分子を、細胞表面受容体または抗原と結合するペプチドまたは抗体と結合させることにより）結合するように改変してもよい。本発明ではアンチセンス治療にさらなる経路、例えば、局所投与、経皮投与 [Brand in Curr. Opin. Mol. Ther. 3:244-8頁. 2001で概説される] ナノ粒子系を用いるアンチセンス投与 [Lambert et al., Adv. Drug. Deliv. Rev. 47:99-112頁. 2001]、またはペプチドと結合したアンチセンスヌクレオチドの投与 [Juliano et al., Curr. Opin. Mol. Ther. 2:297-303頁. 2000] を利用してもよい。

20

30

【0107】

本発明はさらに、本発明のポリヌクレオチドの、遺伝子治療に向けた使用または LEC 遺伝子の活性を調節し得、また、リンパ水腫などの LEC 疾患の治療法において有用である本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを作製する組換え発現ベクターでの使用を意図する。本発明のポリペプチドをコードする機能遺伝子の好適な細胞への送達はウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、またはレトロウイルス）をはじめとするベクターにより *ex vivo*、*in situ*、もしくは *in vivo* で、または物理的 DNA 導入法（例えば、リポソームまたは化学処理）により *ex vivo* で達成される。例えば、Anderson, Nature, 第392巻の増補、第6679号、25-20頁（1998）を参照。遺伝子治療技術のさらなる概説については、Friedmann, (Science, 244: 1275-1281頁. 1989); Verma, (Scientific American: 263:68-72頁, 81-84頁. 1990); および Miller, (Nature, 357: 455-460頁. 1992) を参照。本発明のヌクレオチドのいずれか一つまたは本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の導入はまた、染色体外基質（一時的発現）または人工染色体（安定した発現）で達成してもよい。また、このような細胞を増殖させ、または細胞に対する所望の効果、または細胞における活性を生じさせるために、細胞を *ex vivo* で、本発明のタンパク質の存在下にて培養してもよい。別の態様では、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを発現するベクターを含んでなる細胞を *ex vivo* で培養し、LEC 疾患または疾患の治療を必要とする個体に投与してもよい。

40

【0108】

核酸構築物についての上述の開示内容によれば、配列番号 1 ~ 30、45、47、49

50

および51のいずれかの配列を含んでなる遺伝子の遺伝子産物を日常的な組換えDNA/RNA技術によって作製することができる。種々の発現ベクター/宿主系を利用して、コード配列を含め、発現させてもよい。これらとしては、限定されるものではないが、微生物、例えば、組換えバクテリオファージで形質転換した細菌、プラスミド、ファージミド、またはコスミドDNA発現ベクター；酵母発現ベクターで形質転換した酵母；ウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系；ウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）で形質転換するか、または細菌発現ベクター（例えば、TiまたはpBR322プラスミド）で形質転換した植物細胞系；または動物細胞系さえもが挙げられる。組換えタンパク質産生に有用である哺乳類細胞としては、限定されるものではないが、VERO細胞、HeLa細胞、チャニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、COS細胞（例えば、COS-7）、WI38、BHK、HepG2、3T3、RIN、MDCK、A549、PC12、K562およびHEK293細胞が挙げられる。

【0109】

本発明のポリペプチド

一般に、本発明の単離されたLECおよびBECポリペプチドは、上記の、示差的に発現される本発明のLECおよびBECポリヌクレオチドによりコードされる。LECおよびBECポリペプチドの配列を、該当する場合には、これらの既知のデータベース受託番号とともに表16に示している。表14および15では、これらの受託番号は固有の配列識別子に対応しているため、引用された配列識別子により受託番号の確認が可能である。本発明の単離されたポリペプチドとしては、限定されるものではないが、配列番号31~44、46、48、50および52のいずれか一つで示されるアミノ酸配列もしくは配列番号1~30、45、47、49および51で示されるヌクレオチド配列のいずれか一つによりコードされるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド、または対応する全長もしくは成熟タンパク質が挙げられる。本発明はまた、配列番号31~44、46、48、50および52で示されるアミノ酸配列のいずれかの生物学的に活性、または免疫学的に活性な変異体、または対応する全長もしくは成熟タンパク質を提供する。好適な変異ポリペプチドは、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、一般的には、少なくとも約95%、96%、97%、より一般的には、少なくとも約98%、または最も一般的には、少なくとも約99%アミノ酸同一性であり、かつ、生物活性を保持する配列を有する。本明細書にて開示する配列の少なくとも10個の連続するアミノ酸を含んでなり、かつ、対応する全長タンパク質の生物活性を示し得る本発明のタンパク質の断片もまた、本発明に含まれる。

【0110】

タンパク質のコード配列は配列表で、開示されたヌクレオチド配列の翻訳により確認される。このようなタンパク質の成熟型は、全長ポリヌクレオチドの好適な哺乳類細胞または他の宿主細胞での発現により得られる。成熟型タンパク質の配列はまた、全長型アミノ酸配列からも決定することが可能である。本発明のタンパク質が膜結合する、可溶型タンパク質もまた提供される。このような形態では、タンパク質が発現される細胞からそれが十分に分泌されるように、タンパク質の膜結合を引き起こす領域の一部または全てが欠失している。

【0111】

当技術分野では公知の種々の方法論を用いて、本発明の単離されたポリペプチドまたはタンパク質のいずれか一つを得ることができる。最も簡単なレベルでは、商業的に入手可能なペプチド合成装置を用いてアミノ酸配列を合成することができる。あるいは、本発明のポリペプチドおよびタンパク質を、所望のポリペプチドまたはタンパク質を発現するよう改変した細胞から精製してもよい。本明細書においては、細胞が通常では生成しないか、または通常では低レベルでしか生成しないポリペプチドまたはタンパク質を生成するように細胞が遺伝子操作により作製されるとき、細胞が所望のポリペプチドまたはタンパ

ク質を発現するよう改変されたという。当業者ならば、本発明のポリペプチドまたはタンパク質のうちの一つを生成する細胞を作製するために、組換え配列または合成配列のいずれかを真核細胞または原核細胞へと導入し、発現するための手順を容易に適合させることができる。

【0112】

ポリペプチドの「断片」とは、ペプチドコア、ペプチドコアの変異体、またはポリペプチドの細胞外領域などの分子のいろいろな部分を意味する。ポリペプチドの「変異体」とは、構造および生物活性において完全分子、またはその断片のいずれかと実質的に類似している分子を意味する。よって、2つの分子が類似した活性を有するならば、たとえ分子のうちの一つの組成または二次、三次、もしくは四次構造が他のもので見られるものと同様でなくても、またはアミノ酸残基の配列が同一でなくても、それは本明細書において使用される用語の「変異体」とみなされる。ポリペプチドまたは遺伝子配列の「類似体」とは、機能および構造において単離されたポリペプチドまたは遺伝子配列と実質的に類似しているタンパク質または遺伝子配列を意味する。

10

【0113】

保存的アミノ酸置換は、とりわけ、このような置換の数が小さい場合に生物学的または免疫学的活性を保持するポリペプチドを生じさせるとされる配列番号31~44、46、48、50および52配列のいずれか一つを含んでなる精製および単離されたポリペプチドに対して行われるものであることは本明細書において分かる。「保存的アミノ酸置換」とは、類似した化学的特性の側鎖を有するアミノ酸とのアミノ酸置換を意味する。保存的置換を行うための類似アミノ酸としては、酸性側鎖（グルタミン酸、アスパラギン酸）；塩基性側鎖（アルギニン、リジン、ヒスチジン）；極性アミド側鎖（グルタミン、アスパラギン）；疎水性脂肪族側鎖（ロイシン、イソロイシン、バリン、アラニン、グリシン）；芳香族側鎖（フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン）；小型側鎖（グリシン、アラニン、セリン、スレオニン、メチオニン）；または脂肪族ヒドロキシル側鎖（セリン、スレオニン）を有するものが挙げられる。

20

【0114】

マイクロアレイ

本発明の別の態様は、特定の細胞種に固有の遺伝子発現パターンの検出および特定の細胞種、例えば、リンパ管内皮細胞の発現パターンの変化の検出に用いる複数のポリヌクレオチドプローブを含んでなる組成物である。例えば、本発明は、配列表に記載されるポリヌクレオチド配列から選択される少なくとも10の連続するヌクレオチドを有するポリヌクレオチドを含んでなるマイクロアレイなどのアレイを包含する。

30

【0115】

また、配列番号1~30、45、47、49および51からなる群から選択される少なくとも10の連続するヌクレオチドを有するポリヌクレオチドを含んでなるマイクロアレイも意図される。本発明のマイクロアレイは少なくとも3のポリヌクレオチドを含んでなる（なお、並べられる各ポリヌクレオチドは配列番号1~30、45、47、49および51からなる群から選択される異なる配列を有する）。このようなマイクロアレイはまた、複製ポリヌクレオチドおよびさらなるポリヌクレオチド、例えば、マイクロアレイを用いるハイブリダイゼーションに基づくアッセイに用いる対照ポリヌクレオチドを含んでもよい。4以上の異なる本発明のポリヌクレオチド、例えば、少なくとも5、7、9、20、50以上のこのようなポリヌクレオチドを含む、マイクロアレイをはじめとするアレイは、種々の内皮細胞種などの生体サンプルを微細に区別する能力、またはこのようなアレイの広い用途において、例えば、特定の内皮細胞に関するスクリーニング、異常または病気の細胞および組織などに関するスクリーニングにおいて、異なる、一般的には高い信頼度を与える能力を有する本発明のアレイとして認識される。

40

【0116】

「マイクロアレイ」とは、ハイブリダイズ可能なアレイエレメントの規則正しい配列を指す。アレイエレメントは、好ましくは、少なくとも3以上の異なるアレイエレメント、

50

より好ましくは、少なくとも100のアレイエレメント、最も好ましくは、少なくとも1,000のアレイエレメントが固体支持体上に存在するように配列される。好ましくは、固体支持体は1cm²基質表面、ビーズ、紙、ナイロンもしくはその他各種メンブラン、フィルター、チップ、ガラススライド、または他の好適な固体支持体である。アレイエレメント各々からのハイブリダイゼーションシグナルは個々に識別できる。好ましい態様では、アレイエレメントはポリヌクレオチドプローブを含んでなる。

【0117】

ハイブリダイゼーションとは、2以上の核酸を塩基対合に好適な条件下で接触させることを意味する。ハイブリダイゼーションは、部分的または完全に相補的な核酸間の相互作用を含む。好適なハイブリダイゼーション条件については、当業者ならば周知である。特定の用途においては、低ストリンジェンシー条件を求めることが好ましい。これらの条件下では、たとえ相互作用している鎖の配列が完全に相補的ではなくてもハイブリダイゼーションが起こるが、一つ以上の位置でミスマッチする可能性がある。当技術分野における情報に従い、条件を調整することにより、例えば、塩濃度を高めるおよび/または温度を下げることに条件のストリンジェンシーを下げてよい。好適なハイブリダイゼーション条件は、遺伝子などの同定可能な発現ユニットの遺伝子発現の検出を可能にする条件である。好ましいハイブリダイゼーション条件は、50%ホルムアミド、1%SDS、1M NaCl、10%硫酸デキストランを含有する溶液(すなわち、ハイブリダイゼーション溶液)中、42℃にてのハイブリダイゼーション、および1×SSCおよび0.1%SDSを含有する洗浄液中、65℃にて30分間の洗浄などのストリンジェントなハイブリダイゼーション条件である。Ausubel, et al. (編), Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1994), 6.0.3~6.4.10頁に記載されるように、温度およびバッファ、または塩濃度を変化させることにより等価なストリンジェンシー条件を達成することができることは当技術分野では理解される。ハイブリダイゼーション条件の変更は、経験的に判断してもよいし、またはプローブの長さおよびグアノシン/シトシン(GC)塩基対合の割合に基づいて正確に算出してもよい。ハイブリダイゼーション条件は、Sambrook, et al., (編), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York (第二版; 1989), 9.47~9.51頁に記載のように算出してもよい。

【0118】

本発明のプローブおよびプライマーを使用する一つの方法は、ヒト細胞における遺伝子発現の検出においてである。ゲノムDNAまたはcDNAライブラリーをスクリーニングしてもよいが、通常、標的は発現されたRNAである。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーおよび標的結合部位(すなわち、配列番号1~30、45、47、49および51で示される配列のサブセットに相当するプローブの配列)を変更することにより、相同性の違いに応じたハイブリダイゼーションが起こると思われる。

【0119】

マイクロアレイは、多数の標的ポリヌクレオチドの大規模遺伝子発現解析に用いることができる。マイクロアレイはまた、疾病の診断および治療のモニタリングに用いることもできる。さらに、マイクロアレイはある疾病に対する個体の疾病素因を調査するのに使用することができる。さらに、マイクロアレイは感染、薬物治療などに対する細胞応答を調査するのに使用することができる。

【0120】

核酸プローブは、ゲノムDNAもしくはcDNAまたはmRNAポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド、あるいはペプチド核酸、分枝DNAなどのようなRNA様もしくはDNA様物質であってよい。プローブはセンスまたはアンチセンスヌクレオチドプローブであってよい。標的ポリヌクレオチドが二本鎖である場合、プローブはセンス鎖またはアンチセンス鎖のいずれかである。標的ポリヌクレオチドが一本鎖である場合、プローブは相補的一本鎖である。一つの態様では、プローブはcDNAである。目的のDNA配列の大きさは多様であり、好ましくは、100~10,000ヌクレオチド、より好まし

10

20

30

40

50

くは、150～3,500ヌクレオチドである。

【0121】

プローブは当技術分野では周知の種々の合成的または酵素的技術を用いて作製することができる。当技術分野では周知の化学的手法を用いて、完全にまたは部分的にプローブを合成することができる(Caruthers et al., Nucleic Acids Res., Symp. Ser., 215-233頁, 1980)。

【0122】

医薬製剤および投与経路

本発明のタンパク質(どんな起源のものでもよい、例えば、組換え起源および非組換え起源のもの)は、必要とする患者に単独で投与してもよいし、または種々の疾患を治療または改善する用量で好適な担体、希釈剤、アジュバントまたは賦形剤と混合された医薬組成物として投与してもよい。このような組成物はまた、(タンパク質および担体に加えて)希釈剤、増量剤、塩類、緩衝剤、安定剤、可溶化剤、および当技術分野では周知の他の材料を含有してもよい。「医薬上許容される」とは、有効成分の生物活性の効果を妨げない非毒性材料を意味する。担体の性質は投与経路によって異なる。本発明の医薬組成物はまた、サイトカイン、ケモカイン、リンフォカイン、増殖因子、または他の造血因子、例えば、PDGF、VEGF(特に、VEGF-CまたはVEGF-D)、VEGFR-3(細胞外ドメインを含んでなる可溶性VEGFR-3ペプチドを含む)、M-CSF、GM-CSF、TNF、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IFN、TNF0、TNF1、TNF2、G-CSF、Meg-CSF、トロンボポエチン、幹細胞因子、および赤血球生成促進因子を含有してもよい。これらのポリペプチドの種々の形態、例えば、単離されたホロタンパク、サブユニット、断片(例えば、可溶性断片)、およびペプチド融合物なども意図される。医薬組成物はさらに、タンパク質の活性を増強するか、または治療においてその活性または使用を補うその他の薬剤を含有してもよい。このようなさらなる因子および/または薬剤は、本発明のタンパク質との相乗効果を生むか、または副作用を最小限に抑えるために医薬組成物に含めてもよい。逆に、本発明のタンパク質を、サイトカイン、リンフォカイン、他の造血因子、血栓溶解もしくは抗血栓因子、または抗炎症薬の副作用を最小限に抑えるために特定のサイトカイン、リンフォカイン、他の造血因子、血栓溶解もしくは抗血栓因子、または抗炎症薬の処方に含めてもよい。本発明のタンパク質はそれ自身のタンパク質または他のタンパク質とのマルチマー(例えば、ヘテロ二量体またはホモ二量体)または複合体において活性であることがある。結果として、本発明の医薬組成物は本発明のタンパク質をこのようなマルチマー形態または複合体形態で含んでよい。

【0123】

本願の化合物の製剤および投与に関する技術は、"Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, Pa., 最新版に見出せる。治療上有効な用量とは、さらに、症状の改善、例えば、関連した病状の治療、治癒、予防、または改善、またはこのような状態の有利な変更、治癒、予防または改善の速度の増加をもたらすのに十分な化合物の量を指す。各有効成分の単独投与として適用する場合には、治療上有効な用量とは、その成分だけを指す。組合せに適用する場合には、治療上有効な用量とは、組み合わせ投与、逐次投与、同時投与を問わず、治療効果をもたらす有効成分の併用量を指す。

【0124】

本発明の治療または使用方法の実施において、本発明のタンパク質の治療上有効な量を治療すべき状態または疾患を有する哺乳類に投与する。本発明のタンパク質は本発明の方法に従い、単独投与してもよいし、または他の治療法、例えば、サイトカイン、リンフォカインまたは他の造血因子を使用する治療と組み合わせて投与してもよい。一つ以上のサイトカイン、リンフォカインまたは他の造血因子と同時投与する場合は、本発明のタンパク質をサイトカイン、リンフォカイン、他の造血因子、血栓溶解または抗血栓因子と同時に投与してもよいし、または逐次的に投与してもよい。逐次投与する場合は、医師が本

発明のタンパク質をサイトカイン、リンフォカイン、他の造血因子、血栓溶解または抗血栓因子と組み合わせて投与するための好適な順序を判断する。

【0125】

投与経路

好適な投与経路としては、例えば、経口、直腸、経粘膜、または腸管投与；筋肉内、皮下、髄内注射、ならびに髄腔内、直接脳室内、静脈内、腹腔内、経鼻、または眼内注射といった非経口送達が挙げられる。医薬組成物に用いる本発明のタンパク質または本発明の方法を実施するための本発明のタンパク質の投与は、種々の従来の方法、例えば、経口摂取、吸入、局所適用または皮膚、皮下、腹腔内、非経口または静脈注射で行われる。ヒト患者などの哺乳類への静脈投与が好ましい。また、化合物の投与は全身的よりも局所的に、例えば、目的とする作用部位に化合物を注入することにより行われる。

10

【0126】

組成物/製剤

よって、本発明に用いる医薬組成物は、医薬として使用し得る製剤への活性化化合物の加工を助ける賦形剤および助剤を含んでなる一つ以上の生理学上許容される担体を用いて従来の方法により製剤される。これらの医薬組成物は、それ自体公知である方法で、例えば、従来混合、溶解、造粒、糖衣丸作製、粉末化、乳化、カプセル化、包括または凍結乾燥工程を利用して製造し得る。適した製剤は選択される投与経路によって異なる。本発明のタンパク質の治療上有効な量を経口投与する場合には、本発明のタンパク質は錠剤、カプセル剤、散剤、液剤またはエリキシル剤の形態をとる。錠剤形態で投与する場合、本発明の医薬組成物はさらに、ゼラチンなどの固体担体またはアジュバントを含有してもよい。錠剤、カプセル剤および散剤は約5～95%の本発明のタンパク質、好ましくは、約25～90%の本発明のタンパク質を含有する。液体形態で投与する場合、水、石油、動物または植物起源の油、例えば、落花生油、鉱油、大豆油、または胡麻油、または合成油などの液体担体を添加してもよい。液体形態の医薬組成物はさらに、を含有してもよい。生理食塩水溶液、ブドウ糖または他の糖類溶液、またはグリコール、例えば、エチレングリコール、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコール。液体形態で投与する場合、医薬組成物は約0.5～90重量%の本発明のタンパク質、好ましくは、約1～50%の本発明のタンパク質を含有する。

20

【0127】

本発明のタンパク質の治療上有効な量を静脈、皮膚または皮下注射により投与する場合には、本発明のタンパク質はパイロジェンフリーの、非経口的に許容される水溶液の形態をとる。pH、等張性、安定性などを十分考慮するこのような非経口的に許容されるタンパク質溶液の調製は、当業界の技術で対応できる範囲にある。静脈、皮膚、または皮下注射に好ましい医薬組成物は、本発明のタンパク質に加えて、生理食塩液、リンガー液、ブドウ糖液、ブドウ糖および生理食塩液、乳酸加リンガー液などの等張ビヒクル、または当技術分野では公知のような他のビヒクルを含むはずである。本発明の医薬組成物はまた、安定剤、防腐剤、緩衝剤、酸化防止剤、または当業者には公知の他の添加剤を含有してもよい。注入では、本発明の薬剤を水溶液中、好ましくは、ハンクス液、リンガー液、または生理食塩水緩衝溶液などの生理学上適合性のあるバッファー中に入れて製剤してもよい。経粘膜投与では、浸透させるべきバリアに対して好適な浸透剤を製剤に用いる。このような浸透剤は当技術分野では一般に知られている。

30

40

【0128】

経口投与では、活性化化合物を当技術分野では周知の医薬上許容される担体と組み合わせることにより容易に化合物を製剤することができる。このような担体により、本発明の化合物を治療すべき患者による経口摂取を目的とした錠剤、丸剤、糖衣丸、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤などに製剤することができる。経口用医薬製剤は、固体賦形剤と混合し、所望により、得られた混合物を粉碎し、必要に応じて、好適な助剤を添加した後、顆粒混合物を加工し、錠剤または糖衣丸コアを得ることにより得ることができる。好適な賦形剤は、特に、ラクトース、スクロース、マンニトール、ま

50

たはソルビトールをはじめとする糖類；例えば、トウモロコシデンプン、小麦デンプン、米デンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントガム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどのセルロース調製物、および/またはポリビニルピロリドン（PVP）などの増量剤である。必要に応じて、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくはアルギン酸ナトリウムなどのその塩といった崩壊剤を添加してもよい。糖衣丸コアには好適なコーティングが施される。この目的には、濃縮糖溶液が使用され得、これには、所望により、アラビアガム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー液、ならびに好適な有機溶剤または溶剤混合物を含めてもよい。識別に、または活性化化合物の量の異なる組合せを特徴付けるために錠剤または糖衣コーティングに染料または色素を添加してもよい。

10

【0129】

経口使用し得る医薬製剤としては、ゼラチンから作製した押し込み型カプセル剤、ならびにゼラチンとグリセロールまたはソルビトールなどの可塑剤から作製した密閉型軟カプセル剤が挙げられる。押し込み型カプセル剤は、有効成分をラクトースなどの増量剤、デンプンなどの結合剤、および/またはタルクまたはステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤および所望により、安定剤と混合して含み得る。軟カプセル剤では、活性化化合物を脂肪油、流動パラフィン、または液体ポリエチレングリコールなどの好適な液体に溶解するか、または懸濁する。さらに、安定剤を添加してもよい。経口投与を目的とする全ての製剤はこのような投与に好適な用量にあるべきである。口内投与では、組成物は従来の方法で製剤された錠剤またはトローチ剤の形態をとってよい。

20

【0130】

吸入による投与では、本発明に従って用いる化合物は、好適な噴射剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の好適なガスを用い、加圧パックまたは噴霧器からエアゾールスプレー剤として便宜に送達される。加圧エアゾールの場合、定量を送達するバルブを提供することにより用量単位が決められる。吸入器または吹き入れ器に用いる、例えば、ゼラチンのカプセル剤およびカートリッジ剤を、化合物の粉末ミックスとラクトースまたはデンプンなどの好適な粉末基剤を含めて製剤してもよい。化合物を注入、例えば、ボーラス注射または点滴による非経口投与に向けて製剤してもよい。注入用の製剤は防腐剤を添加した単位投与形、例えば、アンプルまたは複数投与用容器で与えてもよい。組成物は懸濁液、溶液または油性または水性ビヒクル中のエマルジョンのような形態をとってよく、また、懸濁化剤、分解防止剤および/または分散剤などの処方剤を含有してもよい。

30

【0131】

非経口投与用の医薬製剤としては、水溶性形態の活性化化合物の水溶液が挙げられる。さらに、好適な油性注入懸濁液として活性化化合物の懸濁液を調製してもよい。好適な親油性溶剤またはビヒクルとしては、胡麻油などの脂肪油、または、オレイン酸エチルまたはトリグリセリド、またはリポソームなどの合成脂肪酸エステルが挙げられる。水性注入懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストランなどの懸濁液の粘度を高める物質を含有してもよい。所望により、懸濁液はまた、好適な安定剤または化合物の溶解性を高めて、高濃度溶液の調製を可能にする薬剤を含有してもよい。また、有効成分が使用前に好適なビヒクル、例えば、パイロジェンフリーの滅菌水で構成する散剤形態であってもよい。

40

【0132】

化合物をまた、例えば、カカオ脂または他のグリセリドなどの従来の子剤基剤を含有する、子剤または停留浣腸などの直腸組成物に製剤してもよい。これまでに記載した製剤に加えて、化合物はまた、デポ製剤として製剤してもよい。このような長時間作用性製剤は植込み（例えば、皮下または筋肉内）によりまたは筋肉注射により投与し得る。よって、例えば、化合物を好適な高分子もしくは疎水性材料（例えば、許容される油中のエマルジョンとして）またはイオン交換樹脂とともに、または難溶性誘導体、例えば、難溶性塩

50

として製剤してもよい。

【0133】

本発明の疎水性化合物用の医薬担体は、ベンジルアルコール、非極性界面活性剤、水混和性有機高分子、および水相を含んでなる補助溶剤系である。補助溶剤系はVPD補助溶剤系であってよい。VPDは、3% w/vベンジルアルコール、8% w/v非極性界面活性剤ポリソルベート80、および65% w/vポリエチレングリコール300の無水エタノール溶液である。VPD補助溶剤系(VPD:5W)は、5%ブドウ糖水溶液で1:1希釈したVPDからなる。この補助溶剤系は疎水性化合物を十分に溶解し、全身投与においては、それ自身による毒性は低い。当然ながら、補助溶剤系の割合は、その溶解性および毒性特性を壊すことなく大きく変更し得る。さらに、補助溶剤成分自体を変更してもよい；例えば、ポリソルベート80の代わりに他の低毒性非極性界面活性剤を用いてもよい；ポリエチレングリコールの分量を変更してもよい；ポリエチレングリコールを他の生体適合性のある高分子、例えば、ポリビニルピロリドンに置き換えてもよい；および他の糖または多糖をブドウ糖の代用にしてもよい。また、疎水性医薬化合物用の他の送達系を使用してもよい。リポソームおよびエマルションは疎水性薬剤の送達ビヒクルまたは担体のよく知られた例である。また、ジメチルスルホキシドなどの特定の有機溶剤を、通常、高い毒性を犠牲にするが、使用し得る。さらに、持続放出製剤、例えば、治療薬を含有する固体疎水性高分子の半透性支持体を用いて化合物を送達してもよい。種々の持続放出性材料が確立されており、当業者ならば周知である。持続放出カプセル剤は、それらの化学的性質に応じて、数週間～最大100日にわたって化合物を放出し得る。治療用試薬の化学的性質および生物学的安定性により、タンパク質の安定化に向けたさらなる戦略を採用してもよい。

10

20

【0134】

医薬組成物はまた、好適な固相もしくはゲル相担体または賦形剤を含んでなってもよい。このような担体または賦形剤の例としては、限定されるものではないが、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖、デンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、およびポリエチレングリコールなどの高分子が挙げられる。数多くの、プロテイナーゼ阻害する本発明の化合物を、医薬上適合性のある対イオンを有する塩として提供してもよい。このような医薬上許容される塩基付加塩は、遊離酸の生物学的効果および特性を保持し、また、無機または有機塩基、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化マグネシウム、アンモニア、トリアルキルアミン、ジアルキルアミン、モノアルキルアミン、二塩基アミノ酸、酢酸ナトリウム、安息香酸カリウム、トリエタノールアミンなどとの反応により得られる塩である。

30

【0135】

本発明の医薬組成物は、タンパク質またはペプチド抗原との本発明のタンパク質の複合体形態をとってよい。本発明の医薬組成物は、本発明のタンパク質を、他の医薬上許容される担体に加えて、ミセル、不溶性単分子層、液晶、または水溶液中ラメラ層として凝集形態で存在する脂質などの両親媒性薬剤と組み合わせたりリポソーム形態をとってよい。リポソーム製剤に好適な脂質としては、限定されるものではないが、モノグリセリド、ジグリセリド、スルファチド sulfatides, リゾレシチン、リン脂質、サポニン、胆汁酸などが挙げられる。このようなリポソーム製剤の調製は、例えば、その各々が引用することにより本明細書の一部とされる米国特許第4,235,871号；同第4,501,728号；同第4,837,028号；および同第4,737,323号に開示されるように、当技術分野のスキルレベルで対応できる範囲にある。

40

【0136】

医薬組成物における本発明のタンパク質の量は、治療する状態の性質および重篤度、ならびに患者が受けたそれまでの治療の性質によって異なる。最終的には、一人一人の患者を治療するための本発明のタンパク質の量を医師が判断する。最初に、医師は本発明のタンパク質を低用量で投与し、患者の応答を観察する。患者にとって最適な治療効果が得られるまで、また、用量がこれ以上高められないといった時点まで本発明のタンパク質の用量を高めて投与する。本発明の方法の実施に用いる種々の医薬組成物は、kg体重当たり

50

本発明のタンパク質を約 0.01 μg ~ 約 100 mg (好ましくは、約 0.1 μg ~ 約 10 mg、より好ましくは、約 0.1 μg ~ 約 1 mg) 含有すべきと考えられる。投与では、本発明において用いる治療用化合物はパイロジェンフリーの生理学上許容される形態をとる。本発明のタンパク質以外の、所望により、上記のような組成物にも含めてもよい治療上有効な薬剤は、あるいは、またはさらに、本発明の方法において組成物と同時にまたは逐次的に投与してもよい。

【0137】

本発明のポリヌクレオチドはまた、遺伝子治療に使用することもできる。このようなポリヌクレオチドは、哺乳類被験体での発現を目的として *in vivo* または *ex vivo* のいずれかで細胞に導入することができる。本発明のポリヌクレオチドはまた、核酸(限定されるものではないが、ウイルスベクターまたはネイキッド DNA の形態などで)を細胞または生物へと導入する他の公知の方法により投与してもよい。また、細胞は、増殖させ、またはこのような細胞に対する所望の効果またはこのような細胞における活性を生じさせるために、本発明のタンパク質の存在下で *ex vivo* で培養してもよい。その後、処置された細胞は治療目的で *in vivo* 導入することができる。

10

【0138】

有効用量

本発明における使用に好適な医薬組成物としては、本来の用途を達成するのに有効な量で有効成分が含まれる組成物が挙げられる。さらに具体的に言うと、治療上有効な量とは、治療する被験体の、進行を妨げる、または現在の症状を改善するのに有効な量を意味する。有効用量の決定に利用し得る好適な特性としては、LEC および / または BEC 増殖の刺激または阻害の測定、LEC および / または BEC への細胞分化の速度または程度、細胞発現パターンの LEC 特異的または BEC 特異的な発現パターンに近づくまたは LEC 特異的または BEC 特異的な発現パターンから離れる傾向などが挙げられる。有効量の決定は、とりわけ、本明細書に示す詳細の開示内容に照らして、当業者の能力で十分に対応できる範囲にある。本発明の方法において用いる化合物では、治療上有効な用量は細胞培養物アッセイから最初に推測することができる。例えば、阻害方法では、用量は、細胞培養物で決定される IC₅₀ (すなわち、50% 阻害濃度を達成する試験化合物の濃度) を含む循環濃度範囲を達成するように動物モデルにおいて決定される。このような情報を利用して、ヒトにおいて有効な用量をさらに正確に決定することができる。

20

30

【0139】

治療上有効な用量とは、症状の改善または、生命を脅かすような状態では、患者の生存の延長をもたらす化合物の量を指す。このような化合物の毒性および治療効力は、例えば、LD₅₀ (集団の 50% が死に至る量) および ED₅₀ (集団の 50% に治療上有効な量) を決定するために、標準調剤手順により細胞培養物または試験動物において決定することができる。毒性および治療効果間の用量比が治療指数であり、LD₅₀ および ED₅₀ 間の比率として表される。高い治療指数を示す化合物が好ましい。これらの細胞培養物アッセイおよび動物研究から得られるデータをヒトに用いる用量範囲を決定するのに利用することができる。このような化合物の用量は、好ましくは、毒性がほとんどまたは全くない、ED₅₀ をはじめとする循環濃度の範囲内にある。用量は使用する投与形および採用する投与経路に応じ、この範囲内で変更してもよい。厳密な処方、投与経路および用量は、患者の状態を考慮して各医師によって決定される。例えば、Fingl et al., 1975, in "The Pharmacological Basis of Therapeutics", 第1章 1頁を参照。

40

【0140】

投与する組成物の量は、当然のことながら、治療する被験体によって異なり、被験体の体重、苦痛の重さ、投与様式および処方する医師の判断による。

【0141】

パッケージング

組成物は、必要に応じて、有効成分を含有する一つ以上の単位投与形を含み得るパックまたはディスペンサー装置で与えてもよい。パックは、例えば、ブリスターパックなどの

50

金属またはプラスチックホイルを含んでもよい。パックまたはディスペンサー装置には、投与の際の使用説明書が同封される。また、適合性のある医薬担体中に製剤された本発明の化合物を含んでなる組成物では、調製され、好適な容器に入れられ、指定される状態の治療に関するラベルが付けられる。

【0142】

さらに、本発明は、LECおよび/またはBECの過剰増殖性および過少増殖性の疾患、例えば、リンパ水腫、リンパ管腫、リンパ管骨髄腫、リンパ管腫症、リンパ管拡張症、リンパ肉腫、またはリンパ管硬化症を有する細胞または生物、例えば、ヒト患者の、本発明の組成物の有効量または用量を細胞または生物に投与することを含んでなる治療を目的とした薬物を製造するためのこのような組成物の使用を包含する。好適な組成物としては、限定されるものではないが、本発明のポリヌクレオチド（例えば、アンチセンスポリヌクレオチド）、本発明のポリペプチド、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを特異的に認識する抗体、本発明のポリヌクレオチドの発現を調節するのに有効な小分子化合物などが挙げられる。LECまたはBEC関連疾病または疾患に伴う症状を改善するための薬物の製造を目的とした本発明の組成物の使用もまた、意図される。

10

【0143】

抗体

相対的特異性を有する抗体を容易に作製する能力と、抗体をヒト治療法に採用するための技術の継続的な向上により、抗体は本発明のポリペプチドの調節に有用である。よって、本発明は、目的のポリペプチドに特異的な抗体（例えば、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、単鎖抗体、キメラ抗体、二価性/二重特異性抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、ならびに相補性決定領域（CDR）移植抗体（本発明のポリペプチドを特異的に認識するCDR配列を含む化合物など））の本発明への使用を意図する。好ましい抗体は、全開示内容が引用することにより本明細書の一部とされる1993年6月20日公開のWO93/11236に記載の方法に従い、作製され、同定されるヒト抗体、例えば、トランスジェニック動物で作製されたものである。Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFvをはじめとする抗体フラグメントもまた、本発明により提供される。「~に特異的な」とは、本発明の抗体を説明するために用いる場合には、本発明の抗体の可変領域が、他の物質と結合するレベルと検出可能なように異なり、またそれよりも大きいレベルで目的のポリペプチドを認識し、それと結合する（すなわち、ファミリーのメンバー間の部分的配列同一性、相同性、または類似性が存在する可能性にもかかわらず、測定可能な結合親和性の違いに基づいて目的のポリペプチドを同一ファミリーの他の既知のポリペプチドと区別することが可能である）ことを示す。当然のことながら、特異的な抗体はまた、他のタンパク質（例えば、ELISA技術では黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)プロテインAまたは他の抗体）とも抗体の可変領域の外側、特に、分子の定常領域内の配列との相互作用により相互作用する。本発明の抗体の結合特異性を決定するスクリーニングアッセイは当技術分野では周知であり、慣例的に実施されている。このようなアッセイの網羅的な議論については、Harlow et al. (編), *Antibodies A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), 第6章を参照。

20

30

【0144】

非ヒト抗体は当技術分野では公知の方法によりヒト化し得る。好ましい「ヒト化抗体」はヒト定常領域を有するが、抗体の、可変領域、または少なくとも相補性決定領域（CDR）は非ヒト種由来である。非ヒト抗体をヒト化する方法は当技術分野では周知である。（米国特許第5,585,089号および第5,693,762号を参照）。一般に、ヒト化抗体は一つ以上のアミノ酸残基が非ヒトである起源のそのフレームワーク領域に導入されている。ヒト化は、例えば、Jones et al. [*Nature* 321: 522-525頁, (1986)], Riechmann et al., [*Nature*, 332: 323-327頁, (1988)] および Verhoeyen et al. [*Science* 239: 1534-1536頁, (1988)] に記載の方法を用い、齧歯動物CDRの少なくとも一部をヒト抗体の対応する領域の代わりに用いることにより実施することができる。組み込まれた抗体を作製する数多くの技術については、例えば、Owens and Young, *J. Immunol. Meth.*

40

50

、168:149-165頁 (1994)に記載されている。さらに、親和性または免疫原性を調節するために抗体フレームワークにさらなる変更を加えることができる。

【0145】

本発明はさらに、本発明の抗体を産生するハイブリドーマを提供する。本発明の抗体は本発明のポリペプチドの検出および/または精製に有用である。

【0146】

本発明のポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドはまた、ポリペプチドと特異的に反応するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を得るために動物に免疫性を与えるのに用いてもよい。このような抗体は、免疫原として完全ポリペプチドまたはその断片のいずれかを使用して得られる。ペプチド免疫原はさらに、カルボキシル末端にシステイン残基を有し得、キーホールリンペットヘモシニアン (K L H) などのハプテンと結合し得る。このようなペプチドを合成する方法は、例えば、R. P. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-2154頁 (1963); J. L. Krstenansky, et al., FEBS Lett. 211: 10頁 (1987)においてのように当技術分野では公知である。本発明のタンパク質と結合しているモノクローナル抗体が、ポリペプチドの免疫検出に有用な診断用薬であり得る。ポリペプチドと結合している中和モノクローナル抗体は、ポリペプチドと関連する状態に向けた有用な治療用物質、同時にポリペプチドの発現異常が関与しているある種の癌の治療における有用な治療用物質でもあり得る。癌細胞または白血病細胞の場合、ポリペプチドに対する中和モノクローナル抗体はポリペプチドが媒介する癌細胞の転移拡散を検出または予防するのに有用である。一般に、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、ならびに所望の抗体を産生することができるハイブリドーマを作製する技術は当技術分野では周知である (Campbell, A. M., Monoclonal Antibodies Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1984); St. Groth et al., J. Immunol. 35:1-21頁 (1990); Kohler and Milstein, Nature 256:495-497頁 (1975)), トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法 (Kozbor et al., Immunology Today 4:72頁 (1983); Cole et al., in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96頁)。

10

20

【0147】

本発明のペプチドまたはポリペプチドにより、抗体を産生することが知られている動物 (マウス、ウサギなど) に免疫性を与えることができる。免疫化方法は当技術分野では周知である。このような方法としては、ポリペプチドの皮下または腹腔内注射が挙げられる。当業者ならば、免疫化に用いる本発明のORFによりコードされるポリペプチドの量が免疫性を与える動物、ペプチドの抗原性および注射部位によって異なることは分かるであろう。タンパク質の抗原性を高めるために、免疫原として用いるタンパク質をアジュバントで修飾するか、またはアジュバントに含めて投与してもよい。タンパク質の抗原性を高める方法は当技術分野では周知であり、限定されるものではないが、抗原を異種タンパク質 (例えば、グロブリンまたは - ガラクトシダーゼ) と結合させることまたは免疫化中アジュバントを含めることが挙げられる。

30

【0148】

モノクローナル抗体の場合、免疫性を与えた動物由来の脾臓細胞を取り出し、骨髄腫細胞、例えば、SP2/0-Ag14骨髄腫細胞と融合し、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞とする。当技術分野では周知の多数の方法のうちの一つを用いて、所望の特性を有する抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定することができる。これらとしては、ELISAアッセイ、ウエスタンブロット解析、またはラジオイムノアッセイによるハイブリドーマのスクリーニング (Lutz et al., Exp. Cell Research. 175:109-124頁. 1988) が挙げられる。所望の抗体を分泌するハイブリドーマをクローニングし、当技術分野では公知の手順によりクラスおよびサブクラスを決定する (Campbell, A. M., Monoclonal Antibody Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1984))。単鎖抗体の作製に関して記載された技術 (米国特許第4,946,778号) を本発明のポリペ

40

50

プチドに対する単鎖抗体の作製に適応させることもできる。

【0149】

ポリクローナル抗体の場合、免疫性を与えた動物から抗体含有抗血清を単離し、上記の手順の一つを用いて所望の特異性を有する抗体の存在に関してスクリーニングする。本発明はさらに、検出可能なように標識した形態の上記の抗体を提供する。抗体は放射性同位元素、親和性標識（例えば、ビオチン、アビジンなど）、酵素標識（例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼなど）、蛍光標識（例えば、FITCまたはローダミンなど）、常磁性原子などを用いて検出可能なように標識することができる。このような標識化を達成する手順は当技術分野では周知である；例えば、Sternberger, L. A. et al., J. Histochem. Cytochem. 18:315頁. 1970; Bayer, E. A. et al., Meth. Enzym. 62:308頁 (1979); Engval, E. et al., Immunol. 109:129頁. 1972; および Goding, J. W. J. Immunol. Meth. 13:215頁. (1976)を参照。

【0150】

標識した本発明の抗体は、目的のポリペプチドの断片が発現される細胞または組織を同定する *in vitro*、*in vivo*、および *in situ* アッセイに用いることができる。抗体はまた、治療法または他の診断に直接用いてもよい。本発明はさらに、固体支持体に固定化された上記の抗体を提供する。このような固体支持体の例としては、ポリカーボネートなどのプラスチック、アガロースおよびセファロースなどの複合炭水化物、ならびにポリアクリルアミドおよびラテックスビーズなどのアクリル樹脂が挙げられる。抗体をこのような固体支持体と結合させる技術は当技術分野では周知である(Weir, D. M. et al., "Handbook of Experimental Immunology" 第四版, Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, 第10章 (1986); Jacoby, W. D. et al., Meth. Enzym. 34 Academic Press, N.Y. (1974))。固定化した本発明の抗体は、本発明のタンパク質の *in vitro*、*in vivo*、および *in situ* アッセイに、ならびに免疫アフィニティー精製に用いることができる。

【0151】

コンピューター可読配列

この態様の一つの用途では、本発明のヌクレオチド配列をコンピューター可読媒体に記録することができる。本明細書において「コンピューター可読媒体」とは、コンピューターにより直接読み出し、また、アクセスすることができる媒体を指す。このような媒体としては、限定されるものではないが、フロッピーディスク、ハードディスク記憶媒体、および磁気テープなどの磁気記録媒体；CD-ROMなどの光学記憶媒体；RAMおよびROMなどの電気記憶媒体；および磁気/光学記憶媒体などのこれらのカテゴリーの複合型が挙げられる。現在知られているコンピューター可読媒体をいかに用いて、本発明のヌクレオチド配列をそこに記録しているコンピューター可読媒体を含んでなる製造物を創出するのは当業者ならば、容易に理解できる。本明細書において「記録される」とは、情報をコンピューター可読媒体に記憶するプロセスを指す。当業者ならば、情報をコンピューター可読媒体に記録する現在知られている方法を容易に選択して、本発明のヌクレオチド配列情報を含んでなる製造物を生み出すことができる。

【0152】

当業者が本発明のヌクレオチド配列をそこに記録しているコンピューター可読媒体を作製するのに、種々のデータ記憶構造が利用できる。データ記憶構造の選択は、一般に、記憶された情報にアクセスするために選択される手段に基づいて行われる。さらに、本発明のヌクレオチド配列情報をコンピューター可読媒体に記憶するのに、種々のデータ処理装置のプログラムおよび形式を使用することができる。配列情報は、ワードパーフェクトおよびマイクロソフト社製ワードなどの市販のソフトウェアの書式の文書処理テキストファイルで表示されるか、またはDB2、Sybase、オラクルなどのデータベースアプリケーションに記憶されるASCIIファイルの形式で表示される。当業者ならば、本発明のヌクレオチド配列情報をそこに記録しているコンピューター可読媒体を得るために、かなり多数のデータ処理装置構成形式（例えば、テキストファイルまたはデータベース）を容易に適合させることができる。配列番号1~30、45、47、49および51のヌク

レオチド配列もしくはその典型断片、または配列番号1~30、45、47、49および51と少なくとも99.9%同一なヌクレオチド配列をコンピュータに読み込み可能な形式で提供することにより、当業者は種々の用途で配列情報に慣例的にアクセスすることができる。コンピュータソフトウェアは公的に利用可能であり、これにより当業者はコンピュータ可読媒体により提供される配列情報にアクセスすることが可能になる。次の実施例では、いかにBLAST (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410頁, 1990)およびBLAZE (Brutlag et al., Comp. Chem. 17:203-207頁 (1993))検索アルゴリズムをSybaseシステムで実行するソフトウェアを利用して、核酸配列内のオープンリーディングフレーム(ORF)を同定するかを例示している。このようなORFはタンパク質をコードする断片であり得、また、発酵反応および商業的に有用な代謝産物の生産に利用する酵素などの商業的に重要なタンパク質を作製するのに有用であり得る。

10

【0153】

本明細書において「コンピュータに基づくシステム」とは、本発明のヌクレオチド配列情報を解析するのに利用するハードウェア手段、ソフトウェア手段、およびデータ記憶手段を指す。本発明のコンピュータに基づくシステムの最小ハードウェア手段は、中央演算処理装置(CPU)、入力手段、出力手段、およびデータ記憶手段を含んでなる。現在利用可能なコンピュータに基づくシステムのいずれか一つが本発明における使用に好適であることは、当業者ならば容易に理解できる。上記のように、本発明のコンピュータに基づくシステムは、本発明のヌクレオチド配列をそこに記録しているデータ記憶手段、および必要なハードウェア手段および検索手段に対応し、それを実行するソフトウェア手段を含んでなる。本明細書において「データ記憶手段」とは、本発明のヌクレオチド配列情報を記憶できる記憶装置、または本発明のヌクレオチド配列情報をそこに記録している製造物にアクセスできるメモリアクセス手段を指す。

20

【0154】

本明細書において「検索手段」とは、標的配列または標的構造モチーフをデータ記憶手段内に記憶されている配列情報と比較するために、コンピュータに基づくシステムで実行される一つ以上のプログラムを指す。検索手段を用いて、特定の標的配列または標的モチーフに一致する既知の配列の断片または領域を特定する。種々の既知のアルゴリズムは公開されており、検索手段を管理する種々の商業的に入手可能なソフトウェアは本発明のコンピュータに基づくシステムで使用される、また、使用することができる。このようなソフトウェアの例としては、限定されるものではないが、MacPattern(EMBL)、BLASTNおよびBLASTA(NPOLYPEPTIDEIA)が挙げられる。相同性検索を実施するのに利用可能なアルゴリズムのいずれか一つまたは実行ソフトウェアパッケージを本コンピュータに基づくシステムにおける使用に適応させることができることは、当業者ならば容易に理解できる。本明細書において「標的配列」とは、6以上のヌクレオチドまたは2以上のアミノ酸からなる核酸またはアミノ酸配列であり得る。標的配列が長い程、標的配列がデータベースにランダム発生的に存在する可能性が少ないことは、当業者ならば容易に理解できる。標的配列の最も好ましい配列長は約10~100アミノ酸または約30~300ヌクレオチド残基である。しかしながら、商業的に重要な断片、例えば、遺伝子発現およびタンパク質プロセッシングに關与する配列断片の検索ではそれよりも長さが短い場合もあることは十分に理解される。

30

40

【0155】

本明細書において「標的構造モチーフ」または「標的モチーフ」とは、合理的に選択された配列または標的モチーフの折り畳みで形成される三次元構造に基づいて、その配列が選択される配列の組合せを指す。当技術分野では公知の種々の標的モチーフが存在する。タンパク質標的モチーフとしては、限定されるものではないが、酵素活性部位およびシグナル配列が挙げられる。核酸標的モチーフとしては、限定されるものではないが、プロモーター配列、ヘアピン構造および誘導発現エレメント(タンパク質結合配列)が挙げられる。

【0156】

50

診断アッセイおよびキット

本発明はさらに、L E CまたはB E Cなどの内皮細胞の過剰増殖性および/または過少増殖性の疾患または疾病に関する診断アッセイ、および関連キットを提供する。これらのアッセイは、本発明の核酸プローブまたは抗体を用いて試験サンプル中の本発明のO R Fの一つ、またはその相同体の存在または発現を同定する方法を含んでなる。

【0157】

一般に、本発明のポリヌクレオチドを検出する方法は、サンプルを、ポリヌクレオチドと結合し、それと複合体を形成する化合物と、複合体を形成するのに十分な時間接触させること、および複合体が検出される場合には、サンプル中の本発明のポリヌクレオチドを検出するために複合体を検出することを含んでなる。

10

【0158】

このような方法はまた、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、サンプルを、このような条件下で本発明のポリヌクレオチドとアニーリングする核酸プライマーと接触させること、およびポリヌクレオチドが増幅される場合には、サンプル中の本発明のポリヌクレオチドを検出するためにアニーリングしたポリヌクレオチドを増幅することを含んでなっている。

【0159】

一般に、本発明のポリペプチドを検出する方法は、サンプルを、ポリペプチドと結合し、それと複合体を形成する化合物と、複合体を形成するのに十分な時間接触させること、および複合体が検出される場合には、サンプル中の本発明のポリペプチドを検出するために複合体を検出することを含んでなる。詳細には、このような方法は、試験サンプルを一つ以上の本発明の抗体または一つ以上の本発明の核酸プローブとともにインキュベートすること、および核酸プローブまたは抗体の試験サンプル内の成分との結合に関してアッセイすることを含んでなる。

20

【0160】

核酸プローブまたは抗体を試験サンプルとともにインキュベートする条件は様々である。インキュベーション条件は、アッセイに使用する形式、使用する検出方法、ならびにアッセイに使用する核酸プローブまたは抗体の種類および性質により異なる。商業的に入手可能なハイブリダイゼーション、増幅または免疫学的アッセイ形式のうちのいずれか一つを本発明の核酸プローブまたは抗体を使用するのに容易に適應させることができることは、当業者ならば分かるであろう。このようなアッセイの例は、Chard, T., *An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1986); Bullock, G. R. et al., *Techniques in Immunocytochemistry*, Academic Press, Orlando, Fla. 第1巻 (1982), 第2巻 (1983), 第3巻 (1985); Tijssen, P., *Practice and Theory of immunoassays: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1985)に見出せる。本発明の試験サンプルとしては、細胞、細胞のタンパク質もしくは膜抽出物、または唾液、血液、血清、血漿、または尿などの体液が挙げられる。上記の方法に使用する試験サンプルは、アッセイ形式、検出方法の性質ならびにアッセイすべきサンプルとして用いる組織および細胞または抽出物により異なる。細胞のタンパク質抽出物または膜抽出物を調製する方法は当技術分野では周知であり、使用する系と適合性のあるサンプルが得られるように容易に適應させることができる。

30

40

【0161】

本発明の別の態様では、本発明のアッセイを実施するのに必要な試薬を含むキットが提供される。一つの態様では、本発明は、厳重な管理下で、

(a) 本発明のプローブまたは抗体のうちの一つを含んでなる第1の容器; および

(b) 洗浄試薬、結合したプローブまたは抗体の存在を検出することができる試薬、を一つ以上含んでなる一つ以上の他の容器、を含む一つ以上の容器を収容するコンパートメントキットを提供する。

【0162】

50

詳細には、コンパートメントキットとしては、試薬が個別の容器に収容されているキットが挙げられる。このような容器としては、小型ガラス容器、プラスチック容器またはプラスチックもしくは紙のストリップが挙げられる。このような容器では、サンプルと試薬が交差汚染しないように、試薬をあるコンパートメントから他のコンパートメントへと効率的に移すことが可能であり、また、各容器の薬剤または溶液をあるコンパートメントから他のものへと定量的に添加することができる。このような容器としては、試験サンプルを受け入れる容器、アッセイに使用する抗体を収容している容器、洗浄試薬（例えば、リン酸緩衝生理食塩水、Trisバッファーなど）を収容している容器、および結合した抗体またはプローブを検出するのに使用する試薬を収容している容器を含む。検出試薬の種類としては、標識化核酸プローブ、標識化二次抗体、あるいは、一次抗体を標識する場合

10

【実施例】

【0163】

実施例に使用する方法は以下の通りである：

【0164】

抗体

ヒトVEGFR-3に対するモノクローナル抗体（クローン 2E11D11；WO 03/006104として公開された国際特許出願番号PCT/US02/22164を参照）、PAL-E（Monosan）、CD31（Dako）、N-カドヘリン、VE-カドヘリン、 α -カテニンおよびプラコグロビン、ならびにポリクローナルウサギ抗ヒトポドプラニンを使用した（Breiteneder-Geleff, S., et al., Am. J. Pathol. 154:385-394頁（1999））。マウス抗ヒトインテグリン $\alpha 9$ はDr. Dean Sheppard（カリフォルニア大学サンフランシスコ校, San Francisco）およびDr. Curzio Rugg（ローザンヌ大学医学部, Lausanne, Switzerland）から提供されたものであった。蛍光色素結合二次抗体はJackson ImmunoResearchから入手した。

20

【0165】

細胞培養物およびトランスフェクション

ヒト羊膜上皮細胞を5%ウシ胎児血清の存在下、Med199培地で培養した。ヒト皮膚微小血管内皮細胞はPromoCell（Heidelberg, Germany）から入手した。細胞分離では、抗ポドプラニン抗体、ヤギ抗ウサギIgG抗体と結合したMACSコロイド状超常磁性マイクロビーズ（Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany）、LDおよびMS分離カラムならびにMid/MiniMACS分離器（Miltenyi Biotech）を製造業者の使用説明書に従い使用した。単離された細胞は、記載されているように（Makinen, T., et al., EMBO J. 20:4762-4773頁, 2001）、フィブロネクチンコーティング（10 μ g/ml, Sigma, St. Louis, MO）プレート上で培養した。

30

【0166】

RNA単離、ノーザンブロットングおよびマイクロアレイ解析

全RNAを単離し、RNeasyカラム（Qiagen, Valencia, CA）でDNase I処理した。Atlasフィルター（Clontech）とのハイブリダイゼーション用の 32 P標識プローブを、プローブをNick-25カラム（Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden）を用いて精製することを除き、製造業者の使用説明書に従い、2~5 μ gの全RNを用いて調製した。ハイブリダイゼーションおよび洗浄後、Fuji BAS 100 ホスホイメジャーを用いてメンブランを解析した。Affymetrix（商標）解析では、四つの独立したBECおよびLECのサンプル調製およびハイブリダイゼーションを、4ロットの、異なる個体から単離された細胞から抽出したRNAを用いて実施した。Affymetrix（商標）発現解析では、カスタムスーパースク립ト ds-cDNA合成キット（Invitrogen, Carlsbad, CA）を用いた二本鎖cDNAの合成に5 μ gの全RNAを用いた。次いで、Enzo BioArrayTM High YieldTM RNA Transcript標識キット（Affymetrix, Santa Clara, CA）を用いて、ビオチン標識

40

50

した cRNA を調製し、RNeasy カラム (Qiagen, Valencia, CA) を用いて、組み込まれていないヌクレオチドを除去した。特性不明の EST 配列を主として含むヒトゲノム 95Av2 マイクロアレイ (prox-1 試験の場合) および 9513-E マイクロアレイのハイブリダイゼーション、洗浄および染色を、製造業者の使用説明書に従い (Affymetrix, GeneChip Expression Analysis Technical Manual) 行った。プローブアレイを、Agilent

【0167】

GeneArray (商標) スキャナーを用いて 570 nm にてスキャンし、定量的スキャニングでの測定値を Affymetrix (商標) マイクロアレイスイートバージョン 5.0 およびデータマイニングツールバージョン 3.0 により解析した。比較解析では、グローバルスケールリング強度 100 を用いてハイブリダイゼーション強度を算出した。

【0168】

示差的に発現された配列を、国立バイオテクノロジーインフォメーションセンター (National Center for Biotechnology Information) および米国国立医学図書館 (National Library of Medicine) (NCBI/NLM) の GenBank データベースで EST コンテイングを検索するのに用い、オープンリーディングフレームを、NCBI/NLM にて入手可能な orf ファインダーソフトウェアを用いて推測した。SSUI システムをタンパク質配列からのトランスメンブランヘリックスおよびシグナル配列の推定に用い、他のタンパク質ドメイン構造を Pfam (Protein families database of alignments and HMMs) を用いて解析した。

【0169】

免疫蛍光検査法と免疫組織化学

細胞をカバースリップ上で培養し、4% パラホルムアルデヒドで固定し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中 0.1% Triton-X100 で浸透化し、一次抗体で染色した。インテグリン 9 について、染まっている生細胞を抗体とともに氷上で 15 分間インキュベートし、その後、固定した。細胞をさらに FITC または TRITC 結合二次抗体で染色した。F-アクチンをテキサスレッド結合ファロイジン (Molecular Probes, Eugene, OR) を用いて染色した。細胞を Hoechst 33258 蛍光色素 (Sigma) で対比染色し、Zeiss Axioptan 2 蛍光顕微鏡を用いて調べた。

【0170】

外科切除により得られた正常ヒト皮膚を Tissue-Tek (商標) (Sakura, The Netherlands) で包埋し、冷凍し、切片にした。切片 (6 μm) を冷アセトンで 10 分間固定し、一次抗体で染色し、次ぎに、ベクタステイン Elite ABC キット (Vector Laboratories, Burlingame, CA) および 3-アミノ-9-エチルカルバゾール (Sigma, St. Louis, MO) を用いてペルオキシダーゼ染色を行った。

【0171】

実施例 1

示差的に発現された遺伝子の同定

血管およびリンパ管内皮細胞 (各々、BEC および LEC) をヒト皮膚微小血管内皮細胞培養物から磁気マイクロビースおよびリンパ管内皮細胞表面マーカー、ポドプラニンに対する抗体を用いて単離した (Breiteneder-Geleff, S., et al., Am. J. Pathol. 154:385-394 頁 (1999); Makinen, T., et al., EMBO J. 20:4762-4773 頁 (2001))。単離された BEC および LEC 集団の純度は、VEGFR-3 またはポドプラニンに対する抗体を用いた免疫蛍光検査法による評価では、99% を上回っていることが確認された。単離された細胞を 2 継代培養し、培養物から RNA を抽出し、約 12,000 種の既知の遺伝子、すなわち、全推定ヒト転写物総数の約 1/3 の配列を含むオリゴヌクレオチドマイクロアレイとのハイブリダイゼーションに使用した。

【0172】

予想どおり、既知のリンパ管内皮細胞マーカーである、ポドプラニン、デスモプラキン I/II およびマクロファージマンノース受容体の特異的に LEC において見られた。Brei

teneder-Geleff, S., et al., Am. J. Pathol. 154:385-394頁 (1999); Ebata, N., et al., Microvasc. Res. 61:40-48頁 (2001); および Irjala, H., et al., J. Exp. Med. 194:1033-1041頁 (2001)を参照。Since これらの結果が *in vivo* および *in vitro* での既知遺伝子の発現パターンと一致していたため、遺伝子発現プロファイルのさらなる特性決定を行った。反復解析で再現性のあるシグナル \log_2 比 1.0 (2倍の差) を選択した場合、400個を超える遺伝子が LEC および BEC 間で示差的に発現されることが判明した。表1では示差的に発現される遺伝子のいくつかの例に機能的注釈をつけており、表2~4では示差的に発現される遺伝子の完全な一覧表を示している。表3および4では GenBank 受託番号および 独立に採取した BEC および LEC 間の発現レベル変動 (シグナル \log_2 比 $\pm s.d.$) を含む、示差的に発現される遺伝子の完全な一覧表を示している。マイクロアレイデータは31種の選択された遺伝子に関するノーザンプロッティングまたは免疫蛍光検査法により実証した (図1参照)。

10

【0173】

表3および4に示す各遺伝子は、NCBIにより維持管理されている GenBank データベースなどの公開ゲノムデータベースに見出せる遺伝子の配列と関連する遺伝子受託番号により確認される。これらの配列は引用することにより本明細書の一部とされる。

【0174】

【表 1】

表 1

BEC および LEC において示差的に発現された遺伝子の選択された種類

	血管 EC	リンパ管 EC	
接着分子	インテグリン $\alpha 5$ インテグリン $\beta 5$, $\beta 4^*$ ICAM-1*, ICAM-2 N-カドヘリン* セレクチン P, セレクチン E* プロトカドヘリン 42* CD44*	インテグリン $\alpha 9^*$ インテグリン $\alpha 1$ マクロファージマンノース 受容体 I*	10
細胞骨格タンパク質	エフリン B1* ビンキュリン クローディン 7* アクチン, $\alpha 2$ プロフィリン 2	デスモプラキン I および II* アデュシン γ α -アクチニン-2 関連 LIM タンパク質*	
ECM タンパク質	コラーゲン 8A1*, 6A1*, 4A2/13A1*, 1A2* ラミニン* バーシカン* プロテオグリカン 1	基質 Gla タンパク質*	20
ECM 調節	MMP-1, MMP-10, MMP-14* uPA*, tPA* カテプシン C	TIMP-3	
受容体チロシンキナーゼ および他のタンパク質キナーゼ	VEGFR-1 (sVEGFR-1*)	VEGFR-3* Lyn Dyrk3	
転写因子	STAT6* TFEC* MAD-3* HMGI-C* JUN* GATA2	prox-1* MEF2C* c-maf* フォークヘッドボックス M1 CREM ear-3	30
増殖因子	VEGF-C* 胎盤増殖因子	アンギオポイエチン-2	
サイトカイン, ケモカイン および受容体	IL-8*, IL-6* 幹細胞因子* 単球遊走因子 1 UFO/axl* CXCR4 CCRL2/CKRX* IL-4 受容体	IL-7* SDF-1b*	40
細胞周期	p27* p21 gadd45	Cdk 阻害剤 p57KIP2* サイクリン依存性キナーゼ 阻害剤 3, CIP2 サイクリン E2* サイクリン B1, B2*	

	血管 EC	リンパ管 EC
酸化ストレス	チオレドキシニンレダクターゼ β *	セレノタンパク質 P*
その他	ニューロピリン-1 HNMP-1* 内皮細胞タンパク質 C/APC 受容体 RN アーゼ A, 膵臓* TGF- β LTBP-2 メタロチオネイン I, II, III シクロオキシゲナーゼ 2* クラスτεリン/アポリポタン パク質 J ニューロンペントラキシン I*	ポドプラニン* MRC OX2 アポリポタンパク質 D セマフォリン 3A* 脂肪酸結合タンパク質 4 LITAF/Pig7* IGFBP-2* ピッコロ(piccolo)* モノアミンオキシダーゼ A ニューロンペントラキシン II*
計	222 遺伝子	187 遺伝子

10

太字で示した遺伝子はノーザンブロットィングまたは免疫蛍光検査法により確認され、アスタリスク(*)の付いた遺伝子は2種の細胞系統のうち一系統でのみ特異的に発現された。

20

【 0 1 7 5 】

【表 2】

表 2
既知の LEC 特異的遺伝子

遺伝子	検出*	受託番号 開始 EST	可能性のある遺伝子
CD36 =COL1/TS 受容体, 脂肪酸輸送タンパク質	Af (S/4,3)	R20784 H54254	M98399
β 1-シントロフィン	Af (S/4,5)	AA447177	L31529
コレクチンサブファミリーメン バー12	Af (S/4,5)	R74387	NM_030781
メタロプロテアーゼディスイン テグリンドメイン 12	Af (S/4,3)	AA147933	NM_003474
細胞傷害性 T リンパ球関連タン パク質 4	Af (S/4,0)	AI733018	NM_005214
niban タンパク質 NM_022083	Af (S/3,7)	AA554814	NM_052966
niban タンパク質			
複数 PDZ ドメインを有するタン パク質, LNX	Af (S/3,5)	AI738919	NM_032622
MAGE-E1 タンパク質	Af (S/3,2)	AI435112	NM_030801
転写促進因子 1, USF1(ゲノムマ ッチ)	Af (S/2,6)	AA701033	AB017568
ヘアリー/ YRPW1 モチーフ関連 のエンハンサーのスプリット	Af (NS/2,6)	R61374	NM_012258
α -2,8-ポリシアリルトランス フェラーゼ	Af (S/2,5)	AI422986	L41680
セマフォリン 6A1	Af (S/2,4)	W21965	NM_020796
グアニンヌクレオチド結合タン パク質(G タンパク質), γ 2	Af (S/2,3)	AA738022	
内在性膜タンパク質 3	Af (S/2,3)	AA128019	NM_030926
マウスグルココルチコイド誘発 遺伝子 1 に類似	Af (S/2,0)	AI678080	XM_070471
YAP65(65kDa MW の Yes 関連タン パク質)	Af (NS/2,0)	AL048399	X80507
17kDa 胎児脳タンパク質	Af (NS/1,9)	H92988	NM_022343
Kruppel 様因子 5	Af (S/1,8)	AI815057	NM_001730
カルシトニン受容体様, CGRP タ イプ 1 受容体	Af (S/1,7)	AI741128 , T94540	NM_005795, L76380
繊維芽細胞増殖因子 13, イソ型 1A	Af (NS/1,7)	AW014749	NM_004114
膜 4 回貫通型 NET-6 タンパク質	Af (NS/1,6)	W22687	NM_014399
リングフィンガータンパク質 11	Af (S/1,6)	AL079648	BC020964

10

20

30

40

* Af=Affymetrix, S=LEC に対して特異的, NS=非特異的(BEC でも発現される), 数値は BEC および LEC 間のシグナル強度の \log_2 比を示す

【 0 1 7 6 】

実施例 2

炎症に關与する遺伝子の BEC 特異的な発現

内皮細胞は炎症反応のいくつかの工程において重要な役割を果たしている。それらは白 50

血球を炎症病巣に補充し、特殊な内皮細胞（高内皮細静脈）が二次リンパ器官へのリンパ球ホーミングに参与する。さらに、内皮細胞は白血球の活性化を調節し、逆の場合も同じである。それらは白血球により分泌された分子によって活性化された状態になる。細胞培養物でのそれらの活性化と一致し、BECは高レベルの前炎症性サイトカインおよびケモカイン（幹細胞因子、インターロイキン-8、単球遊走因子1（MCP-1））ならびに受容体（UFO/a x 1、CXCR4、IL-4R）を発現した（表I参照）。CXCR4およびそのリガンド、ストローマ細胞由来因子-1（SDF-1）は、正常リンパ球、単球、および造血幹細胞および造血前駆細胞のトラフィックングにおいて重要な役割を果たしている。CXCR4またはSDF-1のいずれかの標的不活性化は心臓発生異常、血液生成および血管新生をもたらす(Tachibana, et al., Nature 393:591-594頁, 1998)。

10

【0177】

実施例3

細胞接着、細胞-細胞相互作用および細胞骨格分子における相違

BECおよびLEC間で検出された最も著しい相違は、細胞骨格および細胞-細胞または細胞-基質相互作用に参与する遺伝子の発現であった（表3および4参照）。例えば、内皮細胞のSMCおよび周皮細胞との相互作用に参与するN-カドヘリン(Gerhardt, et al., Dev. Dyn. 218:472-479頁, 2000)は、特に、BECにおいて検出された。このことは毛細リンパ管がSMCにより被覆されない事実と一致している。免疫染色では、N-カドヘリンはBECにて排他的に検出されたが、一方、VE-カドヘリンは両細胞種に存在していた（図2a-d）。カドヘリンの細胞質ドメインは、それらを-アクチン、ピンキュリン、ZO-1、ZO-2およびスペクトリンを介してアクチン細胞骨格と連結する-カテニン、プラコグロビン（-カテニン）およびp120^{cas}と相互作用する(Provost, E. & Rimm, Curr. Op. Cell Biol. 11:567-572頁, 1999)。BECは有意に高いレベルの-カテニン（図2e, f）およびピンキュリンを発現したが、一方、プラコグロビンはLECにて主に存在した（図2g, h）。また、LECおよびBECの染色ではアクチン細胞骨格の構成が著しく異なることが明らかになった。BECはLECではほとんど完全に存在しない数多くのストレスファイバーを示し、LECでは代わりにアクチンの皮質分布が見られた（図2i, j）。

20

30

【0178】

インテグリンは細胞接着の重要なメディエーターである(Giancotti & Ruoslahti, Science 285:1028-1032頁, 1999)。それらは2つのポリペプチド、およびサブユニットからなるトランスメンブラン型タンパク質である。それらの外部領域は細胞外基質タンパク質と結合し、一方、細胞質ドメインは細胞骨格と、また、シグナル変換に参与するタンパク質と相互作用する。フィブロネクチン受容体のサブユニットとして作用するインテグリン α 5は、主としてBECにおいて発現された。これに対し、ラミニンおよびコラーゲンに対する受容体およびオステオポンチンおよびテネイシンに対する受容体にサブユニットを提供するインテグリン α 1および α 9は各々、LECにおいて発現された（図1aおよび図2k, l）。ヒト皮膚では、インテグリン α 9に対する抗体は毛細リンパ管を特異的に染色したが、一方、血管内皮細胞はネガティブであった（図2m~o）。さらに、インテグリン α 9は、これまでに報告されたように動脈平滑筋細胞において検出された(Palmer, et al., J. Cell Biol. 123:1289-1297頁, 1993)。興味深いことに、インテグリン α 9がリンパ系の正常な発生に重要であることがわかってきた。インテグリン α 9欠損マウスは、胸膜（恐らくリンパ管）滲出液の貯留が原因で呼吸不全を起こし、生後6~12日以内に死亡する(Huang, et al., Mol. Cell Biol. 20:5208-5215頁, 2000)。

40

【0179】

BECは、ラミニンおよび種々のタイプのコラーゲンの両方を生成したが、LECは生

50

成しなかった(表4)。共培養では、LECの接着および増殖にこれらの基底膜成分が必要であると考えられる(Makinen, T., et al., EMBO J. 20:4762-4773頁, 2001)。さらに、いくつかの基質メタロプロテイナーゼ、ヒト組織およびウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子、ならびにプラスミノゲン活性化因子阻害剤Iをはじめとする基質分解および再構築に参与する多くのタンパク質が主としてBECにおいて検出されたが、一方、基質メタロプロテイナーゼ-3(TIMP-3)の組織阻害剤は主としてLECにおいて検出された(表3および図1)。可溶性である他のTIMPとは異なり、TIMP-3は細胞外基質の成分である。組換えTIMP-3は、脈管形成因子に反応する内皮細胞移動および管形成を阻害すること、また、腫瘍モデルで発現した場合には、おそらく、腫瘍拡大、細胞外基質からの増殖因子の放出、または血管形成を妨げることにより腫瘍増殖を阻害することが報告された、(Anand-Apte, et al., Biochemistry & Cell Biology 74:853-862頁, 1996)。

10

【0180】

これまで未知であったさらなる遺伝子が、マイクロアレイにおいてLEC特異的な転写因子またはトランスメンブラン型タンパク質であると分かった。表5および6参照。

【0181】

【表3】

表5
同定された転写因子

遺伝子	検出*	受託番号 開始 EST	可能性のある遺伝子
イルコイ関連ホメオボックス 2に相同 マウス奇数飛び (odd-skipped)関連1ジンク フィンガーTFに類似	Af (S/4,2)	AA936528	ヒトクローンではない (18)
7q35-qter 由来 PAC クローン RP4-751H13	Af (S/3,3)	AI809953	(19)
マウスグルココルチコイド誘 導遺伝子1に類似	Af (S/2,3)	AC004877	
	Af (NS/2)	AI678080	XM_070471

20

* Af=Affymetrix, S=LEC に対して特異的, NS=非特異的(BECでも発現される), 数値は BEC および LEC 間のシグナル強度の \log_2 比を示す

30

【0182】

【表 4】

表6
同定されたトランスメンブランタンパク質

遺伝子	検出*	受託番号 開始 EST	可能性のある遺伝子
KIAA0626	Af (S/4,7)	AB014526	NM_021647 (14)
KIAA0644	Af (S/3,9)	AB014544	NM_014817 (15)
未知のタンパク質	Af (S/3,5)	AI333655	XM_059074 (16)
仮定タンパク質 FLJ20898	Af (NS/1,8)	AI733570	NM_024600 (862)
ライイリンに類似, 不特 定タンパク質生成物	Af (NS/1,7)	AA447940	AK055654, XM_084655 (45)
仮定タンパク質 FLJ23403	Af (NS/3,2)	AI681538	NM_022068 (860)
KIAA0062		D31887	XM_046677 (47)
間葉幹細胞タンパク質 DSCD75	Af (S/1,8)	AW009871	NM_016647 (17)

10

* Af=Affymetrix, S=LEC に対して特異的, NS=非特異的(BEC でも発現される), 数値は BEC および LEC 間のシグナル強度の \log_2 比を示す

20

【0183】

さらに、表 10 および 11 では、同定された既知 LEC 遺伝子とそれらの受託番号、および示差的に発現された遺伝子とそれらの受託番号を各々示している。また、表 12 では、スクリーニングで同定された他の未知のタンパク質を示している。

【0184】

実施例 4

Prox-1 による LEC 遺伝子の示差的調節

リンパの分化プログラムに關与する機構を調査した。Prox-1 ホメオボックス転写因子が LEC において特異的に発現されることが分かり、マウスにおける prox-1 の標的破壊によりリンパ管発生が阻止されたことが報告された (Wigle et al., Cell, 98:769-778頁, 1999)。10 年近く前に prox-1 遺伝子が発見されたという事実にもかかわらず、Prox-1 標的遺伝子はまだ同定されていない。ホメオドメイン転写因子 Prox-1 が LEC および BEC 表現型の分化に寄与するかどうかを調べるため、上記の同定された遺伝子を一次 BEC および LEC における発現に関して、Prox-1 過剰発現の存在および不在で解析した。

30

【0185】

一次内皮細胞における prox-1 のアデノウイルス媒介性遺伝子導入を利用して、BEC において遺伝子発現を誘導した。アデノウイルス感染によって起こる遺伝子発現の変化を排除するため、(-ガラクトシダーゼをコードする) AdLacZ を対照として BEC に導入した。

40

【0186】

prox-1 cDNA を、全 RNA を用いた RT-PCR により、ヒト内皮細胞ならびにプライマー 5' - GCCATCTAGACTACTCATGAAGCAGCT - 3' (配列番号 61) および 5' - GCGCAGAAATTCGGCCCTGACCATGACAGCACCA - 3' (配列番号 62) から増幅した。PCR 産物を pAMC 発現ベクターにクローニングし、N 末端に Myc タグの付いた prox-1 が産生した。次いで、この構築物を pAdCMV にサブクローニングして、アデノウイルス産生用の AdProx-1 を得た。AdProx-1 および AdLacZ ウイルスストックは、記載されているように作製した。アデノウイルス産生される分子量約 85 kDa の Prox-1 は移動し

50

、それは P r o x - 1 C 末端ペプチドに対する抗体によっても認識された。変異型 P r o x - 1 N 6 2 5 A / R 6 2 7 A (コドン 6 2 5 におけるアスパラギンからアラニンへの変化、コドン 6 2 7 におけるアルギニンからアラニンへの変化) は、Q u i k C h a n g e 部位特異的突然変異誘発キット (Stratagene, La Jolla, CA) および次のプライマー :

5 ' - C T C A T C A A G T G G T T T A G C G C T T T C C G T A G T T T T A C T A C - 3 ' (配列番号 6 3) および

5 ' - G T A G T A A A A C T C A C G G A A G C G C T A A A C C A C T T G A T G A G - 3 (配列番号 6 4)

を用いて作製した。

10

【 0 1 8 7 】

ヒト皮膚微小血管内皮細胞、冠動脈内皮細胞 (C A E C)、伏在静脈内皮細胞 (S A V E C)、B E C および L E C をアデノウイルス感染前に 2 4 時間、8 , 0 0 0 細胞 / c m ² の密度で培養し、血清フリー培地で 5 0 ~ 1 0 0 P F U / 細胞にて 1 時間感染させた。インキュベーション終了時に細胞を洗浄し、次いで、完全培地で 2 0 ~ 2 4 時間培養した。全 R N A の単離およびアレイハイブリダイゼーションを上記のように行った。

【 0 1 8 8 】

力価試験では、A d P r o x - 1 または A d L a c Z でのヒト微小血管内皮細胞の感染により、感染後 2 4 時間において細胞の > 9 0 % にアデノウイルスによりコードされるタンパク質の核発現がもたらされることが分かった。P r o x - 1 により誘導される遺伝子発現の変化を調査するために、一般細胞代謝に重要であることが分かっている約 1 , 0 0 0 種の遺伝子、ならびに心臓血管機能または血液生成の調節に特異的に関与する遺伝子を含むヒト c D N A フィルターアッセイを利用した。A d p r o x - 1 は 2 8 種の L E C 遺伝子の発現をアップレギュレートし、6 3 種の B E C 遺伝子の発現をダウンレギュレートした (以下の表 7 参照)。このことは、ノーザンブロットイングにより、1 1 種の選択された遺伝子のうちの 1 0 種で確認された。L E C および B E C において示差的に発現される遺伝子と比べて、P r o x - 1 により調節された 1 5 種の遺伝子 (すなわち、約 3 0 %) が培養 L E C および B E C 間で示差的に発現されることが分かり、P r o x - 1 がリンパ管内皮細胞自体の重要なレギュレーターであることが示唆された。

20

【 0 1 8 9 】

30

【表 5】

表 7
Prox-1 により調節される LEC/BEC 遺伝子

遺伝子	受託番号	¹ シグナル log 比	² s.d.
<u>AdProx-1 により誘発される LEC 特異的遺伝子(28 遺伝子)</u>			
サイクリン E2	AF091433	4.95	1.17
システインとグリシンの豊富なタンパク質 2	U57646	4.58	0.36
Cdk-阻害剤 p57KIP2	U22398	3.77	0.68
両親発現遺伝子 10	AB028974	3.54	0.95
トロンボキサン A2 受容体	D38081	2.32	0.13
B-myb	X13293	2.11	0.28
網膜芽細胞腫関連タンパク質 HEC	AF017790	1.86	0.13
コレステロール 25-ヒドロキシラーゼ	AF059214	1.86	0.56
G タンパク質結合受容体, ファミリー C, グループ 5, メンバー B	AC004131	1.83	0.32
チミジンキナーゼ 1	M15205	1.80	0.39
CREM (cAMP 応答性エレメントモジュレーター)	S68134	1.78	0.30
α-アクチニン-2 関連 LIM タンパク質	AF002282	1.77	0.42
デスモプラキン(DPI, DPII)	AL031058	1.74	1.03
MCM6 ミニ染色体維持欠陥(maintenance deficient) 6	D84557	1.72	0.06
赤血球膜タンパク質バンド 4.9(デマチン)	U28389	1.71	0.25
GTP シクロヒドラーゼ 1	U19523	1.61	0.04
KIAA0186 遺伝子産物	D80008	1.47	0.11
細胞分裂周期 2 タンパク質	X05360	1.35	0.43
クローン 643 由来の仮定タンパク質	AF091087	1.25	0.22
ユビキチン担体タンパク質 E2-C	U73379	1.23	0.12
有糸分裂チェックポイントキナーゼ Mad3L	AF053306	1.22	0.47
V-Erba 関連 Ear-3 タンパク質	HG3510-HT3704	1.20	0.20
グリコーゲンホスホリラーゼ (PYGL)	AF046798	1.16	0.54

10

20

30

40

遺伝子	受託番号	シグナル log 比	s.d.
fms 関連チロシンキナーゼ 4, VEGFR-3	X69878	1.10	0.00
BTB (POZ) ドメイン含有 3	AB023169	1.10	0.08
SMC4 (染色体の構造維持タンパク質 4) 様 1 (酵母)	AB019987	1.09	0.59
高移動度群タンパク質 2	X62534	1.07	0.04
α トポイソメラーゼ	L47276	1.04	0.49
遺伝子	受託番号	シグナル log 比	s.d.
<u>AdProx-1 により抑制される BEC 特異的遺伝子 (63 遺伝子)</u>			
ニューロピリン-1	AF016050	-3.99	0.42
Ras 関連 C3 ボツリヌス菌毒素基質 2, RAC2	M64595	-3.87	0.47
3 部構成モチーフ含有 22	X82200	-3.56	0.28
小型誘導サイトカイン A2 (単球遊走因子 1)	M26683	-3.56	0.03
ジンクフィンガンタンパク質 238	AJ223321	-3.08	0.13
UPA	X02419	-3.05	0.02
転写因子 EC	D43945	-3.04	0.08
RN アーゼ A, 脾臓	D26129	-2.72	0.02
ビタミン A 応答性; 細胞骨格調節	AF070523	-2.51	0.6
インターロイキン 6	X04430	-2.42	0.63
Rho GDP 解離阻害剤 (GDI) β	X69549	-2.42	0.03
マトリックスメタプロテイナーゼ 14	X83535	-2.37	0.08
E3 ユビキチンリガーゼ SMURF2	AA630312	-2.22	0.06
細胞死受容体 6	AF068868	-2.16	0.61
C タンパク質受容体, 内皮 (EPCR)	L35545	-2.09	0.14
遺伝子	受託番号	シグナル log 比	s.d.
造血系および神経系膜タンパク質 (HNMP-1)	U87947	-2.08	0.63
KIAA0836	AB020643	-2.07	0.44
コンドロイチン硫酸プロテオグリカン 2 (パーシカン)	X15998	-1.99	0.65
G タンパク質シグナル伝達レギュレーター 4	A1267373	-1.93	0.54
ホスホフルクトキナーゼ, 筋肉	U24183	-1.93	0.11

	受託番号	シグナル log 比	s.d.
IGF-II mRNA 結合タンパク質 3	U97188	-1.9	0.23
神経細胞接着分子 Nr-CAM/hBRAVO	AB002341	-1.89	0.13
細胞表面糖タンパク質 CD44	L05424	-1.84	0.12
アラスマミンノーゲン活性化因子阻害剤-1	J03764	-1.83	0.33
AF1Q タンパク質	U16954	-1.79	0.23
ヒトクロニン 24674 mRNA 配列	AF070578	-1.76	0.01
ニコチンアミド N-メチルトランスフェラーゼ	U08021	-1.74	0.49
乳酸デヒドロゲナーゼ B	X13794	-1.73	0.08
KIAA0537 遺伝子産物	AB011109	-1.73	0.08
LIM ドメインタンパク質	X93510	-1.67	0.11
リンパ球抗原 75, DEC-205	AF011333	-1.61	0.08
ナチュラルキラー細胞転写物 4	AA631972	-1.59	0.05
ホスホリパーゼ A2	M72393	-1.58	0.41
R-ras	M14949	-1.56	0.1
アダニリルシクラーゼ関連タンパク質 2	N90755	-1.55	0.08
ロイパキシン	AF062075	-1.53	0.3
転写 6 のシグナル変換因子および活性化因子 (STAT6)	AF067575	-1.51	0.45
LYL-1	M22637	-1.51	0.14
セレクチン P	M25322	-1.47	0.37
タンパク質キナーゼ, cAMP 依存性, 触媒, β	M34181	-1.43	0.49
TRAM 様タンパク質	D31762	-1.42	0.43
グアニル酸結合タンパク質 2, インターフェロン誘導性	M55543	-1.41	0.51
遺伝子			
細胞間接着分子 2	X15606	-1.38	0.13
プロテオグリカン 1, 分泌顆粒	X17042	-1.35	0.47
トロポミオシン 1 (α)	Z24727	-1.32	0.1
繊維芽細胞活性化タンパク質, α サブユニット	U09278	-1.25	0.12
仮定タンパク質 DKFZp564D0462	AL033377	-1.25	0.23
分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ活性化タンパク質キナーゼ 3	U09578	-1.2	0.35
アミロイド β (A4) 前駆タンパク質結合	U62325	-1.2	0.18

AXL 受容体チロシンキナーゼ	M76125	NM_001699	-1.19	0.3
インテグリン $\alpha 5$	X06256	NM_002205	-1.18	0.02
アリオントタンパク質(PrP)	U29185		-1.18	0.07
TRAF ファミリーメンバー関連 NFKB 活性化因子	U59863	NM_004180	-1.17	0.13
アネキシン VI	Y00097	NM_001155	-1.16	0.12
トランスコバラミン II	L02648	NM_000355	-1.16	0.12
sushi リピートを含むタンパク質, X 染色体	U61374	NM_006307	-1.13	0.09
骨形態形成タンパク質 6	M60315	NM_001718	-1.13	0.39
クローン 23549 および 23762 由来の仮定タンパク質	U90908	NM_021226	-1.1	0.6
網膜 cDNA ランダムアライムサブライブライリー, EST	W28438		-1.09	0.36
TU3A タンパク質	AF035283		-1.06	0.29
ケラチン 7	AJ238246	NM_005556	-1.05	0.53
ラテントトランスフォーミング増殖因子 β 結合タンパク質 2	Z37976	NM_000428	-1.04	0.13
N-カドヘリン	M34064	NM_001792	-1.02	0.12
cDNA DKFZp564J0323(クローン DKFZp564J0323 由来)	AL049957		-1.01	0.22

10

20

30

40

50

【 0 1 9 0 】

B E C における組換え P r o x - 1 発現 (通常はそれが存在しない) によりこれらの細胞の転写プログラムをリンパ管内皮細胞表現型へと変更し得るかどうかを調査した。対照

¹ 変化を log₂ 比として表している。

² 発現レベルの変化の標準偏差。

の AdLacZ では、オリゴヌクレオチドマイクロアレイ解析により分かるように、BEC 特異的またはLEC 特異的な転写物の発現が有意に変更されなかった。これに対し、AdProx-1 では、数多くのLEC 特異的な mRNA、例えば、VEGFR-3、p57 Kip2、デスモブラキン I/II および - アクチニン関連 LIM タンパク質、の発現が高まった(表8 参照)。驚くべきことに、Prox-1 はまた、BEC において特異的に発現される遺伝子の約 40%、例えば、転写因子 STAT6、UFO/ax1 受容体チロシンキナーゼ、ニューロピリン-1 (NRP-1)、単球遊走因子-1 (MCP-1) およびインテグリン 5 の発現を抑制した(表7 および表8)。これらの遺伝子発現の結果は、リンパ管の *in vivo* 研究と一致している。例えば、VEGFR-3 およびデスモブラキン I/II はリンパ管内皮細胞において見られ(Ebata et al., *Microvasc. Res.* 61:40-48頁, 2001; Kaipainen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:3566-70頁, 1995)、BEC では Prox-1 により抑制される VEGF 補助受容体 NRP-1 は、マウス皮膚における血管では発現されるが、リンパ管では発現されないことが判明した。

10

【0191】

【表 6】

表 8

Prox-1 により調節される LEC および BEC 特異的遺伝子の例

	LEC 特異的遺伝子, アップ レギュレーション型	BEC 特異的遺伝子, ダウン レギュレーション型	
接着分子		インテグリン $\alpha 5$ ICAM-2 CD44 Nr-CAM P-セレクチン	10
細胞骨格タンパク 質	デスモブラキン I および II α -アクチニン-2 関連 LIM タンパク質	ロイパキシン	
ECM タンパク質		バーシカン プロテオグリカン 1	
ECM タンパク質		バーシカン プロテオグリカン 1	20
	LEC 特異的遺伝子, アップ レギュレーション型	BEC 特異的遺伝子, ダウン レギュレーション型	
ECM 調節		MMP-14 uPA PAI-I	
受容体チロシンキ ナーゼ 転写因子	VEGFR-3 CREM ear-3	UFO/axl STAT6	30
サイトカイン, ケ モカインおよび受 容体		TFEC IL-6 MCP-1	
細胞周期制御	p57Kip2 サイクリン E2		40
その他	コレステロール 25-ヒドロ キシラーゼ トロンボキサン A2 受容体	ニューロピリン-1 内皮細胞 C タンパク質受容 体	
計	28 遺伝子 (LEC 特異的遺伝子の 19%)	63 遺伝子 (BEC 特異的遺伝子の 38%)	

太字で示した遺伝子はノーザンブロットィング または RT-PCR により確認された。

【 0 1 9 2 】

50

Prox-1により誘導される遺伝子発現における変化が細胞種特異的なものであるかどうかを調べるために、AdProx-1またはAdLacZ感染後の遺伝子発現の変化をさらなる内皮細胞種、すなわち、冠動脈内皮細胞(CAEC)および伏在静脈内皮細胞(SAVEC)、ならびに非内皮細胞種、すなわち、羊膜上皮細胞(AEC)で解析した。これらの細胞種全てにおいて、AdProx-1はサイクリンE1およびE2、ヒストンH2B、ならびにPCNAを強くアップレギュレートした。しかしながら、AdProx-1はCAECおよびSAVECでのみVEGFR-3発現を誘導したが、AECでは誘導しなかった。

【0193】

これらの結果は、Prox-1欠損胚でのリンパの分化の欠如と一致している。興味深いことに、一次内皮細胞におけるProx-1の発現により、妊娠中期以降のリンパ管内皮細胞に特異的であり、正常なリンパ管の増殖および機能に必要なVEGFR-3受容体チロシンキナーゼのアップレギュレーションがもたらされる(Karkkainen and Petrova, Oncogene 19:5598-5605頁, 2000)。例えば、ヒトおよびマウスにおけるVEGFR-3の不活性化突然変異により、リンパの形成不全およびリンパ水腫が起こる(Jeltsch et al., Science 276:1423-1425頁, 1997; Karkkainen et al., Nat. Genet., 25:153-159頁, 2000; Karkkainen et al., Trends Mol. Med. 7:18-22頁, 2001)。そのため、上記の結果からは、Prox-1によるVEGFR-3発現のアップレギュレーションがリンパ管内皮細胞自体の確立に關与する主要な経路の一つであることが示唆され、また、成人血管内皮の異なる表現型の細胞は形成力があり、内皮細胞に作用する本発明の治療法において有用な転写リプログラミングに反応しやすいことも示唆される。

【0194】

実施例5

AdProx-1トランスフェクト細胞によるex-vivo細胞刺激およびリンパ水腫の遺伝子治療

Prox-1の、LEC発生に特異的に關与する遺伝子を調節する能力は、LEC疾患またはLEC遺伝子発現レベルの上昇または低下のいずれかの結果として起こる状態を示す個体の治療のための手段を提供する。Prox-1によるアップレギュレーションは、リンパ水腫などの広範囲に起こる危険性を特徴とする状態のリンパ系の発達不十分を特徴とするLEC疾患の治療として、LEC発生を促進するのに有用である。逆に、Prox-1による阻害は、リンパ水腫などのリンパ系の過剰発達を特徴とするLEC疾患の治療として、LEC発生をダウンレギュレートするのに有用である。細胞をex vivoでトランスフェクトし、続いて、これらの細胞を患者へ導入することが、導入した特定の遺伝子のin vivoレベルをアップレギュレートする、また、遺伝子の発現不足の結果として起こる疾病を軽減するのに有効な方法であることは当技術分野では公知である(Gelse et al., Arthritis Rheum. 48:430-41頁, 2003; Huard et al., Gene Ther. 9:1617-26頁, 2002; Kim et al., Mol. Ther. 6:591-600頁, 2002)。

【0195】

LEC発生の異常を治療するための治療法を開発するために、CAEC、SAVEC、LECまたはBECなどの内皮細胞をLEC疾患(例えば、リンパ水腫)患者から単離した後、好適な培養培地(上記参照)で培養して、細胞の増殖および生存を促進する。次いで、細胞を上記のようなAdProx-1ベクターで記載されているようにトランスフェクトして、in vitroで非LECのLEC分化を起こし、また、LECの培養増殖を促進する。その後、これらのトランスフェクト細胞を罹患患者に治療上有効な数で導入してin vivoでのLEC拡大を促進する。好ましい態様では、操作する細胞は自己細胞である。これらの細胞は、通常、注射を含む一種以上の投与により送達される。細胞はリンパ水腫などのLEC疾患または疾患局部にまたは全身に送達される。

【0196】

Prox-1トランスフェクト細胞をリンパ水腫を有する患者に与えることで補足的LECを提供し、これがリンパ管の発生を促進するリンパ網に組み込まれ、リンパのクリア

ランスを遂行してリンパ水腫の症状を軽減する。内皮細胞へのAdProx-1トランスフェクションおよびトランスフェクト細胞の投与を含んでなる方法がLEC数または活性の変化を特徴とする疾病、例えば、リンパ水腫、リンパ管腫、リンパ管骨髄腫、リンパ管腫症、リンパ管拡張症、リンパ肉腫、およびリンパ管硬化症の治療において有用であると考えられる。さらに、このような方法はこのような疾病と関連した症状を改善するのに有用である（例えば、リンパ水腫の場合のリンパ誘導性腫脹）。

【0197】

実施例 6

LEC特異的な遺伝子の特性決定

LEC特異的な遺伝子をLECおよびBEC遺伝子間のサブトラクションライブラリーを用いてさらに解析した。ライブラリーを構築するために、全RNAをこれまでに記載しているように単離し、5 μ gの全RNAをSMART（商標）PCR cDNA合成キット(BD Biosciences Clontech)を用いてプレ増幅した。RsaI消化後、PCR-Select cDNAサブトラクションを両方向において実施し、その結果として、示差的に発現された配列の選択的増幅をもたらし、サブトラクション済みLECおよびBEC cDNAライブラリーを調製した(BD Biosciences Clontech)。サブストラクティブハイブリダイゼーションを両方向において1（テスター）：30（ドライバー）比で実施し、サブトラクション済みcDNAプールをPCRにより増幅した。サブトラクション済みライブラリーの構築に向けて、40 ngの精製したPCR増幅産物をpA t l a sベクター（PUCに基づくベクター）にクローニングしたが、当技術分野では公知の数多くの他のベクターを構築に使用してもよい。

【0198】

PCR-セレクトディファレンシャルスクリーニングキットユーザーマニュアル(BD Biosciences Clontech)に記載されているように、サブトラクション済みLEC特異的ライブラリーの示差的スクリーニングを実施した。LEC特異的なサブトラクション済みライブラリーを培養し、各細菌クローンを選抜し、増殖させた。DNA抽出後、挿入物をPCRにより増幅し、配列決定に用いた。また、1アリコートのPCR増幅した挿入物各々をナイロンメンブラン上にアレイし、³²P標識cDNAプローブとのハイブリダイゼーションに用いた。サブトラクション済みLEC特異的（テスター）cDNAプローブおよびサブトラクション済みBEC特異的（ドライバー）cDNAプローブとのハイブリダイゼーションの結果を発現差の解析に用いた。

【0199】

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)を用いて、ヌクレオチド、タンパク質およびEST配列データベースと配列を比較した。未知の配列の場合、ESTコンティグを検索し、ORFファインダーを用いてオープンリーディングフレームを推測した。タンパク質ドメイン構造はPfam (Protein families database of alignments and HMMs) およびSmart (Simple Modular Architecture Research Tool)を用いて解析した。

【0200】

LECとBECにおいて示差的に発現されたクローンのヌクレオチド配列を上記の方法により解析した。最初のスクリーニングで検出されたいくつかのESTまたは未知の遺伝子断片を、既知遺伝子配列とのそれらの配列の類似性を調べるために、また、オープンリーディングフレームおよび機能的ドメインの類似性を確認するためにさらに調査した。これらの結果を表9にまとめている。

【0201】

【表7】

クローン名 (配列番号)	EST	ヒトゲノム 受入番号	KIAA 番号 (配列番号)	予測される遺 伝子機能	
LE000100001_A06 (配列番号 61)	AB014526	NM_021647	KIAA0626 配列番号 14	Ig ドメインモ チーフ, 細胞接 着機能の可能 性	
LE0000100050_A01 (配列番号 59)	AB014544	NM_014817	KIAA0644 配列番号 15	ロイシン豊富 なモチーフ, 細 胞接着活性	10
LE0000100055_H05	AI333655	XM_059074	KIAA 番号なし, hLyrp と呼ばれ る 配列番号 16	ロイシン豊富 なりピート, 細 胞接着タンパ ク質	
	AI681538	NM_016647	配列番号 17	間葉幹細胞タ ンパク質に類 似	
	AA447940	XM_084655	配列番号 45	ライイリンに 類似, 細胞接着 機能の可能性	20
LE000100017_C02 (配列番号 55)	XM_046677	D31887	KIAA0062 配列番号 47	亜鉛輸送モチ ーフ, 金属イオ ン輸送	
LE0000100049_E10 LE0000100054_F09 LE0000100056_F07 配列番号	XM_047672	XM_047672	KIAA1673 配列番号 26	RNA 結合領域, RNA 結合タンパ ク質に類似	
LE0000100053_A06 配列番号 56	AI761647	NM_015147	KIAA0582 配列番号 49		30
LE0000100055_G10 LE0000100046_C12 配列番号 57-58	D14657	NM_014736	KIAA0101 配列番号 51		

【0202】

LEC 特異的な遺伝子のいくつかは未知のヒトタンパク質をコードする大きなヌクレオチド EST クローンである KIAA 遺伝子配列に相当することが判明した。(Kazusa DNA Research Institute, 1532-3, Yana Kisarazu, Chiba, 292-0812, Japan)。これらの LEC 特異的な遺伝子をいくつかの利用可能なデータベースでさらに解析し、種間相同体の存在およびこれらの相同体における類似度を調べ、また、保存されているタンパク質ドメインとの類似性を示すアミノ酸配列も明示した。

【0203】

国立衛生研究所 (National Institutes of Health) が提供し、米国国立バイオテクノロジーインフォメーションセンター (U.S. National Center for Biotechnology Information) が維持管理する HomoloGene データベースを利用して、LEC クローン配列の解析を実施し、種間相同体およびオルソログならびに新たに単離されたヒト LEC 特異的な遺伝子とのそれらの類似度を調べた。UniGene によって代表される、補正し、計算した遺伝子相同体の情報資源を利用して、またはゲノム配列の注釈付け、一般には Un

iGeneのESTおよびmRNA配列、ならびに注釈付けしたゲノム配列から抽出された転写物の比較により、配列の解析を実施した。(Zhang, et al., J. Comp. Biol. 7:203-14頁, 2000)。ある生物のヌクレオチド配列の別の生物のヌクレオチド配列とのベストマッチングは、最小のアラインメント100塩基対での二配列間の類似度による。二配列間の類似性は、アラインメントスコアによって決められた。配列対のアラインメントスコアは、アラインした二配列の部分の類似性スコアの合計である。

【0204】

Homologene解析では、KIAA0626、KIAA0644、およびKIAA0062に相当するヒトLEC遺伝子が、マウス(全て)、ラット(KIAA0062、KIAA0644)、ウシ(KIAA0062)、ブタ(KIAA0626、KIAA0644)およびゼノパス(KIAA0644)のESTおよび未知の遺伝子配列と相同であることが示されている。クローンはHomologeneにより相同体であると確認される遺伝子と約80%(±3%)類似性を示し、KIAA0644はブタEST配列BE233028.1とほぼ86%相同性、また、アフリカツメガエル(*X. laevis*)遺伝子とほぼ72%類似性を示した。

【0205】

LEC遺伝子のPfam比較による解析では、KIAA0626(配列番号14)、KIAA0644(配列番号15)、hLyrp(配列番号16)、XM_084655(配列番号45)およびKIAA0062(配列番号47)に対応するヌクレオチド配列が、コードされるトランスメンブランダメインの特徴を示すヌクレオチド配列モチーフを示すことが明らかになり、対応するポリペプチド(そのアミノ酸配列は各々、配列番号31、32、33、46および48で示される)が細胞表面で発現されることが示された。KIAA1673、KIAA0582およびKIAA0101では、トランスメンブランダメインが明示されず、細胞質または核タンパク質であると思われる。ノーザンブロットによる組織発現のアッセイでは、KIAA0101は腎臓、胸腺、結腸および小腸で検出でき、また、KIAA0582は心臓、骨格筋、および卵巣では強く、腎臓および胎盤では少し下回って、さらに、脳、肺、胸腺、小腸および前立腺ではより弱く発現されることが明示される。

【0206】

KIAA0626転写物のノーザンブロット解析では、KIAA0626がLECで特異的に発現され、心臓、骨格筋および腎臓において認められることが分かる。in situ解析では、マウス胎生期11日(E11)の胚がKIAA0626を、中胚葉節組織および血管周囲の周皮細胞で、ならびに卵黄囊血管、内皮細胞 およびその周囲の周皮細胞で発現することを示している。KIAA0626(配列番号14)のポリヌクレオチド配列はシグナル配列(アミノ酸1~29位)、Ig スーパーファミリドメイン(およそaa 61~127)、短いトランスメンブランダ領域(およそaa 153~175)および長い234個のアミノ酸からなる細胞質ドメイン(およそアミノ酸176~409)を有する409個のアミノ酸(409 aa)からなるタンパク質(配列番号31)をコードする。Ig ドメインが存在することからタンパク質のそのリガンドとの結合を手助けしていると考えられ、また、長い細胞質ドメインがKIAA0626がLECにおける細胞内シグナル伝達に関与していることが分かる。

【0207】

ノーザンブロット解析により、KIAA0644(配列番号15)は主として心臓および脳組織において検出される。E10マウス胚のin situアッセイでは、KIAA0644が胚全体で発現されることが分かる。KIAA0644ポリヌクレオチドは合計13のロイシン豊富な領域を示す811個のアミノ酸からなるポリペプチド(配列番号32)をコードする。ロイシン豊富な領域は、細胞接着および受容体分子の役割を果たすタンパク質に存在する約20~28個のアミノ酸からなる短い配列モチーフを含んでなる。ロイシン豊富な領域(以下、LRNNTおよびLRRCTと呼ぶ)には、システイン豊富なドメインがフランキングすることが多い。KIAA0644タンパク質は、ロイシン豊富なN

10

20

30

40

50

末端領域 (L R R N T : a a 2 6 ~ 5 4)、11のロイシン豊富な内部領域 (L R R 1 : a a 8 4 ~ 1 0 7、L R R 2 : a a 1 0 8 ~ 1 3 1、L R R 3 : a a 1 3 2 ~ 1 5 5、L R R 4 : a a 1 5 6 ~ 1 7 9、L R R 5 : a a 1 8 0 ~ 2 0 3、L R R 6 : a a 2 0 4 ~ 2 2 3、L R R 7 : a a 2 3 0 ~ 2 5 3、L R R 8 : a a 2 5 4 ~ 2 7 7、L R R 9 : a a 2 7 8 ~ 3 0 1、L R R 1 0 : a a 3 0 2 ~ 3 2 5、および L R R 1 1 : a a 3 2 6 ~ 3 4 9) およびロイシン豊富なC末端領域 (L R R C T) (およそアミノ酸 3 5 9 ~ 4 0 4) を含む。K I A A 0 6 4 4 のトランスメンブランドメインは、およそアミノ酸 6 9 6 ~ 7 1 8 に及び、残りが約 9 5 個のアミノ酸 (a a 7 1 9 ~ 8 1 1) からなる細胞質ドメインである。K I A A 0 6 4 4 遺伝子のロイシン豊富な領域により細胞接着またはリガンド結合特有のタンパク質 - タンパク質相互作用に關与する。

10

【0208】

h L y r p (配列番号 1 6) m R N A は、骨格筋組織で検出でき、また、in situハイブリダイゼーションにより、マウス胚の E 1 1、卵黄嚢における P r o x - 1 染色と比べてリンパ管に限局される。K I A A 0 6 4 4 と同様に、h L y r p タンパク質 (配列番号 3 3) は、ロイシン豊富なN末端領域 (L R R N T : a a 2 7 ~ 5 5) から始まり、5のロイシン豊富な内部領域 (L R R 1 : a a 5 7 ~ 8 0、L R R 2 : a a 8 1 ~ 1 0 4、L R R 3 : a a 1 0 5 ~ 1 2 8、L R R 4 : a a 1 2 9 ~ 1 5 3、L R R 5 : a a 1 5 4 ~ 1 7 6) を通じて及び、ロイシン豊富なC末端領域 (L R R C T) (およそ a a 1 8 6 ~ 2 4 0) で終わる一連のロイシン豊富な領域を含む。また、h L y r p ポリペプチドは、アミノ酸 2 4 9 ~ 2 7 2 のトランスメンブランドメイン、残る 2 2 個のアミノ酸からなる短い細胞質ドメインを含む。h L y r p ポリペプチドにいくつかの連続するロイシン豊富な領域が存在することから、そのポリペプチドが細胞接着分子および/または細胞表面受容体の役割を果たすことが分かる。

20

【0209】

L E C で特異的に発現される全長 m R N A 配列を用いて表 3 に示したいくつかのさらなる配列を単離した。これらの配列のドメインの推定により、K I A A 0 7 1 1 (配列番号 8 1 および 8 2) がおよそアミノ酸 1 7 1 ~ 2 6 9 に及び B P B / P O Z ドメインを含むことが分かり、このドメインがタンパク質 - タンパク質相互作用で機能すると考えられる。P O Z ドメインは、転写抑制を媒介し、ヒストン脱アセチル化酵素複合体の成分と相互作用する亜鉛フィンガータンパク質などの転写補因子に現れる。K I A A 0 7 1 1 はまた、アミノ酸 3 8 6 ~ 4 3 7、4 3 9 ~ 4 8 0、および 4 8 4 ~ 5 2 5 に及び 3 つの K e l c h リピート配列を有し、K e l c h モチーフがシート構造の形成に関わっている。さらに、K I A A 0 7 1 1 m R N A は種々の組織で発現される。K I A A 0 7 1 1 m R N A は、最大の発現レベルから最小の発現レベルのものまで、脳および腎臓；肝臓；脾臓；肺；卵巣、膵臓および心臓；平滑筋および精巣で認められる。この発現パターンは R T - P C R E L I S A の一回の実施で得たものであるため、発現プロファイルがかなりの試験間変動を含んでいる可能性がある。よって、発現プロファイルは組織特異的な発現に関する遺伝子の定性的レベルでのスクリーニングに最も好適である。より正確な定量的発現プロファイルが求められる場合には、統計学上より信頼性のあるアプローチを使用すべきであろう (例えば、マルチプル R T - P C R - E L I S A 測定法、D N A チップ解析、R N A プロット解析など) 。

30

40

【0210】

c D N A D K F Z p 5 6 4 0 2 2 2 (配列番号 9 3) に対応する配列のドメインマッピングでは、N末端シグナルペプチド (アミノ酸 1 ~ 2 3)、2つの内部リピートドメインおよびミオシリン、パンコルチン、およびラトロフィリンなどのタンパク質で検出されるオルファクトメジンドメイン (アミノ酸 3 6 1 ~ 6 1 6) の存在が示される。ミオシリンの O L F ドメイン内での突然変異は緑内障と関係がある。

【0211】

K I A A 1 2 3 3 (配列番号 1 1 1) のドメインマッピングでは、K I A A 配列が細胞外基質タンパク質で認められる、一般に、細胞 - 細胞相互作用に、さらに具体的に言うと

50

、補体活性化経路に、血管形成の阻害に、およびアポトーシスに關与する6つのI型トロンボスポンジンリピート配列を含むことが示される。K I A A 1 2 3 3はまた、数多くの糖タンパク質と類似した3つのC-2型免疫グロブリンドメインを含む。また、トロンボスポンジンリピート配列と免疫グロブリンドメインの両方を有するタンパク質は、細胞接着およびアポトーシスなどの細胞内相互作用に關与している。K I A A 1 2 3 3 mRNAは、最大の発現レベルから最小の発現レベルのものまで、脊髄；心臓、脳一般、肺、肝臓、腎臓、膵臓、脳の種々の領域（小脳扁桃、脳梁、尾状核、海馬、黒質、視床、および視床下核）および胎児肝臓；胎児脳；脾臓；ならびに精巣で認められる。

【0212】

K I A A 0 8 4 6（配列番号188）タンパク質は、グアニンヌクレオチド交換因子に見られるモチーフを含み、それゆえ、細胞内タンパク質であるかもしれないし、シグナル伝達タンパク質であるかもしれない。K I A A 0 8 4 6はまた、カルシウム依存性の構造変化を受け、緩衝化/輸送タンパク質でも認められるシグナル伝達タンパク質（例えば、カルモデュリン、S 1 0 0 B）に見られる2つのEF-ハンドモチーフを示す。K I A A 0 8 4 6 mRNAは、最大の発現レベルから最小の発現レベルのものまで、腎臓；心臓、脳および肺；肝臓、脾臓および卵巣；膵臓、平滑筋および精巣で認められる。

【0213】

タンパク質F L J 1 3 1 1 0（配列番号207および208）は、T B 2 / D P 1、H V A 2 2ファミリータンパク質ドメインおよび2つの短いトランスメンブラン領域（配列番号207のアミノ酸4~22および43~65）を示す。H V A 2 2ファミリーとしては、重症度の高い臨床型の家族性大腸腺腫症、常染色体優性遺伝性腫瘍症で欠失しているT B 2 / D P 1（重症家族性大腸腺腫症で欠失している）タンパク質をはじめとする、種々の真核生物由来のメンバーが挙げられる。

【0214】

また、L E C特異的な遺伝子のスクリーニングにより、タンパク質K I A A 0 9 3 7（配列番号211および212）も同定した。K I A A 0 9 3 7は、3つのその保存されている残基に因んで名づけられ、ユビキチンおよびA D Pリボース結合系での特定のタンパク質-タンパク質相互作用を媒介すると推測されるW W Eドメイン（配列番号211のおよそアミノ酸30~112、および113~189）を含む。また、K I A A 0 9 3 7は、亜鉛フィンガードメイン（配列番号211のアミノ酸443~501）を含むと推測され、細胞内転写因子であると考えられる。K I A A 0 9 3 7 mRNAは、最大の発現レベルから最小の発現レベルのものまで、脊髄；視床下核および脳の小脳；脳一般（扁桃、脳梁および胎児脳を含む）および卵巣；胎児肝臓、心臓、肺、腎臓、脾臓および脳の一部（尾状核および海馬）；精巣および膵臓；ならびに平滑筋で認められる。

【0215】

K I A A 0 9 5 2（配列番号241および242）は、B r o a d - C o m p l e x、T r a m t r a c kおよびP O Z（ポックスウイルスおよび亜鉛フィンガー）ドメインとしても知られるB r i c - a - b r a cドメインを含む。これらのドメインは、数種類のC 2 H 2型転写因子のN末端、ならびにS h a w型カリウムチャンネルに認められるタンパク質-タンパク質相互作用ドメインであることが知られている。これらのドメインの既知の構造から、N末端ポリペプチド鎖とらせん構造との間の相互作用によって形成された、強固に結合した二量体であることが示される。

【0216】

K I A A 0 4 2 9（配列番号391および392）と呼ばれるタンパク質は、転移抑制タンパク質と類似しており、アクチン結合W H 2ドメイン（およそアミノ酸467~484）、ならびにプロリン豊富な領域（アミノ酸348~466）を含む。

【0217】

タンパク質F L J 2 3 4 0 3（アミノ酸配列、配列番号859；ポリヌクレオチド配列、配列番号860）は、未知のマウスタンパク質（G e n B a n k受託番号X M _ 1 2 9 0 0 0）と約85%相同性を示し、アミノ酸44~66、86~108、115~137

10

20

30

40

50

および 452 ~ 474 に及ぶ一連の 4 つのトランスメンブランドメインを含む。

【0218】

さらなる L E C 特異的な、アップレギュレートされた遺伝子としては、これまで未確認のタンパク質 K I A A 0 1 8 6 (配列番号 2 2 1 および 2 2 2)、K I A A 0 5 1 3 (配列番号 2 3 5 および 2 3 6) および F L J 1 3 9 1 0 (配列番号 2 9 3 および 2 9 4) と呼ばれるタンパク質が挙げられる。

【0219】

リンパ管内皮細胞特異的な分子の操作は、組織の浮腫を伴う疾患である L E C 疾病の治療に適用できると考えられる。理論にとらわれることなく、このような分子の操作によって、内皮細胞 - 細胞または細胞 - 基質タンパク質相互作用が調節されるか、または経内皮輸送に作用することによりリンパ管壁を流れる液体輸送の状態が変更されると思われる。さらに、このような分子は、増殖因子、有糸分裂促進剤などのような治療用化合物、ならびに当業者には公知の細胞増殖抑制剤または細胞傷害性薬剤の送達に標的を提供する。治療薬を、例えば、L E C 表面マーカーの結合相手 (例えば、抗体) と結合することにより、これらの治療用化合物をこのような細胞へとターゲティングさせる。本明細書に記載するトランスメンブラン型タンパク質、特に、ロイシン豊富なタンパク質もまた、リンパのクリアランスに不可欠な細胞接着事象を調節するのに有用な標的を提供する。

【0220】

実施例 7

L E C 関連疾患およびリンパ関連疾患を検出するマイクロアレイ解析

本明細書に記載する L E C 特異的な遺伝子は、in vivoでの L E C の検出に、また、サンプルのリンパ管構造の程度を判定するのに有用である。L E C 特異的な遺伝子はまた、リンパ水腫および他の L E C 関連疾患の診断にも有用であると考えられる。

【0221】

本発明の別の態様は、特定の細胞種に特有の遺伝子発現パターンの検出に用いる、また特定の細胞種、例えば、リンパ管内皮細胞の発現パターンの変化を検出するための複数のポリヌクレオチドプローブを含んでなる組成物である。本明細書において「ポリヌクレオチドプローブ」とは、配列番号 1 ~ 3 0、4 5、4 7、4 9 および 5 1 で示される核酸配列のいずれか一つもしくはその断片、または配列番号 3 1 ~ 4 4、4 6、4 8 および 5 0 で示されるアミノ酸配列をコードする核酸配列もしくはその断片を指す。好ましくは、その断片は少なくとも 1 0 のヌクレオチド長であり；より好ましくは、少なくとも 2 0 のヌクレオチド長である。このような組成物は、リンパ管内皮細胞の機能異常または機能不全に関わるか、または疑われる状態または疾病の診断および治療に使用される。一つの態様では、本発明は、ポリヌクレオチドプローブの少なくとも一つのサブセットが、上記の L E C 特異的な遺伝子の集団から単離された、発現遺伝子の少なくとも一部を含んでなる複数のポリヌクレオチドプローブを含む組成物を提供する。また、その各々が配列番号 1 ~ 3 0、4 5、4 7、4 9 および 5 1 からなる群から選択される独特の配列を含んでなるこのようなプローブの少なくとも一つのサブセットを含む複数のポリヌクレオチドプローブを含む組成物も意図される。好ましくは、組成物が、その各々が配列番号 1 ~ 3 0、4 5、4 7、4 9 および 5 1 からなる群から選択される異なる配列を有する少なくとも 3 のポリヌクレオチドの 1 サブセットを含んでなる。また、配列番号 1 ~ 3 0、4 5、4 7、4 9 および 5 1 からなる群から選択される配列を有する少なくとも 5、少なくとも 7、少なくとも 9、少なくとも 1 5、少なくとも 2 0、または少なくとも 2 5 の異なるポリヌクレオチドを含む組成物も好ましい。

【0222】

組成物は、複数の標的ポリヌクレオチドの発現をモニタリングするマイクロアレイにおいてハイブリダイズ可能なアレイエレメントのセットとして特に有用である。マイクロアレイは基質とハイブリダイズ可能なアレイエレメントを含んでなる。マイクロアレイは、例えば、リンパ管内皮細胞の活性異常から起こる疾病、例えば、リンパ水腫、リンパ管腫、リンパ管骨髄腫、リンパ管腫症、リンパ管拡張症、リンパ肉腫、およびリンパ管硬化症

10

20

30

40

50

、の診断および予後に使用される。組成物は二以上の細胞種の同定に有用であり得、また二以上の疾病、疾患または状態の診断および予後において有用であり得る。さらに、シグナルを生じるプローブから、また、シグナルを生じないプローブから有用な情報が得られる。

【0223】

配列番号1~30、45、47、49および51のいずれか一つの配列を含んでなるポリヌクレオチドは、配列番号1~30、45、47、49および51によりコードされる遺伝子のいずれか一つの発現異常が関係する状態または疾病の診断に使用し得る。例えば、配列番号1~30、45、47、49および51で示される配列のいずれか一つを含んでなるポリヌクレオチドは、リンパ水腫患者または別のリンパ関連疾病患者の遺伝子発現の異常を検出するための体液または組織(例えば、生検から得られたもの)のハイブリダイゼーションまたはPCRアッセイに使用し得る。さらに、配列番号31~44、46、48または50で示されるアミノ酸配列をコードする配列を含んでなるポリヌクレオチドは、これらのアミノ酸配列のいずれか一つを有するポリペプチドの発現異常と関係する状態または疾病の診断に有用である。また、少なくとも10のヌクレオチドを含んでなる断片は、これらの診断法にも有用である。

10

【0224】

配列番号1~30、45、47、49および51を含んでなる本発明の組成物を用いて、発現プロファイルを得る。マイクロアレイにより得られた発現プロファイルを使用して、疾病に關与する遺伝子の発現の変化を検出する。

20

【0225】

実施例 8

BECおよびLECにおける転写因子

LECにおいて選択的に発現される転写因子には、ジンクフィンガー因子c-mafおよびMADSファミリー転写因子MEF2Cが含まれていた(図1)。MEF2Cの標的化突然変異誘発により、一次脈管構造の再構築障害および心内膜発生異常が原因でE9.5~10にて胚死亡が起こる(Bi, et al., Dev. Biol. 211:255-267頁, 1999)。MEF2Cは、転写因子Sox18と結合すること、また、内皮細胞におけるその活性を増強することが報告されている(Hosking, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 287:493-500頁, 2001)。MEF2C複合体を破壊するSox18に同型接合性突然変異を有する子マウスは、いくつかの遺伝的背景により乳糜性腹水を起こす(Pennisi, D., et al., Nat. Genet. 24:434-437頁, 2000)ことから、両方のタンパク質がリンパ管の発生の調節に關与していることが示唆される。この仮説どおりに、MEF2C^{-/-}胚のRT-PCR解析ではVEGFR-3発現の低下を示した(Bi, et al., Dev. Biol. 上記)。

30

【0226】

IL-4に応答して活性化されるSTAT6転写因子はBECにおいて特異的に発現された。この観察結果と一致して、本明細書での結果はIL-4受容体がMCP-1およびCXCR4などのIL-4標的ケモカインおよび受容体であるように、BECにおいて選択的に発現されたことを示している。VEGF刺激およびVEGFR-2の活性化により、内皮細胞におけるSTAT6のリン酸化および活性化が起こることも知られている(Bar 40
toli, et al., J. Biol. Chem. 275:33189-33192頁, 2000)。よって、LECにSTAT6が存在しないことから、BECとLECとではVEGFR-2の下流のシグナル伝達経路が異なっていることが示唆される。表5では他の転写因子の発現パターンを示している。

【0227】

実施例 9

Sox18および遺伝性リンパ水腫

転写因子MEF2Cの発現はLECにおいてアップレギュレートされる。マウスではMEF2Cと相互作用することが報告されているSox18(配列番号53、およびコードSox18、配列番号54)もまた、リンパ管内皮細胞の発生において潜在的な役割を果 50

たすことが分かった。S o x 1 8 のヒトリンパ水腫における役割を調査するために、ヒト S o x 1 8 変異体のヒト遺伝性リンパ水腫との相関関係を調べた。

【 0 2 2 8 】

S O X タンパク質、S R Y 転写因子ファミリーの相同体は、推定高移動度群 (H M G) D N A 結合ドメインを含む遍在性の転写因子である。(Wegner, M., Nucl. Acids Res. 27:1409-20頁. 1999)。S O X タンパク質は、7量体 S O X コンセンサス結合配列 [5 ' - (A / T) (A / T) C A A (A / T) G - 3 '] にて、それらの D N A 標的と結合する (Pennisi et al., Mol. Cell Bio. 20:9331-36頁. 2000)が、通常、標的遺伝子の転写調節をもたらす二重らせんの主溝よりもむしろ、副溝の D N A と結合する。また、S O X タンパク質は、他の D N A 結合タンパク質の D N A - タンパク質複合体への補充にも関わり、その結果として転写調節を手助けすると思われる (Wegner, 上記)。S O X 1 8 は S O X 7 および S O X 1 7 のいずれとも、グループ F S o x 遺伝子の全てのメンバーと相同性を共有している。

10

【 0 2 2 9 】

S o x 1 8 は血管新生に関与しており、発生中の血管新生性の心血管系および部位に局限している。S o x 1 8 の R a g g e d (R a) 突然変異の同型接合マウスは、リンパ水腫の C h y マウスモデル (Lyon et al., Mouse News Lett. 71: 26頁. 1984)と同様に、乳糜性腹水および浮腫を示す (Pennisi et al., Nat. Genet. 24:434-37頁. 2000)。R a マウスでの突然変異がトランス活性化ドメインの末端切断を引き起こすフレームシフト突然変異であると決定された (Pennisi et al., Nat. Genet. 24:434-37頁. 2000)。しかしながら、S o x 1 8 ヌルマウスは、毛嚢の発生においてわずかし表現型の変化を示さないが、浮腫または血管新生異常の徴候は示さない (Downes and Koopman, Trends Cardio. Med. 11:318-24頁. 2001)。この表現型は、グループ F S o x メンバー、S O X 7 および S O X 1 7 の過剰によると思われる。これらのタンパク質が不在の S o x 1 8 の機能の代わりをするが、R a 突然変異などの S o x 1 8 ドミナントネガティブな変異体に打ち勝つことはできない。従って、グループ F ファミリー全てをノックアウトすることにより、R a g g e d マウスと類似したリンパ水腫表現型が生み出せる。

20

【 0 2 3 0 】

マウスおよびヒト S O X 1 8 は、約 8 0 個のアミノ酸からなる D N A 結合 H M G ボックス (9 7 % 相同)、マウスでは約 9 3 個のアミノ酸からなるトランス活性化ドメイン (9 0 % 相同)、および C 末端ドメイン (9 2 % 相同) を含む相同タンパク質である (Downes and Koopman, 上記)。ヒト S O X 1 8 H M G ボックスは、アミノ酸 8 4 ~ 1 5 1 に対応するヌクレオチド 3 9 5 ~ 5 9 8 に局限された。マウス H M G ボックスは、アミノ酸 7 8 ~ 1 4 8 に対応するヌクレオチド 3 2 0 ~ 5 3 2 によりコードされる。ヒトトランス活性化ドメインは今日まで明確に叙述されたことはないが、当業者ならば、マウス S O X 1 8 のアミノ酸 2 5 2 ~ 3 4 6 に見られる相同マウス配列を用いてヒトトランス活性化ドメインを容易に得ることができる (Hosking et al., Gene 262:239-47頁. 2001)。ヒト S O X 1 8 タンパク質は、一次構造レベルではマウス S o x 1 8 と類似性を示すが、ヒト S o x 1 8 変異体と遺伝性リンパ水腫などの疾病または状態との関係は分かっていない。

30

【 0 2 3 1 】

ヒト S o x 1 8 は、染色体 2 0 q . 1 3 . 3 にマッピングされている (Stanojcic et al., Biochem. Biophys. Acta. 1492:237-41頁. 2000)。遺伝性リンパ水腫と関係しているこの染色体上の位置またはその位置付近の遺伝性突然変異の解明は、疾病の遺伝的な根拠の確認において、遺伝性リンパ水腫を患う患者のスクリーニングにおいて、患者の遺伝性リンパ水腫または他の種類のリンパ水腫の発症に対する素因に関するスクリーニングにおいて、さらに、遺伝性突然変異の克服に向けられた標的治療計画の基礎としても有用である。

40

【 0 2 3 2 】

S o x 1 8 のリンパ水腫との関連を調べるため、連鎖解析および候補遺伝子の位置解析の実施を目的として遺伝性リンパ水腫を有する家族を同定する。家族のメンバーが、片足

50

または両足に非対称性の腫脹または明らかな腫脹を示している場合、またはリンパ水腫の医学的診断を受けたことがある場合、または四肢の腫脹または非対称性についての個人または家族の調査報告書がある場合には遺伝性リンパ水腫を患っていると考えられる。

【0233】

その家族のメンバーから生体サンプルを得て、遺伝解析を実施する。DNAは、Miller et al., (Nucleic Acids Res. 16:1215頁. 1998)の方法により、EDTAで抗凝固処理した全血から、また、Puregene DNA単離キット(Gentra Systems, Minneapolis, MN)を用いて細胞採取用ブラシによる標本(cytobrush specimen)から単離する。ゲノムスキャンに使用するマーカーの解析は、当技術分野では一般的な方法により行う。Brown et al., Am. J. Hum. Genetic., 63:861-869頁 (1998)を参照; さらに、NHLBI哺乳類遺伝子タイピングサービス(NHLBI Mammalian Genotyping Service)も参照。

10

【0234】

Sox18のリンパ水腫における潜在的な役割を調査するため、Sox18遺伝子の一部を直接配列決定することにより、リンパ水腫の家族の発端者を変異に関してスクリーニングする。配列決定戦略では、Sox18 cDNA配列(配列番号53)に基づいて作製した増幅プライマーと関連Sox遺伝子のゲノム機構(イントロン-エクソデータ、同定されたドメインモチーフ)についての情報を使用する。変異位置(単一ヌクレオチド多型)および特異的な配列プライマーを用いて、解析に使用するドメイン内に位置する各変異部位にフランキングする配列を増幅する。

【0235】

正常個体およびリンパ水腫罹患個体両方由来のSox18ゲノムDNAを配列決定し、非罹患個体と比べてリンパ水腫患者のSox18遺伝子で検出される突然変異のマップを作製する。リンパ水腫患者で一般的に検出される突然変異、例えば、保存的または非保存的なヌクレオチドの変化、欠失、または挿入、から、特定のヌクレオチドにおける突然変異がリンパ水腫の発症に対する素因を与えていることが分かる。罹患個体のゲノムDNAの解析によりSox18ゲノム配列における突然変異とリンパ水腫を相互に関連付ける。

20

【0236】

Sox18突然変異とリンパ水腫の発症との相関関係を確認するため、各々が引用することにより本明細書の一部とされる米国特許出願番号US2003026759およびPCT/US99/06133に記載される遺伝的多型の同定方法で示されるように、遺伝的連鎖研究を行う。

30

【0237】

異型接合状態で80%浸透度、同型接合状態で99%浸透度、および1%表現型模写率と予測される常染色体優性モデルを用いて二点連鎖解析を実施する。疾患対立遺伝子の頻度は1/10,000に設定する。マイクロサテライトマーカー対立遺伝子の頻度は、創始対立遺伝子を計数し、伝達されない対立遺伝子数を加えることにより算出される。サウサンプトン大学医学部提供のロケーションデータベースの距離を使用して多点解析を実施する。多点および二点解析は、VITESSE(v1.1)プログラムを用いて容易に実施される。(O'Connell, and Weeks, Nature Genet., 11:402-408頁. 1995)。

【0238】

ゲノムスキャンに使用するマーカーの解析は、当技術分野では一般的な方法により行う。[Brown et al., Am. J. Hum. Genetic., 63:861-869頁 (1998)を参照; さらに、NHLBI哺乳類遺伝子タイピングサービスおよび分子遺伝学センター(Center for Molecular Genetics)(Marshfield, WI)提供のデータベースも参照。当業者ならば、Sox18が限局している第20染色体(特に、20q13.3)で同定される遺伝的連鎖マーカーを容易に選択する(Stanojic et al., 上記)。

40

【0239】

SLINK(Weeks et al., Am. J. Hum. Genet. 47:A204頁. 1990)を用いて連鎖シミュレーションを行い、MSIM(Ott, J., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 86:4175-4178頁. 1989)を用いて連鎖を解析し、評価の対象の家族の潜在的な力を二点連鎖解析により評価する

50

。有効な個体を用い、マーカーの遺伝子型を、連鎖 ($\theta = 0$) モデルおよび非連鎖 ($\theta = 0.5$) モデルで異型接合性 0.875 のマーカーに対してシミュレートする。シミュレーションは連鎖の検出能力が $Z(\theta) \geq 2.0$ の LOD スコア 閾値に対して 90% を上回り、無病誤診率が 5% 未満であるように設定する。

【0240】

遺伝性リンパ水腫と強く相関する突然変異は、SOX18 タンパク質の機能ドメイン、例えば、HMG ボックスドメインまたはトランス活性化ドメイン内に突然変異が存在していると思われる。典型的な突然変異としては、非保存的置換をもたらすミスセンス変異、Sox18 コード領域でフレームシフトをもたらすヌクレオチド欠失もしくは挿入、機能ドメインに影響を及ぼすものなどのインフレーム欠失もしくは挿入、または Sox18 10 発現のレベルに影響を及ぼす制御領域の変化が挙げられる。

【0241】

Sox18 リンパ水腫関連突然変異の同定では、単離された変異型 Sox18 対立遺伝子を含む Sox18 変異型発現ベクターを、例えば、293T または内皮細胞にて発現させる。また、Sox18 変異体 DNA を pGAL4 などの哺乳類 2 ハイブリッド系で有用なプラスミドに組み込んで、その結合相手、例えば、MEF2C との SOX18 相互作用を測定してもよい (Hosking et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 287: 493-500頁, 2001) し、または SOX18 の結合相手に関してスクリーニングしてもよい。例えば、pGAL4 Sox18 ベクターで Sox18 遺伝子を酵母 Gal4 DNA 結合ドメインと連結し、転写アクチベーターを別のベクターにある SOX18 結合相手と連結させる。これら 20 のベクターを宿主細胞へと同時導入することで、SOX18 の結合相手または候補結合相手との相互作用の結果として起こる検出可能なリポーター遺伝子の発現がもたらされる。ルシフェラーゼリポーター系を用いて検出される Sox18 結合活性を有する遺伝子融合物を構築し、発現するこのアッセイには、各々、GAL4 DNA 結合ドメインおよび NF- κ B 転写ドメインを含む pCMV-BD および pCMV-AD ベクターが有用である (BD Biosciences Clontech)。

【0242】

このような 2 ハイブリッドアッセイでは、トランス活性化ドメインを介した Sox18 結合に影響を及ぼす突然変異を含む Sox18 リンパ水腫関連変異体はルシフェラーゼリポーター活性の量を低下させる。このことから、Sox18 リンパ水腫関連突然変異は、そのトランス活性化ドメインを通じてその結合相手と結合するその能力の異常によりリン 30 パ水腫を引き起こすことが分かる。

【0243】

また、Sox18 対立遺伝子は、いくつかの技術によりその HMG ボックス DNA 結合ドメイン内の突然変異について評価される。DNA 結合は、SOX18 が結合する DNA 配列、例えば、5' - (A/T)(A/T)CAA(A/T)G - 3' およびその並べ替え配列 (permutation) が 2 ハイブリッドアッセイでの標的プラスミドと類似のプロモーター/リポーター遺伝子構築物の前に (すなわち、その上流にまたは 5' に) 配置される 1 ハイブリッドアッセイで評価される。さらに、リポーターアッセイでは、SOX18 タン 40 パク質とその推定 DNA 結合配列間の結合を検出する。また、DNA 結合は、精製された SOX18 タンパク質を SOX18 DNA 結合配列を含む 32 P 末端標識した DNA 断片とともにインキュベートすることにより行うゲルシフトアッセイを用いても評価される。さらに、反応生成物は非変性ポリアクリルアミドゲルで解析され、DNA と結合した SOX18 または自由な SOX18 の移動性が測定される。SOX18 ポリペプチドの推定結合部位に対する特異性は、SOX18 の結合部位を含む DNA 断片もしくはヌクレオチドまたは他の無関係の DNA 配列を用いる競合試験により確立される。

【0244】

さらに、DNA / タンパク質結合を検出するための蛍光に基づくアッセイが用いられる。SOX18 DNA 結合は、DNA またはタンパク質のいずれかと結合する単一蛍光団の蛍光測定により検出される。これらのアッセイでは、タンパク質結合が DNA - タンパ 50

ク質複合体が形成した時の蛍光強度または偏光の変化によって決定される。あるいは、各々がタンパク質結合部位の半分を含む2つのDNA断片を作製する。2つの二本鎖DNA断片は、タンパク質結合部位の一部を含んでなる相補的一本鎖オーバーハングを有する。一方のDNA断片を蛍光供与体で標識し、もう一方を受容体で標識して、蛍光を蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)で検出する。タンパク質結合では、2つのDNA断片のオーバーハングがアニーリングし、蛍光供与体と受容体とが近接することで蛍光エネルギーの転移が起こり、これにより受容体の検出可能な蛍光を生じる。Heyduk, et al., Nat. Biotechnol. 20:171-6頁. 2002を参照。

【0245】

ヒトSox18ゲノムの突然変異とリンパ水腫の発症リスクとの相関関係から遺伝性リンパ水腫罹患個体の診断および/または治療のための別の方法を提供する。リンパ水腫と関係のあるSox18突然変異を解明することで、突然変異により破壊されるSox18タンパク質活性、例えば、DNA結合またはタンパク質結合を判定することが可能になり、リンパ水腫患者の治療のための方向性が示される。

【0246】

さらに、リンパ管新生障害を克服するための、Sox18により誘導されたリンパ水腫を有する患者の、VEGF-Cおよび/またはVEGF-Dなどのリンパ増殖因子による治療が意図される。例えば、VEGFR-3欠損動物をVEGF-Cおよび/またはVEGF-Dにより治療することでVEGFR-3のシグナル伝達能力障害を克服し、それにより、リンパ管形成を促進し、リンパ水腫の症状を改善する。Sox18により誘導されたリンパ水腫の患者は治療上有効な量のVEGF-Cおよび/またはVEGF-Dで治療される。さらなる態様では、リンパ水腫の症状を軽減するよう設計された他の治療法と併用してVEGF-Cおよび/またはVEGF-Dが上記の患者に投与される。

【0247】

実施例10

VEGF-CおよびVEGF-Dノックアウトマウスにより、外因性VEGF-Cおよび/またはVEGF-Dポリペプチドの投与により克服できる血管新生異常を例示することができる。Sox18の転写調節により、VEGFR-3プロモーターとのその潜在的な相互作用およびVEGFR-3プロモーターに及ぼす転写の影響によるこの欠陥を克服できるかどうかを判定するために、VEGF-CまたはVEGF-Dノックアウトマウスを細胞特異的なプロモーター(例えば、K-14ケラチンプロモーター)またはレトロウイルスベクターからSox18を過剰発現するマウスと異種交配することにより遺伝的に交雑する。Sox18活性がリンパ水腫に及ぼす影響を、実施例10に記載しているように、リンパ水腫および血管新生の測定を通して評価する。

【0248】

VEGF-Cおよび/またはVEGF-Dノックアウトマウス/Sox18過剰発現マウスでのノックアウトマウスの生存およびリンパ管の発生の検出により、Sox18がVEGFR-3シグナル伝達を誘導し、リンパ管形成において主要な役割を果たすことが示される。

【0249】

VEGF-C過剰発現マウス(K-14-VEGF-C Tg)は、リンパ管構造の大規模なネットワークを示し、腫瘍転移しやすく、アップレギュレートされたVEGFR-3発現およびリンパ水腫の症状を例示する(米国特許第6,361,946号)。Sox18がVEGFR-3を通じたVEGF-Cシグナル伝達を調節するかどうかを判定するために、K-14-VEGF-C Tgマウスを自然変異型Sox18(Ragged突然変異)または当技術分野では公知の部位特異的突然変異誘発および標準ノックアウト技術を用いて構築した実験室設計変異体を発現する動物と交雑して、SOXタンパク質のDNA結合ドメインまたはトランス活性化ドメインのいずれかに突然変異をもたらし、K-14-VEGF-C Tg/Sox18マウスを得る。

【0250】

10

20

30

40

50

K - 14 - VEGF - C Tg 単一変異型動物と比べて K - 14 - VEGF - C Tg / Sox18^{-/-} 二重変異型動物により示されたリンパ管形成の低下、腫瘍転移発生率の低下、および VEGFR - 3 レベルの低下により、Sox18 分子が VEGFR - 3 を通じた VEGF - C シグナル伝達を妨害することおよび Sox18 変異体での VEGFR - 3 シグナル伝達の阻害が活性化された VEGFR - 3 のリンパ管形成作用をダウンレギュレートすることが分かる。

【0251】

また、K - 14 - VEGF - C Tg マウスを過剰発現される Sox18 対立遺伝子のトランスジェニックマウス(上記参照)と交雑し、Sox18 アップレギュレーションの影響を測定する。K - 14 - VEGF - C Tg 単一変異と比べて K - 14 - VEGF - C Tg / Sox18 過剰発現二重変異型動物により示されたリンパ管形成の低下、腫瘍転移発生率の低下、および VEGFR - 3 レベルの低下により、Sox18 転写調節が VEGFR - 3 シグナル伝達を阻害し、リンパ管形成をネガティブに調節する因子であり得ることが分かる。

10

【0252】

Sox18 がリンパ管形成のネガティブレギュレーターであることを示す結果から、腫瘍発生におけるリンパ管形成またはリンパ管肉腫などの大規模なリンパ管構造を介した疾患を、SOX18 転写因子を過剰に提供し、それによりリンパ管形成シグナルの誘導を妨害するベクターの投与により治療する方法を提供する。

【0253】

実施例 11

リンパ管の発生における Sox18

リンパ管内皮細胞は、VEGFR - 3 および Prox - 1 などのいくつかの LEC 特異的な遺伝子により高度に調節された特有の発生パターンを示す。Sox18 は、DNA 結合タンパク質および転写因子として、これらの LEC 特異的な遺伝子の調節に関わり、LEC 細胞の運命の詳細に貢献すると思われる。マウスでは Sox18 は転写因子 MEF2C と結合する、Sox18 変異型および MEF2C 欠損マウスのいずれもが VEGFR - 3 変異型マウスと類似したリンパ水腫症状を示す、また、VEGFR - 3 プロモーターは MEF2C 結合部位を含んでいるといういくつかの証拠により、Sox18 が VEGFR - 3 の転写調節に関与していることが示されている(Ijiri et al, FASEB J. 15:1028-36 頁, 2001)。これらの観察結果は、リンパ管の発生における SOX18 の役割を裏付けている。

20

30

【0254】

LEC 特異的な増殖因子の転写に影響を及ぼす Sox18 の能力を解析するために、血管内皮細胞を誘導し、Ad Prox - 1 ベクターを投入して LEC に発達させる。Sox18 mRNA およびタンパク質レベルは Prox - 1 ベクターの投入前および後に測定する。Prox - 1 ベクターの投入後の Sox18 のアップレギュレーションはリンパ管内皮細胞の発生と関係していると思われ、Sox18 が LEC 分化における一因子であることが分かる。また、Sox18 の DNA 結合またはトランス活性化能力のいずれかを部位特異的突然変異誘発によって破壊し、その結果として、ドミナントネガティブまたは不活性 Sox18 タンパク質のいずれかを生み出す。Sox18 を破壊した対立遺伝子を含むプラスミドを Ad Prox - 1 ベクターで BEC に同時トランスフェクトし、機能異常の Sox18 遺伝子の存在下で LEC の発生を評価する。また、リンパ管の発生を調節する Sox18 の能力を測定するこれらの試験では LYVE - 1 およびポドプラニンなどの LEC 特異的なマーカーの検出も利用する。さらにまた、変異型 Sox18 を LEC 特異的なタンパク質(例えば、VEGFR - 3、Prox - 1、LYVE - 1)をコードするベクターで 293T 細胞に同時トランスフェクトし、これらの遺伝子の活性を調節する変異型 Sox18 の能力を評価する。例えば、Sox18 の存在下および不在下で VEGF - C により刺激された VEGFR - 3 同時トランスフェクト 293T 細胞におけるシグナル伝達をリン酸化アッセイによりを評価する。

40

50

【0255】

リンパ管構造の発生は、R a マウス、S o x 1 8 ヌルマウス、およびリンパ水腫の疾病素因と関係している本明細書に記載の突然変異の S o x 1 8 トランスジェニックマウスをはじめとする S o x 1 8 変異型マウスでも評価できる。リンパ水腫の症状を示す S o x 1 8 トランスジェニックマウスを、ヒト突然変異と相同のマウス遺伝子における突然変異を発現するよう操作するか、またはリンパ水腫特異的な突然変異を含むヒト S o x 1 8 遺伝子を発現するよう操作する。これらの動物における脈管構造の発生は、米国特許第 6, 3 6 1, 9 4 6 号 (Kaipainen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 92:3566-70頁, 1995も参照) で示されているように、V E G F - C および / または V E G F R - 3 m R N A 発現を検出する *in situ* ハイブリダイゼーション、V E G F - C および / または V E G F R - 3 タンパク質の *in vivo* での抗体検出、および L E C の発生程度を判定し、*in vivo* で有効なリンパドレナージを視覚化するエヴァンスブルー染料による検出などの当技術分野では公知の技術を用いて解析する。

10

【0256】

ドミナントネガティブな S o x 1 8 変異型形質転換体における V E G F R - 3 シグナル伝達の増加により、S o x 1 8 発現が V E G F R - 3 媒介性の活性に悪影響を与えることが示される。本発明は、この種の突然変異を克服する治療法であって、ヒト患者などの哺乳類に V E G F R - 3 シグナル伝達を妨害する S o x 1 8 の能力に干渉するドミナントネガティブな遺伝子またはドミナントネガティブな S o x 1 8 リガンドなどの S o x 1 8 阻害剤を含んでなる組成物を投与することを含んでなる方法を意図する。また、S o x 1 8 活性化が V E G F R - 3 活性を促進する場合には、このことによりリンパ水腫の治療法が S o x 1 8 転写活性を促進する組成物、例えば、*ex-vivo* で与えられる S o x 1 8 を過剰発現する細胞を含んでなることが示される。

20

【0257】

実施例 1 2

リンパ水腫における S o x 1 8 治療法

本発明の別の態様は、細胞に基づく治療用化合物、特に、L E C 細胞に基づく組成物を生産するための S o x 1 8 の使用である。一つの態様では、細胞が自己細胞、すなわち、リンパ系の疾病または疾患の治療を受けている生物（例えば、ヒト患者）の細胞である。本発明は、S o x 1 8 の内生的発現を、例えば、相同組換えなどの組換え技術による発現制御領域、例えば、プロモーターの変更により高めることを意図する。あるいは、細胞を単離された S o x 1 8、例えば、*in vivo* または *ex vivo* のいずれかでの異種 S o x 1 8 発現のために異種 S o x 1 8 で形質転換またはトランスフェクトする。

30

【0258】

例えば、S o x 1 8 は、転写因子 M E F 2 C と、V E G F R - 3 プロモーターと結合することにより V E G F R - 3 転写を誘導し、V E G F R - 3 タンパク質発現およびシグナル伝達レベルに作用する複合体と相互作用する。レトロウイルスまたはアデノウイルスベクターにより推進される S o x 1 8 遺伝子の、V E G F R - 3 を発現する L E C への挿入により V E G F R - 3 媒介性のシグナル伝達がアップレギュレートされると考えられる。

【0259】

さらに、これらの S o x 1 8 発現細胞は遺伝性リンパ水腫または外傷性リンパ水腫などの L E C 疾病または疾患を有する患者の治療において治療用化合物として使用される。これらの細胞は、リンパ管腫、リンパ管骨髄腫、リンパ管腫症、リンパ管拡張症、リンパ肉腫、およびリンパ管硬化症などの V E G F R - 3 の発現の低下と関係のある疾病または状態を治療するのに使用される。

40

【0260】

さらに、S o x 1 8 ポリペプチドまたはペプチド断片はリンパ水腫の症状を軽減するためにリンパ水腫患者に投与される。全長 S O X 1 8 ポリペプチドまたは D N A 結合ドメインまたはトランス活性化ドメインのいずれかを含む S O X 1 8 の断片のいずれかを投与して、*in vivo* でその同種の結合相手と結合させ、V E G F R - 3 シグナル伝達を促進し、

50

またはリンパ管形成プロセスでは下流の事象を開始させる。そうすることで、リンパ水腫と関係のある VEGFR-3 シグナル伝達または VEGF-C リガンド結合の障害を回避すると考えられる。

【0261】

関連する態様では、SOX18 発現が転写因子結合または DNA 結合を減少させることにより VEGFR-3 シグナル伝達を阻害する場合、SOX18 を阻害することで、VEGFR-3 の代償性アップレギュレーションが起こり、VEGFR-3 発現不足と関係のある有害な症状を改善すると考えられる。SOX18 が VEGFR-3 活性をネガティブに調節する場合においては、SOX18 遺伝子に特異的なアンチセンス治療の実施により、SOX18 活性が阻害され、それにより、VEGFR-3 媒介性のシグナル伝達およびリンパ管の増殖が可能になる。しかしながら、グループ F Sox タンパク質 (SOX7/17/18) の潜在的な機能的冗長性により、3 つ全てのタンパク質を、グループ F タンパク質全ての DNA 結合活性を阻害する機構を通じて不活性化しなければならない。このことは、例えば、全てのタンパク質の間で高度に相同である DNA 結合ドメインをターゲットングすることにより達成される。変異型 DNA 結合ドメインを発現する組換え SOX7/17/18 タンパク質は、医薬組成物 (3 つ全ての変異型ペプチドを含む) として投与する場合、VEGFR-3 の Sox18 ダウンレギュレーションを阻害し、VEGFR-3 シグナル伝達活性を誘導するか、または促進すると考えられる。本発明の特定の態様は例示を目的として本明細書に記載してきたが、本発明の精神および範囲から逸脱しない限り、種々の変形も可能であることは上述から明らかであろう。

10

20

【0262】

本明細書にて引用されているおよび/または [出願データシート] で示される上記の米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願および非特許公開の全ては、全開示内容が引用することにより本明細書の一部とされる。

【0263】

【表 8】

表 3
リンパ管 EC(187 遺伝子)

受託番号	検出 ¹			遺伝子発現解析		下記方法での確認	
	Affymetrix ID	BEC	LEC	シグナル log 比 ²	s.d. ³	NB	IF
肺 I 型細胞膜関連タンパク質, ホドプラニン	AF030428	A	P	7.4	0.925		+
肺 I 型細胞膜関連タンパク質, ホドプラニン	A1660929	A	P	6.1	0.150		+
細胞内レチノール結合タンパク質	M11433	A	P	7.3	0.255		
マクロファージマシリン受容体 (MRC1)	M93221	A	P	7.1	0.682		
転写因子 C-MAF	AF055376	P	P	5.1	0.522		
転写因子 C-MAF	AF055376	A	P	3.9	0.588		
セレノタンパク質 P	Z11793	A	P	5.0	0.331		
KIAA0466, 免疫グロブリンスーパーファミリー, メンバー 3	AB007935	A	P	4.9	2.028		
HIV gp120 結合 C 型レクチンに類似の II 型膜タンパク質, CD209 抗原様	AB015629	A	P	4.9	0.846		
KIAA0626	AB014526	A	P	4.7	0.212		
KIAA0711	AB018254	A	P	4.6	0.055	+	
インテグリン $\alpha 9$	D25303	A	P	4.3	0.712	+	+
インテグリン $\alpha 9$	D25303	A	P	3.6	1.086	+	+
レラキシン H2	X00948	A	P	4.1	0.432		

10

20

30

40

受託番号	検出 ¹⁾	遺伝子発現解析			下記方法 での確認		シグナル log比	
		Affymetrix ID	BEC	LEC	シグナル log比 ²⁾	s.d. ³⁾		NB
KIAA0644	AB014544	NM_014817	A	P	3.9	0.803	+	
Cdk阻害剤 p57KIP2 (KIP 2)	U22398	NM_000076	A	P	3.8	2.020	+	3.3
Cdk阻害剤 p57KIP2 (KIP 2)	U22398	NM_000076	A	P	3.0	0.150	+	1.4
一時的受容体の可能性の あるチャネル) TRPC6	AJ006276	NM_004621	A	P	3.8	0.988		
cDNA DKFZp5640222(クロ ーンDKFZp5640222由来)	AL050002	38312_at	A	P	3.6	0.876		
スブチリシン様タンパク 質(PACE4),塩基性アミノ 酸対切断系 ⁴⁾	M80482	32001_s_at	P	P	3.6	0.334		
Gタンパク質シグナル伝達 16のレギュレーター, A28 -RGS14p	U70426	41779_at	A	P	3.6	0.673		
ジヒドロピリミジナーゼ 関連タンパク質-1, コラ アシン応答メダイエータ ータンパク質 ¹⁾	D78012	40272_at	A	P	3.5	1.192		
デスモプラキン(DPI, DPI I)	AL031058	NM_004415	A	P	3.5	0.426	+	1.0
ペンドリン, 溶質担体フ アマリール, メンバー ⁴⁾	AF030880	NM_000441	A	P	3.3	1.156		
リールン(RELN)	U79716	NM_005045	P	P	3.3	0.142		
インテグリン, $\alpha 1$	X68742	120_at	P	P	3.3	0.080	+	
インテグリン $\alpha 1$	X68742	37484_at	M	P	2.4	0.345	+	

受託番号	Affymetrix ID	BEC	LEC	遺伝子発現解析		下記方法での確認	
				シグナル log 比 ¹	s.d. ³	NB	IF
コレステロール25-ヒドロキシラーゼ	NM_003956	A	P	3.3	0.137		1.5
インヒビリンβ-B-サブユニット前駆体	NM_002193	P	P	3.2	0.056		3.0
KIAA1233	38856_at	A	P	3.1	1.540		
アプレB細胞刺激因子ホモログ(SDF1b)	33834_at	A	P	3.0	0.860	RT-P CR	
V-Erba関連Ear-3タンパク質	1147_at	P	P	2.9	0.398		1.7
モノクローナル抗体MRC 0 X-2により同定された抗原	37716_at	P	P	2.9	0.283	+	1.0
アポリポタンパク質 D	36681_at	M	P	2.9	0.150	+	
TIMP3, マトリックスメタロプロテイナーゼの組織阻害剤	1035_g_at	A	P	2.8	0.528	+	
TIMP3	1034_at	P	P	1.9	0.224	+	
アルデヒドデヒドロゲナーゼ1	37015_at	P	P	2.8	0.275		
prospero関連ホメオボックス1 (prox 1)	31918_at	A	P	2.8	0.299	+	(5,6)
基質Glaタンパク質	36683_at	A	P	2.6	0.250	+	
ニューロンペントラキシンII (NPTX2)	35663_at	A	P	2.6	1.267		2.9
ヒスタチン2(HIS2)	41148_at	A	P	2.6	1.009		
アデユシン様タンパク質のADDL mRNA, アデユシン3(γ)	33102_at	P	P	2.6	0.277	+	

受託番号	検出 ¹	遺伝子発現解析			下記方法での確認		シグナル log 比	
		Affymetrix ID	BEC	LEC	シグナル log 比 ²	s.d. ³		NB
アデュシン3 (γ)	U37122	NM_016824	M	P	2.4	0.397	+	
MADSボックス転写エンハンサー因子2, ポリペプチドC(筋細胞エンハンサー因子2C)	L08895	NM_002397	A	P	2.5	0.540	+	
MADSボックス転写エンハンサー因子2, (筋細胞エンハンサー因子2C)		NM_002397	A	P	1.9	0.197	+	
MADSボックス転写エンハンサー因子2	S57212	NM_002397	A	P	1.4	0.442	+	
ホスホグルコムターゼ5	L40933	NM_021965	A	P	2.5	0.431		
サイクリンE2	AF102778	NM_004702	A	P	2.5	0.906		5.8
インターロイキン7 (IL7)	M29053	33966_at	A	P	2.4	0.191		
インターロイキン7	J04156	NM_000880	A	P	1.9	0.921		
cDNA DKFZp586L0120(クロ	AL050154	38351_at	P	P	2.4	0.135		
ーンDKFP586L0120由来)								
ペルオキシソーム増殖活性化受容体, γ, PPARG	L40904	NM_005037	A	P	2.4	0.502		
脂肪酸結合タンパク質4	AA128249	NM_001442	P	P	2.4	0.132		
タンパク質キナーゼ Cθ	Z15108	NM_002744	P	P	2.4	0.008		
46kDaコクサッキーウイルス/アデノウイルス受容体(CAR)タンパク質	Y07593	NM_001338	P	P	2.3	0.137		2.2

受託番号	検出 ¹	遺伝子発現解析			下記方法での確認				
		Affymetrix ID	BEC	LEC	シグナル log 比 ²	s.d. ³	NB	IF	シグナル log 比
7q35-qterからのPACクロ ーンRP4-751H13, ジンク フィンガー様	AC004877	39837_s_at	A	P	2.3	0.714			
チミジンキナーゼ1, 可溶 性	M15205	NM_003258	P	P	2.3	0.205			2.1
チミジンキナーゼ1	K02581	NM_003258	M	P	1.7	0.193			1.4
Pig7(PIG7), LPS誘導TNF α因子	AF010312	NM_004862	A	P	2.3	0.233			4.6
LPS誘導TNF α因子	AL120815	NM_004862	P	P	1.3	0.327			3.8
リパーゼA, リンゴーム 酸, コレステロールエス テラーゼ	X76488	NM_000235	P	P	2.3	0.281			
ユビキチン特異的プロテ アーゼ 13(イソペプチダ ーゼT-3)	U75362	NM_003940	A	P	2.2	0.334			
癌胎児性抗原関連細胞接 着分子 1(胆汁糖タンパク 質) CEACAM1	X16354	NM_001712	P	P	2.2	0.048			
cdNA DKFZp586D0918(クロ ーンDKFZp586D0918 由来)	AL049370	41856_at	P	P	2.1	0.385			
KIAA0598, B細胞RAG関連 タンパク質	AB011170	NM_014863	P	P	2.1	0.154			
RAMP2(受容体(カルシトニ ン)活性調節タンパク質2)	AJ001015	NM_005854	P	P	2.1	0.361			
コレステロールエステル転 送タンパク質前駆体	M30185	NM_000078	A	P	2.1	0.191			
上皮膜タンパク質2	U52100	NM_001424	P	P	2.0	0.141			1.0

受託番号	検出 ¹	遺伝子発現解析			下記方法での確認			
		Affymetrix ID	BEC	LEC	シグナル log 比 ²	s.d. ³	NB	IF
MHCクラスIIリンパ球抗原 (HLA-DP)β鎖	M83664	NM_002121	A	P	2.0	1.368		
MHCクラスIIリンパ球抗原 (HLA-DP)β鎖	M83664	NM_002121	A	P	1.2	0.034		
β-アレスタン2	AF106941	NM_004313	A	P	2.0	0.273		
有糸分裂チェックポイントキナーゼBub1(BUB1)	AF053305	NM_004336	A	P	2.0	0.195		
KIAA0229, ヒトアキンリン1(S08275)類似体	D86982	40971_at	P	P	2.0	0.195		1.6
Sprouty 1ホモログ(FGFシグナル伝達アンタゴニスト)	AF041037	38767_at	P	P	2.0	0.209		
Rap1のグアニヌクレオチド交換因子; M-Ras調節GEF, KIAA0277		NM_012294	P	P	2.0	0.497		2.1
トランスリン	X78627	NM_004622	A	P	2.0	0.140		
赤血球膜タンパク質バンド4.9 (デマチン)	U28389	NM_001978	P	P	2.0	0.265		1.9
KIAA0846タンパク質	AB020653	NM_015376	A	P	2.0	0.457		
グリア細胞成長因子, γ	W07033	NM_004877	P	P	1.9	0.083		1.0
インスリン様増殖因子結合タンパク質2(IGFBP-2)	X16302	NM_000597	A	P	1.9	1.157		
平滑筋ミオシン重鎖I型 Smeb	S67247	32838_at	A	P	1.9	0.179		

受託番号	検出 ¹				遺伝子発現解析		下記方法 での確認	
	Affymetrix ID	BEC	LEC	シグナル log比 ²	s.d. ³	NB	IF	シグナル log比
TTG-2(LIMモチーフを有するシステイン豊富なタンパク質), LIMドメインオニリー 2(ロンボチン様1)サイクリンB2	NM_005574	P	P	1.9	0.221			1.0
KIAA0353	NM_004701	A	P	1.9	0.276			1.8
KIAA0559, ピッコロ(プレシナプスのサイトマトリックスタンパク質)	39544_at	P	P	1.9	0.158			
Gタンパク質結合受容体, ファミリーC, グループ5, メンバーB	37780_at	A	P	1.9	0.330			
Gタンパク質結合受容体, ファミリーC, グループ5, メンバーB	AC004131	P	P	1.9	0.047			2.1
Gタンパク質結合受容体, ファミリーC, グループ5, メンバーB	NM_016235	P	P	1.4	0.303			
CREM(サイクリックAMP応答性エレメントモジュレーター-βイソ型)	NM_001881	P	P	1.9	0.098			1.7
CREM(サイクリックAMP応答性エレメントモジュレーター-βイソ型)	32066_g_at	P	P	1.8	0.241			2.0
CREM(サイクリックAMP応答性エレメントモジュレーター-βイソ型)	NM_001881	P	P	1.5	0.182			2.0
仮定タンパク質FLJ13110	NM_022912	A	P	1.9	0.387			

受託番号	検出 ¹	遺伝子発現解析			下記方法 での確認		シグナル log比 ²
		BEC	LEC	s.d. ³	NB	IF	
Affymetrix ID	シグナル log比 ¹	シグナル log比 ¹	s.d. ³	NB	IF	シグナル log比	
イノシトール(ミオ)-I(ま たは4)-モノホスファター ゼ2	AF014398	A	P	0.590		3.2	
KIAA0937タンパク質	AB023154	P	P	0.185			
有糸分裂紡錘体コイルド コイル関連タンパク質	AF063308	A	P	0.257			
システインとグリシンの 豊富なタンパク質2(CSRP 2)	U57646	A	P	0.431		4.3	
トポイソメラーゼ(DNA)II α(170kd)	AI375913	P	P	0.239		1.0	
DNAトポイソメラーゼII	J04088	P	P	0.162			
タンパク質ホスファター ゼ阻害剤 2(PPP1R2)	U68111	P	P	0.319			
KIAA0186	D80008	A	P	0.269		1.4	
二重特異性チロシン-(Y)- リン酸化調節キナーゼ3 (Dyrk3)	Y12735	P	P	0.146			
キネシン様紡錘体タンパ ク質 HKSP(HKSP)	U37426	M	P	0.439			
ハンチンチン関連タンパ ク質相互作用タンパク質 (duo)	U94190	P	P	0.529		1.4	
ジユビキチン	AL031983	A	P	0.841			
ビクニン, セリンプロテ アーゼ阻害剤, Kunitz型, 2	U78095	A	P	0.398			

受託番号	検出 ¹	遺伝子発現解析			下記方法での確認		シグナル log 比 ²
		Affymetrix ID	BEC	LEC	シグナル log 比 ³	s.d. ³	
シトクロムP-450-1(TCDD誘導性)	K03191	NM_000499	A	P	1.7	0.165	2.0
シトクロムP(1)-450	X02612	NM_000499	P	P	1.1	0.125	1.7
KIAA0513		NM_014732	A	P	1.7	0.297	
タンパク質ホスファターゼ阻害剤 2(PPP1R2)	U68111	812_at	P	P	1.7	0.185	
RAMP3(受容体(カルシトニン)活性調節タンパク質 ³)	AJ001016	NM_005856	P	P	1.7	0.228	
B-myb	X13293	NM_002466	M	P	1.7	0.455	2.3
KIAA0952	AB023169	NM_014962	P	P	1.7	0.254	1.0
インターフェロン誘導遺伝子(20kD), HEM45	U88964	NM_002201	A	P	1.7	0.178	
GS3955	D87119	NM_021643	P	P	1.7	0.107	1.6
GS3955	D87119	NM_021643	P	P	1.3	0.098	1.3
GRB2関連アダプタータンパク質(Grap)	U52518	NM_006613	A	P	1.7	0.147	
KIAA1071タンパク質	AB028994	38286_at	A	P	1.7	0.625	
複数のスプライシングを有するRNA結合タンパク質	D84111	34162_at	P	P	1.7	0.347	
遺伝子, RBP-MS/タイプ5							
複数のスプライシングを有するRNA結合タンパク質	D84111	NM_006867	P	P	1.6	0.147	
遺伝子, RBP-MS/タイプ5							
RBP-MS/タイプ4, 複数のスプライシングを有するRNA結合タンパク質	D84110	NM_006867	P	P	1.5	0.263	

受託番号	検出 ¹	遺伝子発現解析		下記方法 での確認		シグナル log比 ²	シグナル s.d. ³	シグナル log比
		Affymetrix ID	BEC	LEC	NB			
RBP-MS/タイプ4, 複数の スプライシングを有するR NA結合タンパク質遺伝子	D84110	NM_006867	P	P	P	1.3	0.268	
RBP-MS/タイプ3, 複数の スプライシングを有するR NA結合タンパク質遺伝子	D84109	NM_006867	P	P	P	1.2	0.225	
α-アークチニン-2-関連LIM タンパク質	AF002282	NM_014476	A	P	P	1.7	0.728	1.5
セマフォリン-III(Hsema- I), セマフォリン3A	L26081	NM_006080	A	P	P	1.6	0.445	
IQモチーフを有するGTPア ーゼ活性化タンパク質2	U51903	NM_006633	M	P	P	1.6	0.395	
アレスチン, α2	HG2059-HT2114	957_at	P	P	P	1.6	0.342	
網膜芽細胞腫関連タンバ ク質 HEC	AF017790	NM_006101	P	P	P	1.6	0.153	2.0
LIMドメイン結合タンバ ク質 (LDB1)	AF052389	NM_001290	P	P	P	1.6	0.153	1.9
二重特異性ホスファター ゼ5	U15932	NM_004419	P	P	P	1.6	0.207	
ヒトcDNA 3', mRNA配列	AI557322	39611_at	P	P	P	1.6	0.081	
モノアミンオキシダーゼA (MAOA)	M68840	NM_000240	P	P	P	1.6	0.148	
モノアミンオキシダーゼA	AA420624	NM_000240	P	P	P	1.4	0.230	
NECDIN関連タンパク質	U35139	NM_002487	P	P	P	1.6	0.245	
調節溶質担体タンパク質, ファミリー1, メンバー1	X82877	NM_006511	A	P	P	1.6	0.916	
TTKタンパク質キナーゼ	M86699	NM_003318	P	P	P	1.6	0.196	

受託番号	Affymetrix ID	BEC	LEC	シグナル log 比 ¹	s.d. ³	検出 ¹ 遺伝子発現解析		下記方法での確認		シグナル log 比
						A	P	NB	IF	
Fms関連チロシンキナーゼ 4, VEGFR-3	NM_002020	A	P	1.5	0.403	+	+	+	+	1.1
TSC403, リンソーム関連膜糖タンパク質類似体	NM_014398	P	P	1.5	0.164					
HMG-2	38065_at	P	P	1.5	0.105					1.1
ヒトクロモニン24416 mRNA 配列	35342_at	P	P	1.5	0.253					
カルシトニン受容体様 KIAA0582タンパク質	NM_005795	P	P	1.5	0.509					1.4
cDNA DKFZp434B102(クロニンDKFZp434B102由来)	NM_015147	M	P	1.5	0.558					1.4
cDNA DKFZp586G1922(クロニンDKFZp586G1922由来)	38630_at	A	P	1.5	0.719					
アシルCoAシンテターゼ3 脂肪酸コエンザイムAリガーゼ, 長鎖 ³	39600_at	P	P	1.5	0.160					
STAT誘導性STAT阻害剤-2	NM_004457	P	P	1.5	0.264					
ホメオテイクタンパク質 Hox5.4	NM_004457	P	P	1.0	0.120					1.7
仮定タンパク質FLJ13910, cDNA DKFZp586M141(クロニンDKFZp586M141由来)	38994_at	A	P	1.5	0.391					
cDNA DKFZp586N012(クロニンDKFZp586N012由来)	696_at	P	P	1.5	0.181					
Ubch10, ユビキチン担体タンパク質E2-C	NM_022780	P	P	1.5	0.228					
	41690_at	P	P	1.4	0.320					
	NM_007019	P	P	1.4	0.022					1.1

受託番号	検出 ¹			遺伝子発現解析		下記方法 での確認		シグナル log比
	Affymetrix ID	BEC	LEC	シグナル log比 ¹	s.d. ³	NB	IF	
サイクリン依存性キナー ゼ阻害剤3, タンパク質チ ロシンホスファターゼ(CI P2)	L25876	P	P	1.4	0.431			
グリコーゲンホスホリラ ーゼ (PYGL)	AF046798	P	P	1.4	0.423			1.5
アンギオポイエチン-2	AF004327	P	P	1.4	0.175	+		1.2
アンギオポイエチン-2	AF004327	P	P	1.2	0.134	+		
フォークヘッドボックスM 1	U74612	M	P	1.4	0.367			1.4
潜在的プレニル化タンバ ク質チロシンホスファタ ーゼhPRL-3	AF041434	A	P	1.4	0.094			2.3
RAB31, Rabサブファミリ ーの低Mr GTP結合タンバ ク質	U59877	P	P	1.4	0.299			
RAB31, メンバー RAS癌遺 伝子ファミリ ー	A1189226	P	P	1.2	0.444			
ミオシンVIIA	U39226	P	P	1.4	0.038			1.2
Grb2関連バインダー-1, I	U43885	A	P	1.4	0.073			
RS-1関連ドッキングタン パク質	L37747	P	P	1.4	0.643			
ラミン B1	D84557	P	P	1.4	0.170			1.8
ミニ染色体維持欠陥(mis 5, 分裂酵母(S. pombe))								
6 HsMcm6								
サイクリンB1	M25753	P	P	1.4	0.398			

	受託番号	検出 ¹				遺伝子発現解析			下記方法 での確認	
		Affymetrix ID	BEC	LEC	シグナル log比 ²	s.d. ³	NB	IF	シグナル log比	
サイクリンB1	M25753	34736_at	P	P	1.3	0.160				
RTP, N-myc 下流調節	D87953	NM_006096	P	P	1.4	0.131				
α2,3-シアリルトランス フェラーゼ	AB022918	NM_006100	P	P	1.4	0.150				
ADP-リボシル化因子様タ ンパク質4	U73960	NM_005738	P	P	1.4	0.281				
セントロメアタンパク質F (350/400kD, マイトシン 両親発現遺伝子10, KIAA1 051	U30872	NM_016343	A	P	1.4	0.245				
チューブリン, α1 (精巣 特異的)	AB028974	NM_015068	P	P	1.4	0.300			4.2	
KIAA0101	X06956	36591_at	M	P	1.4	0.300			1.8	
KIAA0128, セブチン2	D14657	NM_014736	P	P	1.4	0.409				
タンパク質ホスファター ゼ2, 調節サブユニット B (B56), γ	D50918	38826_at	P	P	1.4	0.381			1.8	
デオキシシチジinkinナー ゼ	Z69030	NM_002719	P	P	1.4	0.453				
インテグリンβ3結合タン パク質 (β3-エンドネキ シン)	M60527	NM_000788	A	P	1.3	0.455				
TAL1(SCL)遮断遺伝子座	U37139	NM_014288	P	P	1.3	0.171				
KIAA0666	M74558	NM_003035	M	P	1.3	0.150				
CAMP特異的ホスホジェス テラーゼ8A, PDE8A1	AB014566	33753_at	P	P	1.3	0.356				
	AF056490	37676_at	P	P	1.3	0.222				

受託番号	検出 ¹	遺伝子発現解析			下記方法での確認			
		Affymetrix ID	BEC	LEC	シグナル log 比 ¹	s.d. ³	NB	IF
有糸分裂チェックポイントキナーゼMad3L (MAD3L), BUB1B	AF053306	NM_001211	P	P	1.3	0.216		1.6
リボソームS6キナーゼ	X85106	NM_021135	P	P	1.3	0.145		
HPTP ε (タンパク質チロシンホスファターゼ ε)	X54134	NM_006504	P	P	1.3	0.100		1.0
Lynチロシンキナーゼ, v-yes-1 Yamaguchi 肉腫ウイルス関連癌遺伝子ホモログ	M79321	NM_002350	P	P	1.3	0.054	+	
Lynチロシンキナーゼ, v-yes-1 Yamaguchi 肉腫ウイルス関連癌遺伝子ホモログ	M16038	NM_002350	P	P	1.3	0.382	+	
Lynチロシンキナーゼ	M16038	NM_002350	P	P	1.2	0.066	+	
Brachyury 変異体A(TBX1), Tボックス1転写因子	AF012130	NM_005992	P	P	1.3	0.352		
モノクローナル抗体Ki-67の抗原のmki67a mRNA(長いタイプ)	X65550	NM_002417	A	P	1.3	0.357		1.5
タンパク質チロシンホスファターゼ受容体 pi(PTP RP)	U81561	NM_002847	P	P	1.3	0.193		
cb1-b	U26710	NM_004351	A	P	1.3	0.482		
サイクリンA2	X51688	NM_001237	P	P	1.3	0.277		
スクレオシドホスホリラーゼ	X00737	NM_000270	P	P	1.3	0.272		

受託番号	検出 ¹	遺伝子発現解析			下記方法での確認		シグナル log 比 ²	シグナル log 比
		Affymetrix ID	BEC	LEC	s.d. ³	NB		
TNF関連アポトーシス誘導 リガンドTRAIL	U37518	NM_003810	P	P	1.3	0.316		
ホスホジェステラゼ4B, cAMP 特異的	L20971	NM_002600	P	P	1.3	0.275		
ニドゲン(エナクチン)	M30269	NM_002508	P	P	1.3	0.050		
HYA22タンパク質	D88153	NM_005808	P	P	1.3	0.150		1.3
ホスファチジン酸ホスフ アターゼ 2A型	AF014402	NM_003711	P	P	1.3	0.191		
KIAA0512, ALEX2	AB011084	NM_014782	P	P	1.2	0.268		
トロンボキサンA2受容体	D38081	NM_001060	M	P	1.2	0.385		2.4
トレフォイル因子3(腸管)	A1985964	NM_003226	P	P	1.2	0.183		
G-2期およびS期発現物1	AL031588	NM_016426	A	P	1.2	0.424		3.1
ADP-リボシルトランスフ エラーゼ(NAD+; ポリ(ADP -リボース)ポリメラーゼ) 様2	AJ236876	NM_005484	M	P	1.2	0.362		1.1
セリン/トレオニンキナー ゼ12	AF015254	NM_004217	P	P	1.2	0.126		
チューブリン, α1, イソ 型44	HG2259-HT2348	330_s_at	P	P	1.2	0.096		1.1
ラミンB受容体	L25931	NM_002296	P	P	1.2	0.141		
KIAA0429	AB007889	NM_014751	P	P	1.2	0.150		2.5
転写因子4	M74719	NM_003199	P	P	1.2	0.050		1.1
シンデカン3(N-シンデカ ン), KIAA0468	AB007937	NM_014654	P	P	1.2	0.206		1.0
RECKタンパク質前駆体	AA099265	NM_021111	P	P	1.2	0.173		

受託番号	Affymetrix ID	BEC	LEC	シグナル log 比 ¹	s.d. ³	検出 ¹	遺伝子発現解析	下記方法での確認	シグナル log 比
U42349	NM_006765	P	P	1.1	0.082			NB	1.1
AB020630	41577_at	P	P	1.1	0.082			IF	
U90878	NM_020992	P	P	1.1	0.096				
AF091087	NM_020467	P	P	1.1	0.096				1.1
AA926959	37347_at	P	P	1.1	0.058				
D31887	38797_at	P	P	1.1	0.058				
M91432	37532_at	P	P	1.1	0.308				
M65188	NM_000165	P	P	1.1	0.329				
U78313	NM_005586	P	P	1.1	0.381				
AF073362	NM_005591	P	P	1.1	0.642				
X16155	NM_005654	A	P	1.0	0.446				

¹測定値は、転写物が検出される(存在する, P)か、検出されない(不在である, A)か、またはわずかに検出される(わずかである, M; ある試験では P であるが、別の試験では A である場合も同様)かを示している。

²独立に採取した 2 種の BEC および LEC 間の転写物発現レベルの変化(=計 4 回の比較試験)。その変化を log₂ 比として表している。

³発現レベルの変化の標準偏差(4 回の比較試験による)

NB= ノーザンブロット, IF= 免疫蛍光検査法

【表 9】

表 4
血管 EC (222 遺伝子)

受託番号	Affymetrix ID	検出 ¹		遺伝子発現解析		下記方法での確認		シグナル log 比
		BEC	LEC	シグナル log 比 ²	s.d. ³	NB	IF	
p27 mRNA, インターフェロン α 誘導タンパク質 2	NM_005532	P	A	8.3	0.620			1.5
7 リボヌクレオラーゼ A (RNase A), 膵臓	NM_002933	P	A	7.2	0.208			2.7
造血系神経膜タンパク質 (HNMP-1)	NM_001425	P	A	5.9	0.381			1.6
N-カドヘリン	NM_001792	P	A	5.7	1.345		+	
N-カドヘリン	NM_001792	P	P	3.7	0.514		+	
インターロイキン8 (IL8)	NM_000584	P	A	5.3	1.477		+	
インターロイキン8, β -トロノボグロブリン様タンパク質前駆体	NM_000584	P	P	2.8	0.406		+	1.1
チロシンキナーゼ受容体 (axl)	NM_001699	P	A	5.1	1.112		+	1.0
Tyrosine Kinase, 受容体 Ax1, Alt. スプライス2	HG162-HT3165	P	A	4.7	0.937		+	1.1
細胞表面糖タンパク質 CD4 4 (CD44)	L05424	P	A	4.9	1.527			1.9
細胞接着分子 (CD44)	M59040	P	A	1.9	0.402			2.6
ヒアルロン酸受容体 (CD44)	L05424	P	P	1.9	0.136			2.0

10

20

30

40

受託番号	検出 ¹	遺伝子発現解析			下記方法での確認		シグナル log 比
		BEC	LEC	シグナル log 比 ²	s.d. ³	NB	
Affymetrix ID							
血管内皮細胞増殖因子関連タンパク質VRP, VEGF-C	U43142	P	A	4.6	0.850	+	
血管内皮細胞増殖因子C	X94216	P	A	4.4	1.342	+	
コラーゲンXIII型, $\alpha 1$ (=COL4A2)	M33653	P	A	4.5	0.213		2.7
コラーゲンXIII型, $\alpha-1$	M59217	P	A	3.6	1.683		1.1
コラーゲン $\alpha-2$ I型	K01079	P	A	4.5	2.161		
コラーゲン $\alpha-2$ I型	K01079	P	A	2.8	1.464		
コラーゲン, I型, $\alpha 2$	V00503	P	A	2.4	1.394		
プロテオグリカン1	X17042	P	P	4.3	0.385		1.0
ホスホリパーゼA2, IVA群, カルシウム依存性リン脂質結合タンパク質 (PLA2)	M72393	P	A	4.3	2.398		1.9
炭水化物 (ケラタン硫酸Gal-6)スルホトランスフェラーゼ	AB003791	P	P	4.2	0.232		
トロポミオシン2 (β), 繊維芽細胞トロポミオシン	M12125	P	A	4.2	1.845		
コンドロイチン硫酸プロテオグリカン2 (バーシカン)	X15998	P	A	4.1	1.746		1.5
コンドロイチン硫酸プロテオグリカン2 (バーシカン)	X15998	P	A	2.0	1.219		

受託番号	検出 ¹				遺伝子発現解析			下記方法 での確認	
	Affymetrix ID	BEC	LEC	シグナル log比 ²	s.d. ³	NB	IF	シグナル log比	
ラネントランスフォー ミン増殖因子β結合タ ンパク質 (LTBP-2)	Z37976	P	P	4.1	0.381			1.1	
インタローキン6 (イン ターフェロン, β2)	X04430	P	A	4.0	0.776			2.0	
骨形態形成タンパク質-4 (hBMP-4)	U43842	P	A	4.0	0.883				
骨形態形成タンパク質2B, BMP-4	M22490	P	A	2.6	1.146				
サルコレクチン, ケラチ ン7	AJ238246	P	P	3.9	0.631				
神経細胞接着分子, KIAA0 343	AB002341	P	A	3.9	1.642			1.8	
神経細胞接着分子, hBBAV 0/Nr-CAM前駆体	U55258	P	A	1.5	0.309				
マトリックスメタプロ テイナーゼ1 (間質コラー ゲナーゼ), 皮膚コラーゲ ナーゼ	M13509	P	P	3.9	0.521	+			
幹細胞因子, KITリガンド	M59964	P	A	3.9	0.554	+			
UPA	X02419	P	A	3.8	0.282			3.0	
プラスミノーゲン活性化 因子阻害剤-1	J03764	P	P	3.7	0.161			1.6	
プラスミノーゲン活性化 因子阻害剤1	M14083	P	P	2.9	0.118			1.9	

受託番号	検出 ¹	遺伝子発現解析			下記方法での確認			
		Affymetrix ID	BEC	シグナル log 比 ²	LEC	s.d. ³	NB IF	シグナル log 比
セレクチンP, CD62, 顆粒膜タンパク質-140 (GMP-140)前駆体	M25322	NM_003005	P	3.6	P	1.869		1.2
ラトロフィリン-2	AJ131581	NM_012302	P	3.6	A	0.098		1.1
アクチン, $\alpha 2$	X13839	NM_001613	P	3.6	P	1.067		
繊維芽細胞活性化タンパク質, α	U09278	NM_004460	P	3.6	A	0.789		1.2
Gタンパク質シグナル伝達20のレギュレーター	AF060877	NM_003702	P	3.5	A	0.615		
IGF-II mRNA 結合タンパク質 ³	U97188	NM_006547	P	3.5	P	0.528		2.1
網膜cDNAランダムブライムサブライブラリー, EST	W28438	36497_at	P	3.5	A	0.414		
脳酸可溶タンパク質1, 神経組織に豊富な酸性タンパク質 (NAP-22)	AF039656	NM_006317	P	3.4	A	0.104		1.6
プロフィリン2	AL096719	NM_002628	P	3.4	P	0.111		1.6
Na, K-ATPアーゼ β -1サブユニット	L10678	NM_002628	P	3.1	P	0.076		1.6
クラーウジン-7	U16799	NM_001677	P	3.4	A	0.249		
正常歯肉	AJ011497	NM_001307	P	3.4	A	0.798		
デイスインテグリンおよびメタプロロテイナーゼドメイン23	U51712	39698_at	P	3.4	A	0.391		1.1
$\alpha 1$ (VIII) コラーゲンのCOL8A1 mRNA	AB009672	NM_003812	P	3.4	A	0.600		
	X57527	NM_001850	P	3.3	A	0.819	+	1.7

受託番号	検出 ¹	遺伝子発現解析			下記方法での確認		シグナル log比		
		Affymetrix ID	BEC	LEC	シグナル log比 ²	s.d. ³		NB	IF
転写6のシグナル変換因子 および活性化因子 (STAT 6)	AF067575	41222_at	P	P	3.3	0.338	+	+	1.8
転写因子 <i>IL-4 Stat, STAT</i> 6	U16031	NM_003153	P	A	2.1	0.493	+	+	1.6
リポルチン-III, アネ キシンA3	M20560	NM_005139	P	P	3.3	0.265			1.1
細胞間接着分子1 (CD54), ライノウイルス主要群受 容体前駆体	M24283	NM_000201	P	A	3.2	0.184	+		
溶質担体ファミリー-1 (神 経/上皮高親和性グルタミ ン酸トランスポーター, X ag系)	U08989	NM_004170	P	A	3.2	0.687			1.3
溶質担体ファミリー-1 (神 経/上皮高親和性グルタミ ン酸トランスポーター, X ag系)	A1928365	NM_004170	P	A	2.6	0.524			1.2
p53誘導タンパク質	L47738	37579_at	P	A	3.2	0.249			1.0
ジヒドロピリミジンデヒ ドロゲナーゼ, DPYD	U20938	38220_at	P	A	3.2	0.306			
ナチュラールキラー細胞 転 写物4	AA631972	NM_004221	P	P	3.1	0.082			1.6
PFTAIREタンパク質キナー ゼ1, KIAA0834	AB020641	NM_012395	P	A	3.1	0.841			
RGP4, Gタンパク質シグナ ル伝達4のレギュレーター	U27768	NM_005613	P	A	3.0	0.396			1.5

受託番号	検出 ¹	遺伝子発現解析			下記方法 での確認		
		Affymetrix ID	BEC	LEC	s.d. ³	NB	IF
					シグナル log比 ¹	シグナル log比	
Gタンパク質シグナル伝達 4のレギュレーター	AI267373	NM_005613	P	A	2.6	0.473	1.5
癌遺伝子Am11-Evi-1, 融 合活性化	HG4058-HT4328	1882_g_at	P	M	2.9	0.590	1.5
癌遺伝子 Am11-Evi-1, 融 合活性化	HG4058-HT4328	1881_at	P	A	2.0	0.374	1.5
アデニルシクラーゼ関 連タンパク質2	N90755	NM_006366	P	A	2.8	0.596	1.5
クラステリン (補体溶解 阻害剤, SP-40,40, 硫化 糖タンパク質2, アポリポ タンパク質J)	M25915	NM_001831	P	P	2.8	0.161	
ADPリポシル化因子様7 H 因子 (補体) 様1	AB016811 M65292	NM_005737 NM_002113	P	A	2.7	0.531	
RNAヘリカーゼ関連タンパ ク質, メタロチオネイン -If	H68340	NM_007372	P	P	2.7	0.589	
刺激されたトランス作用 因子(50kDa) Staf50	X82200	NM_006074	P	A	2.7	0.730	6.2
シクロオキシゲナーゼ-2 (hCox-2)	U04636	NM_000963	P	A	2.6	1.281	
GR01癌遺伝子, メラノー マ増殖刺激活性化 (MGSA)	X54489	NM_001511	P	A	2.6	0.369	
NRGN, ニューログラニン マウスdkk-1のホモログ	X99076 AB020315	NM_006176 35977_at	M	A	2.6	1.237	
			P	A	2.5	0.398	

受託番号	検出 ¹	遺伝子発現解析			下記方法 での確認		シグナル log比	
		Affymetrix ID	BEC	LEC	シグナル log比 ²	s.d. ³		NB
J04152	胃腸管腫瘍関連抗原GA733 -1, 腫瘍関連カルシウム シグナル変換因子2	NM_002353	P	P	2.5	0.139		
Z15008	ラミニン	NM_005562	P	A	2.5	0.824		
M95787	トランスゲリン, 22kDa平 滑筋タンパク質 (SM22)	NM_003186	P	A	2.5	0.980		
M28225	単球分泌タンパク質をコ ードするJE遺伝子	34375_at	P	P	2.4	0.186		3.6
AJ223321	ジンクフィンガータンパ ク質238, RP58	NM_006352	P	A	2.4	0.498		3.2
X87212	カテプシンC	NM_001814	P	P	2.4	0.244		
M15518	組織プラスミノーゲン活 性化因子 (t-PA)	NM_000930	P	A	2.4	0.479		
AF060567	sushi-リピータンパク 質	NM_014467	P	A	2.4	0.670		
D00510	アネキシンA6	NM_001155	P	A	2.4	0.181		1.2
U09303	エフリンB1	NM_004429	P	A	2.4	0.946		
U09303	エフリンB1	NM_004429	P	A	1.2	0.489		
D43945	TFECイソ型 (転写因子EC)	NM_012252	P	A	2.4	0.028		3.1
M26683	小型誘導サイトカインA2, (単球遊走因子1)	NM_002982	P	P	2.3	0.283		3.5
M26683	小型誘導 サイトカインA2 (単球遊走因子1)	NM_002982	P	A	1.2	0.385		
L35545	内皮細胞タンパク質C/APC 受容体 (EPCR)	NM_006404	P	P	2.3	0.259		2.2
M55153	トランスグルタミナーゼ2 (Tgase)	NM_004613	P	M	2.3	0.413		

受託番号	検出 ¹⁾			遺伝子発現解析			下記方法 での確認		シグナル log比
	Affymetrix ID	BEC	LEC	シグナル log比 ¹⁾	s.d. ¹⁾	NB	IF		
トランスグルタミナーゼ (Tfase)	M55153	P	P	1.6	0.093				
ヒトメタロチオネイン-Iif	M10943	P	M	2.3	0.230				
トランスフォオミング増 殖因子 β-誘導型 (BIGH .3)	M77349	P	A	2.3	0.951				
ニューロン特異的(γ)エ ノラーゼのEN02遺伝子	X51956	P	A	2.3	0.121			1.6	
FAT腫瘍抑制因子(Drosoph ila)ホモログ	X87241	P	A	2.3	1.204				
悪性細胞発現により促進 される遺伝子/腫瘍進行に より促進される遺伝子	S82470	P	P	2.2	0.469				
悪性細胞発現により促進 される遺伝子/腫瘍進行に より促進される遺伝子	S82470	P	A	1.7	0.420				
cDNA DKFZp566G0746 (ク ローン DKFZp566G0746由 来)	AL050078	P	A	2.2	1.281				
リシルオキシダーゼ様2	U89942	P	P	2.2	0.274				
Ras関連C3ボツリヌス菌毒 素基質2 (rhoファミリー, 小GTP結合タンパク質Rac 2)	M64595	P	P	2.2	0.143			3.5	
内皮白血球接着分子1 (EL AM-1), セレクチンE	M24736	P	A	2.2	0.448				
ラミニン, α5, KIAA0533	AB011105	P	P	2.2	0.146				

受託番号	検出 ¹	遺伝子発現解析			下記方法 での確認		
		BEC	LEC	シグナル log比 ²	s.d. ³	NB IF	シグナル log比
胎盤増殖因子 (PIGF)	X54936	P	P	2.2	0.301	+	1.0
染色体1q由来のALL1融合 遺伝子, AF1q	U16954	P	P	2.2	0.592		
ストロメリニン-2, MMP-1 0	X07820	P	P	2.1	0.159		1.0
メタロチオネイン-I-A	K01383	P	P	2.1	0.238		
コラーゲンVI α -1	X15880	P	A	2.1	0.898		
madタンパク質ホモログ (hMAD-3)	U68019	P	A	2.1	0.269		1.1
madタンパク質ホモログ(h MAD-3)	U68019	P	A	1.8	0.367		1.4
madタンパク質ホモログ (hMAD-3)	U68019	P	A	2.0	0.304		
内在性膜タンパク質2A	AL021786	P	P	2.1	0.570		
インターローイキン1受容体 様1	D12763	P	A	2.1	0.718		
高移動度群 (非ヒストン 染色体) タンパク質イソ 型I-C (HMGI-C)	X92518	P	A	2.0	0.177		
上皮増殖因子受容体キナ ーゼ基質 (Eps8)	U12535	P	A	2.0	0.710		1.0
乳酸デヒドロゲナーゼB	X13794	P	P	2.0	0.029		1.6
未知の産物のmRNA	D29810	P	A	2.0	1.170		
仮定タンパク質 DKFZp564 D0462	AL033377	P	A	2.0	0.137		1.1
リシルヒドロキシラーゼ イソ型2 (PLOD2)	U84573	P	P	2.0	0.157		

受託番号	検出 ¹	遺伝子発現解析			下記方法 での確認				
		Affymetrix ID	BEC	LEC	シグナル log比 ¹	s.d. ¹	NB	IF	シグナル log比
フォリスタチン様3, フオリスタチン関連タンパク質 (FLRG)	U76702	NM_005860	P	A	2.0	0.075			2.6
ヒトクローン24674 mRNA配列	AF070578	36758_at	P	A	2.0	0.612			1.8
L-イジトール-2デヒドロゲナーゼ	L29254	38763_at	P	A	1.9	0.140			
ニューロニンペントラキシン1	U61849	37921_at	P	A	1.9	0.744			2.5
クロンs 23549および23762由来の仮定タンパク質	U90908	34010_at	P	A	1.9	0.870			
UDP-N-アセチルグルコサミンピロホスホララーゼ	AB011004	41242_at	P	P	1.9	0.342			
ジンクフィンガータンパク質185 (LIMドメイン)	Y09538	32139_at	P	A	1.8	0.062			1.6
4つ半のLIMドメイン2, 心臓タンパク質 (FHL-2)	U29332	38422_s_at	P	P	1.8	0.229			
マイトジエン活性化タンパク質 キナーゼ活性化タンパク質キナーゼ3, MAPK APキナーゼ (3pK)	U09578	1637_at	P	A	1.8	0.454			1.4
メタロチオネイン1E (機能的)	R92331	36130_f_at	P	P	1.8	0.131			
TU3Aタンパク質	AF035283	38044_at	P	A	1.8	0.298			1.8
メタロチオネイン1H	R93527	39594_f_at	P	P	1.8	0.415			
グアニル酸結合タンパク質イソ型II (GBP-2)	M55543	32700_at	P	P	1.8	0.304			1.1

受託番号	検出 ¹	遺伝子発現解析			下記方法 での確認		シグナル log比
		BE C	LEC	シグナル log比 ²	s.d. ³	NB	
ID	Affymetrix	BE C	LEC	シグナル log比 ²	s.d. ³	NB	IF
可溶性血管内皮細胞増殖 因子受容体1 (sVEGFR-1)	U01134	P	M	1.8	0.384	+	
R-Ras	M14949	P	P	1.8	0.119		
R-ras	M14949	P	P	1.2	0.330		1.5
クレアチントランスポー ター (SLC6A8), 溶質担体 ファミリー6, メンバー8	U36341	P	A	1.8	0.305		
myb1 (ニワトリ) ホモロ グの標的, ヘムオキシゲ ナーゼ1 (HO-1)	Z82244	P	P	1.8	0.149		
プロコラーゲン-リシン, 2-オキソグルタル酸5-ジ オキシゲナーゼ, リシル ヒドロキシラーゼ (PLOD)	L06419	P	P	1.8	0.310		
KIAA0836	AB020643	P	P	1.8	0.203		1.8
cDNA DKFZp434C171 (クロ ーンDKFZp434C171由来)	AL080169	P	A	1.8	0.606		1.2
インターロイキン4受容体 のIL-4-R mRNA	X52425	P	P	1.7	0.244		
ケモカイン (C-Cモチーフ フ) 受容体様2 (CCRL2), ケモカイン受容体X (CKR X)	AF014958	P	A	1.7	0.386		1.8
ホスホリパーゼC, β 3 (ホスファチジルイノシト ール特異的)	Z16411	P	A	1.7	0.098		
LIMドメインタンパク質	X93510	P	P	1.7	0.067		1.9

受託番号	検出 ¹	遺伝子発現解析			下記方法 での確認		シグナル log比	
		Affymetrix ID	BEC	LEC	シグナル log比 ²	s.d. ³		NB
タンパク質キナーゼ (cAM P依存性, 触媒的) 阻害剤 β	M34181	NM_002731	P	A	1.7	0.315		1.0
rho GDP解離阻害剤2	X69549	NM_001175	P	P	1.7	0.163		2.4
KIAA0975, イミダゾリン 受容体候補	AB023192	NM_007184	P	A	1.7	0.343		
ポリオウイルス受容体	X64116	NM_006505	P	P	1.7	0.173		
ポリオウイルス受容体	X64116	NM_006505	P	P	1.3	0.102		
前初期応答3	S81914	NM_003897	P	P	1.7	0.171		
メタロチオネイン2A	AI547258	NM_005953	P	A	1.7	0.247		
トロポミオシン1 (α)	M19267	NM_000366	P	P	1.6	0.184		1.0
トロポミオシン1 (α)	Z24727	NM_000366	P	P	1.4	0.094		1.3
トロポミオシン1 (α)	M19267	NM_000366	P	P	1.2	0.213		
TRAM様タンパク質	D31762	NM_012288	P	P	1.6	0.244		1.1
E3ユビキチンリガーゼSMU RF2	AA630312	NM_022739	P	P	1.6	0.244		2.2
EGF含有フィブリン様細 胞外マトリックスタンパ ク質1	U03877	NM_004105	P	P	1.6	0.152		
Gタンパク質結合受容体56	AJ011001	NM_005682	P	P	1.6	0.075		
c-Junプロト癌遺伝子 (JU N)	J04111	NM_002228	P	A	1.6	0.377		
Gタンパク質シグナル伝達 10レギュレーター, RGS10	AF045229	NM_002925	P	A	1.6	0.064		

受託番号	検出 ¹	遺伝子発現解析	下記方法 での確認
	Affymetrix ID	BEC LEC log比 ²	NB IF log比
アミロイドβ(A4)前駆体 タンパク質結合, フェミ リーB, メンバー2 (Fe65 様)	U62325	P P 1.6 0.312	1.3
Ras関連rhoタンパク質	M12174	P P 1.6 0.281	1.4
プロテアソーム(プロソ- ム, マクロペイン) 26Sサ ブユニット, 非ATPアー ゼ, 10	AL031177	P A 1.5 0.265	
KIAA0537	NM_014840	P P 1.5 0.135	1.8
リソソーム関連膜タンバ ク質-2	X77196	P P 1.5 0.432	
リン脂質転移タンパク質	L26232	P P 1.5 0.046	
N-ミリスチルトランス フェラーゼ2	AF043325	P P 1.5 0.038	
ホスホフルクトキナーゼ (PFKM)	U24183	P P 1.5 0.374	2.0
インテグリン, β4	X53587	P A 1.5 0.195	
ロイパキシン	AF062075	P A 1.5 0.231	1.3
エンドセリン変換酵素1	Z35307	P P 1.5 0.180	
野生型p53活性化断片-1 (WAF1), サイクリン依存 性キナーゼ阻害剤1A (p2 1, Cip1)	U03106	P P 1.5 0.399	
ICAM-2, LFA-1の細胞接着 リガンド	X15606	P P 1.5 0.024	1.5

受託番号	検出 ¹	遺伝子発現解析			下記方法 での確認				
		Affymetrix ID	BEC	シグナル log比 ²	LEC	s.d. ³	NB	IF	シグナル log比
ICAM-2, LFA-1の細胞接着 リガンド	X15606	NM_000873	P	1.5	P	0.153			2.0
細胞間接着分子2 (ICAM- 2)	M32334	590_at	P	1.4	P	0.152			1.5
真核生物翻訳開始因子2B, eIF-2B βサブユニット	AF035280	NM_014239	P	1.5	P	0.108			
ウリジンホスホリラーゼ	X90858	NM_003364	P	1.5	M	0.064			
インテグリン, β5	X53002	NM_002213	P	1.5	P	0.068			
N-スルホグルコサミンス ルホヒドロラーゼ (スル ファミダーゼ)	U30894	NM_000199	P	1.5	P	0.077			
シナプトジヤニン2	AF039945	36532_at	P	1.5	A	0.164			1.1
メタロチオネイン1L	AA224832	39120_at	P	1.4	A	0.664			
マクロファージキヤッピ ングタンパク質, ゲルソ リン様	M94345	38391_at	P	1.4	P	0.281			
HSPC022タンパク質	W68830	32736_at	P	1.4	P	0.062			2.7
ヒトクローン137308 mRNA, A, 部分的cds	AW006742	38207_at	P	1.4	A	0.442			
プロトカドヘリン42, PC4 2, プロトカドヘリン1 (カドヘリン様1)	L11370	37562_at	P	1.4	A	0.166			
キヤスパーゼ様アポトー シス調節タンパク質2 (CL ARP2)	AF005775	1867_at	P	1.4	P	0.363			1.5

受託番号	検出 ¹⁾	遺伝子発現解析			下記方法での確認				
		Affymetrix ID	BEC	LEC	シグナル log 比 ²⁾	s.d. ³⁾	NB	IF	シグナル log 比
キヤスパーゼ様アポトーシス調節タンパク質2 (CLARP2)	AF005775	NM_003879	P	P	1.2	0.325			2.2
腫瘍vaultタンパク質, lrp	X79882	NM_005115	P	P	1.4	0.252			1.0
Fanconi 貧血, 補足群G	AC004472	NM_004629	P	A	1.4	0.233			
アリオントタンパク質 (PrP)	U29185	NM_000311	P	P	1.4	0.342			1.1
インターフェロン刺激タンパク質, 15 kDa	AA203213	NM_005101	P	A	1.4	0.244			
セリン(またはシステイン) プロテイナーゼ阻害剤, clade B (阿保アルブミン), 細胞質アンチプロテイナーゼ2 (CAP2)	L40377	NM_002640	P	A	1.3	0.360			2.2
バイグリカン	J04599	NM_001711	P	P	1.3	0.101			
ケモカイン (C-X-Cモチーフ), 受容体4 (フウシン)	L06797	NM_003467	P	P	1.3	0.177	+		
ユビキチンカルボキシル末端エステラーゼL1 (ユビキチンチオールエステラーゼ)	X04741	NM_004181	P	P	1.3	0.117			
KIAA0469	AB007938	NM_014851	P	P	1.3	0.124			
TNF (リガンド) スーパーファミリー, メンバー4 (tax転写活性化糖タンパク質1, 34kD)	AL022310	NM_003326	P	A	1.3	0.349			

受託番号	検出 ¹⁾			遺伝子発現解析		下記方法 での確認		シグナル log比
	Affymetrix ID	BEC	LEC	シグナル log比 ¹⁾	s.d. ³⁾	NB	IF	
KIAA1053	40855_at	P	P	1.3	0.242			1.6
NAD(P)H-キノンオキシレ ダクターゼ	38066_at	P	P	1.3	0.058			1.8
sushi-リピート含有タン パク質	NM_006307	P	P	1.3	0.610			1.2
インテグリン, $\alpha 5$	NM_002205	P	P	1.3	0.179		+	1.2
エニグマ (LIMドメイン ンパク質)	NM_005451	P	P	1.3	0.396			
エクトヌクレオシド三リ ン酸1ジホスホヒドロラー ゼ1	NM_001776	P	A	1.3	0.412			1.5
トランスフオーミング増 殖因子- β (tgf- β), 骨 形態形成タンパク質6	NM_001718	P	P	1.3	0.206			
トランスフオーミング増 殖因子- β (tgf- β), 骨 形態形成タンパク質6	NM_001718	P	P	1.0	0.308			
ニコチンアミドN-メチル トランスフェラーゼ, NNM T	NM_006169	P	P	1.2	0.083			2.1
cDNA DKFZp564J0323 (ク ローン DKFZp564J0323由 来)	39170_at	P	P	1.2	0.264			1.2
チオレドキシニンレダクタ ーゼ β	41711_at	P	A	1.2	0.206			
fボックスおよびロイシン 豊富リピートタンパク質2	36525_at	P	A	1.2	0.300			1.2

受託番号	検出 ¹	遺伝子発現解析			下記方法での確認		
		Affymetrix ID	BEC	シグナル log 比 ²	s.d. ³	NB IF	シグナル log 比
トランスコバラミンII (T CN2)	L02648	NM_000355	P	A	1.2	0.342	1.2
アルデヒドデヒドロゲナーゼ2, ミトコンドリア	X05409	NM_000690	P	P	1.2	0.117	
GTP結合タンパク質ragB	X90530	NM_006064	P	M	1.2	0.602	1.7
リンパ球抗原75	AF011333	NM_002349	P	A	1.2	0.132	1.5
GM2活性化因子タンパク質	X62078	35820_at	P	P	1.2	0.101	1.5
3型イノシトール1,4,5-三リン酸受容体 (ITPR3)	U01062	182_at	P	P	1.2	0.052	1.9
KIAA0284	A1828210	38592_s_at	P	P	1.2	0.078	
メタロチオネインI-B	M13485	609_f_at	P	P	1.2	0.266	
BTG2	U72649	36634_at	P	P	1.2	0.210	
アデニル酸キナーゼ1	J04809	36997_at	P	A	1.2	0.246	
腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー, メンバ	Y09392	41189_at	P	P	1.2	0.350	
ー12, WSL-LR, WSL-S1およびWSL-S2タンパク質	M22324	39385_at	P	P	1.2	0.398	
アミノペプチオダーゼN/C D13	M60974	1911_s_at	P	P	1.2	0.177	
成長停止およびDNA傷害誘導タンパク質 (gadd45)	AB014538	37375_at	P	P	1.2	0.680	
KIAA0638タンパク質	M33308	36601_at	P	P	1.2	0.078	+
ピンキュリン							

受託番号	Affymetrix ID	BEC	LEC	遺伝子発現解析		下記方法での確認	シグナル log 比
				シグナル log 比 ¹	s.d. ³		
U90441	NM_004199	P	P	1.1	0.347		
プロコラーゲン-ブロリン, 2-オキソグルタル酸4-ジオキシゲナーゼ (ブロリン4-ヒドロキシラーゼ), αポリペプチドII							
msg1 関連遺伝子1 (msg1), Cbp/p300 相互作用トランス活性化因子	NM_006079	P	P	1.1	0.164	NB	1.2
AF026977	NM_004528	P	P	1.1	0.191		1.1
AF070523	NM_006407	P	P	1.1	0.216		2.9
M13755	NM_005101	P	P	1.1	0.119		
17-kDa タンパク質, インターフェロン刺激タンパク質, 15 kDa							
X83535	NM_004995	P	A	1.1	0.487		2.4
マトリックスメタロプロテイン-14 (膜挿入型)							
J02939	NM_002394	P	P	1.1	0.143		
4F2 細胞表面抗原, 溶質担体ファミリー-3, メンバー2							
M93311	NM_005954	P	P	1.1	0.334		
S76965	NM_006823	P	P	1.1	0.046		
メタロチオネイン-III タンパク質キナーゼ (cAMP 依存性, 触媒的) 阻害剤							
S76965	NM_006823	P	P	1.0	0.367		
α タンパク質キナーゼ (cAMP 依存性, 触媒的) 阻害剤							
α							

受託番号	検出 ¹	遺伝子発現解析			下記方法 での確認		シグナル log比	
		Affymetrix ID	BEC	LEC	シグナル log比 ²	s.d. ³		NB
レチキュロカルビン1, EF 腕カルシウム結合ドメイ ン	D42073	NM_002901	P	P	1.1	0.035		1.1
リピン1, KIAA0188	D80010	38098_at	P	P	1.1	0.080		1.4
プロテアーゼ, セリン, 2 .3	AF015287	40078_at	P	P	1.0	0.099		1.3
hectドメインおよびRLD 2	AF041080	40877_s_at	P	P	1.0	0.104		
GATA結合タンパク質 (GAT A2)	M68891	37194_at	P	P	1.0	0.325		1.0
アグリニン前駆体	AF016903	33454_at	P	P	1.0	0.272		
核酸型ヌクレオシドトラ ンスポーター1 (hENT1)	U81375	33901_at	P	P	1.0	0.352		
コロニン, アクチン結合 タンパク質2B, KIAA0925	AB023142	34772_at	P	A	1.0	0.459		
fボックスおよびWD-40ド メインタンパク質3	U07000	537_f_at	P	M	1.0	0.212		
無症候性聴覚障害タンパ ク質 (DFNA5)	AF073308	41872_at	P	P	1.0	0.535		1.0
アクチンフィラメント関 連タンパク質	D25248	37578_at	P	P	1.0	0.218		
TNFR関連細胞死受容体-6 (DR6)	AF068868	35402_at	P	A	1.0	0.235		1.7
血清/グルココルチコイド 調節キナーゼ	Y10032	973_at	P	A	1.0	0.174		
DNアーゼX	X90392	37214_g_at	P	P	1.0	0.507		
DNアーゼX	X90392	37213_at	P	P	1.0	0.376		
脂肪酸デサチュラーゼ3	AC004770	34224_at	P	P	1.0	0.294		

受託番号	検出 ¹			遺伝子発現解析			下記方法 での確認	
	Affymetrix ID	BEC	LEC	シグナル log比 ²	s.d. ³	NB	IF	シグナル log比
LYL-1	39971_at	P	P	1.0	0.313			1.4
ATP結合カセット, サブフ アミラーゼ (CFTR/MRP), メンバール	34016_s_at	P	A	1.0	0.258			2.3
トランスメンブランタン パク質 (CD59)	39351_at	P	P	1.0	0.141			1.1
Fms関連チロシンキナーゼ 1, VEGFR-1	1545_g_at	P	P	1.0	0.535	+		1.9

¹測定値は、転写物が検出される(存在する, P)か、検出されない(不在である, A)か、またはわずかに検出される(わずかである, M; ある試験ではPであるが、別の試験ではAである場合も同様)かを示している。

²独立に採取した2種のBECおよびLEC間の転写物発現レベルの変化(=計4回の比較試験)。その変化をlog2比として表している。

³発現レベルの変化の標準偏差(4回の比較試験による)

NB=ノーザンブロット, IF=免疫蛍光検査法

【表 10】

表 10
既知の LEC 特異的遺伝子

遺伝子	検出*	受託番号 開始 EST	可能性のある遺伝子
CD36 =COL1/TS 受容体, 脂肪酸輸送タンパク質	Af (S/4,3)	R20784 H54254	M98399
β 1-シントロフィン	Af (S/4,5)	AA447177	L31529
コレクチンサブファミリー メンバー12	Af (S/4,5)	R74387	NM_030781
メタロプロテアーゼディスイ ンテグリンドメイン 12	Af (S/4,3)	AA147933	NM_003474
細胞傷害性 T リンパ球関連タ ンパク質 4	Af (S/4,0)	AI733018	NM_005214
niban タンパク質 NM_022083	Af (S/3,7)	AA554814	NM_052966
niban タンパク質			NM_052966
複数 PDZ ドメインを有するタ ンパク質, LNX	Af (S/3,5)	AI738919	NM_032622
MAGE-E1 タンパク質	Af (S/3,2)	AI435112	NM_030801
転写促進因子 1, USF1(ゲノム マッチ)	Af (S/2,6)	AA701033	AB017568
ヘアリー/ YRPW1 モチーフ関連 のエンハンサーのスプリット	Af (NS/2,6)	R61374	NM_012258
α -2,8-ポリシアリルトランス フェラーゼ	Af (S/2,5)	AI422986	L41680
セマフォリン 6A1	Af (S/2,4)	W21965	NM_020796
グアニンヌクレオチド結合タ ンパク質(G タンパク質), γ 2	Af (S/2,3)	AA738022	
内在性膜タンパク質 3	Af (S/2,3)	AA128019	NM_030926
マウスグルココルチコイド誘 発遺伝子 1 に類似	Af (S/2,0)	AI678080	XM_070471
YAP65(65kDa MW の Yes 関連タ ンパク質)	Af (NS/2,0)	AL048399	X80507
17kDa 胎児脳タンパク質	Af (NS/1,9)	H92988	NM_022343
Kruppel 様因子 5	Af (S/1,8)	AI815057	NM_001730
カルシトニン受容体様, CGRP タイプ 1 受容体	Af (S/1,7)	AI741128, T94540	NM_005795, L76380
繊維芽細胞増殖因子 13, イソ 型 1A	Af (NS/1,7)	AW014749	NM_004114
膜 4 回貫通型 NET-6 タンパク 質	Af (NS/1,6)	W22687	NM_014399
リングフィンガータンパク質	Af (S/1,6)	AL079648	BC020964
11			

* Af=Affymetrix, S=LEC に対して特異的, NS=非特異的(BEC でも発現される), 数値は BEC および LEC 間のシグナル強度の \log_2 比を示す

【 0 2 6 6 】

【表 1 1】

表 11
受託番号により同定された示差的発現遺伝子

遺伝子	検出*	開始 EST	配列番号
EST	Af (S/4,9)	AL079386	1
EST	Af (S/3,7)	N21555	2
EST	Af (S/3,2)	AL119027	3
EST	Af (S/2,9)	H05299	4
EST	Af (S/2,8)	AA973128	5
EST	Af (NS/2,6)	AI128820	
EST	Af (S/2,3)	AW044647	6
EST	Af (S/2,2)	AI333058	7
EST	Af (S/2,1)	AI536067	8
EST	Af (NS/2,0)	AA156409	
EST	Af (S/1,9)	AI770080	9
EST	Af (NS/1,9)	AA456099	
EST	Af (S/1,8)	AI692645	10
EST	Af (S/1,7)	AL119265	11
EST	Af (S/1,6)	AI478114	12
EST	Af (S/1,6)	AI817448	13

10

20

* Af=Affymetrix, S=LEC に対して特異的, NS=非特異的(BEC でも発現される), 数値は BEC および LEC 間のシグナル強度の \log_2 比を示す

【 0 2 6 7 】

【表 1 2】

表 12
同定されたその他のタンパク質

遺伝子	検出*	受託番号 開始 EST	有力な候補遺伝子	
KIAA1392, 仮定タンパク質 DKFZp762K222	Af (S/5,3)	N50545	XM_048721	(20)
ホスホグルコムターゼ 5 に類 似	Af (S/4,5)	AL046941	XM_047649	(21)
トランスメンブラン受容体 Unc5H1 に類似	Af (S/4,5)	R56359	XM_030300	(22)
仮定タンパク質 MGC21854	Af (S/3,7)	AI659418	NM_052862	(23)
KIAA1877	Af (S/3,4)	AW004016		
不特定タンパク質生成物に類 似	Af (NS/3,1)	AA036952	XM_085235	
未知のタンパク質	Af (S/2,9)	AA846091	XM_038314	(24)
KIAA1058 (+test の N 末端が欠 損)	Af (S/2,6)	AA007697	AB028981	(25)
KIAA1673 類似体	Af (S/2,3)	AI948598	XM_059607	(26)
リソソームアミノ酸トランス ポーター1 に類似	Af (S/2,3)	AI692279	XM_058449	(27)
KIAA1673 タンパク質ヒト類似 体	Af (S/2,3)	AI948598	XM_059607	
KIAA0493	Af (S/2,3)	AA532655	AB007962	(28)
仮定タンパク質 MGC2780	Af (S/2,3)	AI734962	NM_025266	(29)
トランスメンブランタンパク 質 2	Af (NS/2,3)	NM_013390	57094_at	
第 1 染色体に位置する新規ヒ ト遺伝子	Af (S/2,2)	AA651889	HS455J72	(30)

10

20

30

* Af=Affymetrix, S=LEC に対して特異的, NS=非特異的(BEC でも発現される), 数値は BEC および LEC 間のシグナル強度の \log_2 比を示す

【 0 2 6 8 】

表 5、6 および 1 2 での括弧内の数字は配列表の配列番号を示す。以下の表 1 3 では、これらの配列をポリペプチド配列、配列番号 3 1 ~ 4 4 および 4 6 (オープンリーディングフレーム、ORF's) と関連付けている。

【 0 2 6 9 】

【表 1 3】

表 13
LEC 特異的なポリヌクレオチドに対応するポリペプチド

受託番号	ポリヌクレオチド	ポリペプチド
NM_021647	配列番号 14	配列番号 31
NM_014817	配列番号 15	配列番号 32
XM_059074	配列番号 16	配列番号 33
NM_016647	配列番号 17	配列番号 34
XM_048721	配列番号 20	配列番号 35
XM_047649	配列番号 21	配列番号 36
XM_030300	配列番号 22	配列番号 37
NM_052862	配列番号 23	配列番号 38
XM_039314	配列番号 24	配列番号 39
AB028981	配列番号 25	配列番号 40
XM_059607	配列番号 26	配列番号 41
XM_058449	配列番号 27	配列番号 42
NM_025266	配列番号 29	配列番号 43
AL137762/HS455J72	配列番号 30	配列番号 44
XM_084655	配列番号 45	配列番号 46

10

20

【 0 2 7 0 】

【表 1 4】

表 14

表 3 の配列についての配列対照表

	受託番号		アミノ酸配列番号	ヌクレオチド配列番号
肺 I 型細胞膜関連タンパク質, ボドプラニン	AF030428	NM_006474	配列番号 65	配列番号 66
肺 I 型細胞膜関連タンパク質, ボドプラニン	<i>AI660929</i>	<i>NM_006474</i>	重複	
細胞内レチノール結合タンパク質	M11433	NM_002899	配列番号 67	配列番号 68
マクロファージマンノース受容体 (MRC1)	M93221		配列番号 69	配列番号 70
転写因子 C-MAF	AF055376	NM_005360	配列番号 71	配列番号 72
転写因子 <i>C-MAF</i>	<i>AF055376</i>	<i>NM_005360</i>	重複	
セレノタンパク質 P	Z11793	NM_005410	配列番号 73	配列番号 74
KIAA0466, 免疫グロブリンスーパーファミリー, メンバー3	AB007935	NM_001542	配列番号 75	配列番号 76
HIV gp120 結合 C 型レクチンに類似の II 型膜タンパク質, CD209 抗原様	AB015629	NM_014257	配列番号 77	配列番号 78
KIAA0626	AB014526	NM_021647	配列番号 79	配列番号 80
KIAA0711	AB018254	NM_014867	配列番号 81	配列番号 82
インテグリン $\alpha 9$	D25303	NM_002207	配列番号 83	配列番号 84
インテグリン $\alpha 9$	<i>D25303</i>	<i>NM_002207</i>	重複	
レラキシン H2	X00948	NM_005059	配列番号 85	配列番号 86
KIAA0644	AB014544	NM_014817	配列番号 87	配列番号 88
Cdk 阻害剤 p57KIP2 (KIP2)	U22398	NM_000076	配列番号 89	配列番号 90
<i>Cdk 阻害剤 p57KIP2 (KIP2)</i>	<i>U22398</i>	<i>NM_000076</i>	重複	
一時的受容体の可能性のあるチャネル) TRPC6	AJ006276	NM_004621	配列番号 91	配列番号 92
cDNA DKFZp5640222(クローン DKFZp5640222 由来)	AL050002			配列番号 93
	M80482	NM_002570	配列番号 94	配列番号 95

10

20

30

40

G タンパク質シグナル伝達 16 のレギュレーター, A28-RGS14p	U70426	NM_002928	配列番号 96	配列番号 97
ジヒドロピリミジナーゼ関連タンパク質-1, コラプシン応答メディエータータンパク質 1	D78012	NM_001313	配列番号 98	配列番号 99
デスマブラキン (DPI, DPII)	AL031058	NM_004415	配列番号 100	配列番号 101
ベンドリン, 溶質担体ファミリー, メンバー4	AF030880	NM_000441	配列番号 102	配列番号 103
リーリン (RELN)	U79716	NM_005045	配列番号 104	配列番号 105
インテグリン, $\alpha 1$	X68742			配列番号 106
インテグリン $\alpha 1$	X68742		重複	
コレステロール 25-ヒドロキシラーゼ	AF059214	NM_003956	配列番号 107	配列番号 108
インヒビン β -B-サブユニット前駆体	M31682	NM_002193	配列番号 109	配列番号 110
KIAA1233	AL109724			
プレ B 細胞刺激因子ホモログ (SDF1b)	L36033	NM_000609	配列番号 112	配列番号 113
V-Erba 関連 Ear-3 タンパク質	HG3510-HT3704			配列番号 114
モノクローナル抗体 MRC OX-2 により同定された抗原	X05323		配列番号 115	配列番号 116
アポリポタンパク質 D	J02611	NM_001647	配列番号 117	配列番号 118
TIMP3, マトリックスメタロプロテイナーゼの組織阻害剤	U14394	NM_000362	配列番号 119	配列番号 120
<i>TIMP3</i>	<i>U14394</i>	<i>NM_000362</i>	重複	
アルデヒドデヒドロゲナーゼ 1	K03000	NM_000689	配列番号 121	配列番号 122
prospero 関連ホメオボックス 1 (prox 1)	U44060	NM_002763	配列番号 123	配列番号 124
基質 Gla タンパク質	AI953789	NM_000900	配列番号 125	配列番号 126
ニューロンペントラキシン II (NPTX2)	U29195		配列番号 127	配列番号 128
ヒスタチン 2 (HIS2)	M26665	NM_000200	配列番号 129	配列番号 130
アデュシン様タンパク質の ADDL mRNA, アデュシン 3 (γ)	D67031	NM_016824	配列番号 131	配列番号 132

10

20

30

40

アデュシン 3 (γ)	U37122	NM_016824	重複	
MADS ボックス転写エンハンサー因子 2, ポリペプチド C(筋細胞エンハンサー因子 2C)	L08895	NM_002397	配列番号 133	配列番号 134
MADS ボックス転写エンハンサー因子 2, (筋細胞エンハンサー因子 2C)		NM_002397	重複	
MADS ボックス転写エンハンサー因子 2, ポリペプチド C(筋細胞エンハンサー因子 2C)	S57212	NM_002397	重複	
ホスホグルコムターゼ 5	L40933	NM_021965	配列番号 135	配列番号 136
サイクリン E2	AF102778	NM_004702	配列番号 137	配列番号 138
インターロイキン 7 (IL7)	M29053		配列番号 139	配列番号 140
インターロイキン 7	J04156	NM_000880	重複	
cDNA DKFZp586L0120(クローン DKFZp586L0120由来)	AL050154			配列番号 141
ペルオキシソーム増殖活性化受容体, γ , PPAR γ	L40904	NM_005037	配列番号 142	配列番号 143
脂肪酸結合タンパク質 4	AA128249	NM_001442	配列番号 144	配列番号 145
タンパク質キナーゼ C θ	Z15108	NM_002744	配列番号 146	配列番号 147
46kDa コクサッキーウイルス/アデノウイルス受容体(CAR)タンパク質	Y07593	NM_001338	配列番号 148	配列番号 149
7q35-qter からの PAC クローン RP4-751H13, ジンクフィンガー様	AC004877		配列番号 150	配列番号 151
チミジンキナーゼ 1, 可溶性	M15205	NM_003258	配列番号 152	配列番号 153
チミジンキナーゼ 1	K02581	NM_003258	重複	
Pig7(PIG7), LPS 誘導 TNF α 因子	AF010312	NM_004862	配列番号 154	配列番号 155
LPS 誘導 TNF α 因子	AL120815	NM_004862	重複	

10

20

30

40

リパーゼ A, リソソーム酸, コレステロールエステラーゼ	X76488	NM_000235	配列番号 156	配列番号 157
ユビキチン特異的プロテアーゼ 13(イソペプチダーゼ T-3)	U75362	NM_003940	配列番号 158	配列番号 159
癌胎児性抗原関連細胞接着分子 1(胆汁糖タンパク質) CEACAM1	X16354	NM_001712	配列番号 160	配列番号 161
cdNA DKFZp586D0918(クローン DKFZp586D0918由来)	AL049370			配列番号 162
KIAA0598, B 細胞 RAG 関連タンパク質	AB011170	NM_014863	配列番号 163	配列番号 164
RAMP2(受容体(カルシトニン)活性調節タンパク質 2)	AJ001015	NM_005854	配列番号 165	配列番号 166
コレステリルエステル転送タンパク質前駆体	M30185	NM_000078	配列番号 167	配列番号 168
上皮膜タンパク質 2	U52100	NM_001424	配列番号 169	配列番号 170
MHC クラス II リンパ球抗原 (HLA-DP)β鎖	M83664	NM_002121	配列番号 171	配列番号 172
MHC クラス II リンパ球抗原(HLA-DP) β鎖	M83664	NM_002121	重複	
β-アレクチン 2	AF106941	NM_004313	配列番号 173	配列番号 174
有糸分裂チェックポイントキナーゼ Bub1(BUB1)	AF053305	NM_004336	配列番号 175	配列番号 176
KIAA0229, ヒトアンキリン 1(S08275)類似体	D86982		配列番号 177	配列番号 178
Sprouty 1 ホモログ(FGFシグナル伝達アンタゴニスト)	AF041037		配列番号 179	配列番号 180
Rap1 のグアニンヌクレオチド交換因子; M-Ras 調節 GEF, KIAA0277		NM_012294	配列番号 181	配列番号 182
トランスリン	X78627	NM_004622	配列番号 183	配列番号 184
赤血球膜タンパク質バンド 4.9 (デマチン)	U28389	NM_001978	配列番号 185	配列番号 186
KIAA0846 タンパク質	AB020653	NM_015376	配列番号 187	配列番号 188
グリア細胞成長因子, γ	W07033	NM_004877	配列番号 189	配列番号 190
インスリン様増殖因子結合タンパク質 2(IGFBP-2)	X16302	NM_000597	配列番号 191	配列番号 192

10

20

30

40

平滑筋ミオシン重鎖イソ型 Smemb	S67247		配列番号 193	配列番号 194
TTG-2(LIM モチーフを有するシステイン豊富なタンパク質), LIMドメインオンリー2(ロンボチン様1)	X61118	NM_005574	配列番号 195	配列番号 196
サイクリン B2	AL080146	NM_004701	配列番号 197	配列番号 198
KIAA0353	AB002351		配列番号 199	配列番号 200
KIAA0559, ピッコロ(プレシナプスのサイトマトリックスタンパク質)	AB011131		配列番号 201	配列番号 202
G タンパク質結合受容体, ファミリーC, グループ5, メンバーB	AC004131	NM_016235	配列番号 203	配列番号 204
G タンパク質結合受容体, ファミリーC, グループ5, メンバーB	AI801872	NM_016235	重複	重複
CREM(サイクリック AMP 応答性エレメントモジュレーターβイソ型)	S68134	NM_001881	配列番号 205	配列番号 206
CREM(サイクリック AMP 応答性エレメントモジュレーターβイソ型)	S68134	NM_001881	重複	重複
CREM(サイクリック AMP 応答性エレメントモジュレーターβイソ型)	S68271	NM_001881	重複	重複
仮定タンパク質 FLJ13110	AL080222	NM_022912	配列番号 207	配列番号 208
イノシトール(ミオ)-1(または4)-モノホスファターゼ2	AF014398	NM_014214	配列番号 209	配列番号 210
KIAA0937 タンパク質	AB023154		配列番号 211	配列番号 212
有糸分裂紡錘体コイルドコイル関連タンパク質	AF063308	NM_006461	配列番号 213	配列番号 214
システインとグリシンの豊富なタンパク質2(CSRP2)	U57646	NM_001321	配列番号 215	配列番号 216
トポイソメラーゼ(DNA)II α(170kD)	AI375913	NM_001067	配列番号 217	配列番号 218
DNA トポイソメラーゼ II	J04088	NM_001067	重複	重複
タンパク質ホスファターゼ阻害剤 2(PPP1R2)	U68111		配列番号 219	配列番号 220

10

20

30

40

KIAA0186	D80008	NM_021067	配列番号 221	配列番号 222
二重特異性チロシン -(Y)-リン酸化調節キ ナーゼ 3 (Dyrk3)	Y12735	NM_003582	配列番号 223	配列番号 224
キネシン様紡錘体タン パク質 HKSP(HKSP)	U37426	NM_004523	配列番号 225	配列番号 226
ハンチンチン関連タン パク質相互作用タンパ ク質(duo)	U94190	NM_003947	配列番号 227	配列番号 228
ジユビキチン	AL031983	NM_006398	配列番号 229	配列番号 230
ピクニン, セリンプロ テアーゼ阻害剤, Kunitz 型, 2	U78095	NM_021102	配列番号 231	配列番号 232
シトクロム P-450-1 (TCDD 誘導性)	K03191	NM_000499	配列番号 233	配列番号 234
シトクロム P(1)-450	X02612	NM_000499	重複	重複
KIAA0513		NM_014732	配列番号 235	配列番号 236
タンパク質ホスファタ ーゼ阻害剤 2(PPP1R2)	U68111		重複	
RAMP3(受容体(カルシ トニン)活性調節タン パク質 3)	AJ001016	NM_005856	配列番号 237	配列番号 238
B-myb	X13293	NM_002466	配列番号 239	配列番号 240
KIAA0952	AB023169	NM_014962	配列番号 241	配列番号 242
インターフェロン誘導 遺伝子(20kD), HEM45	U88964	NM_002201	配列番号 243	配列番号 244
GS3955	D87119	NM_021643	配列番号 245	配列番号 246
GS3955	D87119	NM_021643	重複	重複
GRB2 関連アダプタータ ンパク質(Grap)	U52518	NM_006613	配列番号 247	配列番号 248
KIAA1071 タンパク質	AB028994		配列番号 249	配列番号 250
複数のスプライシング を有する RNA 結合タン パク質遺伝子, RBP-MS/ タイプ 5	D84111	NM_006867	配列番号 251	配列番号 252
複数のスプライシング を有する RNA 結合タン パク質遺伝子, RBP-MS/ タイプ 5	D84111	NM_006867	重複	重複

10

20

30

40

RBP-MS/タイプ 4, 複数のスプライシングを有する RNA 結合タンパク質遺伝子	D84110	NM_006867	重複	
RBP-MS/タイプ 4, 複数のスプライシングを有する RNA 結合タンパク質遺伝子	D84110	NM_006867	重複	重複
RBP-MS/タイプ 3, 複数のスプライシングを有する RNA 結合タンパク質遺伝子	D84109	NM_006867	重複	重複
α -アクチニン-2-関連 LIM タンパク質	AF002282	NM_014476	配列番号 253	配列番号 254
セマフォリン-III(Hse ma-I), セマフォリン 3 A	L26081	NM_006080	配列番号 255	配列番号 256
IQ モチーフを有する GTP アーゼ活性化タンパク質 2	U51903	NM_006633	配列番号 257	配列番号 258
アレスチン, $\alpha 2$	HG2059-HT2114		重複	
網膜芽細胞腫関連タンパク質 HEC	AF017790	NM_006101	配列番号 259	配列番号 260
LIM ドメイン結合タンパク質 (LDB1)	AF052389	NM_001290	配列番号 261	配列番号 262
二重特異性ホスファターゼ 5	U15932	NM_004419	配列番号 263	配列番号 264
ヒト cDNA 3', mRNA 配列	AI557322			配列番号 265
モノアミノオキシダーゼ A (MAOA)	M68840	NM_000240	配列番号 266	配列番号 267
モノアミノオキシダーゼ A	AA420624	NM_000240	重複	
NECDIN 関連タンパク質	U35139	NM_002487	配列番号 268	配列番号 269
調節溶質担体タンパク質, ファミリー1, メンバー1	X82877	NM_006511	配列番号 270	配列番号 271
TTK タンパク質キナーゼ	M86699	NM_003318	配列番号 272	配列番号 273
Fms 関連チロシンキナーゼ 4, VEGFR-3	X69878	NM_002020	配列番号 274	配列番号 275
TSC403, リソソーム関連膜糖タンパク質類似体	AB013924	NM_014398	配列番号 276	配列番号 277
HMG-2	X62534		配列番号 278	配列番号 279
ヒトクローン 24416 mRNA 配列	AF052159		配列番号 280	配列番号 281

10

20

30

40

カルシトニン受容体様	L76380	NM_005795	配列番号 282	配列番号 283
KIAA0582 タンパク質	AI761647	NM_015147	配列番号 284	配列番号 285
cDNA DKFZp434B102(クローン DKFZp434B102 由来)	AL080192			配列番号 286
cDNA DKFZp586G1922(クローン DKFZp586G1922 由来)	AL080110		配列番号 287	配列番号 287
アシル CoA シンテターゼ 3	D89053	NM_004457	配列番号 288	配列番号 289
脂肪酸コエンザイム A リガーゼ, 長鎖 3	AA977580	NM_004457	重複	
STAT 誘導性 STAT 阻害剤 -2	AF037989		配列番号 290	配列番号 291
ホメオティックタンパク質 Hox5.4	HG3502-HT3696			配列番号 292
仮定タンパク質 FLJ13910, cDNA DKFZp586M141(クローン DKFZp586M141 由来)	AL050139	NM_022780	配列番号 293	配列番号 294
cDNA DKFZp586N012(クローン DKFZp586N012 由来)	AL049471			配列番号 295
UbcH10, ユビキチン担体タンパク質 E2-C	U73379	NM_007019	配列番号 296	配列番号 297
サイクリン依存性キナーゼ阻害剤 3, タンパク質チロシンホスファターゼ(CIP2)	L25876	NM_005192	配列番号 298	配列番号 299
グリコーゲンホスホリラーゼ (PYGL)	AF046798		配列番号 300	配列番号 301
アンギオポイエチン-2	AF004327	NM_001147	配列番号 302	配列番号 303
アンギオポイエチン-2	AF004327	NM_001147	重複	重複
フォークヘッドボックス M1	U74612	NM_021953	配列番号 304	配列番号 305
潜在的プレニル化タンパク質チロシンホスファターゼ hPRL-3	AF041434	NM_007079	配列番号 306	配列番号 307
RAB31, Rab サブファミリーの低 Mr GTP 結合タンパク質	U59877	NM_006868	配列番号 308	配列番号 309
RAB31, メンバー RAS 癌遺伝子 ファミリー	AI189226	NM_006868		
ミオシン VIIA	U39226	NM_000260	配列番号 310	配列番号 311

10

20

30

40

Grb2 関連バインダー-1, IRS-1 関連ドッキングタンパク質	U43885	NM_002039	配列番号 312	配列番号 313
ラミン B1	L37747		配列番号 314	配列番号 315
ミニ染色体維持欠陥 (mis5, 分裂酵母 (S. pombe)) 6 HsMcm6	D84557	NM_005915	配列番号 316	配列番号 317
サイクリン B1	M25753			配列番号 318
サイクリン B1	M25753		重複	重複
RTP, N-myc 下流調節	D87953	NM_006096	配列番号 319	配列番号 320
α 2,3-シアリルトランスフェラーゼ	AB022918	NM_006100	配列番号 321	配列番号 322
ADP-リボシル化因子様タンパク質 4	U73960	NM_005738	配列番号 323	配列番号 324
セントロメアタンパク質 F (350/400kD, マイトシン)	U30872	NM_016343	配列番号 325	配列番号 326
両親発現遺伝子 10, KIAA1051	AB028974	NM_015068	配列番号 327	配列番号 328
チューブリン, α 1 (精巣特異的)	X06956		配列番号 329	配列番号 330
KIAA0101	D14657	NM_014736	配列番号 331	配列番号 332
KIAA0128, セブチン 2	D50918		配列番号 333	配列番号 334
タンパク質ホスファターゼ 2, 調節サブユニット B (B56), γ	Z69030	NM_002719	配列番号 335	配列番号 336
デオキシシチジンキナーゼ	M60527	NM_000788	配列番号 337	配列番号 338
インテグリン β 3 結合タンパク質 (β 3-エンドネキシン)	U37139	NM_014288	配列番号 339	配列番号 340
TAL1(SCL) 遮断遺伝子座	M74558	NM_003035	配列番号 341	配列番号 342
KIAA0666	AB014566		配列番号 343	配列番号 344
CAMP 特異的ホスホジエステラーゼ 8A, PDE8A1	AF056490		配列番号 345	配列番号 346
有糸分裂チェックポイントキナーゼ Mad3L (MAD3L), BUB1B	AF053306	NM_001211	配列番号 347	配列番号 348
リボソーム S6 キナーゼ	X85106	NM_021135	配列番号 349	配列番号 350
HPTP ϵ (タンパク質チロシンホスファターゼ ϵ)	X54134	NM_006504	配列番号 351	配列番号 352

10

20

30

40

Lyn チロシンキナーゼ, v-yes-1 Yamaguchi 肉腫ウイルス関連癌遺伝子ホモログ	M79321	NM_002350	配列番号 353	配列番号 354
lyn チロシンキナーゼ, v-yes-1 Yamaguchi 肉腫ウイルス関連癌遺伝子ホモログ	M16038	NM_002350	重複	
lyn チロシンキナーゼ	M16038	NM_002350	重複	
Brachyury 変異体 A(TBX1), T ボックス 1 転写因子	AF012130	NM_005992	配列番号 355	配列番号 356
モノクローナル抗体 Ki-67 の抗原の mki67a mRNA(長いタイプ)	X65550	NM_002417	配列番号 357	配列番号 358
タンパク質チロシンホスファターゼ受容体 pi(PTPRP)	U81561	NM_002847	配列番号 359	配列番号 360
cbl-b	U26710	NM_004351	配列番号 361	配列番号 362
サイクリン A2	X51688	NM_001237	配列番号 363	配列番号 364
ヌクレオシドホスホリラーゼ	X00737	NM_000270	配列番号 365	配列番号 366
TNF 関連アポトーシス誘導リガンド TRAIL	U37518	NM_003810	配列番号 367	配列番号 368
ホスホジエステラーゼ 4B, cAMP 特異的	L20971	NM_002600	配列番号 369	配列番号 370
ニドゲン(エナクチン)	M30269	NM_002508	配列番号 371	配列番号 372
HYA22 タンパク質	D88153	NM_005808	配列番号 373	配列番号 374
ホスファチジン酸ホスファターゼ 2A 型	AF014402	NM_003711	配列番号 375	配列番号 376
KIAA0512, ALEX2	AB011084	NM_014782	配列番号 377	配列番号 378
トロンボキサン A2 受容体	D38081	NM_001060	配列番号 379	配列番号 380
トレフォイル因子 3(腸管)	AI985964	NM_003226	配列番号 381	配列番号 382
G-2 期および S 期発現物 1	AL031588	NM_016426	配列番号 383	配列番号 384
ADP-リボシルトランスフェラーゼ(NAD ⁺ ; ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ)様 2	AJ236876	NM_005484	配列番号 385	配列番号 386
セリン/トレオニンキナーゼ 12	AF015254	NM_004217	配列番号 387	配列番号 388

10

20

30

40

チューブリン, α 1, イソ型 44	HG2259-HT2348		重複	
ラミン B 受容体	L25931	NM_002296	配列番号 389	配列番号 390
KIAA0429	AB007889	NM_014751	配列番号 391	配列番号 392
転写因子 4	M74719	NM_003199	配列番号 393	配列番号 394
シンデカン 3(N-シンデカン), KIAA0468	AB007937	NM_014654	配列番号 395	配列番号 396
RECK タンパク質前駆体	AA099265	NM_021111	配列番号 397	配列番号 398
推定前立腺癌腫瘍抑制因子	U42349	NM_006765	配列番号 399	配列番号 400
タンパク質ホスファターゼ 1, 調節(阻害剤)サブユニット	AB020630		配列番号 401	配列番号 402
PDZ および LIM ドメイン 1(エルフィン)	U90878	NM_020992	配列番号 403	配列番号 404
クローン 643 由来の仮定タンパク質	AF091087	NM_020467	配列番号 405	配列番号 406
p53 により調節を受ける DDA3	AA926959			配列番号 407
KIAA0062	D31887		配列番号 408	配列番号 409
中鎖アシル CoA デヒドロゲナーゼ	M91432		配列番号 410	配列番号 411
ギャップジャンクションタンパク質, α 1, 43kD(コネキシン 43)	M65188	NM_000165	配列番号 412	配列番号 413
MyoD ファミリー阻害剤	U78313	NM_005586	配列番号 414	配列番号 415
エンド/エキソヌクレアーゼ Mre11 (MRE11A)	AF073362	NM_005591	配列番号 416	配列番号 417
核受容体サブファミリー-2, グループ F, メンバー1	X16155	NM_005654	配列番号 418	配列番号 419

10

20

30

【 0 2 7 1 】

【表 15】

表 15

表 4 の配列についての配列対照表

	受託番号		アミノ酸 配列番号	ヌクレオチド配 列番号
p27 mRNA, インターフ ェロン α 誘導 タンパ ク質 27	X67325	NM_005532	420	421
リボヌクレアーゼ A (RN アーゼ A), 膵臓	D26129	NM_002933	422	423
造血系神経膜タンパ ク質 (HNMP-1)	U87947	NM_001425	424	425
N-カドヘリン	M34064	NM_001792	426	427
N-カドヘリン	M34064	NM_001792	重複	
インターロイキン 8 (IL8)	M28130	NM_000584	428	429
インターロイキン 8, β -トロンボグロブリン 様タンパク質前駆 体	M17017	NM_000584	430	431
チロシンキナーゼ受 容体 (axl)	M76125	NM_001699	432	433
	HG162-HT3165		重複	
細胞表面糖タンパク 質 CD44 (CD44)	L05424		434	435
細胞接着分子 (CD44)	M59040	NM_000610	重複	
ヒアルロン酸受容体 (CD44)	L05424		重複	
血管内皮細胞増殖因 子関連タンパク質 VRP, VEGF-C	U43142	NM_005429	436	437
血管内皮細胞増殖因 子 C	X94216	NM_005429	重複	
コラーゲン XIII 型, $\alpha 1$ (=COL4A2)	M33653	NM_005203	438	439
コラーゲン XIII 型, $\alpha -1$	M59217	NM_005203	重複	
コラーゲン $\alpha -2$ I 型	K01079			440
コラーゲン $\alpha -2$ I 型	K01079		重複	
コラーゲン, I 型, α 2	V00503	NM_000089	重複	
プロテオグリカン 1	X17042	NM_002727	441	442

10

20

30

40

ホスホリパーゼ A2, IVA 群, カルシウム依存性リン脂質結合タンパク質 (PLA2)	M72393		443	444
炭水化物 (ケラタン硫酸 Gal-6) スルホトランスフェラーゼ	AB003791	NM_003654	445	446
トロポミオシン 2 (β), 繊維芽細胞トロポミオシン	M12125	NM_003289	447	448
コンドロイチン硫酸プロテオグリカン 2 (パーシカン)	X15998	NM_004385	449	450
コンドロイチン硫酸プロテオグリカン 2 (パーシカン)	X15998	NM_004385	重複	
ラテントトランスフォーミング増殖因子 β 結合タンパク質 (LTBP-2)	Z37976	NM_000428	451	452
インターロイキン 6 (インターフェロン, $\beta 2$)	X04430	NM_000600	453	454
骨形態形成タンパク質-4 (hBMP-4)	U43842	NM_001202	455	456
骨形態形成タンパク質 2B, BMP-4	M22490	NM_001202	重複	
サルコレクチン, ケラチン 7	AJ238246	NM_005556	457	458
神経細胞接着分子, KIAA0343	AB002341	NM_005010	459	460
神経細胞接着分子, hBRAVO/Nr-CAM 前駆体	U55258	NM_005010	重複	
マトリックスメタロプロテイナーゼ 1 (間質コラーゲナーゼ), 皮膚コラーゲナーゼ	M13509	NM_002421	461	462
幹細胞因子, KIT リガンド	M59964	NM_000899	463	464
UPA	X02419	NM_002658	465	466
プラスミノゲン活性化因子阻害剤-1	J03764	NM_000602	467	468
プラスミノゲン活性化因子阻害剤 1	M14083	NM_000602	重複	

10

20

30

40

セレクトイン P, CD62, 顆粒膜タンパク質 -140 (GMP-140) 前駆 体	M25322	NM_003005	469	470
ラトロフィリン-2	AJ131581	NM_012302	471	472
アクチン, $\alpha 2$	X13839	NM_001613	473	474
繊維芽細胞活性化タ ンパク質, α	U09278	NM_004460	475	476
Gタンパク質シグナル 伝達 20 のレギュレー ター	AF060877	NM_003702	477	478
IGF-II mRNA 結合タン パク質 3	U97188	NM_006547	479	480
網膜 cDNA ランダムプ ライムサブライブラ リー, EST	W28438			481
脳酸可溶タンパク質 1, 神経組織に豊富な 酸性タンパク質 (NAP-22)	AF039656	NM_006317	482	483
プロフィリン 2	AL096719	NM_002628	484	485
プロフィリン 2	<i>L10678</i>	<i>NM_002628</i>	重複	
Na,K-ATP アーゼ β -1 サブユニット	U16799	NM_001677	486	487
クラウジン-7	AJ011497	NM_001307	488	489
正常歯肉	U51712			490
ディスインテグリン およびメタロプロテ イナーゼドメイン 23	AB009672	NM_003812	491	492
$\alpha 1$ (VIII) コラーゲ ンの COL8A1 mRNA	X57527	NM_001850	493	494
転写 6 のシグナル変 換因子および活性化 因子 (STAT6)	AF067575		495	496
転写因子 <i>IL-4 Stat</i> , <i>STAT6</i>	<i>U16031</i>	<i>NM_003153</i>	重複	
リボコルチン-III, アネキシン A3	M20560	NM_005139	497	498
細胞間接着分子 1 (CD54), ライノウイ ルス主要群受容体前 駆体	M24283	NM_000201	499	500

10

20

30

40

溶質担体ファミリー1 (神経/上皮高親和性 グルタミン酸トラン スポーター, Xag 系)	U08989	NM_004170	501	502
溶質担体ファミリー1 (神経/上皮高親和性 グルタミン酸トラン スポーター, Xag 系)	A1928365	NM_004170	重複	
p53 誘導タンパク質	L47738		503	504
ジヒドロピリミジン デヒドロゲナーゼ, DPYD	U20938	NM_000110	505	506
ナチュラルキラー細 胞 転写物 4	AA631972	NM_004221	507	508
PFTAIRE タンパク質キ ナーゼ 1, KIAA0834	AB020641	NM_012395	509	510
RGP4, G タンパク質シ グナル伝達 4 のレギ ュレーター	U27768	NM_005613	511	512
G タンパク質シグナル 伝達 4 のレギュレー ター	A1267373	NM_005613	重複	
癌遺伝子 Aml1-Evi-1, 融合活性化	HG4058-HT432 8		513	514
癌 遺 伝 子 Aml1-Evi-1, 融合活 性化	HG4058-HT432 8		重複	
アデニリルシクラー ゼ関連タンパク質 2	N90755	NM_006366	515	516
クラスτεリン (補体 溶解阻害剤, SP-40,40, 硫化糖タ ンパク質 2, アポリポ タンパク質 J)	M25915	NM_001831	517	518
ADP リボシル化因子様 7	AB016811	NM_005737	519	520
H 因子 (補体) 様 1	M65292	NM_002113	521	522
RNA ヘリカーゼ関連タ ンパク質, メタロチ オネイン-If	H68340	NM_007372	523	524
刺激されたトランス 作用因子 (50kDa) Staf50	X82200	NM_006074	525	526
シクロオキシゲナー ゼ-2 (hCox-2)	U04636	NM_000963	527	528

10

20

30

40

GRO1 癌遺伝子, メラ ノーマ増殖刺激活性 化 (MGSA)	X54489	NM_001511	529	530
NRGN, ニューログラ ニン	X99076	NM_006176	531	532
マウス dkk-1 のホモ ログ	AB020315		533	534
胃腸管腫瘍関連抗原 GA733-1, 腫瘍関連カ ルシウムシグナル変 換因子 2	J04152	NM_002353	535	536
ラミニン	Z15008	NM_005562	537	538
トランスゲリン, 22kDa 平滑筋 タンパ ク質 (SM22)	M95787	NM_003186	539	540
単球分泌タンパク質 をコードする JE 遺伝 子	M28225		541	542
ジンクフィンガータ ンパク質 238, RP58	AJ223321	NM_006352	543	544
カテプシン C	X87212	NM_001814	545	546
組織プラスミノーゲ ン活性化因子 (t-PA)	M15518	NM_000930	547	548
sushi-リピートタン パク質	AF060567	NM_014467	549	550
アネキシン A6	D00510	NM_001155	551	552
エフリン B1	U09303	NM_004429	553	554
エフリン B1	U09303	NM_004429	重複	
TFEC イソ型 (転写因 子 EC)	D43945	NM_012252	555	556
小型誘導サイトカイン A2, (単球遊走因子 1)	M26683	NM_002982	557	558
小型誘導 サイトカイン A2 (単球遊走因子 1)	M26683	NM_002982	重複	
内皮細胞タンパク質 C/APC 受容体 (EPCR)	L35545	NM_006404	559	560
トランスグルタミナ ーゼ 2 (Tgase)	M55153	NM_004613	561	562
トランスグルタミナ ーゼ (TGase)	M55153	NM_004613	重複	

10

20

30

40

ヒトメタロチオネイン-If	M10943		563	564
トランスフォーミング増殖因子 β -誘導型 (BIGH3)	M77349	NM_000358	565	566
ニューロン特異的 (γ)エノラーゼの ENO2 遺伝子	X51956		567	568
FAT 腫瘍抑制因子 (Drosophila) ホモログ	X87241	NM_005245	569	570
悪性細胞発現により促進される遺伝子/腫瘍進行により促進される遺伝子	S82470	NM_024298	571	572
悪性細胞発現により促進される遺伝子/腫瘍進行により促進される遺伝子	S82470	NM_024298	重複	574
cDNA DKFZp566G0746 (クローン DKFZp566G0746 由来)	AL050078			575
リシルオキシダーゼ様 2	U89942	NM_002318	576	577
Ras 関連 C3 ボツリヌス菌毒素基質 2 (rhoファミリー, 小GTP結合タンパク質 Rac2)	M64595	NM_002872	578	579
内皮白血球接着分子 1 (ELAM-1), セレクチン E	M24736	NM_000450	580	581
ラミニン, $\alpha 5$, KIAA0533	AB011105		582	583
胎盤増殖因子 (PlGF)	X54936	NM_002632	584	585
染色体 1q 由来の ALL1 融合遺伝子, AF1q	U16954	NM_006818	586	587
ストロメリシン-2, MMP-10	X07820	NM_002425	588	589
メタロチオネイン-I-A	K01383		590	591
コラーゲン VI α -1	X15880		592	593
mad タンパク質ホモログ (hMAD-3)	U68019	NM_005902	594	595
mad タンパク質ホモログ (hMAD-3)	U68019	NM_005902	重複	

10

20

30

40

<i>mad</i> タンパク質ホモログ (<i>hMAD-3</i>)	U68019	NM_005902	重複	
内在性膜タンパク質 2A	AL021786			596
インターロイキン 1 受容体様 1	D12763	NM_003856	597	598
高移動度群 (非ヒストン染色体) タンパク質イソ型 I-C (HMG1-C)	X92518		599	600
上皮増殖因子受容体キナーゼ基質 (Eps8)	U12535	NM_004447	601	602
乳酸デヒドロゲナーゼ B	X13794	NM_002300	603	604
未知の産物の mRNA	D29810		605	606
仮定タンパク質 DKFZp564D0462	AL033377			607
リシルヒドロキシラーゼイソ型 2 (PLOD2)	U84573	NM_000935	608	609
フォリスタチン様 3, フォリスタチン関連タンパク質 (FLRG)	U76702	NM_005860	610	611
ヒトクローン 24674 mRNA 配列	AF070578			612
L-イジトール-2 デヒドロゲナーゼ	L29254		613	614
ニューロンペントラキシン 1	U61849	NM_002522	615	616
クローン s 23549 および 23762 由来の仮定タンパク質	U90908	NM_021226	617	618
UDP-N-アセチルグルコサミンピロホスホリラーゼ	AB011004	NM_003115	619	620
ジンクフィンガータンパク質 185 (LIM ドメイン)	Y09538	NM_007150	621	622
4つ半の LIM ドメイン 2, 心臓タンパク質 (FHL-2)	U29332	NM_001450	623	624
マイトジェン活性化タンパク質 キナーゼ活性化タンパク質キナーゼ 3, MAPKAP キナーゼ (3pK)	U09578	NM_004635	625	626
メタロチオネイン 1E (機能的)	R92331			627

10

20

30

40

TU3A タンパク質	AF035283	NM_007177	628	629
メタロチオネイン 1H	R93527	NM_005951	630	631
グアニル酸結合タンパク質イソ型 II (GBP-2)	M55543	NM_004120	632	633
可溶性血管内皮細胞増殖因子受容体 1 (sVEGFR-1)	U01134	NM_002019	634	635
R-Ras	M14949		636	637
<i>R-ras</i>	<i>M14949</i>		638	639
クレアチントランスポーター (SLC6A8), 溶質担体ファミリー 6, メンバー8	U36341	NM_005629	640	641
myb1 (ニワトリ) ホモログの標的, ヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1)	Z82244	NM_005488	642	643
プロコラーゲン-リシン, 2-オキソグルタル酸 5-ジオキシゲナーゼ, リシルヒドロキシラーゼ (PLOD)	L06419	NM_000302	644	645
KIAA0836	AB020643		646	647
cDNA DKFZp434C171 (クローン DKFZp434C171 由来)	AL080169		648	649
インターロイキン 4 受容体の IL-4-R mRNA	X52425	NM_000418	650	651
ケモカイン (C-Cモチーフ) 受容体様 2 (CCRL2), ケモカイン受容体 X (CKRX)	AF014958	NM_003965	652	653
ホスホリパーゼ C, β 3 (ホスファチジルイノシトール特異的)	Z16411	NM_000932	654	655
LIMドメインタンパク質	X93510	NM_003687	656	657
タンパク質キナーゼ (cAMP 依存性, 触媒的) 阻害剤 β	M34181	NM_002731	658	659
rho GDP 解離阻害剤 2	X69549	NM_001175	660	661
KIAA0975, イミダゾリン受容体候補	AB023192	NM_007184	662	663

10

20

30

40

ポリオウイルス受容体	X64116	NM_006505	664	665
ポリオウイルス受容体	X64116	NM_006505	重複	
前初期応答 3	S81914	NM_003897	666	667
メタロチオネイン 2A	AI547258	NM_005953	668	669
トロポミオシン 1 (α)	M19267	NM_000366	670	671
トロポミオシン 1 (α)	Z24727	NM_000366	重複	
トロポミオシン 1 (α)	M19267	NM_000366	重複	
TRAM 様タンパク質	D31762	NM_012288	672	673
E3 ユビキチンリガーゼ SMURF2	AA630312	NM_022739	674	675
EGF 含有フィブリン様細胞外マトリックスタンパク質 1	U03877	NM_004105	676	677
Gタンパク質結合受容体 56	AJ011001	NM_005682	678	679
c-jun プロト癌遺伝子 (JUN)	J04111	NM_002228	680	681
Gタンパク質シグナル伝達 10 レギュレーター, RGS10	AF045229	NM_002925	682	683
アミロイド β (A β) 前駆体タンパク質結合, ファミリーB, メンバー2 (Fe65 様)	U62325		684	685
Ras 関連 rho タンパク質	M12174	NM_004040	686	687
プロテアソーム(プロソーム, マクロペイン) 26S サブユニット, 非 ATP アーゼ, 10	AL031177	NM_002814	688	689
KIAA0537	AB011109	NM_014840	690	691
リソソーム関連膜タンパク質-2	X77196	NM_002294	692	693
リン脂質転移タンパク質	L26232	NM_006227	694	695
N-ミリストイルトランスフェラーゼ 2	AF043325	NM_004808	696	697
ホスホフルクトキナーゼ (PFKM)	U24183	NM_000289	698	699

10

20

30

40

インテグリン, $\beta 4$	X53587	NM_000213	700	701
ロイパキシン	AF062075	NM_004811	702	703
エンドセリン変換酵素1	Z35307	NM_001397	704	705
野生型 p53 活性化断片-1 (WAF1), サイクリン依存性キナーゼ阻害剤1A (p21, Cip1)	U03106	NM_000389	706	707
ICAM-2, LFA-1 の細胞接着リガンド	X15606	NM_000873	708	709
ICAM-2, LFA-1 の細胞接着リガンド	X15606	NM_000873	重複	
細胞間接着分子 2 (ICAM-2)	M32334		710	711
真核生物翻訳開始因子2B, eIF-2B β サブユニット	AF035280	NM_014239	712	713
ウリジンホスホリラーゼ	X90858	NM_003364	714	715
インテグリン, $\beta 5$	X53002	NM_002213	716	717
N-スルホグルコサミンスルホヒドロラーゼ (スルファミダーゼ)	U30894	NM_000199	718	719
シナプトジャニン 2	AF039945		720	721
メタロチオネイン 1L	AA224832	NM_002450	722	723
マクロファージキャッピングタンパク質, ゲルソリン様	M94345	NM_001747	724	725
HSPC022 タンパク質	W68830	NM_014029	726	727
ヒトクローン 137308 mRNA, 部分的 cds	AW006742		no	728
プロトカドヘリン 42, PC42, プロトカドヘリン 1 (カドヘリン様 1)	L11370	NM_002587	729	730
キャスパーゼ様アポトーシス調節タンパク質 2 (CLARP2)	AF005775	NM_003879	731	732
キャスパーゼ様アポトーシス調節タンパク質 2 (CLARP2)	AF005775	NM_003879	重複	

10

20

30

40

腫瘍 vault タンパク質, lrp	X79882	NM_005115	733	734
Fanconi 貧血, 補足群 G	AC004472	NM_004629	735	736
プリオンタンパク質 (PrP)	U29185	NM_000311	737	738
インターフェロン刺激タンパク質, 15 kDa	AA203213	NM_005101	739	740
セリン(またはシステイン) プロテイナーゼ阻害剤, clade B (阿保アルブミン), 細胞質アンチプロテイナーゼ 2 (CAP2)	L40377	NM_002640	741	742
バイグリカン	J04599	NM_001711	743	744
ケモカイン (C-X-C モチーフ), 受容体 4 (フウシン)	L06797	NM_003467	745	746
ユビキチンカルボキシル末端エステラーゼ L1 (ユビキチンチオールエステラーゼ)	X04741	NM_004181	747	748
KIAA0469	AB007938	NM_014851	749	750
TNF (リガンド) スーパーファミリー, メンバー 4 (tax 転写活性化糖タンパク質 1, 34kD)	AL022310	NM_003326	751	752
KIAA1053	AB028976		753	754
NAD(P)H-キノンオキシレダクターゼ	M81600		755	756
sushi-リピート含有タンパク質	U61374	NM_006307	757	758
インテグリン, $\alpha 5$	X06256	NM_002205	759	760
エニグマ (LIM ドメインタンパク質)	L35240	NM_005451	761	762
エクトヌクレオシド三リン酸 1 ジホスホヒドロラーゼ 1	AJ133133	NM_001776	763	764
トランスフォーミング増殖因子- β (tgf- β), 骨形態形成タンパク質 6	M60315	NM_001718	765	766

10

20

30

40

トランスフォーミング増殖因子- β (<i>tgf-β</i>), 骨形態形成タンパク質6	M60315	NM_001718	重複	
ニコチンアミド N-メチルトランスフェラーゼ, NNMT	U08021	NM_006169	767	768
cDNA DKFZp564J0323 (クローン DKFZp564J0323由来)	AL049957		no	769
チオレドキシシンレダクターゼ β	AB019694	NM_006440	770	771
fボックスおよびロイシン豊富リピートタンパク質2	AL049953		772	773
トランスコバラミン II (TCN2)	L02648	NM_000355	774	775
アルデヒドデヒドロゲナーゼ2, ミトコンドリア	X05409	NM_000690	776	777
GTP 結合タンパク質 ragB	X90530	NM_006064	778	779
リンパ球抗原 75	AF011333	NM_002349	780	781
GM2 活性化因子タンパク質	X62078		782	783
3 型イノシトール 1,4,5-三リン酸受容体 (ITPR3)	U01062	NM_002224	784	785
KIAA0284	AI828210		no	786
メタロチオネイン I-B	M13485		787	788
BTG2	U72649	NM_006763	789	790
アデニル酸キナーゼ1	J04809	NM_000476	791	792
腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー, メンバー 12, WSL-LR, WSL-S1 および WSL-S2 タンパク質	Y09392	NM_003790	793	794
アミノペプチオダーゼ N/CD13	M22324	NM_001150	795	796
成長停止および DNA 傷害誘導タンパク質 (gadd45)	M60974	NM_001924	797	798
KIAA0638 タンパク質	AB014538		799	800
ピンキュリン	M33308	NM_003373	801	802

10

20

30

40

プロコラーゲン-プロリン, 2-オキソグルタル酸 4-ジオキシゲナーゼ (プロリン 4-ヒドロキシラーゼ), α ポリペプチド II	U90441	NM_004199	803	804
msg1 関連遺伝子 1 (msg1), Cbp/p300 相互作用トランス活性化因子	U65093	NM_006079	805	806
ミクロソームグルタチオン S-トランスフェラーゼ 3	AF026977	NM_004528	807	808
ビタミン A 応答性; 細胞骨格関連	AF070523	NM_006407	809	810
17-kDa タンパク質, インターフェロン刺激タンパク質, 15 kDa	M13755	NM_005101	811	812
マトリックスメタロプロテイナーゼ 14 (膜挿入型)	X83535	NM_004995	813	814
4F2 細胞表面抗原, 溶質担体ファミリー3, メンバー2	J02939	NM_002394	815	816
メタロチオネイン -III	M93311	NM_005954	817	818
タンパク質キナーゼ (cAMP 依存性, 触媒的) 阻害剤 α	S76965	NM_006823	819	820
タンパク質キナーゼ (cAMP 依存性, 触媒的) 阻害剤 α	S76965	NM_006823	重複	
レチキュロカルビン 1, EF 腕カルシウム結合ドメイン	D42073	NM_002901	821	822
リピン 1, KIAA0188	D80010		823	824
プロテアーゼ, セリン, 23	AF015287	NM_007173	825	826
hect ドメインおよび RLD 2	AF041080	NM_004667	827	828
GATA 結合タンパク質 (GATA2)	M68891	NM_002050	829	830
アグリン前駆体	AF016903		831	832
核酸型ヌクレオシドトランスポーター1 (hENT1)	U81375	NM_004955	833	834

10

20

30

40

コロニン, アクチン結合タンパク質 2B, KIAA0925	AB023142		835	836
f ボックスおよびWD-40ドメインタンパク質 3	U07000	NM_012165	837	838
無症候性聴覚障害タンパク質 (DFNA5)	AF073308	NM_004403	839	840
アクチンフィラメント関連タンパク質	D25248	NM_021638	841	842
TNFR 関連細胞死受容体-6 (DR6)	AF068868	NM_014452	843	844
血清/グルココルチコイド調節キナーゼ	Y10032	NM_005627	845	846
DN アーゼ X	X90392	NM_006730	847	848
<i>DN</i> アーゼ X	<i>X90392</i>	<i>NM_006730</i>	重複	
脂肪酸デサチュラーゼ 3	AC004770	NM_021727	849	850
LYL-1	M22637		851	852
ATP 結合カセット, サブファミリー C (CFTR/MRP), メンバー 1	X78338	NM_004996	853	854
トランスメンブランタンパク質 (CD59)	M84349		855	856
Fms 関連チロシンキナーゼ 1, VEGFR-1	S77812		857	858
仮定タンパク質 FLJ23403	AI681538	NM_022068	859	860
仮定タンパク質 FLJ20898	AI733570	NM_024600	861	862

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

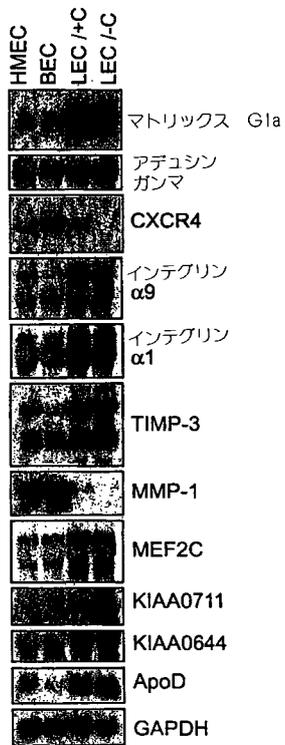
【0272】

【図1】LECおよびBECにおいて示差的に発現された遺伝子の例。指定転写物のノーザンブロットングおよびハイブリダイゼーション。GAPDHのプロービングにより同等のローディングであることが確認された。マイクロアレイ解析では、VEGF-C (LEC/+C)の存在下で培養したLECからRNAを抽出した。アレイの結果を立証する場合には、VEGF-Cを添加していないLECの培養物 (LEC/-C) から対照としてRNAを抽出した。

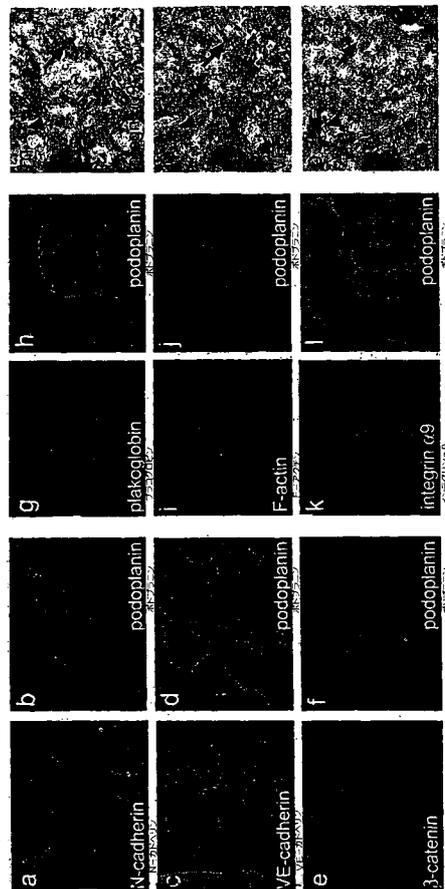
【図2】BECおよびLECにおける細胞骨格構造、カドヘリン複合体およびインテグリン 9の発現。LECおよびBECの混合培養物を、N-カドヘリン (a)、VE-カドヘリン (c)、 α -カテニン (e)、プラコグロビン (g)、F-アクチン (i) およびインテグリン 9 (k)、ならびにLECに特異的なマーカー、ポドプラニン (緑色; b、d、f、h、j、l) について二重染色した。インテグリン 9はリンパ管内皮細胞では発現している (矢) が、血管内皮細胞では発現していない (矢の根)。ヒト皮膚の近接する切片をインテグリン 9 (m)、VEGFR-3 (n) または血管内皮細胞抗原 PA

L - E (o) に対する抗体で染色した。

【 図 1 】



【 図 2 】



【配列表】

2005536186000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成16年11月8日(2004.11.8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

血管内皮細胞(BEC)またはリンパ管内皮細胞(LEC)の増殖または分化を示差的に調節する方法であって、

内皮細胞を、血管またはリンパ管内皮細胞を示差的に調節する薬剤を含んでなる組成物と接触させることを含んでなり、

該薬剤が、

(a) BECポリペプチドもしくはLECポリペプチドのアミノ酸配列を含んでなる、ポリペプチド、または該ポリペプチドの活性断片；

(b) (a)のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる、ポリヌクレオチド；

(c) (a)のポリペプチドと特異的に結合する、抗体；

(d) (c)の抗体のフラグメントを含んでなる、ポリペプチド(ここで、このフラグメントおよび抗体は該ポリペプチドと結合する)；

(e) (a)のポリペプチドをコードするヒト遺伝子またはmRNAに対する、アンチセンス核酸；

(f) (a)のポリペプチドをコードするヒト遺伝子またはmRNAに対する、干渉RNA(RNAi)

からなる群より選択される、方法。

【請求項2】

内皮細胞が組成物とex vivoで接触される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

組成物が、医薬上許容される希釈剤、アジュバント、または担体を含んでなり、かつ、接触工程が、哺乳類被験体に組成物を投与して、哺乳類被験体においてBECまたはLECを示差的に調節することを含んでなる、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

LECの過剰増殖を特徴とする疾患を有するヒト被験者を同定し；かつ

そのヒト被験者に組成物を投与し、ここで、この薬剤はBECの増殖と比べてLECの増殖を示差的に阻害する

ことを含んでなる、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

LECの過剰増殖を特徴とする疾患を有するヒト被験者を同定し；

被験者のLECをスクリーニングして、表3に示されるポリペプチドの過剰発現を同定し；かつ

そのヒト被験者に組成物を投与し、ここで、この薬剤は、スクリーニング工程によって同定されたポリペプチドの発現を阻害することにより、BECの増殖と比べてLECの増殖を示差的に阻害する

ことを含んでなる、請求項3に記載の方法。

【請求項6】

ヒト被験者においてリンパ管内皮細胞の増殖を調節する、請求項3に記載の方法であって、

過少増殖性のリンパ管疾患を有するヒト被験者を同定し；

被験者をスクリーニングして、表 3 に示される L E C ポリペプチド（該タンパク質は表 1 または 2 に示されるものではない）の発現不足または活性不足を同定し；

そのヒト被験者に組成物を投与する（ここで、この薬剤はスクリーニング工程によって同定された L E C ポリペプチド（ a ））、もしくは該ポリペプチドの活性断片を含んでなるか、またはそのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド（ b ）を含んでなる）

ことを含んでなる、方法。

【請求項 7】

血管内皮細胞（ B E C ）またはリンパ管内皮細胞（ L E C ）の増殖または分化を示差的に調節するための薬物の製造を目的とした薬剤の使用であって、

該薬剤が、

（ a ） B E C ポリペプチドもしくは L E C ポリペプチドのアミノ酸配列を含んでなる、ポリペプチド、または該ポリペプチドの活性断片；

（ b ）（ a ）のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる、ポリヌクレオチド；

（ c ）（ a ）のポリペプチドと特異的に結合する、抗体；

（ d ）（ c ）の抗体のフラグメントを含んでなる、ポリペプチド（ここで、このフラグメントおよび抗体は該ポリペプチドと結合する）；

（ e ）（ a ）のポリペプチドをコードするヒト遺伝子または m R N A に対する、アンチセンス核酸；および

（ f ）（ a ）のポリペプチドをコードするヒト遺伝子または m R N A に対する、干渉 R N A（ R N A i ）

からなる群より選択される、使用。

【請求項 8】

ポリペプチドが、表 3 に示される L E C ポリペプチド群から選択される L E C ポリペプチドであり、かつ、薬剤が B E C の増殖または分化よりも L E C の増殖または分化を示差的に調節する、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法または使用。

【請求項 9】

ポリペプチドが、表 4 に示される B E C ポリペプチド群から選択される B E C ポリペプチドであり、かつ、薬剤が L E C の増殖または分化よりも B E C の増殖または分化を示差的に調節する、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法または使用。

【請求項 10】

ポリペプチドが表 1 または 2 に示されるものではない、請求項 8 に記載の方法または使用。

【請求項 11】

L E C ポリペプチドが、配列番号 8 1、1 8 7、2 0 7、2 1 1、2 2 1、2 3 5、2 4 1、2 9 3 および 3 9 1 からなる群より選択されるアミノ酸を含んでなる、請求項 8 に記載の方法または使用。

【請求項 12】

L E C ポリペプチドが、配列番号 3 1 ~ 3 4、4 6 および 4 8 からなる群より選択されるアミノ酸を含んでなる、請求項 8 に記載の方法または使用。

【請求項 13】

薬剤が（ c ）の抗体または（ d ）のポリペプチドを含んでなる、請求項 1 2 に記載の方法または使用。

【請求項 14】

薬剤が（ a ）のポリペプチドの細胞外ドメイン断片、または該細胞外ドメイン断片をコードするポリヌクレオチドを含んでなる、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 15】

薬剤がアンチセンス分子を含んでなる、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法また

は使用。

【請求項 16】

遺伝性リンパ水腫を治療する方法であって、

リンパ水腫を有し、かつ、表 3 に示される L E C タンパク質をコードする遺伝子の少なくとも一つの対立遺伝子における突然変異を有するヒト被験者を同定し、ここで、この突然変異はヒト被験者におけるリンパ水腫と関係があり、ただし、該 L E C タンパク質は V E G F R - 3 ではなく；かつ

該被験者に、V E G F - C ポリペプチド、V E G F - D ポリペプチド、V E G F - C ポリヌクレオチド、および V E G F - D ポリヌクレオチドからなる群より選択されるリンパ増殖剤を含んでなる組成物を投与する

ことを含んでなる、方法。

【請求項 17】

表 3 に示される L E C 遺伝子における突然変異から起こる遺伝性リンパ水腫の治療のための薬物の製造における、V E G F - C ポリペプチド、V E G F - D ポリペプチド、V E G F - C ポリヌクレオチド、および V E G F - D ポリヌクレオチドからなる群より選択されるリンパ増殖剤の使用（ただし、L E C 遺伝子は V E G F R - 3 ではない）。

【請求項 18】

内皮細胞疾患または該疾患に対する疾病素因をスクリーニングする方法であって、

ヒト被験者から内皮細胞 m R N A を含む生体サンプルを得；かつ

B E C または L E C 遺伝子から転写されたサンプル中の m R N A の量から B E C または L E C 遺伝子の発現を測定する（ここで、この B E C または L E C 遺伝子は表 3 または 4 に示されるポリペプチドをコードしてなる）

ことを含んでなる、方法。

【請求項 19】

内皮細胞に対する薬物の効力または毒性をモニタリングする方法であって、

哺乳類被験体に薬物を投与する前および投与した後、その被験体の内皮細胞における少なくとも一つの B E C または L E C 遺伝子の発現を測定する工程（ここで、この少なくとも一つの B E C または L E C 遺伝子は表 3 または表 4 に示されるポリペプチドをコードし、かつ、B E C または L E C 遺伝子の発現の変化は内皮細胞に対する薬物の効力または毒性と相関する）

を含んでなる、方法。

【請求項 20】

内皮細胞の増殖を調節する化合物を同定する方法であって、

化合物の存在下および不在下で内皮細胞を培養し；かつ

その細胞において少なくとも一つの B E C または L E C 遺伝子の発現を測定する（ここで、B E C または L E C 遺伝子は表 3 および表 4 に示されるポリペプチドをコードする遺伝子から選択され、化合物の不在下と比べて存在下での少なくとも一つの B E C 遺伝子の発現に変化があれば、その化合物は B E C 増殖のモジュレーターであると同定され、また化合物の不在下と比べて存在下での少なくとも一つの L E C 遺伝子の発現に変化があれば、その化合物は L E C 増殖のモジュレーターであると同定される）

ことを含んでなる、方法。

【請求項 21】

B E C または L E C の増殖または分化を選択的に調節する化合物をスクリーニングする、請求項 20 に記載の方法であって、

前記測定工程が、細胞において少なくとも一つの B E C 遺伝子および少なくとも一つの L E C 遺伝子の発現を測定することを含んでなり、かつ、

少なくとも一つの L E C 遺伝子の発現に比べて少なくとも一つの B E C 遺伝子の発現を示差的に調節する化合物を選択することにより、B E C または L E C の増殖または分化を選択的に調節する化合物に関してスクリーニングすることを含んでなる、方法。

【請求項 22】

配列番号 31 ~ 44、46、48、50、52、81、187、207、211、221、235、241、293 および 391 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドをコードする核酸配列を含んでなる、単離されたポリヌクレオチドと

、
医薬上許容される希釈剤、担体またはアジュバントとを含んでなる、組成物。

【請求項 23】

配列番号 14 ~ 30、45、47、49、51、82、93、111、188、208、212、222、236、242、294 および 392 からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド、またはそのポリペプチドをコードするその断片を含んでなる、請求項 22 に記載の組成物。

【請求項 24】

配列番号 31 ~ 44、46、48、50、52、81、187、207、211、221、235、241、293 および 391 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドと、機能的に連結された発現制御配列を含んでなる、発現ベクター。

【請求項 25】

該ポリヌクレオチドを含む複製欠陥アデノウイルスまたはアデノ随伴ウイルスである、請求項 24 に記載の発現ベクター。

【請求項 26】

請求項 24 または 25 に記載の発現ベクターと、医薬上許容される希釈剤、担体またはアジュバントとを含んでなる、組成物。

【請求項 27】

哺乳類被験体のリンパ系を調節するために該被験体に組成物を投与するためのプロトコールとともにパッケージングされた、請求項 22、23 または 26 のいずれか一項に記載の組成物を含んでなる、キット。

【請求項 28】

請求項 24 に記載の発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた、宿主細胞。

【請求項 29】

LEC ポリペプチドを生産する方法であって、細胞がポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを発現する条件下で請求項 28 に記載の宿主細胞を増殖させる工程を含んでなる、方法。

【請求項 30】

配列番号 31 ~ 44、46、48、50、52、81、187、207、211、221、235、241、293 および 391 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなる、精製および単離されたポリペプチド。

【請求項 31】

(a) 配列番号 31 ~ 34、46、48、207、676、859 および 861 ;
(b) (a) のアミノ酸配列のうち少なくとも 10 個のアミノ酸からなる細胞外ドメイン断片
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなる、精製および単離されたポリペプチド。

【請求項 32】

配列番号 31 ~ 34、46、48、207、676、859 および 861 からなる群より選択されるアミノ酸配列の細胞外ドメイン断片を含んでなり、ポリペプチドがトランスメンブランドメインを欠いている、請求項 31 に記載の精製および単離された可溶性ポリペプチド。

【請求項 33】

細胞内ドメインを欠いている、請求項 32 に記載のポリペプチド。

【請求項 34】

免疫グロブリン定常領域を含んでなる免疫グロブリン断片と融合した、請求項 32 または 33 に記載のポリペプチドを含んでなる、融合タンパク質。

【請求項 35】

請求項 30 ~ 34 のいずれか一項に記載のポリペプチドまたはタンパク質と、医薬上許容される希釈剤、担体またはアジュバントとを含んでなる、組成物。

【請求項 36】

請求項 35 に記載の組成物と、哺乳類被験体のリンパ系を調節するために該被験体に該医薬組成物を投与するためのプロトコールとを含んでなる、キット。

【請求項 37】

請求項 30 ~ 34 のいずれか一項に記載のポリペプチドと特異的に結合する、抗体。

【請求項 38】

ヒト化抗体である、請求項 37 に記載の抗体。

【請求項 39】

請求項 30 ~ 34 のいずれか一項に記載のポリペプチドと特異的に結合する抗体の抗原結合ドメインを含んでなるタンパク質であって、該ポリペプチドと特異的に結合する、タンパク質。

【請求項 40】

LEC 核酸を同定する方法であって、

(a) 候補 LEC 核酸を含む生体サンプルを、配列番号 1 ~ 30、45、47、49、51、82、93、111、188、208、212、236、242、294 および 392 からなる群より選択される配列の少なくとも 14 の連続するヌクレオチドからなる断片を含んでなるポリヌクレオチド、またはその相補体と、下記のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件：

(i) 50%ホルムアミド、5×SSPE、5×デンハート溶液、0.1%SDS および 0.1mg/ml 変性サケ精子DNA を含有する溶液中、42℃にて20時間のハイブリダイゼーション、および

(ii) 1×SSC、0.1%SDS 中、65℃にて30分間の洗浄の下で接触させ；かつ

(b) 該候補 LEC 核酸と該ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションを検出し、それにより LEC 核酸を同定することを含んでなる、方法。

【請求項 41】

LEC タンパク質を同定する方法であって、

(a) 候補 LEC タンパク質を含む生体サンプルを、請求項 37 に記載の抗体または請求項 39 に記載のタンパク質からなる群より選択される LEC タンパク質結合相手と、それらの間の結合に適した条件下で接触させ；かつ

(b) 該候補 LEC タンパク質と該 LEC 結合相手の間の結合を検出し、それにより LEC タンパク質を同定することを含んでなる、方法。

【請求項 42】

LEC を同定する方法であって、

(a) 細胞を含む生体サンプルを LEC 結合相手と、それらの間の結合に適した条件下で接触させ（ここで、該 LEC 結合相手は配列番号 31 ~ 34、46、48、207、676、859 および 861 からなる群より選択される配列を含んでなるポリペプチドと結合する抗体を含んでなるか、または該抗体の抗原結合フラグメントを含んでなり；かつ

(b) 細胞と LEC 結合相手との間の結合を検出することにより LEC を同定し、ここで、LEC 結合相手と細胞が結合していれば、LEC であると確認されることを含んでなる、方法。

【請求項 43】

遺伝性リンパ水腫の発症リスクをアッセイする方法であって、

(a) 遺伝性リンパ水腫の表現型と関連があり、かつ、ヒト被験者の少なくとも一つの対立遺伝子のコードされているアミノ酸配列が、対応する野生型対立遺伝子によりコードされているポリペプチドのアミノ酸配列と比べた場合に変更されている突然変異に関してヒト被験者の核酸をアッセイし、ここで、この野生型ポリペプチドは表3に示されているポリペプチドである

ことを含んでなる、方法。

【請求項44】

遺伝性リンパ水腫の発症リスクをアッセイする方法であって、

(a) 遺伝性リンパ水腫の表現型と関連があり、かつ、ヒト被験者の少なくとも一つの対立遺伝子のコードされているアミノ酸配列が、対応する野生型対立遺伝子によりコードされているポリペプチドのアミノ酸配列と比べた場合に変更されている突然変異に関してヒト被験者の核酸をアッセイし、ここで、この野生型ポリペプチドは配列番号31~44、46、48、52、54、207、676、859および861からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなり；かつ

(b) 核酸における該突然変異の有無と、遺伝性リンパ水腫の発症リスクを相関させ、ここで、核酸に該突然変異が存在する場合を遺伝性リンパ水腫の発症の高いリスクがあることと関連づけ、核酸に該突然変異が不在である場合を遺伝性リンパ水腫の発症の高いリスクがないことと関連づける

ことを含んでなる、方法。

【請求項45】

遺伝性リンパ水腫の発症リスクをアッセイする方法であって、

(a) ヒト被験者の少なくとも一つの転写因子対立遺伝子のコードされているアミノ酸配列、および、その対立遺伝子によりコードされている転写因子ポリペプチドの転写調節活性が、野生型対立遺伝子によりコードされている転写因子ポリペプチドの転写調節活性と比べた場合に変更されている突然変異に関してヒト被験者の核酸をアッセイし、ここで、この野生型転写因子ポリペプチドは配列番号81、配列番号211、配列番号241、および表5の配列によりコードされている転写因子からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなり；かつ

(b) 核酸における該突然変異の有無と、遺伝性リンパ水腫の発症リスクを相関させ、ここで、核酸に該突然変異が存在する場合を遺伝性リンパ水腫の発症の高いリスクがあることと関連づけ、核酸に該突然変異が不在である場合を遺伝性リンパ水腫の発症の高いリスクがないことと関連づける

ことを含んでなる、方法。

【請求項46】

野生型転写因子対立遺伝子が、配列番号54で示されるS o x 1 8アミノ酸配列を含んでなる、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

アッセイにより、S o x 1 8対立遺伝子によりコードされるタンパク質のトランス活性化またはDNA結合ドメインのアミノ酸配列を変更する突然変異が確認される、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

該突然変異が、野生型S O X 1 8による該遺伝子の転写の活性化と比べてS O X 1 8応答性遺伝子の転写活性化を低下させる、請求項46に記載の方法。

【請求項49】

遺伝性リンパ水腫の発症リスクをアッセイする方法であって、

(a) ヒト被験者の少なくとも一つのL E C対立遺伝子のコードされているアミノ酸配列が、また、そのL E C対立遺伝子によりコードされている接着ポリペプチドの結合親和性が、野生型対立遺伝子によりコードされている接着ポリペプチドの結合親和性と比べた場合に変更されている突然変異に関するヒト被験者の核酸をアッセイし、ここで、この

野生型接着ポリペプチドは配列番号 31 ~ 34、46、207、676、859 および 861 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなり；かつ

(b) 核酸における該突然変異の有無と、遺伝性リンパ水腫の発症リスクを相関させ、ここで、核酸に該突然変異が存在する場合を遺伝性リンパ水腫の発症の高いリスクがあることと関連づけ、核酸に該突然変異が不在である場合を遺伝性リンパ水腫の発症の高いリスクがないことと関連づける

ことを含んでなる、方法。

【請求項 50】

アッセイにより突然変異の存在が確認され、相関工程によりその患者の遺伝性リンパ水腫の発症の高いリスクが確認される、請求項 43 ~ 49 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 51】

遺伝性リンパ水腫の発症の高いリスクがあるかどうかヒト被験者をスクリーニングする方法であって、表 3 のアミノ酸配列を含んでなる少なくとも一つのポリペプチドのコードされているアミノ酸配列を変更する突然変異に関してヒト被験者の核酸をアッセイすることを含んでなる、方法。

【請求項 52】

ポリペプチドが、遺伝性リンパ水腫の発症リスクと相関する様式で、配列番号 31 ~ 44、46、48、50、52 および 54、207、676、859 および 861 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなる、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 53】

ポリペプチドが配列番号 54 に示される SOX18 アミノ酸配列を含んでなる、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

(a) ヒト被験者の少なくとも一つのポリヌクレオチドの少なくとも一つのコドンのヌクレオチド配列を決定すること；

(b) ヒト被験者由来の核酸が 1 以上の参照配列と同じヌクレオチド配列を有するか、異なるヌクレオチド配列を有するかを決定するためにハイブリダイゼーションアッセイを行うこと；

(c) ヒト被験者由来の核酸が 1 以上の参照配列と同じヌクレオチド配列を有するか、異なるヌクレオチド配列を有するかを決定するためにポリヌクレオチド移動アッセイを行うこと；

(d) ヒト被験者由来の核酸が 1 以上の参照配列と同じヌクレオチド配列を有するか、異なるヌクレオチド配列を有するかを決定するために制限エンドヌクレアーゼ消化を行うこと

からなる群より選択される少なくとも一つの手順を含んでなる、請求項 43 ~ 49、51、52、または 53 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 55】

該 LEC ポリヌクレオチドのコード配列を含んでなる核酸を増幅するためにポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行うこと、および増幅された核酸のヌクレオチド配列を決定することを含んでなる、請求項 43 ~ 49、51、52、または 53 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 56】

ヒト被験者において遺伝性リンパ水腫の遺伝子をスクリーニングする方法であって、

(a) 該被験者由来の核酸を含んでなる生体サンプルを準備し；かつ

(b) 該核酸を、ヒト被験者において少なくとも一つの遺伝子の少なくとも一つの対立遺伝子のコードされているアミノ酸配列を、配列番号 31 ~ 44、46、48、50、52、54、207、676、859 および 861 からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードするヒト遺伝子と比べて変更する突然変異が存在するかどうか分析し、ここで、ヒト被験者に、コードされるアミノ酸配列を、ヒト被験者のリンパ水腫と相関する様式で変更する突然変異が存在していれば、遺伝性リンパ水腫の遺伝子型と確認される

ことを含んでなる、方法。

【請求項 57】

該生体サンプルが細胞サンプルである、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

該分析が該核酸の一部を配列決定することを含んでなる、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 59】

ヒト被験者が本スクリーニング方法により同定される遺伝性リンパ水腫の遺伝子型を有する、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 60】

少なくとも一つの遺伝子が、配列番号 54 で示されるアミノ酸配列をコードするヒト Sox18 遺伝子に相当する、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 61】

リンパ管形成を阻害する方法であって、被験体に LEC トランスメンブランポリペプチドの阻害剤を投与することを含んでなり、ここで、この LEC トランスメンブランポリペプチドが配列番号 31 ~ 34、46、48、207、676、859 および 861 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなり、かつ、

この阻害剤が

(a) LEC トランスメンブランポリペプチドの可溶性細胞外ドメイン断片；

(b) LEC トランスメンブランポリペプチドの細胞外ドメインと結合する抗体；

(c) (b) の抗体の抗原結合ドメインを含んでなるポリペプチド；および

(d) LEC トランスメンブランポリペプチドまたはその相補体をコードする核酸と

相補的なアンチセンス核酸

からなる群より選択される、方法。

【請求項 62】

阻害剤が LEC ポリペプチドの細胞外ドメイン断片を含んでなるポリペプチドであり、該細胞外ドメインの配列が配列番号 31 のアミノ酸 1 ~ 152、配列番号 32 のアミノ酸 1 ~ 695 および配列番号 33 のアミノ酸 1 ~ 248 からなる群より選択される、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 63】

該被験体が腫瘍を含むヒトである、請求項 61 または 62 に記載の方法。

【請求項 64】

哺乳類被験体においてリンパ管形成を調節する方法であって、

リンパ管形成の調節を必要とする哺乳類被験体に、LEC ポリヌクレオチド（この LEC ポリヌクレオチドは配列番号 14 ~ 30、45、47、49 および 51、208、677、860 および 862 からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含んでなる）に対するアンチセンス分子を、LEC ポリヌクレオチドによりコードされているポリペプチドの転写または翻訳を阻害するのに有効な量で投与することを含んでなる、方法。

【請求項 65】

遺伝性リンパ水腫を治療する方法であって、

(a) 遺伝性リンパ水腫を有し、かつ、ヒト被験者の少なくとも一つのポリペプチドのコードされているアミノ酸配列を、配列番号 31 ~ 44、46、48、50、52、54、207、676、859 および 861 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドのアミノ酸配列と比べて変更する突然変異を有するヒト被験者を同定し；かつ

(b) 該被験者に、VEGF - C ポリヌクレオチド、VEGF - C ポリペプチド、VEGF - D ポリヌクレオチドおよび VEGF - D ポリペプチドからなる群より選択されるリンパ増殖因子を投与する

ことを含んでなる、方法。

【請求項 66】

内皮細胞または内皮前駆細胞の増殖を調節する方法であって、内皮細胞または内皮前駆

細胞を、細胞において p r o x - 1 の転写調節を調節する薬剤を含んでなる組成物と接触させることを含んでなり、その薬剤が

- (a) p r o x - 1 ポリペプチド；
- (b) p r o x - 1 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；
- (c) p r o x - 1 に対するアンチセンス分子；

からなる群より選択される、方法。

【請求項 6 7】

細胞が培養内皮細胞または内皮前駆細胞を含み、接触が ex vivo で行われる、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

接触が培養培地に薬剤を含めることを含んでなる、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 6 9】

細胞が内皮前駆細胞を含む、請求項 6 6 ~ 6 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 0】

細胞が、接触工程の後に哺乳類被験体に導入される、請求項 6 6 ~ 6 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 1】

被験体がヒトである、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

ヒト被験者が L E C 疾患を有する、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

ヒト被験者において L E C 機能を増強する方法であって、
ヒト被験者から内皮細胞または内皮前駆細胞を単離し；
内皮細胞を、 p r o x - 1 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトして L E C の分化および増殖を促進し；かつ
形質転換またはトランスフェクション工程の後にその L E C 細胞をヒト被験者に投与することを含んでなる、方法。

【請求項 7 4】

単離工程と投与工程のヒト被験者が同一である、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

ヒト被験者がリンパ水腫を有する、請求項 7 3 または 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

ベクターおよび形質転換またはトランスフェクション方法が p r o x - 1 の一時的発現向けに選択される、請求項 7 3 または 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 7】

発現ベクターが複製欠陥アデノウイルスベクターを含んでなる、請求項 7 3 または 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 8】

配列番号 3 1 のアミノ酸 6 1 ~ 1 2 7 と少なくとも 9 5 % 同一なアミノ酸配列を含んでなる、単離されたポリペプチド。

【請求項 7 9】

配列番号 3 1 のアミノ酸 3 0 ~ 1 5 2 と少なくとも 9 5 % 同一なアミノ酸配列を含んでなる、請求項 7 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 8 0】

配列番号 3 1 で示されるアミノ酸配列の断片を含んでなる可溶性ポリペプチドであって、該断片が配列番号 3 1 のトランスメンブランおよび細胞内アミノ酸を欠いている、可溶性ポリペプチド。

【請求項 8 1】

配列番号 3 2 の少なくとも一つのロイシン豊富な領域を含んでなる、単離されたポリペプチド。

【請求項 8 2】

配列番号 3 2 のトランスメンブランアミノ酸を欠いている、請求項 8 1 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 8 3】

配列番号 3 3 の少なくとも一つのロイシン豊富な領域を含んでなる、単離されたポリペプチド。

【請求項 8 4】

配列番号 3 3 のトランスメンブランアミノ酸を欠いている、請求項 8 1 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 8 5】

配列番号 1 1 1 で示されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドの断片であって、少なくとも一つの I 型トロンボスポンジンリピート配列を含む断片と、少なくとも 9 5 % 同一なアミノ酸配列を含んでなる、単離されたポリペプチド。

【請求項 8 6】

該断片が配列番号 1 1 1 の 6 つの I 型トロンボスポンジンリピート配列を含む、請求項 8 5 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 8 7】

配列番号 1 1 1 で示されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドの断片であって、少なくとも一つの C - 2 型免疫グロブリンドメインを含む断片と、少なくとも 9 5 % 同一なアミノ酸配列を含んでなる、単離されたポリペプチド。

【請求項 8 8】

該断片が配列番号 1 1 1 の 3 つの C - 2 型免疫グロブリンドメイン配列を含む、請求項 8 5 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 8 9】

請求項 7 8 ~ 8 8 のいずれか一項に記載のポリペプチドと異種ポリペプチドを含んでなる、融合タンパク質。

【請求項 9 0】

請求項 7 8 ~ 8 8 のいずれか一項に記載のポリペプチドと特異的に結合する、抗体。

【請求項 9 1】

請求項 7 8 ~ 8 9 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド。

【請求項 9 2】

発現制御配列と機能的に連結された請求項 9 1 に記載のポリヌクレオチドを含んでなる、発現ベクター。

【請求項 9 3】

複製欠陥アデノウイルスベクターである、請求項 9 2 に記載の発現ベクター。

【請求項 9 4】

ポリペプチドが表 1 または 2 に示されるものではない、請求項 9 に記載の方法または使用。

【請求項 9 5】

薬剤がアンチセンス分子を含んでなり、かつ、ポリペプチドが表 1 または 2 に示されるものではない、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法または使用。

【請求項 9 6】

アッセイにより突然変異の存在が確認され、相関工程によりその患者の遺伝性リンパ水腫の発症の高いリスクが確認され、かつ、下記 (a) ~ (d) からなる群より選択される少なくとも一つの手順を含んでなる、請求項 4 3 ~ 4 9 のいずれか一項に記載の方法：

(a) ヒト被験者の少なくとも一つのポリヌクレオチドの少なくとも一つのコドンのヌクレオチド配列を決定すること；

(b) ヒト被験者由来の核酸が1以上の参照配列と同じヌクレオチド配列を有するか、異なるヌクレオチド配列を有するかを決定するためにハイブリダイゼーションアッセイを行うこと；

(c) ヒト被験者由来の核酸が1以上の参照配列と同じヌクレオチド配列を有するか、異なるヌクレオチド配列を有するかを決定するためにポリヌクレオチド移動アッセイを行うこと；

(d) ヒト被験者由来の核酸が1以上の参照配列と同じヌクレオチド配列を有するか、異なるヌクレオチド配列を有するかを決定するために制限エンドヌクレアーゼ消化を行うこと。

【請求項97】

アッセイにより突然変異の存在が確認され、相関工程によりその患者の遺伝性リンパ水腫の発症の高いリスクが確認され、かつ、

該LECポリヌクレオチドのコード配列を含んでなる核酸を増幅するためにポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うこと、および増幅された核酸のヌクレオチド配列を決定することを含んでなる、請求項43~49のいずれか一項に記載の方法。

【請求項98】

ヒト被験者がリンパ水腫を有し、かつ、

ベクターおよび形質転換またはトランスフェクション方法がprox-1の一時的発現向けに選択される、請求項73または74に記載の方法。

【請求項99】

ヒト被験者がリンパ水腫を有し、かつ

発現ベクターが複製欠陥アデノウイルスベクターを含んでなる、請求項73または74に記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/06900		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC(7) : C07H 21/04; C12Q 1/68 US CL : 435/6, 325, 375, 91.1; 514/2, 44; 536/24.5, 24.3 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) U.S. : 435/6, 325, 375, 91.1; 514/2, 44; 536/24.5, 24.3				
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 practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
A	KARPANEN et al. Vascular Endothelial Growth Factor C Promotes Tumor Lymphangiogenesis and Intralymphatic Tumor Growth. Cancer Research. 01 March, 2001, Vol. 61, pages 1786-1790.	1-9, 13-14, 16-21, 25-29, 33-39, 41, 43, 47, 48, 50, 51, 57-59, 63, 66-75, and 89-93		
A	MANDRIOTA et al. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumor metastasis. The EMBO Journal. 2001, Vol. 20, No. 4, pages 672-682.	1-9, 13-14, 16-21, 25-29, 33-39, 41, 43, 47, 48, 50, 51, 57-59, 63, 66-75, and 89-93		
A	JOUKOV et al. A Recombinant Mutant Vascular Endothelial Growth Factor-C that Has Lost Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Binding, Activation, and Vascular permeability Activities. Journal of Biological Chemistry. 20 March, 1998, Vol. 273, No. 12, pages 6599-6602.	1-9, 13-14, 16-21, 25-29, 33-39, 41, 43, 47, 48, 50, 51, 57-59, 63, 66-75, and 89-93		
A	WO 98/33917 A1 (THE LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH) 06 August 1998 (06.08.1998), see Abstract.	1-9, 13-14, 16-21, 25-29, 33-39, 41, 43, 47, 48, 50, 51, 57-59, 63, 66-75, and 89-93		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 </td> <td style="width: 50%; border: none;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 12 June 2003 (12.06.2003)		Date of mailing of the international search report 15 AUG 2003		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Terra C. Gibbs Telephone No. (703) 308-0196		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/06900

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claim Nos.: 11, 12, 22-24, 30-32, 40, 42, 44-46, 49, 52, 53, 56, 60-62, 64, 65 and 78-88
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Please See Continuation Sheet
3. Claim Nos.: 10, 15, 54, 55, 76, 77
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
- Remark on Protest** The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/06900

Continuation of Box I Reason 2:

Claims 11, 12, 22, 23, 24, 30, 31, 32, 40, 42, 44, 45, 46, 49, 52, 53, 56, 60, 61, 62, 64, 65, and 78-88 encompass SEQ ID NOs. where no meaningful search could be performed because the application does not contain a sequence listing or a disk containing the sequence listing.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

Medline, Embase, CaPlus, CancerLit

search terms: VEGF-C vascular endothelial growth factor C, VEGFR-3, VEGF-D, VEGFR-2 and tumor growth

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	4 C 0 8 7
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/46	C 0 7 K 16/46	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/06	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 N 5/00	E
	C 1 2 N 5/00	A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,M W,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

フロッピー

(74)代理人 100091487

弁理士 中村 行孝

(74)代理人 100094640

弁理士 紺野 昭男

(74)代理人 100107342

弁理士 横田 修孝

(74)代理人 100111730

弁理士 伊藤 武泰

(72)発明者 カリ、アリタロ

フィンランド国ユニバーシティ、オブ、ヘルシンキ、ピー・オー・ボックス63(ハールトマニ
ンカトゥ、8)、モレキュラー/キャンサー、バイオロジー、ラボラトリー、バイオメディカム、
ヘルシンキ

(72)発明者 タイア、マキネン

ドイツ連邦共和国マルチンスリート、アム、クロプファーシュピッツ、18アー、マックス プラ
ンク、インスティテュート、オブ、ニューロバイオロジー、デパートメント、オブ、モレキュール
、ニューロバイオロジー

- (72)発明者 タティアナ、ペトロワ
 フィンランド国ユニバーシティー、オブ、ヘルシンキ、ピー．オー．ボックス63（ハールトマニ
 ンカトゥ、8）、モレキュラー／キャンサー、バイオロジー、ラボラトリー、バイオメディカム、
 ヘルシンキ
- (72)発明者 ピプサ、サハリネン
 フィンランド国ユニバーシティー、オブ、ヘルシンキ、ピー．オー．ボックス63（ハールトマニ
 ンカトゥ、8）、モレキュラー／キャンサー、バイオロジー、ラボラトリー、バイオメディカム、
 ヘルシンキ
- (72)発明者 フーア、サハリネン
 フィンランド国ユニバーシティー、オブ、ヘルシンキ、ピー．オー．ボックス63（ハールトマニ
 ンカトゥ、8）、モレキュラー／キャンサー、バイオロジー、ラボラトリー、バイオメディカム、
 ヘルシンキ

F ターム(参考) 2G045 AA40 BA13 BB20 BB24 CB01 DA13 FB02 FB05
 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA09 CA20 DA01 DA02 DA05 DA11
 EA02 EA04 HA14
 4B063 QA01 QA13 QA17 QA18 QA19 QQ08 QQ43 QQ79 QR32 QR40
 QR56 QR62 QS25 QS34
 4B064 AG01 CA19 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA01X AA57X AA93X AA93Y AA94X AA94Y AA95X AB01 BA02 CA24
 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA13 BA01 BA08 BA23 BA44 CA53 NA14 ZA361 ZA362
 ZB261 ZB262
 4C085 AA13 AA14 AA16 BB11 DD62 EE01 EE05 LL18
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA02 MA05 NA14 ZA36 ZB26
 4C087 AA02 BC83 NA14 ZA36 ZB26
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 EA20 EA50
 FA74

专利名称(译)	淋巴管和血管内皮细胞基因		
公开(公告)号	JP2005536186A	公开(公告)日	2005-12-02
申请号	JP2003578393	申请日	2003-03-07
[标]申请(专利权)人(译)	路德维格癌症研究所 黑麦Sentia有限公司		
申请(专利权)人(译)	路德维格研究所，四，癌症，研究 赖Sentia有限公司		
[标]发明人	カリアリタロ タイアマキネン タティアナペトロワ ピプササハリネン フーアサハリネン		
发明人	カリ、アリタロ タイア、マキネン タティアナ、ペトロワ ピプサ、サハリネン フーア、サハリネン		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K35/76 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P9/00 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/06 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	C07K16/22 A61K38/00 C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N33/574 G01N33/5748 G01N2800/52		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K35/76 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P9/00 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02. C C12Q1/02 C12Q1/68.A C12Q1/68.Z G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M A61K37/02 C12N5/00.E C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/FB02 2G045 /FB05 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063 /QA13 4B063/QA17 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR40 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/CA19 4B064 /CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065 /AA94X 4B065/AA94Y 4B065/AA95X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065 /CA46 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA23 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZA361 4C084/ZA362 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB11 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE05 4C085/LL18 4C086/AA01 4C086 /AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA02 4C086/MA05 4C086/NA14 4C086/ZA36 4C086/ZB26 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/NA14 4C087/ZA36 4C087/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045 /AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	耀希达凯贤治 中村KoTakashi		
优先权	60/363019 2002-03-07 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了在淋巴管内皮细胞和血管内皮细胞中差异表达的多核苷酸和基因。这些基因是用于通过淋巴系统治疗淋巴疾病如淋巴水肿，各种炎性疾病和癌症转移的有用靶标。

表5
同定された転写因子

遺伝子	検出*	受託番号 開始 EST	可能性のある遺伝子
イルコイ関連ホモボックス 2に相同	Af (S/4,2)	AA936528	ヒトクローンではな い (18)
マウス奇数飛び (odd-skipped)関連1ジンク フィンガー-TF に類似	Af (S/3,3)	A1809953	(19)
7q35-qter 由来 PAC クローン RP4-751H13	Af (S/2,3)	AC004877	
マウスグルコルチコイド誘 導遺伝子1に類似	Af (NS/2)	A1678080	XM_070471

* Af=Affymetrix, S=LEC に対して特異的, NS=非特異的(BEC でも発現される), 数値は BEC