

(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2018-519275

(P2018-519275A)

(43) 公表日 平成30年7月19日 (2018.7.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	4 B 0 6 3
A 6 1 K 31/165 (2006.01)	A 6 1 K 31/165	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/198 (2006.01)	A 6 1 K 31/198	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 C 2 0 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-563327 (P2017-563327)
 (86) (22) 出願日 平成28年6月15日 (2016.6.15)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年1月11日 (2018.1.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2016/063745
 (87) 国際公開番号 W02016/202854
 (87) 国際公開日 平成28年12月22日 (2016.12.22)
 (31) 優先権主張番号 15305921.7
 (32) 優先日 平成27年6月15日 (2015.6.15)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 511025226
 ユニヴェルシテ デクスーマルセイユ
 UNIVERSITE D' AIX-MA
 RSEILLE
 フランス、エフー13284 マルセイユ
 セデックス 07、ブールパール シャ
 ルル リヴオン、ジャルダンデュファ
 ロ、58
 Jardin du Pharo, 58
 , Bld Charles Livon
 , F-13284 Marseille
 cedex 07, France

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝性乾燥赤血球症の治療及び診断

(57) 【要約】

本発明は、被験体において遺伝性乾燥赤血球症を診断する *in vitro* 方法であって、該被検体においてガルドスチャネルをコードする KCNN4 遺伝子の遺伝子型を決定することを含む、方法に関する。本発明はまた、特に KCNN4 遺伝子におけるミスセンス突然変異 c. 1055 G>A 又は c. 844 G>A の保因者であるヒト被験体において遺伝性乾燥赤血球症の治療に使用される KCNN4 タンパク質の阻害剤に関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

赤血球からのカリウムの流出を特異的に阻害する選択的ガルドスチャネル遮断薬である、遺伝性乾燥赤血球症の治療に使用されるガルドスチャネル（K C N N 4 タンパク質）の阻害剤。

【請求項 2】

有機分子、アミノ酸及び抗体からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 1 に記載の使用のための阻害剤。

【請求項 3】

イミダゾール系抗真菌剤、クロトリマゾール、メトロニダゾール、エコナゾール、アルギニン、T r a m-34、カリブドトキシシン、ニフェジピン、2, 2-ビス（4-フルオロフェニル）-N-メトキシ-2-フェニルアセトアミジン、2-（2-クロロフェニル）-2, 2-ジフェニルアセトアルデヒドオキシム、2-（2-クロロフェニル）-2, 2-ビス（4-フルオロフェニル）-N-ヒドロキシアセトアミジン、2, 2, 2-トリス（4-フルオロフェニル）-N-ヒドロキシアセトアミジン、2-（2-フルオロフェニル）-2-（4-フルオロフェニル）-N-ヒドロキシ-2-フェニルアセトアミジン、リン酸 3-（2-オキサゾリル）-4-[3-（トリフルオロメチル）フェニルスルホンアミド] フェニルモノエステル、N-[2-（4, 5-ジヒドロオキサゾール-2-イル）フェニル]-3-（トリフルオロメチル）ベンゼンスルホンアミド、N-[4-メトキシ-2-（2-オキサゾリル）フェニル] ベンゼンスルホンアミド、N-[4, 5-ジメトキシ-2-（3-メチル-1, 2, 4-オキサジアゾール-5-イル）フェニル]-3-（トリフルオロメチル）ベンゼンスルホンアミド、N-[2-（2-フリル）フェニル]-3-（トリフルオロメチル）ベンゼンスルホンアミド及びN-[4-メチル-2-（2-オキサゾリル）フェニル]-3-（トリフルオロメチル）ベンゼンスルホンアミド、並びにセニカポクからなる群から選択され、好ましくはセニカポクであることを特徴とする、請求項 2 に記載の使用のための阻害剤。

【請求項 4】

コドン 352 におけるアルギニンからヒスチジンへのアミノ酸変化、コドン 282 におけるバリンからメチオニンへのアミノ酸変化、又はコドン 282 におけるバリンからグルタミンへのアミノ酸変化をそれぞれ起こす、ガルドスチャネルをコードする K C N N 4 遺伝子における c. 1055 G > A、c. 844 G > A、又は c. 845 T > A からなる群から選択されるミスセンス突然変異、好ましくは c. 1055 G > A 又は c. 844 G > A、好ましくは c. 1055 G > A の保因者であるヒト被験体の遺伝性乾燥赤血球症の治療に使用されることを特徴とする、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の使用のための阻害剤。

【請求項 5】

ヒト被験体において *in vitro* で K C N N 4 遺伝子の遺伝子型を決定する方法であって、

（a）前記被験体から得られる核酸サンプルから m R N A 又はゲノム D N A を単離する工程と、

（b）ガルドスチャネルをコードする K C N N 4 遺伝子の c. 1055 位に存在するヌクレオチドを決定する工程と、

を含む、方法。

【請求項 6】

前記 m R N A 又はゲノム D N A を前記被験体の血液サンプルから得ることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記 m R N A を前記被験体の網状赤血球から得て、前記ゲノム D N A を前記被験体の白血球から得ることを特徴とする、請求項 5 又は 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記工程 (b) を、ハイブリダイゼーション法、選択的増幅、核酸シーケンシング、制限酵素断片長多型解析 (RFLP)、増幅断片長多型解析 (AFLP)、ライゲーション連鎖反応 (LCR) 又は質量分析によって行うことを特徴とする、請求項 5～7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

c. 1055 位の前記ヌクレオチドを、配列番号 3 のプローブ及び配列番号 4 のプローブを用いるリバースドットプロットにより決定することを特徴とする、請求項 5～7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

ヒト被験体において遺伝性乾燥赤血球症の存在、又はそれに対する素因を診断する *in vitro* 方法であって、該方法は、

(i) 前記被験体の生体サンプルを準備する工程と、

(ii) 前記生体サンプルにおいてガルドスチャネルをコードする KCNN4 遺伝子におけるミスセンス突然変異 c. 1055 G>A、又はガルドスチャネル (KCNN4 タンパク質) におけるミスセンス突然変異 p. Arg 352 His の存在を検出する工程と、を含み、

前記突然変異の存在が、遺伝性乾燥赤血球症のマーカー、又は前記被験体における遺伝性乾燥赤血球症に対する素因を構成する、方法。

【請求項 11】

ガルドスチャネルをコードする KCNN4 遺伝子におけるミスセンス突然変異 c. 1055 G>A の存在が、請求項 5～9 のいずれか一項に記載の方法に従って前記ヒト被験体において KCNN4 遺伝子の遺伝子型を決定することにより検出されることを特徴とする、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

ガルドスチャネルにおける突然変異 p. Arg 352 His の存在が、タンパク質シーケンシング、又は特異的にガルドスチャネル変異体 p. Arg 352 His に対するリガンドへの結合によって検出されることを特徴とする、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

配列番号 3 のプローブ及び／又は配列番号 4 のプローブを含む、遺伝性乾燥赤血球症を診断するキット。

【請求項 14】

ヒト被験体において *in vitro* で遺伝性乾燥赤血球症を診断するための配列番号 3 のプローブ及び／又は配列番号 4 のプローブの使用。

【請求項 15】

p. Arg 352 His、p. Val 282 Met、又は p. Val 282 Glu からなる群から選択されるヒトガルドスチャネル (KCNN4 タンパク質) 変異体の生物学的に活性のある阻害剤をスクリーニングする *in vitro* 方法であって、該方法が、*in vitro* で試験化合物を、ヒトガルドスチャネル (KCNN4 タンパク質) 変異体 p. Arg 352 His、p. Val 282 Met、又は p. Val 282 Glu それぞれと接触させることと、配列番号 2 の野生型ヒトガルドスチャネル (KCNN4 タンパク質) と比較した場合に該試験化合物が該チャネルを介したイオン伝導を妨げる能力を判定することと、を含み、配列番号 2 の野生型ヒトガルドスチャネル (KCNN4 タンパク質) と比較した場合に該チャネルを介したイオン伝導を妨げることは、該化合物がヒトガルドスチャネル (KCNN4 タンパク質) 変異体 p. Arg 352 His、p. Val 282 Met、又は p. Val 282 Glu を阻害する能力についての指標をもたらす、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、遺伝性乾燥赤血球症 (hereditary xerocytosis) の診断、及びこの障害の治

10

20

30

40

50

療に関する。

【背景技術】

【0002】

水分及び溶質の恒常性は、赤血球の完全性の維持に必須であり、一価陽イオン含量の調節によって制御される。原発性の赤血球の水和障害が幾つか存在し、ナトリウム及びカリウムに対する赤血球膜の浸透性異常によって、赤色細胞の膨張又は収縮を起こすことを特徴とする（非特許文献1）。臨床的には、これらの遺伝性障害は、慢性溶血性貧血を伴い、様々な膜貫通イオンチャネル又は輸送体の欠損が原因となっている（非特許文献2）。

【0003】

遺伝性乾燥赤血球症（HX）（[OMIM] 194380）は、原発性の赤血球脱水を特徴とする常染色体優性の先天性溶血性貧血である（非特許文献3）。HX患者では、赤色血液細胞が細胞内の陽イオン含量の変化、並びに平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）の上昇及び赤血球浸透圧脆弱性の低下に関わる細胞脱水を呈する（非特許文献4）。顕微鏡下で、血液細胞の薄膜は様々な形態異常を示し、その最も特徴的なものが中央淡明、線形又は鎌形であり、そのことがこれらの細胞に対する口唇状赤血球、及びHXの代替名である脱水型遺伝性口唇状赤血球症の名の由来である（非特許文献2）。

【0004】

HXは、赤色細胞膜の機械受容陽イオンチャネルであるPIEZO1をコードするFAM38Aのミスセンス突然変異に関連するものである（非特許文献5、非特許文献6）。機能研究から、PIEZO1の突然変異がチャネルの不活性化を遅らせ、また顕著な活性化遅滞（latency）を誘導することが明らかになっている（非特許文献7）。最近になって、偽性高カリウム血症に伴う別の種の赤色細胞イオン交換の欠損が、ATP結合カセット輸送体ABC B6の突然変異と結び付けられた（非特許文献8）。非特許文献1では、遺伝性乾燥赤血球症についての遺伝子座が16q23～q24にマッピングされたが、罹患遺伝子は未だ同定されていないとの報告がある。

【0005】

ガルドスチャネルは、KC a 3.1又はKC NN4とも称される陽イオンチャネルである。ガルドスチャネルは、Ca²⁺感受性の中間伝導度カリウム選択性チャネルであり、当初は脾臓細胞に存在すると記載されていたが、赤血球を含む多くの細胞型に存在している（非特許文献9）。ガルドスチャネル（KC NN4タンパク質）をコードする遺伝子の遺伝子座は、19q13.2にマッピングされている。ガルドスチャネルは、4つの同一のサブユニットで構成されており、各サブユニットが単一遺伝子KC NN4でコードされており、6つの膜貫通ドメインと、5番目の膜貫通ドメインと6番目の膜貫通ドメインとの間に細孔領域とを含んでいる（非特許文献9）。定常状態の条件下において、ガルドスチャネルは不活性である。その機能は、成熟した正常赤血球では完全に解明されていない。外部刺激下で、細胞内Ca²⁺が増大した後、ガルドスチャネルの4つのチャネルサブユニットのそれぞれに密に結合しているカルモジュリン分子と相互作用する。カルモジュリンへのCa²⁺の結合により、チャネルの開放、並びに迅速なK⁺及び水の流出が起こり、赤血球の脱水及び収縮を引き起こし、この機構はガルドス作用と呼ばれている（非特許文献9、非特許文献10）。赤色血液細胞は、血液循環中、一定の動きをとり、細胞膜には機械的応力がかかる。オンセルパッチクランプ実験を用いることで、局所的な膜変形が赤色細胞において刺激事象として働き、ガルドスの活性化を引き起こし得ることが分かっており、この機械受容機構によって、赤血球が微小血管系の狭い毛細血管を通るようにその容量及び形態を適合させることが可能となり得ることが示唆されている（非特許文献11）。最近の研究では、多様な生理学的事象におけるガルドスチャネルの役割が多く記載されており、ガルドスチャネルが大きなヒト疾患パネルにおける興味深い治療標的であると指摘されている（非特許文献12、非特許文献13）。

【0006】

本発明者らは、ガルドスチャネルの機能的領域の1つに位置するミスセンス突然変異（p. Arg352His突然変異）と、8人の罹患HX患者（persons）を含む2つの血

10

20

30

40

50

縁関係にないH X家系における慢性溶血及び脱水細胞との突然変異の関係性とを特定した。罹患者は様々な重症度の慢性貧血を示す。その赤色細胞は、楕円赤血球、ヘミゴースト(hemighosts)、破碎赤血球、及び極めて稀な口唇状赤血球等の様々な形態異常を呈する。ミスセンス突然変異は、カルモジュリンと相互作用し、チャネルの開放及び K^+ の流出に関わる領域に位置する、種間で高度に保存された残基に関するものである。

【0007】

アフリカツメガエル(Xenopus)卵母細胞にて行った機能実験から、残基352が突然変異したチャネルは、通常 Ca^{2+} の流入により活性化し、野生型(wt)チャネルに比べて K^+ の流出の強さが増大しており、正常チャネルに比べて長期間、開放及び活性の状態を保つことが分かった。ガルドスチャネルのカルモジュリン結合ドメインにおける正電荷を除去する突然変異によって、この活性化パートナーとの相互作用が変わり、チャネルがより活性になると考えられる。ヒト細胞株HEK293での実験から、突然変異KCNN4では電流密度が高くなることが確認された。カルモジュリン結合部位が突然変異しているにも関わらず、突然変異体のトラフィック特性は、トラフィック特性が大きく異なる細胞(HEK293及びアフリカツメガエル卵母細胞)であっても類似しており、影響を受けない。これらの実験から、p.Arg352His突然変異が、10分の1の Ca^{2+} 濃度でも活性化されるようにチャネルの Ca^{2+} 感受性を変えることが分かった。 Ca^{2+} に対する感受性の上昇に伴う活性化動態の変化(anomaly)が、p.Arg352His KCNN4に病原性を付与する。

【0008】

本発明者らは、H X生理病理に関与するこのガルドスチャネルにおける2つの他の突然変異、すなわちp.Val282Met(V282M)及びp.Val282Glu(V282E)の突然変異(非特許文献14、非特許文献15)がそれぞれ、R352H突然変異と同様にKCNN4活性の上昇をもたらすことを更に示した。

【0009】

生物学的診断を行うことができる2つの検査は通常の研究所では行うことができず、その中でも浸透圧抵抗検査は、本事例では通常のものであるEMA検査に置き換えられることが非常に多くなっているものの、赤血球内の K^+ 判定は現時点で日常的に行われていないことから、これらの患者におけるこの障害の診断は阻まれている。

【0010】

そのため、新たな遺伝性乾燥赤血球症の診断検査の提供は臨床的関心事である。

【0011】

加えて、現在この病状には薬理学的治療法がない。

【0012】

本発明者らは、KCNN4阻害剤クロトリマゾールの誘導体であるセニカボク我突然変異KCNN4を阻害する効力を評価した。セニカボクは、過去に鎌状赤血球症の治療について第I I I相試験が行われ、この際に非毒性であることが証明された(非特許文献16)。トランスフェクトしたHEK細胞及びヒト赤色血液細胞を用いて、本発明者らは、R352H突然変異の場合にセニカボクがKCNN4電流を阻害することにより、 K^+ 喪失及び脱水を防ぐのに有効であることを示した。さらに、本発明者らは、V282M突然変異を持つチャネルが野生型KCNN4と同程度にセニカボクに対して感受性であるが、V282E突然変異を持つチャネルは極めて感受性が低いことも示した。したがって、これらの結果から、セニカボクが少なくともガルドスチャネルにおけるR352H又はV282Mの突然変異に関連する赤色血液細胞の脱水を治療する治療法であると考えられることが強く示唆される。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】Rinehart et al., 2010

【非特許文献2】Da Costa L, et al., 2013

10

20

30

40

50

- 【非特許文献 3】Miller et al., 1971
【非特許文献 4】Archer et al., 2014
【非特許文献 5】Zarychanski et al., 2012
【非特許文献 6】Andolfo et al., 2013a
【非特許文献 7】Bae et al., 2013
【非特許文献 8】Andolfo et al., 2013b
【非特許文献 9】Maher and Kuchel, 2003
【非特許文献 10】Fanger et al., 1999
【非特許文献 11】Dyrda et al., 2010
【非特許文献 12】Wulff and Koehler, 2013
【非特許文献 13】Wulff and Castle, 2010
【非特許文献 14】Andolfo et al., 2015
【非特許文献 15】Glogowska et al., 2015
【非特許文献 16】Ataga et al., 2011
【発明の概要】

【0014】

したがって、本発明は、遺伝性乾燥赤血球症の治療に使用されるガルドスチャネル（KCNN4タンパク質）の阻害剤を提供する。

【0015】

ガルドスチャネルは、KCa_{3.1}又はKCNN4とも称されるCa²⁺感受性の中間伝導度カリウム選択性チャネルである（非特許文献9）。ガルドスチャネルは、野生型ガルドスチャネル又は突然変異体ガルドスチャネル、例えばガルドスチャネル（KCNN4タンパク質）変異体p.Arg352His、p.Val282Met及びp.Val282Glu、好ましくはp.Arg352His、p.Val282Met、より好ましくはp.Arg352Hisとすることができる。

【0016】

好ましい実施の形態では、ガルドスチャネルは、ヒト起源のものである。野生型ヒトガルドスチャネル（KCNN4タンパク質）のアミノ酸配列は、UniProtKBデータベースにおいてアクセッション番号O15554（GI:17366160）にて入手可能であり、本明細書では配列番号2と称する。

【0017】

ガルドスチャネルの阻害剤は、赤血球からのカリウムの流出を特異的に阻害する選択的ガルドスチャネル遮断薬を指す。

【0018】

ガルドスチャネルの阻害剤は、赤血球からのカリウムの流出を特異的に阻害する能力について候補化合物集団をスクリーニングすることにより特定することができる。赤血球からのカリウムの流出の阻害を測定する方法自体は既知である。このような方法例は、Brugnara et al., 1993a及び1993b、Ellory et al., 1994に記載されている。ガルドスチャネルの阻害パーセント及びガルドスチャネルの阻害剤のIC₅₀はいずれも、Brugnara et al., 1993bに記載の方法を用いて調べることができる。

【0019】

ガルドスチャネルの阻害剤の効力は、Brugnara et al., 1993aにて開示されているような方法によって赤血球を用いて調べることができる。

【0020】

ガルドスチャネルの阻害剤としては、有機分子、アミノ酸及び抗体が挙げられる。

【0021】

抗体は、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体であってもよい。「抗体("antibody" or "antibodies")」という用語には、本明細書で使用される場合、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体のフラグメント、又はそれらのフラグメント（例えばFv、Fab、Fab'及びF(ab')₂フラグメント）を含む抗体の機能フラグメントも包含される

10

20

30

40

50

。好適な抗体は、K C N N 4 タンパク質（ガルドスチャネル）に対するものである。有益には、上記抗体は、モノクローナル抗体又はそのフラグメントである。

【0022】

好ましい実施の形態では、ガルドスチャネルの阻害剤は、イミダゾール系抗真菌剤 (Brugnara et al., 1996)、例えばクロトリマゾール (Brugnara et al., 1993a)、メトロニダゾール (Brugnara et al., 1993a)、エコナゾール (Brugnara et al., 1993a)；アルギニン (Romero et al., 2002)；T r a m-34 (1-[(2-クロロフェニル) ジフェニルメチル]-1H-ピラゾール) (Wulff et al., 2000)；カリブドトキシシン；マウロトキシシン (Castle et al., 2002)；ニフェジピン (Brugnara et al., 1993a)；ニトレジピン (Brugnara et al., 1993a)；セニカボク (I C A-17043；ビス (4-フルオロフェニル) フェニルアセトアミド；Ataga et al., 2008、2009)、2, 2-ビス (4-フルオロフェニル)-N-メトキシ-2-フェニルアセトアミジン、2-(2-クロロフェニル)-2, 2-ジフェニルアセトアルデヒドオキシム、2-(2-クロロフェニル)-2, 2-ビス (4-フルオロフェニル)-N-ヒドロキシアセトアミジン、2, 2, 2-トリス (4-フルオロフェニル)-N-ヒドロキシアセトアミジン、2-(2-フルオロフェニル)-2-(4-フルオロフェニル)-N-ヒドロキシ-2-フェニルアセトアミジン、リン酸3-(2-オキサゾリル)-4-[3-(トリフルオロメチル) フェニルスルホンアミド] フェニルモノエステル、N-[2-(4, 5-ジヒドロオキサゾール-2-イル) フェニル]-3-(トリフルオロメチル) ベンゼンスルホンアミド、N-[4-メトキシ-2-(2-オキサゾリル) フェニル] ベンゼンスルホンアミド、N-[4, 5-ジメトキシ-2-(3-メチル-1, 2, 4-オキサジアゾール-5-イル) フェニル]-3-(トリフルオロメチル) ベンゼンスルホンアミド、N-[2-(2-フリル) フェニル]-3-(トリフルオロメチル) ベンゼンスルホンアミド、及びN-[4-メチル-2-(2-オキサゾリル) フェニル]-3-(トリフルオロメチル) ベンゼンスルホンアミドを含む、国際公開第00/50026号、国際公開第2004/016221号、国際公開第2005/113490号及び国際公開第2006/084031号に記載されるガルドスチャネルに対する選択性及び効力を示すカルシウム活性化カリウム流の阻害剤からなる群から選択され、好ましくはセニカボクである (Stocker et al., 2003も参照されたい)。

【0023】

より好ましい実施の形態では、ガルドスチャネルの阻害剤はセニカボクである。

【0024】

ガルドスチャネルの阻害剤自体を投与しても、又は好適な担体又は賦形剤 (複数の場合もある) と混合してもよい。阻害剤は全身に使用することができる。全身投与に適した製剤であればどのようなものを使用してもよい。

【0025】

本明細書で使用される場合、「治療」又は「治療する」という用語は、遺伝性乾燥赤血球症の被験体に、この障害の緩和、軽減、変更、改善、回復、快方又はこの障害への作用を目的とする上記のガルドスチャネルの阻害剤の投与を含む。

【0026】

被験体は、好ましくはヒト被験体、より好ましくはコドン352におけるアルギニンからヒスチジンへのアミノ酸変化 (p. A r g 352 H i s)、コドン282におけるバリンからメチオニンへのアミノ酸変化 (p. V a l 282 M e t)、又はコドン282におけるバリンからグルタミンへのアミノ酸変化 (p. V a l 282 G l u) をそれぞれ起こす、ガルドスチャネルをコードするK C N N 4 遺伝子におけるc. 1055G>A、c. 844G>A、及びc. 845T>Aからなる群から選択されるミスセンス突然変異、好ましくはc. 1055G>A又はc. 844G>A、より好ましくはc. 1055G>Aの保因者であるヒト被験体である。

【0027】

ガルドスチャネルをコードする野生型ヒトK C N N 4 遺伝子の核酸配列 (M a p : 19

q13.2)は、NCBI GenBankデータベースにおけるアクセッション番号NC_000019.10 (GI:568815579)にて入手可能である。

【0028】

野生型ヒトKCNN4遺伝子によりコードされるmRNA (cDNA)の核酸配列は、NCBI GenBankデータベースにおけるアクセッション番号NM_002250.2 (GI:25777651)にて入手可能であり、本明細書では配列番号1と称する。

【0029】

野生型ヒトガルドスチャネル (KCNN4タンパク質)のアミノ酸配列は、UniProtKBデータベースにおいてアクセッション番号O15554 (GI:17366160)、又はNCBI GenBankデータベースにおいてNM_002250.2 (GI:25777651)にて入手可能であり、本明細書では配列番号2と称する。

【0030】

上記突然変異を特定する方法を下記に記載する。

【0031】

特定の実施の形態において、本発明は、コドン352におけるアルギニンからヒスチジンへのアミノ酸変化 (p. Arg352His)、コドン282におけるバリンからメチオニンへのアミノ酸変化 (p. Val282Met)、又はコドン282におけるバリンからグルタミンへのアミノ酸変化 (p. Val282Glu)をそれぞれ起こす、ガルドスチャネルをコードするKCNN4遺伝子におけるc. 1055G>A、c. 844G>A、及びc. 845T>Aからなる群から選択される、好ましくはc. 1055G>A及びc. 844G>Aから選択されるミスセンス突然変異より好ましくはミスセンス突然変異c. 1055G>Aの保因者であるヒト被験体の遺伝性乾燥赤血球症の治療に使用されるセニカポク (ICA-17043;ビス(4-フルオロフェニル)フェニルアセトアミド)を提供する。

【0032】

本発明はまた、遺伝性乾燥赤血球症を治療する方法であって、それを必要とする被験体に有効量の上記ガルドスチャネル (KCNN4タンパク質)の阻害剤を投与することを含む、方法を提供する。

【0033】

本発明はまた、遺伝性乾燥赤血球症を治療する薬剤の調製のための上記ガルドスチャネル (KCNN4タンパク質)の阻害剤の使用を提供する。

【0034】

本発明はまた、ヒト被験体において*in vitro*でKCNN4遺伝子の遺伝子型を決定する方法であって、

(a)上記被験体から得られる核酸サンプルからmRNA又はゲノムDNAを単離する工程と、

(b)ガルドスチャネルをコードするKCNN4遺伝子のc. 1055位、c. 844位又はc. 845位、好ましくはc. 1055位に存在するヌクレオチドを決定する工程と、を含む、方法を提供する。

【0035】

本明細書で使用される場合、「ガルドスチャネルをコードするKCNN4遺伝子のc. 1055位、c. 844位、又はc. 845位に存在するヌクレオチドに対応するヌクレオチドを決定する」という用語は、上記の単離されたmRNA又はゲノムDNAのいずれかにおいてガルドスチャネルをコードするKCNN4遺伝子のc. 1055位、c. 844位、又はc. 845位に存在するヌクレオチドに対応するヌクレオチドを決定することを表す。

【0036】

上記被験体は、遺伝性乾燥赤血球症を患っているか、又は患っていない。

【0037】

被験体から核酸サンプルを得る方法は、当該技術分野において既知である。被験体から mRNA 又はゲノム DNA を単離する方法も当該技術分野において既知である。

【0038】

有益には、mRNA 又はゲノム DNA を、上記被験体の血液サンプルから、特に mRNA の単離では上記被験体の網状赤血球から、又はゲノム DNA の単離では上記被験体の白血球から得ることができる。

【0039】

工程 (b) における上記ヌクレオチドを決定する方法は、当該技術分野において既知である単一ヌクレオチド多型 (SNP) の検出方法を含む。

【0040】

SNP の検出方法は、従来技術において記載されており、これには選択的ハイブリダイゼーション法 (例えば、リバーソットプロット、DNA ではサザンプロット、RNA ではノーザンプロット)、選択的増幅、核酸シーケンシング、制限酵素断片長多型解析 (RFLP)、増幅断片長多型解析 (AFLP)、ライゲーション連鎖反応 (LCR)、質量分析が挙げられる (Kaplan and Delpach, 2007 のレビューを参照されたい)。

【0041】

特に、mRNA 又はゲノム DNA において SNP を決定するのに、それぞれ対応する mRNA 又はゲノム領域を増幅する必要がある。このために、増幅させる SNP を含む配列からヌクレオチド配列を得ることができる PCR プライマーを使用することができる。次いで、PCR によって増幅されたフラグメントをシーケンシング (例えば、サンガーシーケンシング) 又はハイブリダイゼーション法によって分析することができる。PCR によって増幅されたフラグメントは、多型部位が既知の 2 種の変異体 (野生型又は変異体) を識別する特異的な伸長プライマーによる質量分析計でも分析することができる。

【0042】

例として、上記の PCR プライマーセットとしては、配列番号 5 の PCR プライマーと配列番号 6 の PCR プライマーとのセットが挙げられる。

【0043】

mRNA 又はゲノム DNA における SNP は、リバーソットプロットによっても決定することができる。野生型配列を決定するのに配列番号 3 のプローブを使用することができ、c. 1055 G > A 変異体 (突然変異体) 配列を決定するのに配列番号 4 のプローブを使用することができる。

【0044】

ガルドスチャネルをコードする KCNN4 遺伝子の突然変異 c. 844 又は c. 845 の遺伝子型を決定する方法は、非特許文献 14 及び非特許文献 15 に記載されている。

【0045】

その遺伝子型決定方法によれば、ガルドスチャネルをコードする KCNN4 遺伝子の c. 1055 位に存在するヌクレオチドがアデニン (A) である場合、又はガルドスチャネルをコードする KCNN4 遺伝子の c. 844 位に存在するヌクレオチドがアデニン (A) である場合、又はガルドスチャネルをコードする KCNN4 遺伝子の c. 845 位に存在するヌクレオチドがアデニン (A) である場合に、被験体は遺伝性乾燥赤血球症を患うと推測することができる。

【0046】

本発明はまた、ヒト被験体において遺伝性乾燥赤血球症の存在、又はそれに対する素因を診断する *in vitro* 方法であって、該方法は、

(i) 上記被験体の生体サンプルを準備する工程と、

(ii) 上記生体サンプルにおいて、ガルドスチャネルをコードする KCNN4 遺伝子における c. 1055 G > A、c. 844 G > A、及び c. 845 T > A からなる群から選択される、好ましくは c. 1055 G > A 及び c. 844 G > A から選択されるミスセンス突然変異、より好ましくはミスセンス突然変異 c. 1055 G > A の存在、又はガルドスチャネル (KCNN4 タンパク質) における p. Arg352His、p. Val28

10

20

30

40

50

2 Met、及び p. Val 282 Glu からなる群から選択される、好ましくは p. Arg 352 His 及び p. Val 282 Met から選択されるミスセンス突然変異、より好ましくはミスセンス突然変異 p. Arg 352 His の存在を検出する工程と、
を含み、

上記突然変異の存在が、遺伝性乾燥赤血球症のマーカー、又は上記被験体における遺伝性乾燥赤血球症に対する素因を構成する、方法を提供する。

【0047】

工程 (i i) の好ましい実施の形態では、ガルドスチャネルをコードする KCNN4 遺伝子における c. 1055 G>A、c. 844 G>A 及び c. 845 T>A から選択される、好ましくは c. 1055 G>A 及び c. 844 G>A から選択されるミスセンス突然変異、より好ましくはミスセンス突然変異 c. 1055 G>A の存在が検出される。

10

【0048】

本明細書で使用される場合、「KCNN4 遺伝子におけるミスセンス突然変異 c. 1055 G>A、c. 844 G>A、又は c. 845 T>A の存在を検出する」という用語は、上記被験体の核酸サンプル由来の mRNA 又はゲノム DNA のいずれかでの KCNN4 遺伝子におけるミスセンス突然変異 c. 1055 G>A、c. 844 G>A、又は c. 845 T>A に対応する突然変異の存在を検出することを指す。

【0049】

ガルドスチャネルをコードする KCNN4 遺伝子におけるミスセンス突然変異 c. 1055 G>A、c. 844 G>A、又は c. 845 T>A の存在は、上記のように、上記ヒト被験体において KCNN4 遺伝子の遺伝子型を決定することにより検出することができる。

20

【0050】

タンパク質において点突然変異を決定する方法は、当該技術分野において既知である (Kaplan and Delpech, 2007 のレビューを参照されたい)。ガルドスチャネル (KCNN4 タンパク質) における p. Arg 352 His、p. Val 282 Met、又は p. Val 282 Glu の突然変異の存在は、タンパク質シーケンシング、又は特異的にガルドスチャネル (KCNN4 タンパク質) 変異体 p. Arg 352 His、p. Val 282 Met、若しくは p. Val 282 Glu それぞれに対するリガンド (例えば抗体) への結合によって、特に特異的にガルドスチャネル (KCNN4 タンパク質) 変異体 p. Arg 352 His、p. Val 282 Met、又は p. Val 282 Glu それぞれに対する抗体を使用するウェスタンブロットによって、好ましくはタンパク質シーケンシングによって検出することができる。

30

【0051】

本発明はまた、被験体における遺伝性乾燥赤血球症を診断及び治療する方法であって、
(i) 上記被験体の生体サンプルを準備する工程と、

(i i) 上記のように、上記生体サンプルにおいて、ガルドスチャネルをコードする KCNN4 遺伝子における c. 1055 G>A、c. 844 G>A、及び c. 845 T>A からなる群から選択される、好ましくは c. 1055 G>A 及び c. 844 G>A から選択されるミスセンス突然変異、より好ましくはミスセンス突然変異 c. 1055 G>A が存在するか否か、又はガルドスチャネル (KCNN4 タンパク質) における p. Arg 352 His、p. Val 282 Met、及び p. Val 282 Glu からなる群から選択される、好ましくは p. Arg 352 His 及び p. Val 282 Met から選択されるミスセンス突然変異、より好ましくはミスセンス突然変異 p. Arg 352 His が存在するか否かを検出する工程と、

40

(i i i) 生体サンプルにおける工程 (i i) に記載の突然変異の存在が検出された場合に被験体が遺伝性乾燥赤血球症であると診断する工程と、

(i v) 有効量の上記のようなガルドスチャネル (KCNN4 タンパク質) の阻害剤、好ましくはセニカボクを診断済みの被験体に投与する工程と、
を含む、方法を提供する。

50

【0052】

本発明はまた、配列番号3のプロープ及び／又は配列番号4のプロープを含む、遺伝性乾燥赤血球症を診断するキットを提供する。

【0053】

本発明はまた、ヒト被験体において *in vitro* で遺伝性乾燥赤血球症を診断するための配列番号3のプロープ及び／又は配列番号4のプロープの使用を提供する。

【0054】

本発明はまた、ガルドスチャネルの阻害剤をスクリーニングする方法に関する。このような阻害剤は、赤血球からのカリウムの流出を特異的に阻害する選択的ガルドスチャネル遮断薬として、更に遺伝性乾燥赤血球症の治療に有用である。

【0055】

上記方法は、結合アッセイ及び／又は機能アッセイを含み、ヒトガルドスチャネル（KCNN4タンパク質）変異体 p. Arg 352 His、p. Val 282 Met、又は p. Val 282 Glu、好ましくは p. Arg 352 His 又は p. Val 282 Met、より好ましくは p. Arg 352 His を伴って、*in vitro* で、細胞系（酵母、細菌、アフリカツメガエル卵母細胞）において、又は動物において行うことができる。

【0056】

細胞系では、細胞は、生検材料としての又は細胞培養物にて増殖する、ネイティブ細胞、すなわちガルドスチャネル（KCNN4タンパク質）変異体 p. Arg 352 His、p. Val 282 Met、又は p. Val 282 Glu ポリペプチドを通常発現する細胞とすることができる。これらのネイティブ細胞は赤血球に由来するものであるのが好ましい。代替的には、細胞は、ガルドスチャネル（KCNN4タンパク質）変異体 p. Arg 352 His、p. Val 282 Met、又は p. Val 282 Glu を発現する、組換え宿主細胞、特にアフリカツメガエル（*Xenopus laevis*）卵母細胞である。

【0057】

したがって、本発明は、p. Arg 352 His、p. Val 282 Met、及び p. Val 282 Glu からなる群から選択されるヒトガルドスチャネル（KCNN4タンパク質）変異体、好ましくは変異体 p. Arg 352 His 又は p. Val 282 Met、より好ましくは変異体 p. Arg 352 His の生物学的に活性のある阻害剤をスクリーニングする *in vitro* 方法であって、該方法が、*in vitro* で試験化合物を、ヒトガルドスチャネル（KCNN4タンパク質）変異体 p. Arg 352 His、p. Val 282 Met、又は p. Val 282 Glu と接触させることと、配列番号2の野生型ヒトガルドスチャネル（KCNN4タンパク質）と比較した場合に該試験化合物が該チャネルを介したイオン伝導を妨げる能力を判定することとを含み、配列番号2の野生型ヒトガルドスチャネル（KCNN4タンパク質）と比較した場合に該チャネルを介したイオン伝導を妨げることは、該化合物がヒトガルドスチャネル（KCNN4タンパク質）変異体 p. Arg 352 His、p. Val 282 Met、又は p. Val 282 Glu を阻害する能力についての指標をもたらす、方法を提供する。

【0058】

上記方法の好ましい実施の形態では、該方法は、アフリカツメガエル卵母細胞においてヒトガルドスチャネル（KCNN4タンパク質）変異体 p. Arg 352 His、p. Val 282 Met、又は p. Val 282 Glu をコードする突然変異 cDNA を含むプラスミドを発現させることと、試験化合物の存在下で電流電圧を測定することとを含み、伝導度の低下は、該試験化合物がヒトガルドスチャネル（KCNN4タンパク質）変異体 p. Arg 352 His、p. Val 282 Met、又は p. Val 282 Glu を阻害することを示す。

【0059】

上記方法の別の好ましい実施の形態では、ガルドスチャネル（KCNN4タンパク質）変異体 p. Arg 352 His、p. Val 282 Met、又は p. Val 282 Glu ポリペプチドを発現する赤血球を試験化合物及び Rb 含有培地に曝す。初期の ⁸⁶Rb 輸

10

20

30

40

50

送速度は、赤血球による⁸⁶Rb取り込みの線形最小二乗傾斜等のパラメータから算出することができる。阻害定数は、コンピュータ支援非線形曲線適合を用いた標準法によって算出することができる。

【0060】

アフリカツメガエル卵母細胞において電流電圧を測定する方法を下記実施例Iに記載する。

【0061】

上記の特徴に加えて、本発明は更に、下記の記載に出てくる他の特徴を含み、この記載は、ガルドスチャネルにおけるp. Arg 352 His突然変異の同定、並びに慢性溶血及び脱水細胞とその突然変異の関係性、並びにガルドスチャネルにおける突然変異により引き起こされる遺伝性乾燥赤血球症の治療へのセニカボクの使用に加えて、添付の図面のことも指す。

【図面の簡単な説明】

【0062】

【図1A】赤色血液細胞及びDNA研究を示す図である。突然変異分離を示す家系図である。

【図1B】赤色血液細胞及びDNA研究を示す図である。発端者1及びその母親の血液塗抹標本(MGG)である。

【図1C】赤色血液細胞及びDNA研究を示す図である。残基352の領域におけるKCNN4の多種間タンパク質配列アラインメントである。

【図1D】赤色血液細胞及びDNA研究を示す図である。KCNN4転写産物シーケンシングであり、上パネルが野生型配列であり、下パネルが突然変異c. 1055 G>A (p. Arg 352 His)を有する転写産物である。

【図1E】赤色血液細胞及びDNA研究を示す図である。0.1%~1%のNaCl溶液範囲での浸透圧勾配を用いた赤色細胞の浸透圧脆弱性試験である。A:対照、家系1由来の母親及び発端者についてT0及び37℃。B:対照及び発端者について4℃又は37℃でT24時間のインキュベーション後。

【図2A】ガルドスチャネル変異体p. Arg 352 Hisの機能分析を示す図である。活性化動態である。WT KCNN4又はp. Arg 352 His KCNN4を発現する卵母細胞について、0mVでの電流を時間の関数としてプロットした(左パネル)。最大電流強度はWT KCNN4と突然変異KCNN4とで異なり、異なる時点でのIとI_{max}との比を各条件について算出し、時間の関数としてプロットした。データは、3つの異なるバッチに由来する15個(WT)又は22個(p. Arg 352 His)の卵母細胞の平均である。矢印は、カルシウムイオノフォア灌流の開放を示す。棒グラフ(右パネル)は、WT KCNN4又はp. Arg 352 His KCNN4を発現する卵母細胞における220sでの残存電流を定量化したものである。それぞれの記録について、220sでの電流をI_{max}(約135sでの)で除算した。データは、15個(WT)又は22個(p. Arg 352 His)の卵母細胞の平均±標準誤差である。マンホイットニー検定を用いて統計分析を行った。2つの棒グラフには、0.2%のリスク差がある(双方向)。

【図2B】ガルドスチャネル変異体p. Arg 352 Hisの機能分析を示す図である。定量化を伴う卵母細胞膜におけるWT KCNN4及び突然変異KCNN4の電流-電圧曲線である。I/V曲線は、1μM A23187を含むグルコン酸培地中のWT KCNN4又はp. Arg 352 His KCNN4を発現する卵母細胞について記録された最大電流(およそ135s)に対応している。データは、15個(WT)又は22個(p. Arg 352 His)の卵母細胞に対して記録された傾斜の平均である。NIは、対照(非注入)卵母細胞(n=4)である。挿入図:矢印で示されたWT KCNN4及び突然変異KCNN4のウェスタンブロット検出(およそ50kDa)。

【図2C】ガルドスチャネル変異体p. Arg 352 Hisの機能分析を示す図である。TRAM-34阻害:p. Arg 352 His突然変異体を発現する卵母細胞において最

10

20

30

40

50

大電流に達したら、 $10\ \mu\text{M}$ TRAM-34を添加した。これにより、迅速な電流低下が誘導された。 50 mV での最大電流の平均値（白色の棒グラフ）を算出し、TRAM-34添加後の 50 mV での最小電流の平均値（灰色の棒グラフ）と比較した。データは、4個の卵母細胞の平均±標準誤差である。

【図3A】HEK293細胞におけるKCNN4発現を示す図である。全細胞構成にて記録されたwt KCNN4及びp. Arg352His KCNN4の活性化動態である。WT KCNN4又はp. Arg352His KCNN4をHEK293細胞において発現させた後、全細胞構成にてパッチクランプ実験を行った。電流は、 -60 mV の保持電位にて -120 mV から $+80\text{ mV}$ までの 150 ms の電圧傾斜プロトコルを用いたブレークイン（break-in）の直後に記録した。 -20 mV での電流を時間の関数としてプロットした。値は、12回～8回の実験の平均±標準誤差である。

【図3B】HEK293細胞におけるKCNN4発現を示す図である。wt KCNN4又はp. Arg352His KCNN4を発現するHEK293についての代表的な電流／電圧曲線である。挿入図（左上）は、ブレークイン直後及び定常状態での逆転電位を表している。値は、チューキープロットとして表す（ $n=12\sim8$ ）。クラスカルウォリス検定の後にチューキーの事後検定を用いて統計分析を行った。

【図3C】HEK293細胞におけるKCNN4発現を示す図である。wt sk4及び突然変異sk4における -20 mV での電流密度を示すチューキープロットである（ $n=12\sim8$ ；*** $p<0.001$ ）。マンホイットニー検定を用いて統計分析を行った。

【図3D】HEK293細胞におけるKCNN4発現を示す図である。インサイドアウトマクロパッチ構成にて記録されたwt KCNN4及びp. Arg352His KCNN4の電流の Ca^{2+} 依存性の活性化の代表的なトレースである。電流は、 -120 mV から $+80\text{ mV}$ までの 150 ms の電圧傾斜によって誘起させた。各トレースは、 I/V の右側に示される様々な濃度の Ca^{2+} に対応している。

【図3E】HEK293細胞におけるKCNN4発現を示す図である。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に応じて -45 mV で測定した正規化 K^+ 電流をwt KCNN4（四角）及びp. Arg352His突然変異KCNN4（丸）について $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の関数としてプロットした。実験値（平均±標準誤差）をヒルの式に当てはめた（Origin software（マサチューセッツ州ノーサンプトン））：

【数1】

$$Y = \frac{Y_{\max} [\text{Ca}^{2+}]_i^n}{(K_{0.5})^n + [\text{Ca}^{2+}]_i^n}$$

（式中、Yは各 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ についての -45 mV での相対KCNN4電流（ $I/I_{\max}$ ）であり、 $Y_{\max}$ は最大電流（ $I_{\max}$ ）であり、 $K_{0.5}$ は見掛けの解離定数であり、 n はヒル係数である）。挿入図（右下）は、ヒルの式のパラメータ $K_{0.5}$ 及び n_h を示している。値は、チューキープロットとして表す（ $n=4$ 、* $p<0.05$ ）。マンホイットニー検定を用いて統計分析を行った。

【図4A】バナジン酸塩とのインキュベーション時間を関数とする陽イオン含量を示す図である。 5 mM バナジン酸塩（対照赤色細胞については黒色円、患者の赤色細胞については黒色四角）、又は $10\ \mu\text{M}$ TRAM-34を含む 5 mM バナジン酸塩（対照赤色細胞については灰色円、患者の赤色細胞については灰色四角）とインキュベートした赤色細胞における K^+ 含量である。乾燥重量 1 g 当たりの μmol 単位のデータは、平均±標準偏差、 $n=3$ である。

【図4B】バナジン酸塩とのインキュベーション時間を関数とする細胞容量を示す図である。 5 mM バナジン酸塩（対照赤色細胞については黒色円、患者の赤色細胞については黒色四角）、又は $10\ \mu\text{M}$ TRAM-34を含む 5 mM バナジン酸塩（対照赤色細胞については灰色円、患者の赤色細胞については灰色四角）とインキュベートした赤色細胞における細胞水である。乾燥重量 1 g 当たりの μmol 単位のデータは、平均±標準偏差

、 $n = 3$ である。

【図4C】バナジン酸塩とのインキュベーション時間を関数とする陽イオン含量を示す図である。5 mM バナジン酸塩（対照赤色細胞については黒色円、患者の赤色細胞については黒色四角）、又は10 μ M TRAM-34を含む5 mM バナジン酸塩（対照赤色細胞については灰色円、患者の赤色細胞については灰色四角）とインキュベートした赤色細胞における Na^+ 含量である。乾燥重量1 g当たりの μmol 単位のデータは、平均±標準偏差、 $n = 3$ である。

【図5A】HEK293細胞におけるKCNN4突然変異体の特性評価を示す図である。WT KCNN4、V282E KCNN4、又はV282M KCNN4をHEK293細胞で発現させた後、 -60 mV の保持電位にて -120 mV から $+80\text{ mV}$ までの150 msの電圧傾斜プロトコルを用いた全細胞構成でのパッチクランプ実験を行った。8回～10回の実験の平均電流／電圧曲線を左側に表す。右パネルでは、値を、WT KCNN4及び突然変異KCNN4（V282E及びV282M）でトランスフェクトした細胞において0 mVで測定した電流密度を示すチューキー箱ひげ図として表す。クラスカルウォリス検定の後にチューキーの事後検定を用いて統計分析を行った（ $n = 8 \sim 10$ ；* $p < 0.05$ ）。

【図5B】HEK293細胞におけるKCNN4突然変異体の特性評価を示す図である。WT KCNN4をHEK293細胞で発現させた後、図5Aに記載のパッチクランプ実験を行った。1 μ M 遊離 Ca^{2+} を含有する細胞内溶液（ $n = 8$ ）、又は0.25 μ M 遊離 Ca^{2+} を含有する細胞内溶液（ $n = 4$ ）を用いて記録された細胞の平均電流／電圧曲線を左側に表す。右パネルでは、値をチューキープロットとして表す。マンホイットニー検定を用いて統計分析を行った（ $n = 4 \sim 8$ 、*** $p < 0.001$ ）。

【図5C】HEK293細胞におけるKCNN4突然変異体の特性評価を示す図である。V282E KCNN4をHEK293細胞で発現させた後、図5Aに記載のパッチクランプ実験を行った。1 μ M 遊離 Ca^{2+} を含有する細胞内溶液（ $n = 10$ ）、又は0.25 μ M 遊離 Ca^{2+} を含有する細胞内溶液（ $n = 8$ ）を用いて記録された細胞の平均電流／電圧曲線を左側に表す。右パネルでは、値をチューキープロットとして表す。マンホイットニー検定を用いて統計分析を行った（ $n = 8 \sim 10$ 、ns：有意ではない）。

【図5D】HEK293細胞におけるKCNN4突然変異体の特性評価を示す図である。V282M KCNN4をHEK293細胞で発現させた後、図5Aに記載のパッチクランプ実験を行った。1 μ M 遊離 Ca^{2+} を含有する細胞内溶液（ $n = 8$ ）、又は0.25 μ M 遊離 Ca^{2+} を含有する細胞内溶液（ $n = 8$ ）を用いて記録された細胞の平均電流／電圧曲線を左側に表す。右パネルでは、値をチューキープロットとして表す。マンホイットニー検定を用いて統計分析を行った（ $n = 8$ 、 $p < 0.001$ ）。

【図6A】HEK293細胞におけるKCNN4突然変異体に対するセニカボクの効果を示す図である。セニカボクによるWT KCNN4及び突然変異KCNN4（R352H、V282M及びV282E）の用量依存性阻害を示す代表的なトレースである（ $n =$ 各条件で記録された細胞数）。全細胞パッチクランプ構成で記録された電流は、 -60 mV の保持電位にて -120 mV から $+80\text{ mV}$ までの150 msの電圧傾斜によって誘起させた。各トレースは、 I/V の右側に示される様々な濃度のセニカボクに対応している。

【図6B】HEK293細胞におけるKCNN4突然変異体に対するセニカボクの効果を示す図である。〔セニカボク〕に応じて0 mVで測定された正規化 K^+ 電流をWT KCNN4（黒色四角）、R352H突然変異KCNN4（黒色丸）及びV282M突然変異KCNN4（黒色菱形）について〔セニカボク〕の関数としてプロットした。実験値（平均±標準誤差）を、ヒルの式を用いて当てはめた。

【図6C】HEK293細胞におけるKCNN4突然変異体に対するセニカボクの効果を示す図である。各条件についてのIC50値を示すチューキー箱ひげ図である（ $n = 5 \sim 11$ 、* $p < 0.05$ ）。クラスカルウォリス検定の後にチューキーの事後検定を用いて統計分析を行った。

【図7A】KCNN4 R352H突然変異を有する赤色血液細胞に対するセニカボク及

びTRAM-34の効果を示す図である。対照の赤色血液細胞における正味の K^+ 流の動態である。 $5\mu M$ バナジン酸塩を、非存在下にて（丸）、又は $10\mu M$ TRAM-34（四角）若しくは $0.4\mu M$ セニカボク（三角）の存在下にて $t=0$ で赤色細胞に添加した。データは、2名の異なる対照の血液を用いた3回にわたる代表的な一実験に由来する3つのサンプルの平均±標準誤差である。

【図7B】KCNN4 R352H突然変異を有する赤色血液細胞に対するセニカボク及びTRAM-34の効果を示す図である。患者の赤色血液細胞における正味の K^+ 流の動態である。 $5\mu M$ バナジン酸塩を、非存在下にて（丸）、又は $10\mu M$ TRAM-34（四角）若しくは $0.4\mu M$ セニカボク（三角）の存在下にて $t=0$ で赤色細胞に添加した。データは、単一の患者の血液を用いた3回にわたる代表的な一実験に由来する3つのサンプルの平均±標準誤差である。

【図7C】KCNN4 R352H突然変異を有する赤色血液細胞に対するセニカボク及びTRAM-34の効果を示す図である。対照の赤色血液細胞における含水量の動態である。 $5\mu M$ バナジン酸塩を、非存在下にて（丸）、又は $10\mu M$ TRAM-34（四角）若しくは $0.4\mu M$ セニカボク（三角）の存在下にて $t=0$ で赤色細胞に添加した。データは、2名の異なる対照の血液を用いた3回にわたる代表的な一実験に由来する3つのサンプルの平均±標準誤差である。

【図7D】KCNN4 R352H突然変異を有する赤色血液細胞に対するセニカボク及びTRAM-34の効果を示す図である。患者の赤色血液細胞における含水量の動態である。 $5\mu M$ バナジン酸塩を、非存在下にて（丸）、又は $10\mu M$ TRAM-34（四角）若しくは $0.4\mu M$ セニカボク（三角）の存在下にて $t=0$ で赤色細胞に添加した。データは、単一の患者の血液を用いた3回にわたる代表的な一実験に由来する3つのサンプルの平均±標準誤差である。

【図8A】KCNN4 R352H突然変異を有する対照の赤色血液細胞の浸透圧抵抗を示す図である。血液を $4^\circ C$ でインキュベートした。インキュベーションは、非存在下にて（菱形）、又は $10\mu M$ TRAM-34（灰色四角）、 $0.4\mu M$ セニカボク（灰色三角、破線）若しくは $4\mu M$ セニカボク（明灰色のバツ印）の存在下にて行った。データは、2名の異なる対照の血液を用いた2～3回の異なる実験の代表値である。

【図8B】KCNN4 R352H突然変異を有する患者の赤色血液細胞の浸透圧抵抗を示す図である。血液を $4^\circ C$ でインキュベートした。インキュベーションは、非存在下にて（菱形）、又は $10\mu M$ TRAM-34（灰色四角）、 $0.4\mu M$ セニカボク（灰色三角、破線）若しくは $4\mu M$ セニカボク（明灰色のバツ印）の存在下にて行った。データは、単一の患者の血液を用いた2～3回の異なる実験の代表値である。

【図8C】KCNN4 R352H突然変異を有する対照の赤色血液細胞の浸透圧抵抗を示す図である。血液を $37^\circ C$ でインキュベートした。インキュベーションは、非存在下にて（菱形）、又は $10\mu M$ TRAM-34（灰色四角）、 $0.4\mu M$ セニカボク（灰色三角、破線）若しくは $4\mu M$ セニカボク（明灰色のバツ印）の存在下にて行った。データは、2名の異なる対照の血液を用いた2～3回の異なる実験の代表値である。

【図8D】KCNN4 R352H突然変異を有する患者の赤色血液細胞の浸透圧抵抗を示す図である。血液を $37^\circ C$ でインキュベートした。インキュベーションは、非存在下にて（菱形）、又は $10\mu M$ TRAM-34（灰色四角）、 $0.4\mu M$ セニカボク（灰色三角、破線）若しくは $4\mu M$ セニカボク（明灰色のバツ印）の存在下にて行った。データは、単一の患者の血液を用いた2～3回の異なる実験の代表値である。

【図9】ヒト赤色血液細胞におけるKCNN4の電流に対するセニカボクの効果を示す図である。内因性のKCNN4の電流を、全細胞パッチクランプ構成を用いて記録した。電流は、 $-20mV$ の保持電位にて $-40mV$ から $+70mV$ までの $800ms$ の電圧傾斜プロトコルによって誘起させた。赤色血液細胞を5分間、TRAM-34（ $10\mu M$ ）又はセニカボク（ $0.5\mu M$ ）と予めインキュベートさせた後、パッチクランプ実験を行った。患者（黄色、 $n=4$ ）、セニカボクで処理した患者（緑色、 $n=6$ ）又は対照（灰色、 $n=5$ ）、TRAM-34で処理した対照（橙色、 $n=4$ ）、又はセニカボクで処理し

10

20

30

40

50

た対照（青色、 $n = 3$ ）の代表的な電流／電圧曲線を示している。挿入図（右下）は、赤色血液細胞にて記録された電流の定量化を示したものである。値は、チューキープロットとして表す（*** $p < 0.001$ ）。

【発明を実施するための形態】

【実施例】

【0063】

実施例 I：遺伝性乾燥赤血球症に関連するガルドスチャネルにおける $p. Arg352His$ 突然変異の同定

1. 材料及び方法

血液学的検査：低張生理食塩水溶液中の赤色血液細胞の脆弱性の観察に基づく浸透圧脆弱性検査をサンプリング直後及び $4^{\circ}C$ 又は $37^{\circ}C$ での 24 時間のインキュベーション後に行った。

【0064】

NMR：NMR 実験は、イオノフォア A23187 (Sigma Aldrich) による刺激を用いて $400\text{ MHz } ^1H$ NMR 分光計 (Bruker Biospin、マサチューセッツ州ビレリカ) にて行った。

【0065】

NGS シークエンシング：エクソームシークエンシングは、Ion AmpliSeq (商標) (Thermo Fisher Scientific Inc.、米国マサチューセッツ州ウォルサム) を用いたエクソーム濃縮、Ion OneTouch (商標) 2 System の Ion PI (商標) Template OT2 200 Kit v2 を用いたテンプレート作製、並びに Ion Proton (商標) Sequencer の Ion PI (商標) Chip Kit v2 及び Ion PI (商標) Sequencing 200 Kit v2 (Thermo Fisher Scientific Inc.、米国マサチューセッツ州ウォルサム) を用いたシークエンシング後に行った。生データを初めに、提供されるソフトウェアスイートによりアライメントして、BAM ファイルを作成した。包括度 (coverage) 及びシークエンシング深度分析を、BEDtools suite v2.17 (Quinlan and Hall, 2010) 及び社内スクリプトを用いてコンピュータ処理した。変異体を、Torrent Browser Variant コーラー (バージョン 4.0.2) を用いて同定し、AnnoVar (Wang et al., 2010) を含む社内「VarAFT」システムを用いてアノテーションを行い、優先順位を付けた。

【0066】

突然変異は、サンガーシークエンシング (3500XL Genetic Analyzer (商標)、Life Technologies、カリフォルニア州カールスバッド) により新鮮網状赤血球の DNA サンプル及び KCNN4 転写産物に対して確認した。

【0067】

アフリカツメガエル卵母細胞における実験：プラスミド $p.cDNA3KCNN4-HA$ (Joiner et al., 2001) を用いて、PCR により点突然変異 $p. Arg352His$ を導入した。ヘマグルチニンタグ (HA) は KCNN4 の C 末端に存在していた (Joiner et al., 1997)。本出願人らの倫理委員会にて推奨される手法に従って、雌性のアフリカツメガエルに MS222 で麻酔をかけた。卵母細胞を採取し、先に公開されているように (Barneaud-Rocca et al., 2011) 注入した。

【0068】

電流の記録は下記のように行った： -120 mV から $+80\text{ mV}$ までの 2 秒間の傾斜プロトコル、保持電位 -80 mV を、Clampex (PClamp, Molecular Devices Corporation) を用いて適用した。塩化物チャネル活性化を考慮に入れないように、電流の記録は、塩化物をグルコン酸塩 (グルコン酸 $Na\ 85\text{ mM}$ 及びグルコン酸 $K\ 1\text{ mM}$) に置き換えた MBS 中で行った。接合部電位を、寒天橋及び $3\text{ M } KCl$ を用いて最小にした。 $3\text{ M } KCl$ を充填した電極は、 0.5 M オーム抵抗であった。このグルコン酸 MBS にて平衡化した後、グルコン酸 MBS 中、 $1\text{ }\mu\text{M}$ のカルシウムイオノフォア A23

187によってKCNN4を活性化した。対照の卵母細胞では、イオノフォア添加では電流が活性化しなかった。

【0069】

卵母細胞に対するウェスタンブロット：卵母細胞膜を先に記載のように準備した (Martial et al., 2007)。抗HA抗体 (1/1000、Sigma) を用いてKCNN4-HAの免疫検出を行った。異なるサンプルにおけるKCNN4の発現レベルを比較するために、細胞膜マーカー β 1 Na、K ATPアーゼを使用した (1/500、Sigma)。シグナルを、Immobilon Western試薬 (Millipore) 及びFusion F X7 (Vilber-Lourmat、フランス) との化学発光反応によって検出した。 β 1 Na、K ATPアーゼシグナルに対するKCNN4バンドの強度を、ImageJ Version 1.44ソフトウェア (NCBI) を用いて定量化した。

10

【0070】

HEK293細胞のトランスフェクション：HEK293細胞をDMEM glutamax (Gibco) 10% FBSペニシリンーストレプトマイシン中で増殖させた。細胞を、CaPO₄を用いて1 μ gのWT pcDNA3-KCNN4-HA又は点突然変異pcDNA3-KCNN4-HA及び0.5 μ gのpIRES-eYFPで同時トランスフェクトした。16時間後、細胞をPBSで2回洗浄し、蛍光標識細胞に対してパッチークランプ記録を行った。

【0071】

パッチークランプ電気生理：ガラスピペット (Brand、ドイツ、ウェルトヘイム) を、水平型のピペットプレー (P-97、Sutter Instrument Co.、カリフォルニア州ノバート) にて作製し、3M Ω ~5M Ω の範囲の最終抵抗を得た。全細胞実験については、パッチ溶液をNaCl 140mM、KCl 5mM、CaCl₂ 1mM、グルコース 29mM、Hepes 25mM (NaOHでpHを7.4に調整する) とした。細胞内溶液は、KCl 30mM、グルコン酸K 100mM、EGTA 5mM、Hepes 10mM (NaOHでpHを7.2に調整する)、CaCl₂ 4.19mM (1 μ M遊離カルシウムに相当する)、MgATP 2mMとした。電流は、-60mVの保持電位にて-120mVから+80mVまでの傾斜プロトコルを用いて室温で測定した (サンプリング周波数 10kHz、フィルタリング 1kHz)。

20

【0072】

インサイドアウト記録：KCNN4のカルシウム依存性を、KCl 30mM、グルコン酸K 100mM、EGTA 5mM、Hepes 10 (KOHでpHを7.2に調整する)、4.91mM; 4.19mM; 3.61mM; 2.82mM; 1.7mMと様々な濃度のCaCl₂ (10⁻⁵M; 10⁻⁶M; 5 $\times$ 10⁻⁷M; 2.5 $\times$ 10⁻⁷M; 10⁻⁷Mの遊離カルシウム) の細胞内 (浴) 溶液を用いて調べた。Maxchelatorを用いて、遊離Ca²⁺濃度を算出した (<http://maxchelator.stanford.edu/CaEGTA-TS.htm>)。細胞外溶液：NaCl 140mM、KCl 5mM、CaCl₂ 1mM、グルコース 29mM、Hepes 25mM (NaOHでpHを7.4に調整する)。電流は、-120mVから80mVまでの電圧傾斜 (150ms) によって惹起させ、1kHzでフィルタリングを行い、10kHzのサンプリング周波数にて得た。全てのトレースを液体接合部電位に対して補正した。用量応答実験のために、-45mVでの電流の正規化値を遊離Ca²⁺濃度に対してプロットした。

30

40

【0073】

全てのパッチークランプ実験を、PC制御したEPC-9パッチークランプ増幅器 (HEKA、ドイツ、ランブレヒト/プファルツ州) を用いて行った。電流を得て、Pulse+Pulsefitソフトウェア (HEKA) を用いて分析した。

【0074】

免疫組織：HEK293細胞におけるKCNN4-HAの免疫検出を、抗HA抗体 (Sigma-Aldrich) を用いて行った。

【0075】

50

赤色細胞の陽イオン含量及び容量測定：家系1のインフォームドコンセントを得た（informed）患者及び健常なボランティアから新鮮静脈血を静脈穿刺によって得た。24時間、インキュベーションを行い、血液サンプルを37℃又は4℃で保存した。

【0076】

バナジン酸塩実験：血液を室温でNaCl（147mM）、KCl（5mM）、MgSO₄（2mM）、CaCl₂（1mM）、Hepes/NaOH pH7.4（10mM）を含有する媒体で4回洗浄した。次いで、赤色細胞懸濁液を、37℃、30%ヘマトクリットにてインキュベートし、5mM バナジン酸塩を単独で、又は10μM TRAM-34とともに添加した。サンプリング時間の数分前に、400μlの細胞懸濁液を採り、3個のナイロンチューブに入れ、これを正確なサンプリング時間にて4℃、20000gで10分間、遠心分離した。細胞外のイオン含量の測定のために上清を回収した。赤色細胞のペレットを抽出し、直後に湿重量を計測した。一晚加熱した後（80℃）、乾燥重量を測定した。血中（packed）細胞間の捕捉媒体に対応する3.64%の補正を行い、含水量を算出した。細胞内のイオンは、5mlのmilliRho水（Millipore）中の4℃での一晚のインキュベーションによって乾燥ペレットから抽出した。EppendorfのELEX6361を用いたフレイム分光法によってNa⁺及びK⁺を測定した。

10

【0077】

2. 結果

初めに、浮腫を伴わない重度の子宮貧血について、胎児（発端者1）を調べたところ、27週間で1回の子宮内輸血が必要であった（Hb：30g/l）。早産後、胎児に出生直後、2週齢（Hb：65g/l）及び6週齢（Hb：70g/l）にて3回の追加の輸血を行った後、6週間、EPOで治療した。治療下で、網状赤血球数は徐々に増加し、Hb値は3ヶ月齢で90g/lで安定した。更なる輸血は不必要であった。現在、4歳10ヶ月齢の発端者は、軽度の貧血及び脾腫を呈した。病歴から、発端者の母親（mother's proband）が幼児期に原因不明の中等度の慢性溶血性貧血を患っていたことが明らかとなった。母親は乳児期から青年期に亘って定期的な輸血レジメンによる治療を受けた。キレート療法を8歳から開始し、25歳で脾臓摘出術を受けた。成人期では、出産時に1回、パルボウイルスB19に感染時にもう1回の2回、輸血を行った。フランス系のこの家系（家系1）の他の4人の親族も、慢性溶血性貧血を患っていた（図1A）。4人のうち3人が脾臓摘出術を受けており、2人が定期的な輸血及び長期のキレート療法を受けていた。

20

30

【0078】

第2の血縁関係にない家系（家系2）の25歳の発端者（発端者2）は、幼少期に中等度の慢性溶血性貧血を患っていた。発端者は、輸血を受けたことがなく、胆石症のために胆嚢摘出術を受けていた。発端者の父親はポーランド系であり、重度の溶血性貧血を患い、脾臓摘出術及び随時の輸血による治療を行っていたことが報告された。発端者の2歳の息子は、正常妊娠（normal pregnancy carried to term）を経て生まれ、良好な忍容性を示す慢性溶血性貧血を呈していた。発端者1、その母親、発端者2及びその息子の血液学的パラメータを下記表1にまとめる。貧血に加えて、4人全てにMCHC値の個別の上昇が見られる。

【0079】

40

【表 1】

表 1：K C N N 4 c. 1 0 5 5 G > A 突然変異を持つ 4 人の被験体についての血液学的パラメータ（定常状態条件での代表値）

成人の 正常範囲	Hb(g/l) 130～160	MCV(fl) 80～100	網状赤血球数 (G/l) 20～80	M C H C (g/l) 310～350	血小板 (G/l) 150～400	フェリチン (μg/l) 22～322
発端者 1 (4 歳)	9 8	8 7. 9	2 6 3	3 5 6	3 1 9	1 1 6
発端者 1 の母親	8 5	1 0 9	2 5 5	3 5 4	7 8 3	9 4
発端者 2	1 1 0	9 3. 1	2 4 9	3 6 1	2 3 0	N d
発端者 2 の息子 (2 歳)	1 0 4	8 6. 9	3 6 3	3 6 5	4 6 4	1 2 1

10

【0 0 8 0】

発端者 1 の血液塗抹の顕微鏡検査から、1 %未満の標的赤血球、多染性赤色血液細胞、涙滴赤血球、ヘモグロビン分布が異常であり得る楕円赤血球、ヘミゴースト、咬傷赤血球、接続赤血球、破碎赤血球及び稀な口唇状の赤色細胞を含む軽度の変形赤血球症が示された（図 1 B）。発端者 1 の母親及び発端者 2 については、変形赤血球症がより顕著であり、有棘赤血球の存在の点で奇形は類似していた（図 1 B）。赤色血液細胞の好塩基性斑点はなかった。

20

【0 0 8 1】

E M A 検査、赤色細胞膜タンパク質の電気泳動及びヘモグロビン試験は、発端者ら全てで正常であった。血液薄膜上に口唇状赤血球がほとんどなく、エクタサイトメトリー（ektacytometry）を繰り返したところ、4 人全ての検査した罹患者で正常であるとみなされたことから、脱水遺伝性有口赤血球症（xerocytosis）の診断は、初期には保たれなかった。

【0 0 8 2】

全エクソームシーケンシングを、発端者、罹患した発端者の母親及び罹患していない発端者の妹の家系 1 の 3 人の被験体に対して行った。変異体は、d b S N P 1 3 7 に対して、罹患者のみに存在するヘテロ接合型のエクソン突然変異についてフィルタリングを行った。3 3 の遺伝子がエクソンのヘテロ接合型の非同義突然変異を持つことが認められ、その中でもガルドスチャネルをコードする K C N N 4 は、赤色細胞における発現のために最も矛盾のない候補であった。サンガーシーケンシングによって確認されたミスセンス突然変異 c. 1 0 5 5 G > A (p. A r g 3 5 2 H i s) は、カルモジュリン相互作用領域に位置しており、種間で高度に保存された残基を伴い（図 1 C）、コンピュータによる分析によって、最大値 1 に対して 0. 9 9 2 のスコアにて病原性であると予測された（P o l y p h e n : <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>）。慢性溶血に罹患した 2 人及び罹患していない 1 人の家系 1 の他の 3 人の親族において突然変異分離を調べたところ、突然変異と結び付く表現型の優性遺伝と一致した。家系 2 の 2 人の罹患した被験体における K C N N 4 のダイレクトシーケンシングの後、同じミスセンス突然変異 c. 1 0 5 5 G > A が、どちらの被験体においてもヘテロ接合型の条件で同定された。正常サイズの転写産物が突然変異についてヘテロ接合体であったことから、スプライシングは置換による影響を受けなかった（図 1 D）。発端者 1 におけるエクソームシーケンシングのデータを用いて、F A M 3 8 において、P I E Z O 1 をコードし、これまで H X の主な原因とされてきた突然変異が存在しなかったことが確認された。

30

40

【0 0 8 3】

次いで、更なる研究を発端者 1 及びその母親に対して行った。浸透圧脆弱性を調べ、赤

50

色細胞の脱水を確認した。母親及び息子がどちらも、 37°C での24時間のインキュベーション後に異常なプロファイルを示し、正常対照と比べて減少した塩濃度にて50%の赤色細胞の溶解が得られた(図1E)。このプロファイルは、 4°C で24時間後に同じ分析を行った場合には正常対照と類似し、これにより、エクタサイトメトリーを 4°C でのインキュベーション後に行ったことから、エクタサイトメトリーが正常であった理由が説明される。サンプリング後の様々な時間及び温度の条件における血漿 K^{+} 濃度を電位差測定により測定したところ、正常範囲内であった。 Ca^{2+} 刺激下での K^{+} の動的流出を、イオノフォアA23187による刺激を用いた赤血球懸濁液の ^{39}K NMRにより評価した。 Ca^{2+} 活性化後の K^{+} 放出の短時間の遅延を除いて、摂動は観察されなかった(データ図示せず)。

10

【0084】

加えて、赤色細胞の脱水は通常、溶血性貧血を伴い、これは、G6PD欠損細胞及びHbS細胞の正常な赤色血液細胞の両方において先に示されるように、収縮がホスファチジルセリン(PS)曝露を刺激するためである(Lang et al., 2004, Weiss et al., 2011)。陽イオン漏出と溶血性貧血との関係性は、Band 3突然変異を含む他の膜タンパク質突然変異でも観察されている(Bruce et al., 2005)。本試験では、ガルドスチャネルに突然変異を含む患者において、家系1ではかなり重度の貧血である一方で、家系2の人及びPIEZO1突然変異を有する人は正常又は準正常のHbレベルを呈するという疾患重症度の違いが観察された(Carella et al., 1998, Houston et al., 2011)。実際、家系1の罹患者のうち2人では、発端者は極めて重度な子宮内貧血エピソードを伴う顕著な貧血を呈し(他に同定された原因なし、特に母胎不適合なし)、母親は多くの事例で多くの輸血が必要であった。このことから、これらの患者において、長期の Ca^{2+} 活性化によって起こり、PS曝露をもたらすスクランブラーゼ活性化に対する感受性が高まり得ることが示唆される。発端者の母親が定期的な輸血及びDeferriproxによる治療を受けており、発端者自身が鉄過剰を患うには若すぎたこともあり、慢性貧血に起因する鉄過剰を家系1で評価することが難しい。第2の家系では、患者は慢性溶血性貧血で見られるような中等度の鉄過剰を呈している。

20

【0085】

次いで、ガルドスチャネル変異体p. Arg352Hisの機能を、アフリカツメガエル卵母細胞における突然変異cDNAを含むプラスミドの発現により調べた。電流電圧曲線により、ミスセンス突然変異p. Arg352Hisが野生型チャネルと比べてチャネルを介するイオン伝導度を妨げないことが分かった(図2A)。カルシウムイオノフォアにより誘導されたWTチャネル及びp. Arg352Hisチャネルの活性化相は類似していたが、WT KCNN4活性が最大に達した後、減少しているのに対し、p. Arg352His突然変異体の活性は、数分間、比較的一定に保たれている。p. Arg352Hisにより高く維持された電流は、ピークから2分を超えて記録することが難しかった。逆転電位(-120mV)はWTチャネルと突然変異チャネルとで類似していたが、アフリカツメガエル卵母細胞におけるp. Arg352His KCNN4発現により誘起された電流はWTで観察されるものよりも高かった(図2B)。ウェスタンブロットにより、これらのタンパク質がどちらも同様のレベルで発現していることが確認され、このことから、突然変異チャネルで観察された伝導度の増大が突然変異に直接関連していることが示唆される。これらのデータから、突然変異がより長期の活性化状態へとチャネル活性の調節を変えることが示される。従来のKCNN4阻害剤であるTRAM-34を用いて行った阻害試験では電流発生の低減が起こり、このことから、p. Arg352His変異体が阻害に対して感受性であることが示される(図2C)。

30

40

【0086】

p. Arg352His KCNN4を更に特性評価するために、HEK293細胞をWTチャネル又は突然変異チャネルでトランスフェクトした。突然変異は原形質膜へのチャネルのアドレッシング(addressing)を妨げない。全細胞記録により、WT KCNN4又はp. Arg352His KCNN4を発現するHEK293細胞でカルシウム依

50

存性活性化の動態が異なることが分かる（図 3 A）。前者では、 Ca^{2+} がピペットから細胞内区画へと拡散しながら、電流が徐々に現れる。これに対して、後者の場合、突然変異体についてブレークイン直後に電流が活性化され、記録時には更に増大している。卵母細胞実験と同じように、最大電流密度が $\text{p. Arg 352 His KCNN4}$ を発現する細胞において増大している（図 3 A～図 3 C）。これらの結果から、突然変異がカルシウムに対するチャネル感受性を増大させることが示唆される。WT についてブレークインと定常状態との間で観察される逆転電位の左方向ヘシフトにより、チャネルを活性化させる Ca^{2+} 拡散に起因する遅延が確認される。この遅延は $\text{p. Arg 352 His KCNN4}$ では観察されない。巨大切り採り（giant excised）インサイドアウトパッチークランプ実験を行うことにより、突然変異 KCNN4 に対する WT KCNN4 のカルシウム感受性を更に調べた。図 3 D には、電圧及び膜の内面に適用された Ca^{2+} 濃度の関数としての K^+ 電流の代表的なトレースを示している。図 3 E では、 -45 mV での電流を Ca^{2+} 濃度の関数としてプロットしている。定量的分析により、WT KCNN4 のカルシウム依存性が $0.95 \pm 0.09 \mu\text{M}$ の見掛けの Kd を有するのに対し、 p. Arg 352 His 突然変異体の見掛けの Kd は、 $0.21 \pm 0.02 \mu\text{M}$ であることが分かった。ヒル係数は、WT KCNN4 と突然変異型 KCNN4 とで統計的な差がない（それぞれ、 3.75 ± 1.45 及び 3.3 ± 0.85 、 $n = 4$ ）。

【0087】

電気生理学的データによれば、 KCNN4 は対照と比べて患者の赤色細胞でのより低いカルシウム濃度により活性化されると考えられる。対照又は患者の赤色細胞におけるガルドスチャネル活性化の動態に対する細胞内 Ca^{2+} の増大の影響を評価するために、正味のカリウム流をバナジン酸塩で処理した赤色細胞において測定した。バナジン酸塩が、カルシウムポンプを阻害し、更にカルシウム流入を活性化させることにより、赤色細胞における細胞内 Ca^{2+} 濃度を増大させる（Varecka and Carafoli, 1982, Bennekou et al., 2012）。図 4 には、 $10 \mu\text{M}$ TRAM-34 を含む又は含まない 5 mM バナジン酸塩の存在下での対照又は患者の赤色細胞の K^+ 含量を示している。バナジン酸塩は、1 時間では対照の赤色細胞における細胞内 K^+ 含量を有意に変化させなかったのに対し、患者の赤色細胞では細胞内 K^+ の有意な減少が観察され、この減少は TRAM-34 によって妨げられた。図 4 B に示されるように、 K^+ 流出は細胞容量の減少と相関関係にある。 Na^+ 含量の有意な変化は、対照及び患者の赤色細胞のどちらでも観察されなかった（図 4 C）。

【0088】

37°C 又は 4°C で 24 時間保存した血液中の赤色細胞の K^+ 含量を下記表 2 に示す。

【0089】

【表 2】

表 2：血液温度を関数とする赤色細胞における K^+ 含量。データを乾燥重量 1 グラム当たりの μmol で表す（3 サンプルについて $\mu\text{mol/g d. w.} \pm$ 標準偏差）。

K^+ 含量	t 0	24 時間 37°C	24 時間 4°C
対照	281.1 ± 4.9	260.0 ± 1.7	257.0 ± 3.4
発端者 1 の叔母(罹患)	316.9 ± 5.5	223.1 ± 10.2	281.6 ± 4.6

【0090】

対照赤色細胞では、 37°C で 24 時間後に K^+ 含量が $21.1 \mu\text{mol/g d. w.}$ 減少している。この変動は、 4°C で 24 時間保存した血液でも同様である（ $-24.1 \mu\text{mol/g d. w.}$ ）。これに対して、 K^+ 喪失は、 4°C で 24 時間保存した患者の血液での $35.3 \mu\text{mol/g d. w.}$ と比べて、 37°C で保存した患者の赤色細胞では $93.8 \mu\text{mol/g d. w.}$ である。

【0091】

実施例 I I：ガルドスチャネルにおける突然変異により引き起こされる遺伝性乾燥赤血球症のサブセットの治療のためのセニカボクの使用

10

20

30

40

50

1. 材料及び方法

プラスミド p c D N A 3 - K C N N 4 - H A を用いて、上記のように P C R により点突然変異 V 2 8 2 M 及び V 2 8 2 E を導入した。

【0092】

H E K 2 9 3 細胞のトランスフェクション：H E K 2 9 3 細胞を D M E M g l u t a m a x (Gibco) 1 0 % F B S 1 % ペニシリン-ストレプトマイシン中で増殖させた。細胞を、C a P O ₄ を用いて 1 μ g の野生型 (W T) 又は点突然変異 p c D N A 3 - K C N N 4 - H A 及び 0. 5 μ g の p I R E S - e Y F P で同時トランスフェクトした。1 6 時間後、細胞を P B S で 2 回洗浄し、蛍光標識細胞に対してパッチークランプを行った。

10

【0093】

パッチークランプ電気生理：ガラスピペット (Brand、ドイツ、ウェルトヘイム) を、水平型のピペットプラー (P - 9 7、Sutter Instrument Co.、カリフォルニア州ノバート) にて作製し、3 M Ω ~ 5 M Ω の範囲の最終抵抗を得た。H E K 細胞における全細胞実験については、パッチ溶液を N a C l 1 4 5 m M、K C l 5 m M、C a C l ₂ 2 m M、M g C l ₂ 1 m M、H e p e s 1 0 m M (N a O H で p H を 7. 4 に調整する) (3 2 0 m O s m) とした。細胞内溶液は、K C l 1 4 5 m M、M g C l ₂ 1 m M、H e p e s 1 0 m M (K O H で p H を 7. 2 に調整する)、C a C l ₂ 0. 8 7 m M E G T A 1 m M (1 μ M 遊離カルシウムに相当する。M a x c h e l a t o r ソフトウェアを遊離 C a ²⁺ 濃度の算出に使用した (<http://maxchelator.stanford.edu/CaEGTA-TS.htm>)) (3 0 5 m O s m) とした。電流は、- 6 0 m V の保持電位にて - 1 2 0 m V から + 8 0 m V までの傾斜プロトコルを用いて室温で測定した (サンプリング周波数 1 0 k H z、フィルタリング 1 k H z)。

20

【0094】

ヒト赤色血液細胞における全細胞実験については、ガラスピペット (Brand、ドイツ、ウェルトヘイム) を、垂直型のピペットプラー (P I P 5 ; H E K A、ドイツ、ランブレヒト / プファルツ州) にて作製し、1 7 M Ω ~ 2 0 M Ω の範囲の最終抵抗を得た。ピペット及び浴には同じ溶液を使用し、K C l 1 5 0 m M、N a C l 5 m M、M g C l ₂ 1 m M、H e p e s 1 0 m M、C a C l ₂ 1 m M、p H 7. 4 (3 2 0 m O s m) を含んでいた。電流は、- 2 0 m V の保持電位にて 8 0 0 m s の間、- 4 0 m V から + 7 0 m V までの傾斜プロトコルを用いて室温で測定した (サンプリング周波数 1 0 k H z、フィルタリング 1 k H z)。全てのパッチークランプ実験を、P C 制御した E P C 9 パッチークランプ増幅器 (H E K A、ドイツ、ランブレヒト / プファルツ州) を用いて行った。電流を得て、P u l s e + P u l s e f i t ソフトウェア (H E K A) を用いて分析した。

30

【0095】

血液学的検査：家系 1 のインフォームドコンセントを得た (informed) 患者 (上記を参照されたい) 及び健常なボランティアから新鮮静脈血を静脈穿刺によって得た。低張生理食塩水溶液での浸透圧脆弱性検査を、1 0 μ M T R A M - 3 4 又は 0. 4 μ M 若しくは 4 μ M セニカポクの存在下又は非存在下において 4 ° C 又は 3 7 ° C での 2 5 時間のインキュベーション後に赤色血液細胞に対して行った。

40

【0096】

赤色血液細胞の陽イオン含量及び容量の測定：新たに採った血液を室温で、N a C l 1 4 7 m M、K C l 5 m M、M g S O ₄ 2 m M、C a C l ₂ 1 m M、H e p e s 1 0 m M (N a O H で緩衝化、p H 7. 4) (3 2 0 m O s m) を含む媒体で 4 回洗浄した。次いで、赤色血液細胞懸濁液を、3 7 ° C、3 0 % ヘマトクリットにてインキュベートし、5 m M バナジン酸塩を単独で、又は 1 0 μ M T R A M - 3 4 若しくは様々な濃度のセニカポクとともに添加した。サンプリング時間の数分前に、4 0 0 μ l の細胞懸濁液を採り、3 個のナイロンチューブに入れ、これを正確なサンプリング時間にて 4 ° C、2 0 0 0 0 g で 1 0 分間、遠心分離した。細胞外のイオン含量の測定のために上清を回収した。赤色細胞のペレットを抽出し、直後に秤量した。次いで、一晚加熱した後 (8 0 ° C)、

50

乾燥重量を測定した。血中細胞間の捕捉媒体に対応する 3.64% の補正を行い、含水量を算出した。細胞内のイオンは、5 ml の *milli Rho* 水 (Millipore) 中の 4 °C での一晩のインキュベーションによって乾燥ペレットから抽出した。PFP7 (Jenway) を用いたフレイム分光法によって Na^+ 及び K^+ を測定した。統計値：マンホイットニー検定を、赤色血液細胞実験における患者に対する対照又は阻害剤に対する対照の比較に用いた。

【0097】

2. 結果

HX と結び付く KCNN4 の様々な突然変異を調べ、比較するために、HEK293 細胞を、HX 赤色血液細胞に対してパッチークランプを行う難しさを克服することのできる信頼性のある異種発現系として使用した。

10

【0098】

KCNN4 突然変異体 V282M 及び V282E の電流特徴

HEK293 細胞を、WT KCNN4 又は V1282 での 2 つの突然変異体、すなわち V282E 及び V282M KCNN4 で一過性トランスフェクトした後、電流を全細胞構成で記録した。図 5A から、V1282 での 2 つの置換が WT と比べて電流密度を増大させたことが分かる。これらの電流のカルシウム感受性を評価するために、同じ実験を、2 つの異なる細胞内 Ca^{2+} 濃度：WT KCNN4 の EC50 に対応する $1 \mu\text{M}$ 及び R352H 突然変異体の EC50 に対応する $0.25 \mu\text{M}$ にて行った（上記を参照されたい）。図 5B 及び図 5C から、2 つの細胞内カルシウム濃度での V282E KCNN4 及び WT KCNN4 の活性が類似していることが分かる。しかしながら、このカルシウム感受性は V282M 突然変異体では観察されず、細胞内 Ca^{2+} $0.25 \mu\text{M}$ と $1 \mu\text{M}$ とで電流密度が類似している（図 5D）。

20

【0099】

セニカボクに対する感受性

HX と結び付く 3 つの異なる突然変異のセニカボク感受性を、各コンストラクトで一過性トランスフェクトした HEK 細胞にて評価した。図 6A には、様々な濃度のセニカボクを関数とする WT KCNN4 及び突然変異 KCNN4 についての代表的な電流／電圧曲線を示している。V282E はセニカボクに対してほぼ不感受性であることが観察され、 $10 \mu\text{M}$ セニカボクにおいて僅かな阻害しか観察されなかった。これに対して、R352H 突然変異体は、WT チャネルよりもセニカボクに対する感受性が極めて高い。WT チャネルと V282M チャネルとは類似のセニカボク感受性を呈している。図 6B は、WT と、2 つの突然変異体 R352H 及び V282M との阻害の用量応答曲線をまとめたものである。WT 及び V282M は、IC50 が 10 nM 付近と有意差はない。これに対して、R352H 突然変異体は、 $\text{IC}_{50} = 0.3 \text{ nM}$ と WT よりもおよそ 30 倍感受性が高い（図 6C）。

30

【0100】

R352H 突然変異を有する赤色細胞に対するセニカボクの効果

新鮮血液サンプルを、ガルドスチャネルに対する R352H 突然変異を持つ患者から得た。阻害剤が HEK293 細胞と同様に赤色血液細胞においても突然変異ガルドスチャネルに対して有効であり得るか否かを調べるために、その効果を、1) ガルドスチャネル活性化後の K^+ 喪失、2) 赤色血液細胞の浸透圧抵抗、及び 3) 赤色血液細胞の Ca^{2+} 活性化 K^+ 電流に対して評価した。セニカボクは、血液を用いた実験において高いヘモグロビン濃度を構成させるために HEK293 細胞よりも高い濃度で使用した。

40

【0101】

1) 赤色血液細胞の K^+ 喪失

ガルドスチャネルは、細胞内 Ca^{2+} の増大により活性化した。バナジン酸塩を、先に記載のように Ca^{2+} ポンプの遮断及び細胞内 Ca^{2+} の増大に使用した (Bennekou et al., 2012, Rapetti-Mauss et al., 2015)。図 7 に、対照 (A) 及び患者 (B) の赤色血液細胞において 5 mM バナジン酸塩により誘導される K^+ 喪失の動態を示している。

50

この K^+ 喪失は細胞容量の減少と相関しており（図 7 C 及び図 7 D）、細胞内 Na^+ 含量は変化がなかった（図示せず）。この図から、TRAM-34 及びセニカボクはどちらも、WT 又は R352H ガルドスチャネルを有する赤色血液細胞において K^+ 喪失及び細胞水喪失を低減することができたことが分かる。

【0102】

バナジン酸塩との 1 時間のインキュベーション後、対照と比べて大きな K^+ 流出が患者の赤色血液細胞にて観察された： $-53 \pm 16 \mu mol / g \text{ d. w.}$ に対する $-92 \pm 14 \mu mol / g \text{ d. w.}$ 、3 つの独立実験の平均 $\pm$ 標準誤差（ $p < 0.05$ にて差は有意である）。60 分の時点で、対照赤色血液細胞では、 $10 \mu M$ TRAM-34 によって K^+ 喪失が $97 \pm 1\%$ 阻害されており、患者赤色血液細胞では、 $92 \pm 3\%$ 阻害されている（3 つの独立実験の平均 $\pm$ 標準誤差、患者及び対照の赤色血液細胞の両方において TRAM-34 に対する対照 $p < 0.05$ ）。 $0.4 \mu M$ のセニカボクは、患者及び対照の赤色血液細胞それぞれについて K^+ 喪失を $79 \pm 12\%$ 及び $84 \pm 4\%$ 阻害した（患者及び対照の赤色血液細胞の両方においてセニカボクに対する対照 $p < 0.05$ 、患者の赤色血液細胞に対して対照では有意差なし）。10 倍高いセニカボク濃度（ $4 \mu M$ ）は単一時点（60 分）で評価した。 $4 \mu M$ セニカボクでは、60 分後にバナジン酸塩による K^+ 喪失は、対照及び患者の赤色血液細胞それぞれにおいて $95 \pm 4\%$ 及び $94 \pm 9\%$ 低減した（患者及び対照の赤色血液細胞の両方においてセニカボクに対する対照 $p < 0.05$ ）。

【0103】

2) 浸透圧抵抗

新たに採った血液を、TRAM-34（ $10 \mu M$ ）又はセニカボク（ $4 \mu M$ 又は $0.4 \mu M$ ）の存在下において $37^\circ C$ 又は $4^\circ C$ で 25 時間保存し、対照条件と比較した。浸透圧抵抗は、 $4^\circ C$ でインキュベートした血液では患者と対照とで類似しており、セニカボクは効果がない（図 8 A 及び図 8 B）。これに対して、 $37^\circ C$ での患者の赤色血液細胞の浸透圧抵抗は、対照赤色血液細胞と比べて左方向にシフトしており、患者及び対照の赤色血液細胞の 50% 溶血はそれぞれ、 0.45 及び 0.5 の相対オスモル濃度であった（図 8 C 及び図 8 D の黒色菱形の曲線）。曲線の傾きも、対照血液と比べて患者において激減している。セニカボクとのインキュベーションが対照血液の浸透圧抵抗曲線を変えなかったのに対し（図 8 C）、患者赤色血液細胞に対してのみセニカボクの用量依存性の効果がある。患者赤色血液細胞では、浸透圧抵抗が右方向にシフトし、セニカボクの存在下において曲線の峻度が増大している（図 8 D の三角及びバツ印）。TRAM-34 は、対照及び患者の赤色血液細胞において浸透圧抵抗を、 $4^\circ C$ ではほんの僅か、及び $37^\circ C$ ではより顕著に低減させることができる。検査前に、TRAM-34 が対照赤色血液細胞と同様に患者において強い溶血を誘導したことが観察された。これはセニカボクでは観察されなかった。

【0104】

3) 赤色血液細胞のネイティブ電流 (native current)

図 9 には、全細胞構成での患者（R352H 突然変異）及び対照の赤色血液細胞にて記録されたガルドスチャネルの活性を示している。対照と比べて患者赤色血液細胞にて有意な電流の増大が観察されている。電流はどちらも $0.5 \mu M$ セニカボク又は $10 \mu M$ TRAM-34 により完全に妨げられる。

【0105】

参考文献

10

20

30

40

【数 2】

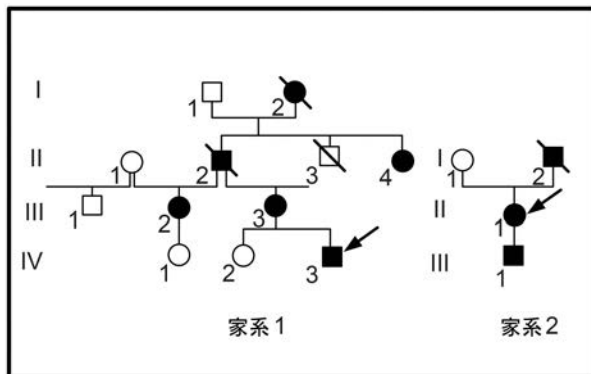
参考文献

- Andolfo I, *et al.*, 2013a, Blood. 121:3925-3935.
- Andolfo I, *et al.*, 2013b, Am J Hematol. 88:66-72.
- Andolfo I, *et al.*, 2015, Am J Hematol. 90:921-926.
- Archer NM, *et al.*, 2014, Am J Hematol. 89:1142-1146.
- Ataga KI, *et al.*, 2008, Blood. 111:3991-3997.
- Ataga KI, *et al.*, 2009, Expert Opin Investig Drugs. 18:231-239. 10
- Ataga KI, *et al.*, 2011, Br J Haematol. 153:92-104.
- Bae C, *et al.*, 2013, Proc Natl Acad Sci U S A. 110:E1162-1168.
- Barneaud-Rocca *et al.*, 2011, J Biol. Chem. 286:8909-8916.
- Bennekou P, *et al.*, 2012, Blood Cells Mol. Dis. 48:102-109.
- Bruce LJ, *et al.*, 2005, Nat Genet. 37:1258-1263.
- Brugnara C, *et al.*, 1993a, J Clin Invest. 92:520-526.
- Brugnara C, *et al.*, 1993b, J. Biol. Chem. 268:8760-8768
- Brugnara C, *et al.*, 1996, J Clin Invest. 97:1227-1234. 20
- Carella M, *et al.*, 1998, Am J Hum Genet. 63:810-816.
- Castle A, *et al.*, 2002, Mol. Pharmacol. 63:409-18.
- Da Costa L, *et al.*, 2013, Blood Rev. 27:167-178.
- Dyrda A, *et al.*, 2010, PLoS One. 5:e9447.
- Ellory JC, *et al.*, 1994, Br J Pharmacol. 111:903-905
- Fanger CM, *et al.*, 1999, J Biol Chem. 274:5746-5754.
- Glogowska E, *et al.*, 2015, Blood. 126:1281-1284.
- Houston BL, *et al.*, 2011, Blood Cells Mol Dis. 47:226-231. 30
- Joiner WJ, *et al.*, 1997, Proc Natl Acad Sci U S A. 94:11013-11018.
- Joiner WJ, *et al.*, 2001, J Biol Chem. 276:37980-5.
- Kaplan JM and Delpech M., 2007, Biologie moléculaire et médecine (3^e Éd.) (Coll. De la biologie à la clinique), Ed. Flammarion
- Lang F, *et al.*, 2004, Adv Exp Med Biol. 559:211-217.
- Maher AD, Kuchel PW, 2003, Int J Biochem Cell Biol. 35:1182-1197.
- Martial S, *et al.*, 2007, J Cell Physiol. 213:70-78.

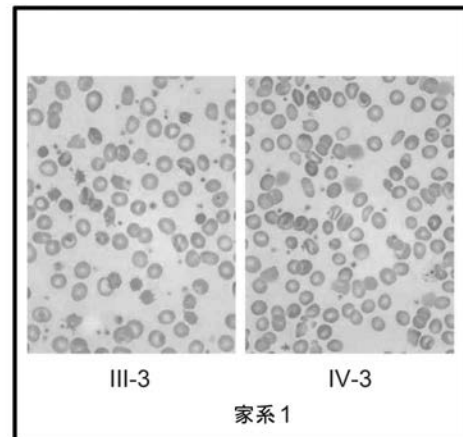
- Miller DR, *et al.*, 1971, *Blood*. 38:184-204.
 Morales P, *et al.*, 2013, *J Gen Physiol*. 142:37-60.
 Quinlan AR and Hall IM, 2010, *Bioinformatics*. 26:841-842.
 Rapetti-Mauss R, *et al.*, 2015, *Blood*. 126:1273-1280.
 Rinehart J, *et al.*, 2010, *Curr Opin Hematol*. 17:191-197.
 Romero JR, *et al.*, 2002, *Blood*. 99:1103-1108.
 Stocker W, *et al.*, 2003, *Blood*. 101:2412-2418.
 Varecka L and Carafoli E., 1982, *J Biol Chem*. 257:7414-7421.
 Wang K, *et al.*, 2010, *Nucleic Acids Res.*;38: e164.
 Weiss E, *et al.*, 2011, *Anemia*. 2011:379894.
 Wulff H, Castle NA, 2010, *Expert Rev Clin Pharmacol*. 3:385-396.
 Wulff H, *et al.*, 2000, *PNAS*. 97:8151-8156.
 Wulff H, Köhler R, 2013, *J Cardiovasc Pharmacol*. 61:102-112.
 Zarychanski R, *et al.*, 2012, *Blood*. 120:1908-1915.

10

【図 1 A】

**Fig. 1A**

【図 1 B】

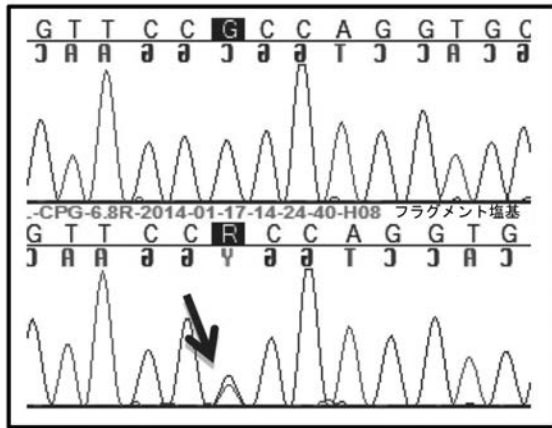
**Fig. 1B**

【図 1 C】

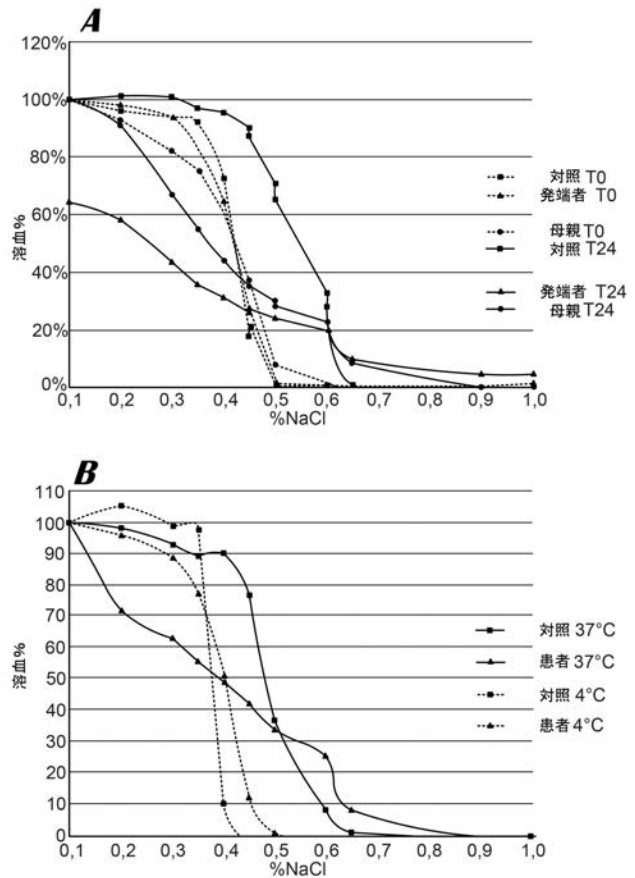
ヒト	KLLAAINAFRQVRLKHKRLREQ	配列番号NO 7
P. トログロディテス (P.troglodytes : チンパンジー)	KLLAAINAFRQVRLKHKRLRE	配列番号NO 8
M. ムラッタ (M.mulatta : アカゲザル)	INAFRQVRLKHKRLQE	配列番号NO 9
F. カツス (F.catus : ネコ)	RLLAAINRFRQVRLKHKR	配列番号NO 10
M. ムスカルス (M.musculus : ハツカネズミ)	KMLAAIHTFRQVRLKHKR	配列番号NO 11
D. メラノガスター (D.melanogaster : キイロシジヤウバエ)	KFLLAIIYALRKVKMDQRKLM	配列番号NO 12
C. エレガンス (C.elegans)	KFLLAIIYEMRRVRRDQ	配列番号NO 13
X. トロピカリス (X.tropicalis : ネットイソダガエル)	NLLRAIHVFRSRISHKNLKD	配列番号NO 14

Fig. 1C

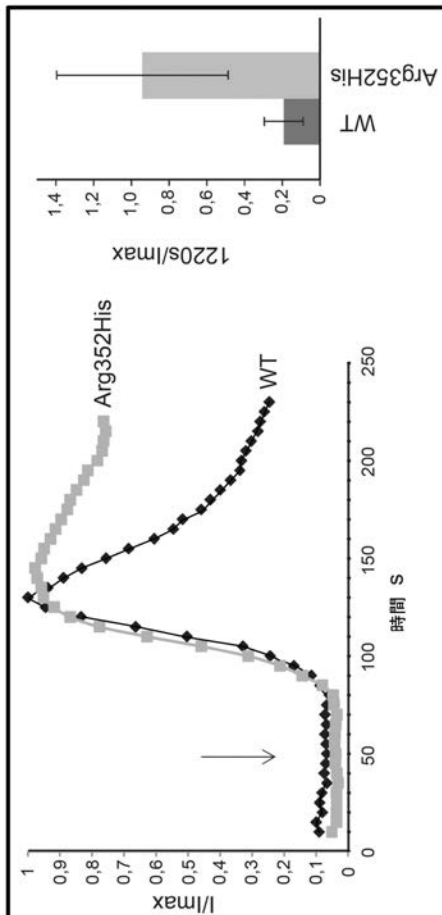
【図 1 D】

**Fig. 1D**

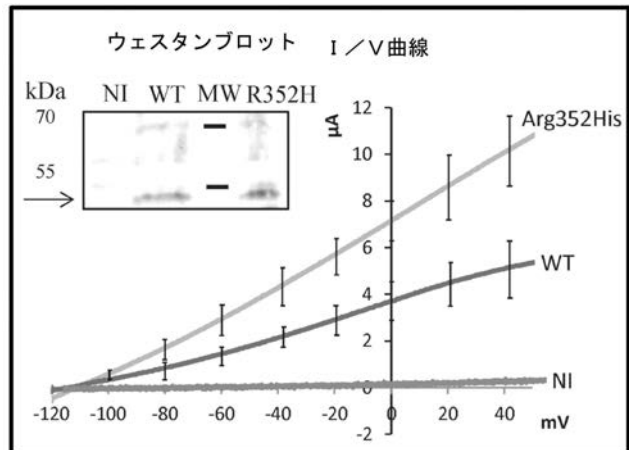
【図 1 E】

**Fig. 1E**

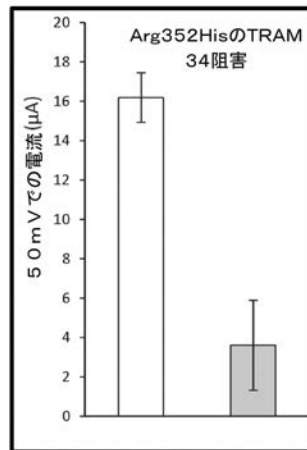
【図 2 A】

**Fig. 2A**

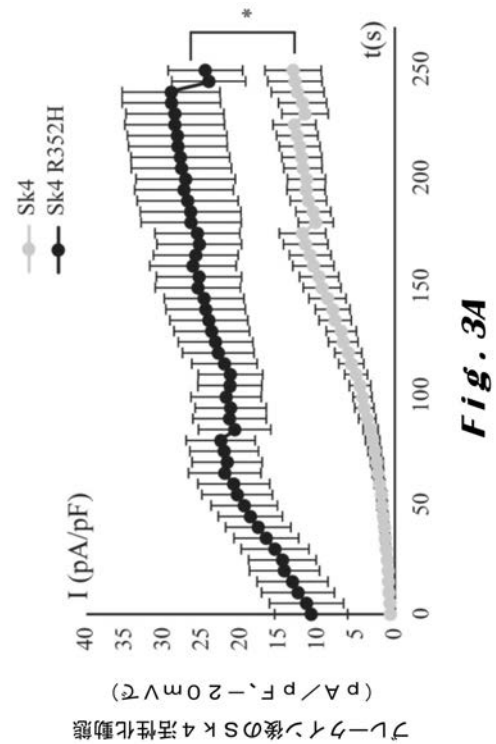
【図 2 B】

**Fig. 2B**

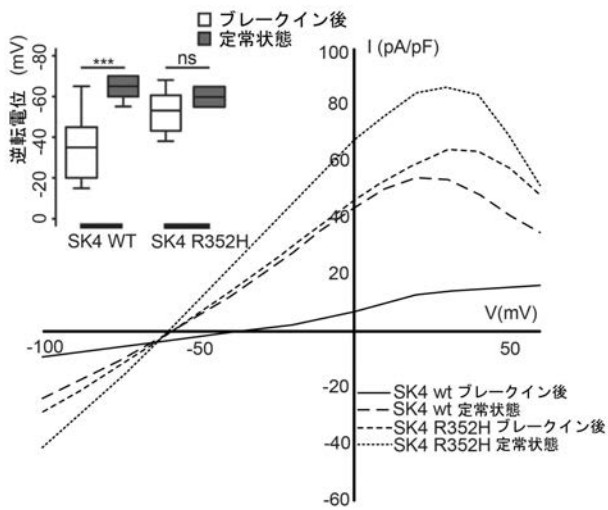
【図 2 C】

**Fig. 2C**

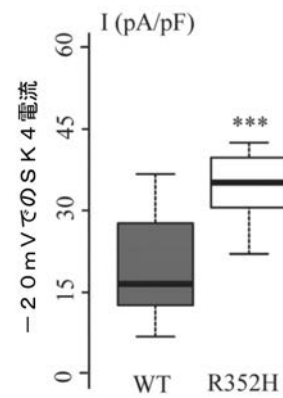
【図 3 A】

**Fig. 3A**

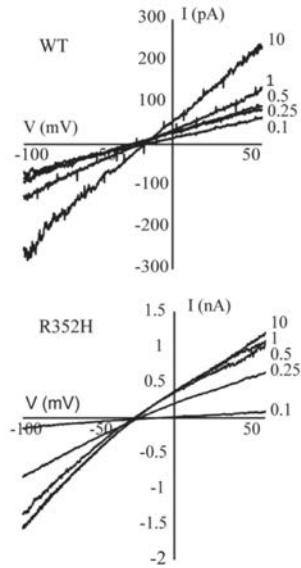
【図 3 B】

**Fig. 3B**

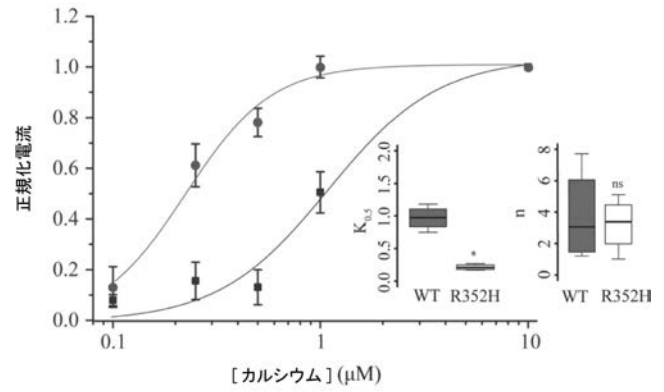
【図 3 C】

**Fig. 3C**

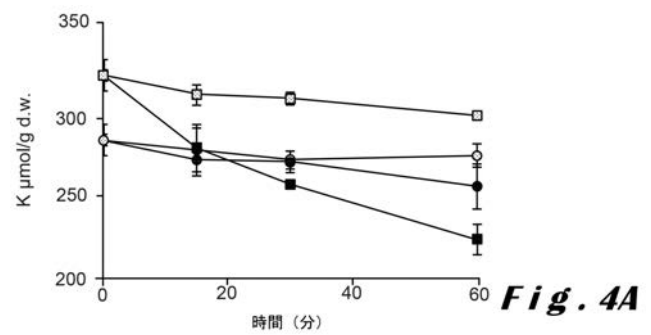
【図 3 D】

**Fig. 3D**

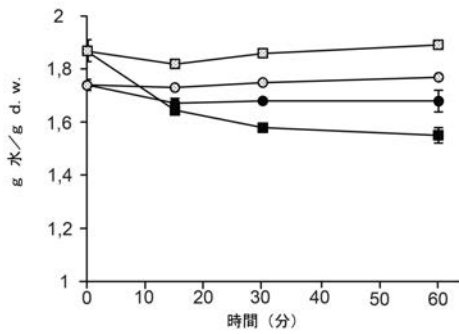
【図 3 E】

**Fig. 3E**

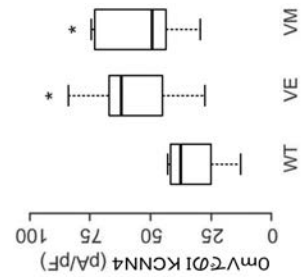
【図 4 A】

**Fig. 4A**

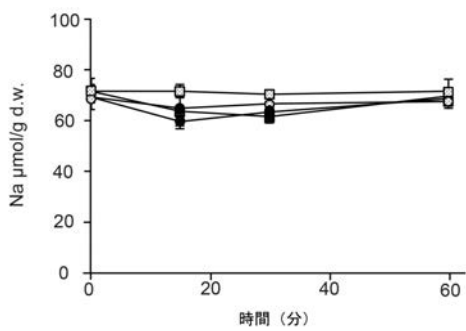
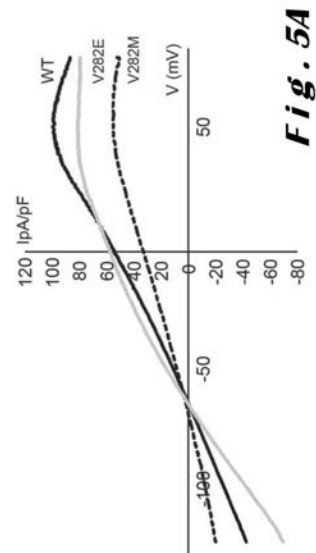
【図 4 B】

**Fig. 4B**

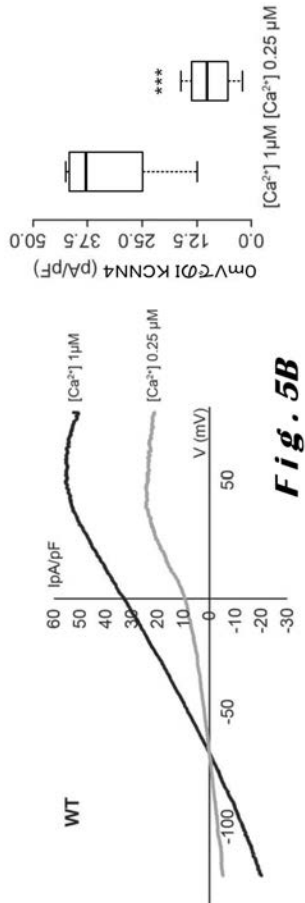
【図 5 A】



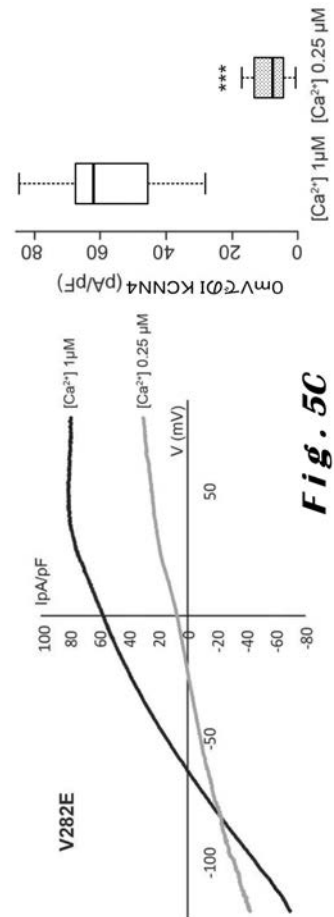
【図 4 C】

**Fig. 4c****Fig. 5A**

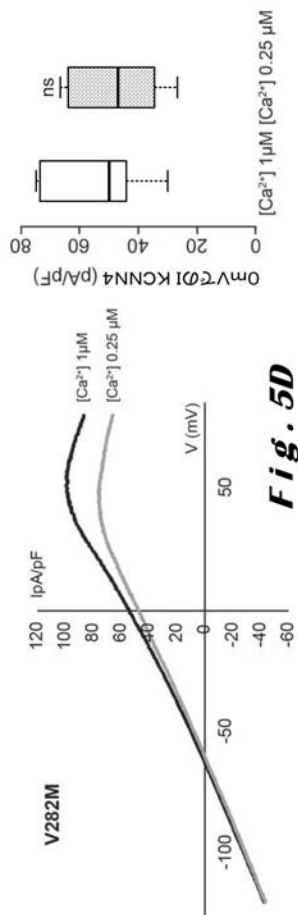
【図 5 B】



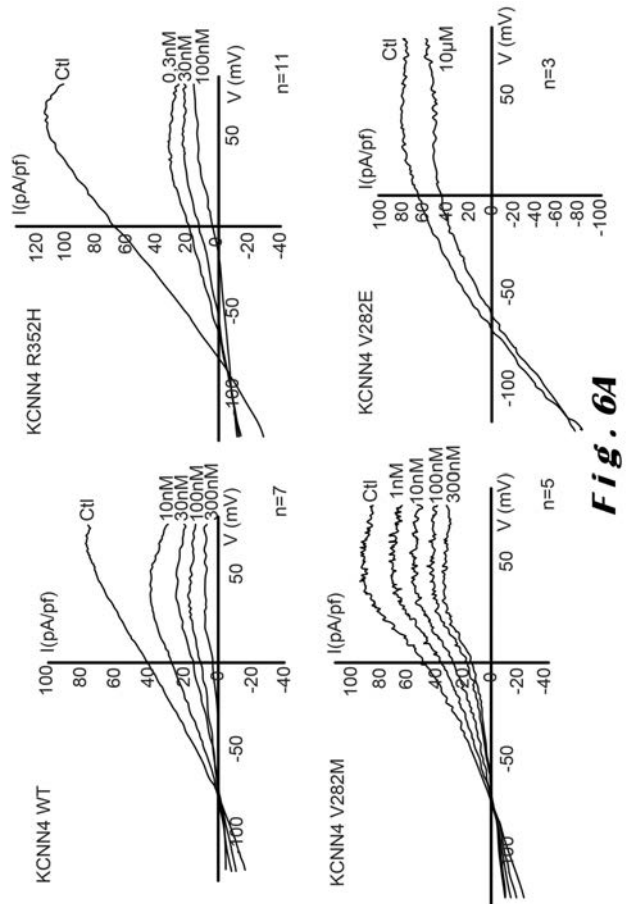
【図 5 C】



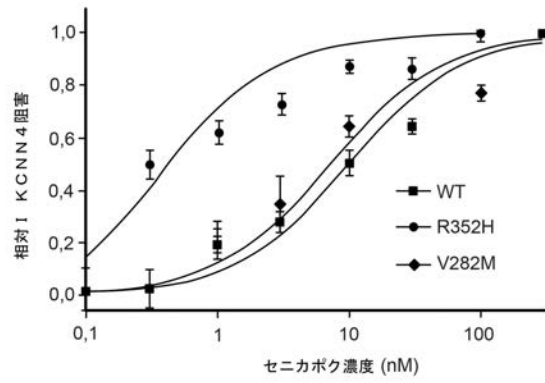
【図 5 D】



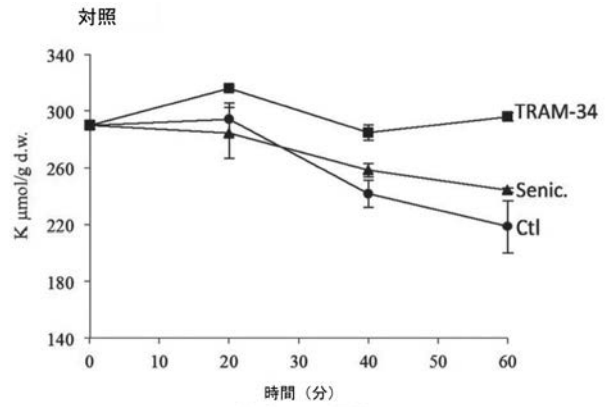
【図 6 A】



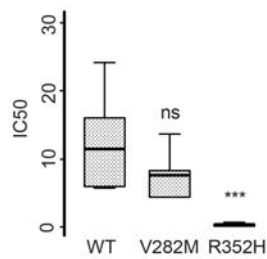
【図 6 B】

**Fig. 6B**

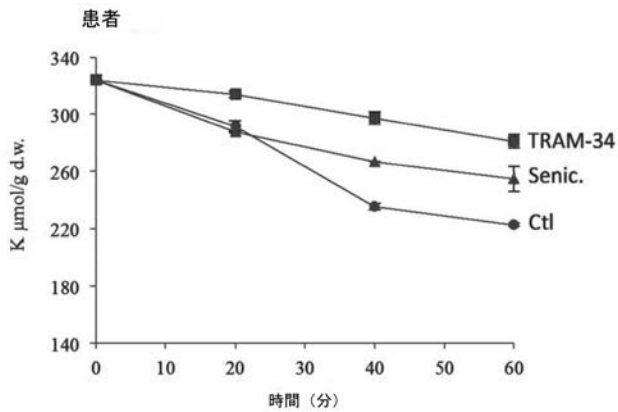
【図 7 A】

**Fig. 7A**

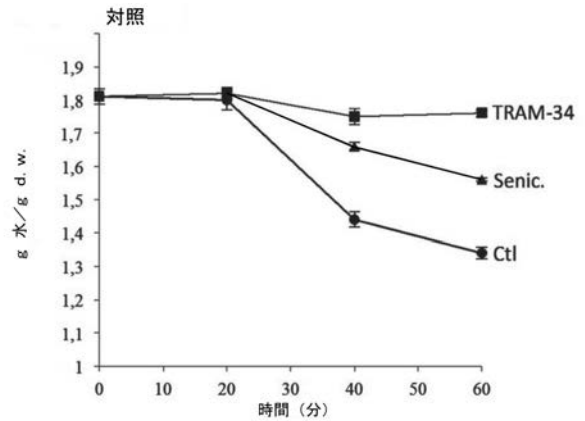
【図 6 C】

**Fig. 6C**

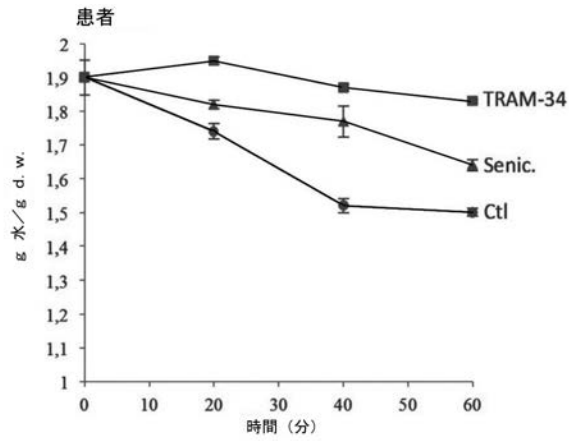
【図 7 B】

**Fig. 7B**

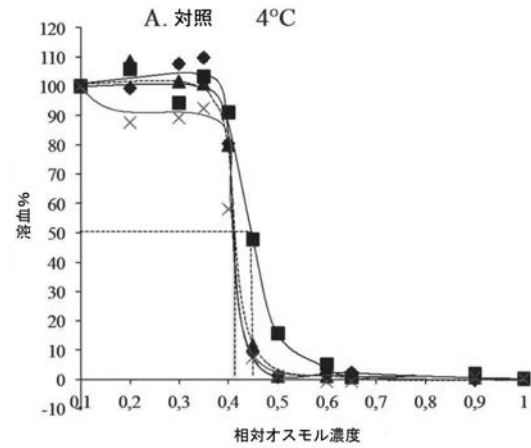
【図 7 C】

**Fig. 7C**

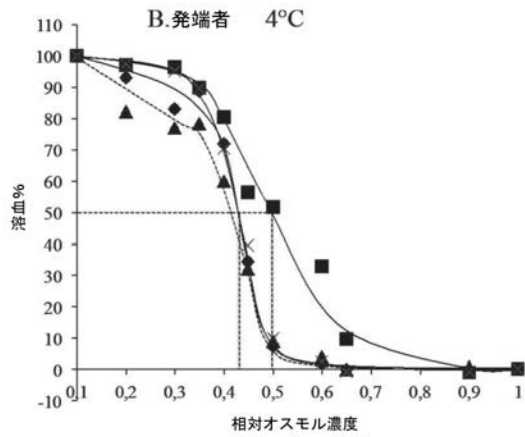
【図 7 D】

**Fig. 7D**

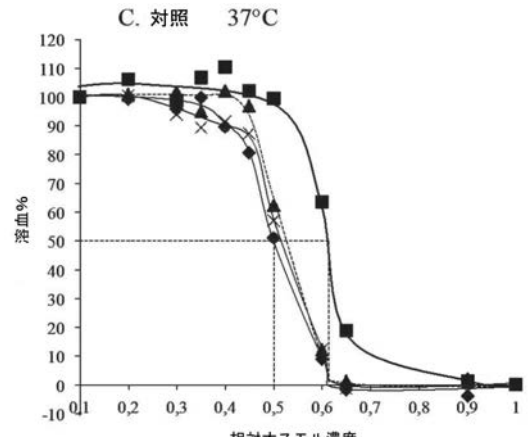
【図 8 A】

**Fig. 8A**

【図 8 B】

**Fig. 8B**

【図 8 C】

**Fig. 8C**

【圖 9】

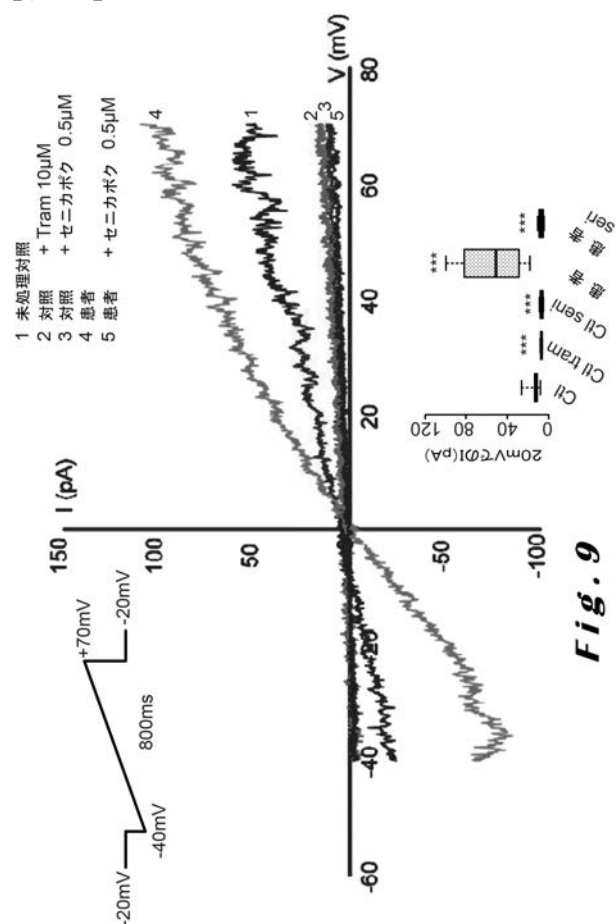


Fig. 9

2018519275000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/063745

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K31/00 G01N33/50 A61P7/00
ADD.

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)

A61K G01N A61P

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)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	IMMACOLATA ANDOLFO ET AL: "Novel Gardos channel mutations linked to dehydrated hereditary stomatocytosis (xerocytosis)", AMERICAN JOURNAL OF HEMATOLOGY, vol. 99, no. 10, 21 October 2015 (2015-10-21), pages 921-926, XP55224751, US ISSN: 0361-8609, DOI: 10.1002/ajh.24117 abstract page 923, right-hand column, paragraph 3-4; figure 2 page 926, right-hand column, paragraph 1 ----- -/--	1-4,15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 September 2016

Date of mailing of the international search report

14/10/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Habedanck, Robert

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/063745

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	R. RAPETTI-MAUSS ET AL: "A mutation in the Gardos channel is associated with hereditary xerocytosis", BLOOD, vol. 126, no. 11, 10 September 2015 (2015-09-10), pages 1273-1280, XP55224795, US ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2015-04-642496 abstract page 1276, left column, paragraph 3 page 1280, left column, paragraph 2; figure 4 -----	1-4,15
X,P	E. GLOGOWSKA ET AL: "Mutations in the Gardos channel (KCNN4) are associated with hereditary xerocytosis", BLOOD, vol. 126, no. 11, 21 July 2015 (2015-07-21), pages 1281-1284, XP55305517, US ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2015-07-657957 abstract page 1282, left column, paragraph 2 -----	1-4,15
A	WO 2014/064465 A1 (NHS BLOOD & TRANSPLANT [GB]) 1 May 2014 (2014-05-01) page 1, lines 5-8 page 6, line 14-page 8, line 2; page 1, lines 5-8; claims 1-20 claims 1-20 page 6, line 14 - page 8, line 2 -----	1-15
A	WO 00/50026 A1 (ICAGEN INC [US]; MCNAUGHTON SMITH GRANT ANDREW [US]; RIGDON GREGORY CO) 31 August 2000 (2000-08-31) cited in the application page 3, lines 6-29; page 5, lines 12-21; page 3, lines 6-29 page 5, lines 12-21 -----	1-15
A	STUART M CAHALAN ET AL: "Piezo1 links mechanical forces to red blood cell volume", ELIFE, vol. 4, 22 May 2015 (2015-05-22), XP055224839, DOI: 10.7554/eLife.07370 abstract -----	1-15
10 2	A US 2008/293623 A1 (DALTON JOAN [GB] ET AL) 27 November 2008 (2008-11-27) claims 1,7 -----	1-15

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/063745

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014064465	A1	01-05-2014	NONE
WO 0050026	A1	31-08-2000	AP 1465 A 22-09-2005
		AT 370728 T 15-09-2007	
		AU 762039 B2 19-06-2003	
		AU 2880700 A 14-09-2000	
		BR 0008416 A 29-01-2002	
		CA 2371857 A1 31-08-2000	
		CN 1344158 A 10-04-2002	
		DE 60036093 T2 15-05-2008	
		EP 1158971 A1 05-12-2001	
		ES 2291191 T3 01-03-2008	
		HK 1045262 A1 29-07-2005	
		IL 145012 A 10-12-2006	
		JP 4038337 B2 23-01-2008	
		JP 2002537331 A 05-11-2002	
		JP 2007262075 A 11-10-2007	
		OA 11838 A 22-08-2005	
		US 6288122 B1 11-09-2001	
		WO 0050026 A1 31-08-2000	
US 2008293623	A1	27-11-2008	US 2008293623 A1 27-11-2008
			US 2011021418 A1 27-01-2011

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
C 1 2 Q 1/6809 (2018.01)	C 0 7 K 16/28 Z N A	
C 1 2 Q 1/6813 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6809 Z	
C 1 2 Q 1/6844 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6813 Z	
C 1 2 Q 1/6876 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6844 Z	
C 1 2 Q 1/6872 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6876 Z	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	C 1 2 Q 1/6872 Z	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/50 P	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	G 0 1 N 33/50 Z	
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/15 Z	
	C 0 7 K 14/705	
	C 1 2 N 15/00 1 0 0 Z	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(71)出願人 517421563

アシスタンス ピュブリック-オピト ドゥ マルセイユ

フランス国 1 3 3 5 4 マルセイユ セデックス 5 リュ プロシエ 8 0

(71)出願人 509000747

アンスティトゥー ナショナル ドゥ ラ サンテ エ ドゥ ラ レシエルシュ メディカル (イエヌエスエエールエム)

フランス国 エフー7 5 0 1 3 パリ リュ ドゥ トルビアック 1 0 1

(71)出願人 502205846

サントル ナショナル ドゥ ラ ルシエルシュ シアンティフィク

フランス国 パリ セデックス 1 6 リュ ミシエルーアンジュ 3

(71)出願人 510171911

ユニヴェルシテ ドゥ ニース ソフィア アンティポリス

UNIVERSITE DE NICE SOPHIA ANTIPOLIS

フランス国 F-0 6 1 0 8 ニース セデックス 2 アブニュ ヴァルローズ 2 8 グランシャトー パルク ヴァルローズ

(74)代理人 110000796

特許業務法人三枝国際特許事務所

(72)発明者 バダン カトリーヌ

フランス国 1 3 0 0 6 マルセイユ ノートル ダム ブールバード 1 0 4

(72)発明者 チュレ イザベル

フランス国 1 3 1 9 0 アロッシュ トラベルス ドゥ ラ サレット 5 0 2

(72)発明者 ギーゾウラン エレーヌ

フランス国 0 6 0 0 0 ニース ブールバード ジャン-ジョレス 1 2

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA26 CB01 DA13 DA15 FB02 FB03

4B063	QA13	QA19	QQ03	QQ42	QQ52	QR08	QR32	QR35	QS25	QS34
	QX02									
4C084	AA17	NA14	ZA51	ZC42						
4C085	AA13	AA14	BB11	EE01						
4C206	AA01	AA02	FA53	GA07	GA22	MA01	MA04	NA14	ZA51	ZC42
4H045	AA11	AA30	CA50	DA76	EA50	FA74				

专利名称(译)	遗传性干红细胞增多症的治疗和诊断		
公开(公告)号	JP2018519275A	公开(公告)日	2018-07-19
申请号	JP2017563327	申请日	2016-06-15
[标]申请(专利权)人(译)	安妮研究所国家德比Rasante埃杜Laleh外壳格哈德·李医学等NS强麦EM 法国国家科学研究中心 单威赛引用和尼斯索菲亚 - 安提波利斯		
申请(专利权)人(译)	Université de la Méditerranée - Marseille 安妮研究所国家德比Rasante埃杜Laleh外壳格哈德·李医学等NS强麦EM 中心法国国家科学研究中心 尼斯大学索菲亚 - 安提波利斯		
[标]发明人	バダンカトリーヌ チュレイザベル ギーゾウランエレーヌ		
发明人	バダン カトリーヌ チュレ イザベル ギーゾウラン エレーヌ		
IPC分类号	A61K45/00 A61P7/00 A61K31/165 A61K31/198 A61K39/395 A61P43/00 C07K16/28 C12Q1/6809 C12Q1/6813 C12Q1/6844 C12Q1/6876 C12Q1/6872 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/15 C07K14/705 C12N15/00		
CPC分类号	G01N33/6872 A61K31/165 A61K31/167 A61K31/198 A61K31/415 A61K31/4164 A61K31/4168 A61K31/4174 A61K31/4422 A61P7/00 C12Q1/6883 C12Q2600/118 C12Q2600/156 G01N33/50 G01N33/5008 G01N33/502 G01N2333/705 G01N2800/22 G01N2800/50		
FI分类号	A61K45/00 A61P7/00 A61K31/165 A61K31/198 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P43/00.111 C07K16/28.ZNA C12Q1/6809.Z C12Q1/6813.Z C12Q1/6844.Z C12Q1/6876.Z C12Q1/6872.Z G01N33/50.P G01N33/53.D G01N33/50.Z G01N33/15.Z C07K14/705 C12N15/00.100.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA15 2G045/FB02 2G045/FB03 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA51 4C084/ZC42 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/EE01 4C206/AA01 4C206/AA02 4C206/FA53 4C206/GA07 4C206/GA22 4C206/MA01 4C206/MA04 4C206/NA14 4C206/ZA51 4C206/ZC42 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA50 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2015305921 2015-06-15 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及诊断受试者遗传性干红细胞疾病的体外方法，该方法包括对受试者中编码Gardos通道的KCNN4基因进行基因分型。本发明还涉及用于治疗遗传性干红细胞疾病的KCNN4蛋白的抑制剂，特别是在作为KCNN4基因中的错义突变c.1055G> A或c.844G> A的携带者的人类受试者中。。[选择图]无

(51) Int. Cl.		F 1		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	45/00 (2006. 01)	A 6 1 K	45/00	2 G 0 4 5	
A 6 1 P	7/00 (2006. 01)	A 6 1 P	7/00	4 B 0 6 3	
A 6 1 K	31/165 (2006. 01)	A 6 1 K	31/165	4 C 0 8 4	
A 6 1 K	31/198 (2006. 01)	A 6 1 K	31/198	4 C 0 8 5	
A 6 1 K	39/395 (2006. 01)	A 6 1 K	39/395	D	4 C 2 0 6
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全 38 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号		特願2017-563327 (P2017-563327)		(71) 出願人 511025226	
(86) (22) 出願日		平成28年6月15日 (2016. 6. 15)		ユニヴェルシテ デクスーマルセイユ	
(85) 翻訳文提出日		平成30年1月11日 (2018. 1. 11)		UNIVERSITE D' AIX-M	
(86) 国際出願番号		PCT/EP2016/063745		RSEILLE	
(87) 国際公開番号		W02016/202854		フランス、エフー13284 マルセイユ	
(87) 国際公開日		平成28年12月22日 (2016. 12. 22)		セデックス 07、ブールバール シャ	
(31) 優先権主張番号		15305921. 7		ルル リヴォン、ジャルダンデュファ	
(32) 優先日		平成27年6月15日 (2015. 6. 15)		ロ、58	
(33) 優先権主張国		欧州特許庁 (EP)		Jardin du Pharo, 58	
				, Bld Charles Livon	
				, F-13284 Marseille	
				cedex 07, France	
				最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 遺伝性乾燥赤血球症の治療及び診断					