

(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2009-537123

(P2009-537123A)

(43) 公表日 平成21年10月29日(2009.10.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B024
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 ZNAA	4B050
C12N 9/64 (2006.01)	C12N 9/64	4B063
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 D	
GO1N 37/00 (2006.01)	GO1N 33/53 M	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-510325 (P2009-510325)
 (86) (22) 出願日 平成19年5月9日 (2007.5.9)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年12月26日 (2008.12.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2007/004095
 (87) 国際公開番号 W02007/134718
 (87) 国際公開日 平成19年11月29日 (2007.11.29)
 (31) 優先権主張番号 102006023253.4
 (32) 優先日 平成18年5月18日 (2006.5.18)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

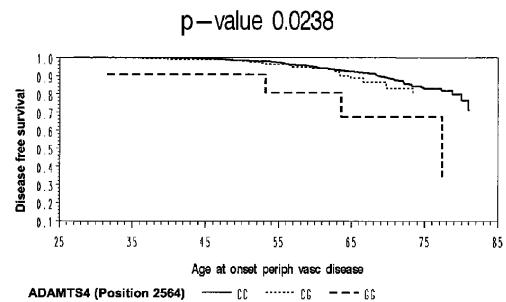
(71) 出願人 399050909
 サノフィーアベンティス
 フランス75013パリ、アヴニュ・ドゥ
 ・フランス 174番
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次
 (74) 代理人 100105290
 弁理士 三輪 昭次
 (74) 代理人 100140132
 弁理士 竹林 則幸
 (74) 代理人 100091731
 弁理士 高木 千嘉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ADAMTS 4 遺伝子およびニパク質の多型の使用

(57) 【要約】

試験しようとする個体から採取した生物学的サンプルにおける心血管障害および末梢血管障害、または心血管障害および末梢血管障害を発症する危険度の高さを同定するためのADAMTS 4 遺伝子の一塩基多型 (SNP) の使用 ; 心血管障害および末梢血管障害を予防および / または処置する上で有効な物質を同定するためのADAMTS 4 の使用、ならびにそれを行う方法。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試験しようとする個体から採取した生物学的サンプルにおいて心血管障害および末梢血管障害を、または心血管障害および末梢血管障害が発症する危険度の高さを同定するための、一つまたはそれ以上の A D A M T S 4 一塩基多型 (S N P) またはタンパク質多型の使用。

【請求項 2】

試験しようとする個体から採取した生物学的サンプルにおいて心血管障害および末梢血管障害を、または心血管障害および末梢血管障害が発症する危険度の高さを同定するための、A D A M T S 4 タンパク質もしくは核酸またはそれらの機能的フラグメントの使用。

10

【請求項 3】

個体における心血管障害および末梢血管障害を、または心血管障害および末梢血管障害が発症する危険度の高さを同定する方法であって、

個体から採取したサンプルを、

a) A D A M T S 4 遺伝子の一方または両方の対立遺伝子の位置 6 3 5、8 2 0、8 3 5、2 5 6 4、および 1 0 5 7 0 の一つまたはそれ以上に存在するヌクレオチドのタイプ (この場合上記一つまたはそれ以上の位置に存在するヌクレオチドのタイプがその個体の心血管障害および末梢血管障害に罹患するまたはそれらが発症する危険度の指標となる) ; または、

b) A D A M T S 4 タンパク質のポリペプチド鎖の位置 7 7 および 7 2 0 の一方または両方に存在するアミノ酸のタイプ (この場合上記一つまたはそれ以上の位置に存在するアミノ酸のタイプがその個体の心血管障害および末梢血管障害に罹患するまたはそれらが発症する危険度の指標となる) ; または、

20

c) サンプル中に存在する A D A M T S 4 m R N A および / またはタンパク質の量が一つまたはそれ以上の参照サンプルのそれらと異なるかどうか (この場合その量の違いの存在が心血管障害および末梢血管障害に罹患するまたはそれらが発症する危険度の高さを示す) 、

について試験することを含む方法。

【請求項 4】

単離された個体のサンプルを、上記の S N P またはタンパク質多型の一つまたはそれ以上の存在について分析し、その年齢および A D A M T S 4 遺伝子の位置 6 3 5、8 2 0、8 3 5、2 5 6 4、および 1 0 5 7 0 の一つもしくはそれ以上、または A D A M T S 4 タンパク質の位置 7 7 もしくは 7 2 0 に存在するヌクレオチドまたはアミノ酸のタイプに基づき危険度予測値を計算することを含む、心血管障害および末梢血管障害に罹患する危険度の決定方法。

30

【請求項 5】

薬物の用量を、心血管障害および末梢血管障害の予防および / または処置に適合させるための、一つまたはそれ以上の A D A M T S 4 一塩基多型 (S N P) またはタンパク質多型の使用。

【請求項 6】

薬物の用量を、心血管障害および末梢血管障害の予防および / または処置に適合させるための、A D A M T S 4 タンパク質もしくは核酸またはそれらの機能的フラグメントの使用。

40

【請求項 7】

薬物の用量を、個体における心血管障害および末梢血管障害の予防および / または処置に適合させる方法であって、

個体から採取したサンプルを、

a) A D A M T S 4 遺伝子のいずれかまたは両方の対立遺伝子の位置 6 3 5、8 2 0、8 3 5、2 5 6 4、および 1 0 5 7 0 の一つまたはそれ以上に存在するヌクレオチドのタイプ (この場合上記用量はこれらの位置の一つまたはそれ以上に存在するヌクレオチド

50

のタイプに基づき適合される) ; または、

b) A D A M T S 4 タンパク質のアミノ酸鎖の位置 7 7 および 7 2 0 のうちの一方または両方に存在するアミノ酸のタイプ (この場合上記用量はこれらの位置の一方または両方に存在するアミノ酸のタイプに基づき適合される) ; または、

c) サンプル中に存在する A D A M T S 4 m R N A および / またはタンパク質の量が一つまたはそれ以上の採取した参照サンプルのそれと異なるかどうか (この場合上記用量は採取した個体のサンプル中のタンパク質および / または m R N A の量が参照サンプルまたは参照サンプル群のそれらと相違するかどうかに基づき適合される)、
 について試験することを含む方法。

【請求項 8】

心血管障害および末梢血管障害の処置および / または予防のための薬物に反応する個体を同定するための、一つまたはそれ以上の A D A M T S 4 一塩基多型 (S N P) またはタンパク質多型の使用。

【請求項 9】

心血管障害および末梢血管障害の処置および / または予防のための薬物に反応する個体を同定するための、A D A M T S 4 タンパク質もしくは核酸またはそれらの機能的フラグメントの使用。

【請求項 10】

心血管障害および末梢血管障害の予防および / または処置に有効な物質を同定するための、A D A M T S 4 タンパク質もしくは核酸またはそれらの機能的フラグメントもしくは誘導体の使用。

【請求項 11】

試験しようとする個体の身体から採取した生物学的サンプルを分析することにより心血管障害および末梢血管障害を、または心血管障害および末梢血管障害の素因を診断するための、A D A M T S 4 検出手段の使用。

【請求項 12】

生物学的サンプル中の A D A M T S 4 を検出するための手段を少なくとも一つ含む、心血管障害および末梢血管障害を、または心血管障害および末梢血管障害の素因を診断するための試験キット。

【請求項 13】

A D A M T S 4 遺伝子のいずれかまたは両方の対立遺伝子が以下のゲノム変異 :

- a . ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 6 3 5 におけるアデノシン ;
- b . ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 8 2 0 におけるアデノシン ;
- c . ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 8 3 5 におけるチミジン ;
- d . ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 2 5 6 4 におけるグアノシン ;
- e . ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 1 0 5 7 0 におけるグアノシン ;

の一つまたはそれ以上を有するかどうかに関して採取したサンプルを試験することを含み、請求項 3 に記載の方法においては上記変異の一つまたはそれ以上の存在が危険度の高さを示し、請求項 7 に記載の方法においては薬物の用量を上記ゲノム変異の一つまたはそれ以上の存在下で適合させる、請求項 3 または 7 に記載の方法。

【請求項 14】

採取したサンプルが、以下のタンパク質変異 :

- a . そのポリペプチド鎖の位置 7 7 におけるスレオニン、および / または
- b . そのポリペプチド鎖の位置 7 2 0 におけるアラニン、

の一方または両方を有する A D A M T S 4 タンパク質を含むかどうかに関して試験することを含み、請求項 3 に記載の方法においては上記変異の一方または両方の存在が個体の心血管障害および末梢血管障害に罹患するまたはそれらが発症する危険度の高さを示し、請求項 7 に記載の方法においては薬物の用量を上記ゲノム変異の一方または両方の存在下で適合させる、請求項 3 または 7 に記載の方法。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

A D A M T S 4 遺伝子のいずれかまたは両方の対立遺伝子が以下のゲノム変異：

- a . A D A M T S 4 遺伝子の一方または両方の対立遺伝子におけるゲノム A D A M T S 4 配列の位置 6 3 5 におけるアデノシン以外のヌクレオチド、好ましくはグアノシン；
- b . A D A M T S 4 遺伝子の一方または両方の対立遺伝子におけるゲノム A D A M T S 4 配列の位置 8 2 0 におけるアデノシン以外のヌクレオチド、好ましくはグアノシン；
- c . A D A M T S 4 遺伝子の両方の対立遺伝子におけるゲノム A D A M T S 4 配列の位置 8 3 5 におけるチミジン以外のヌクレオチド、好ましくはシチジン；
- d . A D A M T S 4 遺伝子の一方または両方の対立遺伝子におけるゲノム A D A M T S 4 配列の位置 2 5 6 4 におけるグアノシン以外のヌクレオチド、好ましくはシチジン；
- e . A D A M T S 4 遺伝子の一方または両方の対立遺伝子におけるゲノム A D A M T S 4 配列の位置 1 0 5 7 0 におけるグアノシン以外のヌクレオチド、好ましくはアデノシン；

10

の一つまたはそれ以上を有するかどうかに関して採取したサンプルを試験することを含み、請求項 3 に記載の方法においては上記変異の一つまたはそれ以上の存在が個体の心血管障害および末梢血管障害に罹患するまたはそれらが発症する危険度の低さを示し、請求項 7 に記載の方法においては薬物の用量を上記ゲノム変異の一つまたはそれ以上の存在で適合させる、請求項 3 または 7 に記載の方法。

【請求項 1 6】

採取したサンプルが、以下のタンパク質変異：

- a . A D A M T S 4 タンパク質のポリペプチド鎖の位置 7 7 におけるスレオニン以外のアミノ酸、好ましくはアラニン、
- b . A D A M T S 4 タンパク質のポリペプチド鎖の位置 7 2 0 におけるアラニン以外のアミノ酸、好ましくはプロリン、

20

の一方または両方を有する A D A M T S 4 タンパク質を含むかどうかに関して採取したサンプルを試験することを含み、請求項 3 に記載の方法においては上記変異の一方または両方の存在が個体の心血管障害および末梢血管障害に罹患するまたはそれらが発症する危険度の低さを示し、請求項 7 に記載の方法においては薬物の用量を上記ゲノム変異の一方または両方の存在で適合させる、請求項 3 または 7 に記載の方法。

【請求項 1 7】

A D A M T S 4 が哺乳動物、好ましくはヒト A D A M T S 4 である、請求項 1 ~ 1 6 のいずれかに記載の使用、方法、または試験キット。

30

【請求項 1 8】

心血管障害が狭心症、不安定狭心症、心筋梗塞、早期心筋梗塞、末梢血管障害、高血圧、脳卒中、P R I N D、T I A、または冠動脈形成術の着手を必要とする障害である、請求項 1 ~ 1 7 のいずれかに記載の使用、方法、または試験キット。

【請求項 1 9】

グルコース代謝障害を有する、好ましくは糖尿病、特に好ましくは I 型糖尿病に罹患している個体から採取したサンプルを分析することを含む、請求項 1 ~ 1 8 のいずれかに記載の使用、方法、または試験キット。

【請求項 2 0】

試験するサンプルを採取した個体が高血圧に罹患しているおよび/またはすでに心筋梗塞を経験している、請求項 1 ~ 1 9 のいずれかに記載の使用、方法、または試験キット。

40

【請求項 2 1】

サンプルが哺乳動物、好ましくはヒトサンプルである、請求項 1 ~ 2 0 のいずれかに記載の使用、方法、または試験キット。

【請求項 2 2】

サンプルが組織学的サンプル、生検サンプル、細胞抽出物、一つもしくはそれ以上の細胞、または採取した体液である、請求項 1 ~ 2 1 のいずれかに記載の使用、方法、または試験キット。

【請求項 2 3】

50

A D A M T S 4 を単離した分子として使用する、請求項 1 ~ 1 1 のいずれかに記載の使用または方法。

【請求項 2 4】

位置 6 3 5、8 2 0、8 3 5、2 5 6 4、および 1 0 5 7 0 の S N P の一つまたはそれ以上を分析する、請求項 1、2、5、または 8 のいずれかに記載の使用。

【請求項 2 5】

核酸が、ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 6 3 5、8 2 0、8 3 5、2 5 6 4、および 1 0 5 7 0 の S N P の一つまたはそれ以上を含む、請求項 6、9、または 1 0 のいずれかに記載の使用。

【請求項 2 6】

S N P が：

a . A D A M T S 4 遺伝子の一方または両方の対立遺伝子におけるゲノム A D A M T S 4 配列の位置 6 3 5 におけるアデノシン；

b . A D A M T S 4 遺伝子の一方または両方の対立遺伝子におけるゲノム A D A M T S 4 配列の位置 8 2 0 におけるアデノシン；

c . A D A M T S 4 遺伝子の一方の対立遺伝子におけるゲノム A D A M T S 4 配列の位置 8 3 5 におけるチミジン；

d . A D A M T S 4 遺伝子の一方または両方の対立遺伝子におけるゲノム A D A M T S 4 配列の位置 2 5 6 4 におけるグアノシン；

e . A D A M T S 4 遺伝子の一方または両方の対立遺伝子におけるゲノム A D A M T S 4 配列の位置 1 0 5 7 0 におけるグアノシン、

である、請求項 2 4 または 2 5 に記載の使用または方法。

【請求項 2 7】

以下のタンパク質多型：

a . A D A M T S 4 タンパク質のポリペプチド鎖の位置 7 7 におけるスレオニン；

b . A D A M T S 4 タンパク質のポリペプチド鎖の位置 7 2 0 におけるアラニン、
の一方または両方の同定が、疾患または危険度の高さを示す、請求項 1、2、もしくは 4 ~ 6 のいずれかに記載の使用、または請求項 3 に記載の方法。

【請求項 2 8】

A D A M T S 4 遺伝子の位置 6 3 5、8 2 0、8 3 5、2 5 6 4、および / または 1 0 5 7 0 位におけるヌクレオチドのタイプが一つまたはそれ以上の適するプライマーまたはプローブにより決定される、請求項 1、2、6、もしくは 8 ~ 1 1 の一つに記載の使用、または請求項 3、7、1 4、もしくは 1 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 9】

ヌクレオチドのタイプが P C R、サザンプロット、アレイハイブリダイゼーション、またはチップハイブリダイゼーションにより同定される、請求項 2 9 に記載の使用または方法。

【請求項 3 0】

検出手段が A D A M T S 4 D N A 検出手段である、請求項 1 1 に記載の使用または請求項 1 2 に記載の試験キット。

【請求項 3 1】

手段が、プライマーもしくはプライマーセット、適するプローブ、または配列特異的な抗 D N A 抗体である、請求項 3 0 に記載の使用または試験キット。

【請求項 3 2】

m R N A 量の変化を分析する、好ましくは A D A M T S 4 c D N A 増幅用の一つもしくはそれ以上の適するプライマーまたは標準的条件下での A D A M T S 4 c D N A もしくは m R N A とのハイブリダイゼーションに適した一つもしくはそれ以上のプローブを用いて分析する、請求項 2、6、8、もしくは 9 のいずれかに記載の使用、または請求項 3 もしくは 7 に記載の方法。

【請求項 3 3】

10

20

30

40

50

mRNA量をPCR、ノーザンブロット、アレイハイブリダイゼーション、またはチップハイブリダイゼーションにより分析する、請求項32に記載の使用または方法。

【請求項34】

検出手段が、生物学的サンプル中に存在するADAMTS4 mRNAおよび/またはタンパク質を検出する手段である、請求項11に記載の使用または請求項12に記載の試験キット。

【請求項35】

ADAMTS4タンパク質検出手段が抗体である、請求項34に記載の使用または試験キット。

【請求項36】

ADAMTS4タンパク質量の変化を測定する、請求項2、6、8、もしくは9のいずれかに記載の使用、または請求項3もしくは7に記載の方法。

【請求項37】

少なくとも一つの抗体を用いてタンパク質を検出する、請求項1、6、または36のいずれかに記載の使用または方法。

【請求項38】

ELISA、ウェスタンブロット、またはプロテインチップによって検出を行う、請求項37に記載の使用、方法、または試験キット。

【請求項39】

免疫組織化学的または放射免疫化学的な検出方法によって検出を行う、請求項36または37に記載の使用、方法、または試験キット。

【請求項40】

ゲノムADAMTS4核酸配列が、場合により位置635、820、835、2564、および10570のヌクレオチドの一つまたはそれ以上に関する偏りを伴う配列番号1または16に規定される配列である、請求項1～39のいずれかに記載の方法、使用、または試験キット。

【請求項41】

配列が、以下のSNP：

- a. ゲノムADAMTS4配列の位置635におけるアデノシン、
- b. ゲノムADAMTS4配列の位置820におけるアデノシン、
- c. ゲノムADAMTS4配列の位置835におけるチミジン、
- d. ゲノムADAMTS4配列の位置2564におけるグアノシン、および/または
- e. ゲノムADAMTS4配列の位置10570におけるグアノシン、

の一つまたはそれ以上を有する、請求項40に記載の方法、使用、または試験キット。

【請求項42】

配列番号5、6、8、9、11、12、14、もしくは15に規定される配列の一つもしくはそれ以上のプライマーを含むプライマーセットまたは配列番号4、7、10、もしくは13に規定される配列のプローブにより特徴付けられる、請求項28～33のいずれかに記載の方法、使用、または試験キット。

【請求項43】

ADAMTS4核酸またはそのフラグメントが、ゲノム核酸配列における位置635、820、835、2564、および10570の一つまたはそれ以上を含み、かつ好ましくはまた以下のSNP：

- a. 位置635におけるアデノシン；
- b. 位置820におけるアデノシン；
- c. 位置835におけるチミジン；
- d. 位置2564におけるグアノシン；
- e. 位置10570におけるグアノシン；

の一つまたはそれ以上も含む、請求項10に記載の使用。

【請求項44】

10

20

30

40

50

アミノ酸の位置 77 および 720 の一方または両方を含みかつ以下のタンパク質多型：
そのポリペプチド鎖の位置 77 におけるスレオニンまたは 720 におけるアラニン
の一方または両方を含む A D A M T S 4 タンパク質またはそのフラグメントを使用する、
請求項 10 に記載の使用。

【請求項 45】

配列番号 1 または 16 に示されるゲノム A D A M T S 4 配列を有し、かつ以下の S N P
：

- a . ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 635 におけるアデノシン、
- b . ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 820 におけるアデノシン、
- c . ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 835 におけるチミジン、
- d . ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 2564 におけるグアノシン、および / または
- e . ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 10570 におけるグアノシン、

の一つまたはそれ以上を含む、単離された核酸。

10

【請求項 46】

以下のタンパク質多型：

- a) A D A M T S 4 タンパク質のポリペプチド鎖の位置 77 におけるスレオニン；
- b) A D A M T S 4 タンパク質のポリペプチド鎖の位置 720 におけるアラニン；

の一方または両方を有する、単離された A D A M T S 4 タンパク質。

【請求項 47】

配列番号 3、17、18、または 19 の一つに示される配列を有する、請求項 46 に記
載の単離された A D A M T S 4 タンパク質。

20

【請求項 48】

配列番号 5、6、8、9、11、12、14、または 15 に示される核酸配列を有する
核酸プライマー。

【請求項 49】

配列番号 4、7、10、または 13 に示される核酸配列を有する核酸プローブ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、心血管障害および末梢血管障害の危険度の高さを同定するための一塩基多型
(S N P) およびタンパク質多型の使用ならびに該使用に適したプライマーおよび核酸に
関する。さらに、本発明は、心血管障害および末梢血管障害の予防および処置のための有
効物質の探索における A D A M T S 4 (トロンボスポンジンモチーフを有するディスイン
テグリンおよびメタロプロテアーゼ (a d i s i n t e g r i n a n d m e t a l l o p r o t e a s e w i t h t h r o m b o s p o n d i n m o t i f s)) の
使用に関する。

30

【背景技術】

【0002】

西洋社会において心血管障害および末梢血管障害は男女とも最も多い死因の一つである
。心血管障害には心機能が影響を受ける全ての障害が包含され、特に心組織および心血管
の障害が含まれる。末梢血管障害は、心臓外部のいずれかの動脈、静脈、動静脈、または
リンパの閉塞的または機能的な特徴の障害であり得、この用語は例えば末梢血管疾患 (P
V D) を包含する。P V D は、心臓外部動脈における動脈硬化性プラークの形成のことで
ある。

40

【0003】

冠状動脈性心疾患 (c o r o n a r y h e a r t d i s e a s e s) 、特に冠動脈
疾患は、心血管障害の主な原因の一つと考えることができる。アンギナは、狭心症とも呼
ばれる、心筋に十分な酸素が供給されない場合に起こる一時的な胸痛または圧迫感である
。冠動脈が狭窄または遮断されて、酸素の要求の増加に見合う程度に心筋への血流を増や
すことができなくなると、その結果として虚血が起こり、それによって上記の疼痛 (すな
わち

50

わち狭心症)が引き起こされる場合がある。通常、狭心症は冠動脈疾患に起因するものであるが、他の冠状動脈性心疾患によって引き起こされる場合もある。あらゆる心筋虚血が狭心症に関連する疼痛または圧迫感を引き起すわけではない。この種の、すなわち狭心症を伴わない、心筋虚血は無症候性虚血と呼ばれる。無症候性虚血の危険は、罹患した個体が心筋への損傷に気づかないという事実にある。従って、患者または担当医は、前記損傷が最終的に心筋梗塞を引き起こすまで、心組織に対する潜在的な損傷を認識することができない場合が多い。この理由から、可能な限り早期の診断、従って治療的介入を可能にする、血管および心臓の変性を認識するための診断方法および手段に対する要望が大きい。

【0004】

高血圧(動脈性高血圧)は、収縮期および/または拡張期の血圧の上昇(140 mmHg以上の収縮期血圧および/または90 mmHg以上の拡張期血圧)であり、原発性または二次性のいずれかであり得る。原発性高血圧の病因は今日まで知られていないが;単一の要因に起因するものではなく、遺伝が素因を与える要素であり、例えば環境因子および栄養と一緒に作用することは確かである。二次性高血圧は、特定タイプの腎疾患または他の障害、例えば特定のホルモン障害に関連する。未処置の高血圧は、若年期に左心室不全、心筋梗塞、脳出血、およびその他の致死的可能性のある疾患にかかる危険度を大きく増加させる。心筋梗塞(heart infarction)は、心筋梗塞(myocardial infarction)とも呼ばれる、心筋組織の不可逆的な壊死であり、組織の長期間の虚血により引き起こされる。

【0005】

脳卒中は、脳の血液供給の突然の損壊(脳の虚血)であり、通常は特定の脳領域が影響を受け、神経学的障害を引き起こし、その特徴は影響を受ける脳領域に依存する。一過性脳虚血発作(TIA)は、脳卒中と似た原因を有する一過性の神経学的障害であるがその症状は通常完全に可逆的である。TIAは数分~数時間(定義上は最大で24時間)で見られ、脳卒中の発症の可能性を暗示するものである(症例の51%においては数年以内、21%においてはその後数ヶ月以内)。遷延性可逆性虚血性神経脱落症状(PRIND)は、遅れて進行する脳の血液供給の障害であり、その症状は通常24~28時間以内に現れる。TIAと同様、PRIND発症後は、脳卒中にかかる可能性が高くなる。

【0006】

心血管疾患および末梢血管疾患に関連する社会経済学および個人的な負担の大きさから、該障害の早期診断および早期処置の大いなる必要性が存在する

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

従って、本発明の目的は、心血管障害および末梢血管障害の改善された診断および処置方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明により、この目的は、試験しようとする個体から採取した生物学的サンプルにおいて心血管障害および末梢血管障害を、または心血管障害および末梢血管障害が発症する危険度の高さを同定するためにADAMTS4遺伝子の一塩基多型(SNP)またはADAMTS4タンパク質の多型の一つまたはそれ以上を使用することによって果たされる。

【0009】

これは、例えば、ADAMTS4核酸配列の位置635、820、835、2564、および10570の一つもしくはそれ以上における一塩基多型ならびに/またはADAMTS4タンパク質の位置77および720の一つもしくはそれ以上におけるタンパク質多型の存在についてADAMTS4核酸またはタンパク質を分析することによって、または採取したサンプル中に存在するADAMTS4のタンパク質またはmRNAの量を分析することによって果たすことができる。

【0010】

10

20

30

40

50

A D A M T S 4 核酸またはタンパク質内の任意の関連位置におけるヌクレオチドまたはアミノ酸のタイプは、ここでは一般的な方法に基づき決定することができる。特定位置におけるヌクレオチドまたはアミノ酸のタイプを知ることによって、当業者はサンプルを得た個体からその個体が属する危険グループを容易に決定することができる。

【 0 0 1 1 】

A D A M T S 4 は、少なくとも 14 のメンバーを含む細胞外プロテアーゼファミリーに属し、アグリカナーゼ - 1 と呼ばれる。A D A M T S 4 遺伝子は染色体の 1 q 2 1 - 2 3 に位置し、シグナル配列、プロペプチドドメイン、ディスインテグリン様ドメイン、およびトロンボスポンジン I 型モチーフを有する c 末端ドメインからなる 8 3 7 アミノ酸のタンパク質をコードする。A D A M T S 4 の基質には、細胞外マトリクスタンパク質のアグリカン、プレビカン、およびパーシカンが含まれる (*Int J Biochem Cell Biol* . 3 3 (1) : 3 3 - 4 4 , 2 0 0 1 ; *Curr Opin in Pharmacol* 2 : 3 2 2 - 3 2 9 , 2 0 0 2) 。これまで、アグリカナーゼ A D A M T S 4 の役割および機能は、A D A M T S 4 がアグリカンのプロテアーゼとして作用し、関節軟骨におけるアグリカンの損失および分解が病態生理学的帰結と直接的に関連することから、関節疾患との関連で研究されてきた。A D A M T S 4 の発現は転写レベルおよび / または転写後レベルで調節され、かつ刺激に応じて異なって発現され得る。A D A M T S 4 機能の活性化因子には、T G F 、 I L - 1 、 T N F アルファ、フィブロネクチンフラグメント (概観するには、*Curr Opin in Pharmacol* 2 : 3 2 2 - 3 2 9 , 2 0 0 2 およびその引用文献を参照のこと) 、およびグリコシルホスファチジルイノシトールアンカー型膜型メタロプロテイナーゼ 4 型 (M T 4 - M M P 、 M M P - 1 7 ; *JBC* 2 0 0 4 , V o l . 2 7 9 , p . 1 0 0 4 2 - 1 0 0 5 1) が含まれる。これらは、A D A M T S 4 の発現を調節することによって作用するか、I L - 1 について *Ahrthrit is & Rheumatism* , 2 0 0 3 , V o l . 4 8 , p 1 1 9 - 1 3 3 に示されているように、(A D A M T S 4 阻害因子の発現もしくは機能の阻害または A D A M T S 4 活性化因子の発現もしくは機能の活性化を通じて) 構成的に生産される A D A M T S 4 タンパク質を活性化することによって作用するかのいずれかであり得る。I L - 1 は、A D A M T S 4 のプロテアーゼ活性の特異性および活性に対する効果を有する A D A M T S 4 の c 末端プロセッシングに影響することによって、その A D A M T S 4 に対する調節効果を発揮することが明らかにされている (*JBC* 2 0 0 4 , V o l . 2 7 9 , p . 1 0 1 9 0 - 1 0 1 1 9) 。 A D A M T S 4 のアグリカナーゼ活性は、M T 4 - M M P による C 末端プロセッシングおよびシンデカン - 1 のコンドロイチン硫酸またはヘパリン硫酸残基への活性化型 A D A M T S 4 の結合によって正の影響を受ける (*JBC* 2 0 0 4 , V o l . 2 7 9 , p . 1 0 0 4 2 - 1 0 0 5 1) 。 A D A M T S 4 遺伝子は、ヒト脳 c D N A ライブラリから最初に単離され、当初 K I A A 0 6 8 8 と命名された (*DNA Res.* 5 : 1 6 9 - 1 7 6 , 1 9 9 8) 。

【 0 0 1 2 】

A D A M T S 4 遺伝子の配列は当該分野で公知である。ゲノム A D A M T S 4 配列の一部は、N C B I N u c l e o t i d e D a t a b a s e から N M _ 0 0 5 0 9 9 . 2 番として入手することができる (配列番号 1) 。この遺伝子の完全コード核酸配列は、A Y 0 4 4 8 4 7 . 1 番として入手することができる (配列番号 2) 。誘導されるタンパク質配列 (配列番号 3) は、N C B I N u c l e o t i d e D a t a b a s e において N M _ 0 0 5 0 9 9 . 3 番として利用可能であり、同様にその m R N A 配列 (配列番号 1 6) は N M _ 0 0 5 0 9 9 . 3 番として利用可能である。N C B I は N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n (住所 : N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n , N a t i o n a l L i b r a r y o f M e d i c i n e , B u i l d i n g 3 8 A , B e t h e s d a , M D 2 0 8 9 4 , U S A ; ウェブアドレス : w w w . n c b i . n h m . n i h . g o v) である。

【 0 0 1 3 】

相互に関連する本発明群は、A D A M T S 4 遺伝子および/またはタンパク質における変異がこのような変異のキャリアの臨床像・表現型像に及ぼす影響を評価するために本発明者らが行った、患者の臨床コホートにおける染色体レベルでのA D A M T S 4 遺伝子の研究に基づくものである。

【0014】

一塩基多型(SNP)は、個々の位置に置換を含む特定のヌクレオチド配列の変異であり、これは当業者によく知られている。本明細書中で使用される場合、タンパク質多型という用語は、そのタンパク質の一次構造(すなわちアミノ酸配列)、二次構造(すなわちタンパク質フォールディング)、および/または三次構造(すなわち種々のポリペプチドサブユニットからのタンパク質の形成)における任意の変化を含み、好ましくはタンパク質をコードする遺伝子の一つまたはそれ以上のSNPに起因する変化を含み;例えばそのタンパク質のアミノ酸変換、アミノ酸欠失、または短縮が一例である。

【0015】

A D A M T S 4 遺伝子における様々な一塩基多型(SNP)が当該分野で公知であり、NCBIデータベース、例えば「http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=9507」において公開されている。

【0016】

しかし、本発明の基礎となるA D A M T S 4 遺伝子における遺伝子多型および該A D A M T S 4 多型と心血管障害および末梢血管障害を発症する素因との関連については今日まで知られていなかった。

【0017】

本発明者らの実験により、A D A M T S 4 遺伝子における特定の変異が心血管障害および末梢血管障害に罹患したヒトにおいて統計学的に有意な頻度で生じていることが初めて実証された。A D A M T S 4 の遺伝子内のSNPまたはタンパク質の変異と、疾患の発症および進行との起り得る関連を評価するため、A D A M T S 4 の遺伝的変異を詳細に分析し、遺伝子型・表現型関連性分析を十分明確な患者コホートにおいて実施した。その結果が、A D A M T S 4 の多型が心血管障害および末梢血管障害の素因と相関するという驚くべき発現である。A D A M T S 4 遺伝子の多型とこのタイプの疾患の素因との相関はこれまで一切開示されておらず、関節疾患と関連するA D A M T S 4 の公知の機能からみても非常に驚くべきものと考えられる。

【0018】

本発明の様々な側面は、全ての動物または人類に対して適用可能である。好ましい実施態様は、哺乳動物および/またはヒトへの適用に関するものである。従って、A D A M T S 4 (核酸、タンパク質、多型等に関する)という用語は、あらゆる動物種またはホモサピエンス由来のA D A M T S 4 を意味する。好ましい実施態様には、哺乳動物由来のA D A M T S 4 および/またはホモサピエンス(hs)A D A M T S 4 が含まれる。

【0019】

従って、本発明の別の側面は、試験しようとする個体から採取した生物学的サンプルにおいて心血管障害および末梢血管障害を、または心血管障害および末梢血管障害が発症する危険度の高さを同定するための、A D A M T S 4 タンパク質もしくは核酸またはそれらの機能的フラグメントの使用に関する。

【0020】

以下において、A D A M T S 4 遺伝子および/もしくは核酸またはタンパク質内の所定の位置に存在する最も高頻度に存在するヌクレオチドまたはアミノ酸を、最も高頻度の変異または「野生型」と称する。従って、本願において、A D A M T S 4 遺伝子および/もしくは核酸、もしくはタンパク質内の当該位置における核酸塩基もしくはアミノ酸の置換もしくは変異、またはA D A M T S 4 遺伝子および/もしくは核酸、もしくはタンパク質のより低い頻度の変異に言及する場合、これは、A D A M T S 4 遺伝子、核酸、またはタンパク質内の所定の位置における野生型または最も高頻度の変異以外の核酸塩基またはア

10

20

30

40

50

ミノ酸の存在に関係するものである。

【0021】

A D A M T S 4 - G 6 3 5 G は、A D A M T S 4 遺伝子の両方の対立遺伝子における参照配列 NM__005099.2 (配列番号1) で言うところの位置 6 3 5 にグアノシン (G) を有する個体群を表す。この多型は、参照配列たる配列番号 3 (NM__005099.3 由来のタンパク質配列) の位置 7 7 にアミノ酸アラニン (Ala または A) を有する (Ala 77) A D A M T S 4 タンパク質をもたらす。前記個体は前記 A D A M T S 4 変異に関してホモ接合型である。表 5 から得られるように、ヌクレオチド G は A D A M T S 4 遺伝子の位置 6 3 5 における最も高頻度の変異であり、アミノ酸アラニンは A D A M T S 4 タンパク質の位置 7 7 における最も高頻度の変異である。

10

【0022】

A D A M T S 4 - G 6 3 5 A は、A D A M T S 4 遺伝子の一方の対立遺伝子における参照配列 NM__005099.2 (配列番号1) の位置 6 3 5 にグアノシン (G) を有する個体群を表し、対応するタンパク質の位置 7 7 にアミノ酸アラニン (Ala または A) をもたらす。前記個体群は、A D A M T S 4 遺伝子の他方の対立遺伝子の参照配列 NM__005099.2 (配列番号1) の位置 6 3 5 においてはアデノシン (A) を有し、A D A M T S 4 タンパク質の位置 7 7 にアミノ酸スレオニン (Thr または T) をもたらす (Thr 77)。これらの個体はこの A D A M T S 4 変異に関してヘテロ接合型である。

【0023】

A D A M T S 4 - A 6 3 5 A は、A D A M T S 4 遺伝子の両方の対立遺伝子における参照配列 NM__005099.2 (配列番号1) の位置 6 3 5 にアデノシン (A) を有する個体群を表し、A D A M T S 4 タンパク質の位置 7 7 にアミノ酸スレオニン (Thr または T) をもたらす (Thr 77)。前記個体は前記 A D A M T S 4 変異に関してホモ接合型である。

20

【0024】

A D A M T S 4 - G 8 2 0 G は、A D A M T S 4 遺伝子の両方の対立遺伝子における参照配列 NM__005099.2 (配列番号1) の位置 8 2 0 にグアノシン (G) を有する個体群を表す。この多型は、参照配列たる配列番号 3 (NM__005099.3 由来のタンパク質配列) の位置 1 3 1 にアミノ酸スレオニン (Thr または T) を有する (Thr 1 3 1) A D A M T S 4 タンパク質をもたらす。前記個体群は前記 A D A M T S 4 変異に関してホモ接合型である。表 3 から得られるように、ヌクレオチド T は、A D A M T S 4 遺伝子の位置 8 2 0 における最も高頻度の変異である。

30

【0025】

A D A M T S 4 - G 8 2 0 A は、A D A M T S 4 遺伝子の一方の対立遺伝子における参照配列 NM__005099.2 (配列番号1) の位置 8 2 0 にグアノシン (G) を有する個体群を表し、対応するタンパク質の位置 1 3 1 にアミノ酸スレオニン (Thr または T) をもたらす (Thr 1 8 1)。この個体群は、A D A M T S 4 遺伝子の他方の対立遺伝子の参照配列 NM__005099.2 (配列番号1) の位置 8 2 0 においてはアデノシン (A) を有する。A D A M T S 4 タンパク質の位置 1 3 1 のアミノ酸は同じである。これらの個体は前記 A D A M T S 4 変異に関してヘテロ接合型である。

40

【0026】

A D A M T S 4 - A 8 2 0 A は、A D A M T S 4 遺伝子の両方の対立遺伝子における参照配列 NM__005099.2 (配列番号1) の位置 8 2 0 にアデノシン (A) を有する個体群を表す。該個体は前記 A D A M T S 4 変異に関してホモ接合型である。

【0027】

A D A M T S 4 - C 8 3 5 C は、A D A M T S 4 遺伝子の両方の対立遺伝子における参照配列 NM__005099.2 (配列番号1) の位置 8 3 5 にシチジン (C) を有する個体群を表す。この多型は、参照配列たる配列番号 3 (NM__005099.3 由来のタンパク質配列) の位置 1 3 6 にアミノ酸プロリン (Pro または P) を有する (Pro 1 3 6) A D A M T S 4 タンパク質をもたらす。前記個体はこの A D A M T S 4 変異に関して

50

ホモ接合型である。表2から得られるように、ヌクレオチドCは、ADAMTS4遺伝子の位置835における最も高頻度の変異である。

【0028】

ADAMTS4 - C835Tは、ADAMTS4遺伝子の一方の対立遺伝子における参照配列NM_005099.2(配列番号1)の位置835にシチジン(C)を有する個体群を表し、対応するタンパク質の位置136にアミノ酸プロリン(ProまたはP)をもたらす(Pro136)。この個体群は、ADAMTS4遺伝子の他方の対立遺伝子の参照配列NM_005099.2(配列番号1)の位置835においてはチミジン(T)を有する。ADAMTS4タンパク質の位置136のアミノ酸は同じである。これらの個体は前記ADAMTS4変異に関してヘテロ接合型である。

10

【0029】

ADAMTS4 - T835Tは、ADAMTS4遺伝子の両方の対立遺伝子における参照配列NM_005099.2(配列番号1)の位置835にチミジン(T)を有する個体群を表す。該個体はこのADAMTS4変異に関してホモ接合型である。

【0030】

ADAMTS4 - C2564Cは、ADAMTS4遺伝子の両方の対立遺伝子における参照配列NM_005099.2(配列番号1)の位置2564にシチジン(C)を有する個体群を表す。この多型は、参照配列たる配列番号3(NM_005099.3由来のタンパク質配列)の位置720にアミノ酸プロリン(ProまたはP)を有する(Pro720)ADAMTS4タンパク質をもたらす。前記個体は前記ADAMTS4変異に関してホモ接合型である。表1から得られるように、ヌクレオチドCは、ADAMTS4遺伝子の位置2564における最も高頻度の変異であり、アミノ酸プロリンは、ADAMTS4タンパク質の位置720における最も高頻度の変異である。

20

【0031】

ADAMTS4 - C2564Gは、ADAMTS4遺伝子の一方の対立遺伝子における参照配列NM_005099.2(配列番号1)の位置2564にシチジン(C)を有する個体群を表し、対応するタンパク質の位置720にアミノ酸プロリン(ProまたはP)をもたらす(Pro720)。この個体群は、ADAMTS4遺伝子の他方の対立遺伝子の参照配列NM_005099.2(配列番号1)の位置2564においてはグアノシン(G)を有し、対応するタンパク質の位置720にアミノ酸アラニン(AlaまたはA)をもたらす(Ala720)。これらの個体はこのADAMTS4変異に関してヘテロ接合型である。

30

【0032】

ADAMTS4 - G2564Gは、ADAMTS4遺伝子の両方の対立遺伝子における参照配列NM_005099.2(配列番号1)の位置2564にグアノシン(G)を有する個体群を表す。この多型は、参照配列たる配列番号3(NM_005099.3由来のタンパク質配列)の位置720にアミノ酸アラニン(AlaまたはA)を有するADAMTS4タンパク質をもたらす。前記個体はこのADAMTS4変異に関してホモ接合型である。

【0033】

ADAMTS4 - A10570Aは、ADAMTS4遺伝子の両方の対立遺伝子における参照配列AY044847.1(配列番号2)の位置10570にアデノシン(A)を有する個体群を表す。該個体はこのADAMTS4変異に関してホモ接合型である。位置10570は3'-UTR(非翻訳領域)内に位置するため、ADAMTS4タンパク質のアミノ酸配列に対しては全く影響がない。表4から得られるように、ヌクレオチドAは、ADAMTS4遺伝子の位置10570における最も高頻度の変異である。

40

【0034】

ADAMTS4 - A10570Gは、ADAMTS4遺伝子の一方の対立遺伝子における参照配列AY044847.1(配列番号2)の位置10570にグアノシン(G)を、ADAMTS4遺伝子の他方の対立遺伝子における参照配列AY044847.1(配

50

列番号 2) の位置 1 0 5 7 0 にアデノシン (A) を有する個体群を表す。これらの個体はこの A D A M T S 4 変異に関してヘテロ接合型である。

【 0 0 3 5 】

A D A M T S 4 - G 1 0 5 7 0 G は、A D A M T S 4 遺伝子の両方の対立遺伝子における参照配列 A Y 0 4 4 8 4 7 . 1 (配列番号 2) の位置 1 0 5 7 0 にグアノシン (G) を有する個体群を表す。該個体はこの A D A M T S 4 変異に関してホモ接合型である。

【 0 0 3 6 】

A D A M T S 4 遺伝子における遺伝子変異は、例えば：

a) その遺伝子変異を含む可能性のある A D A M T S 4 遺伝子、本発明においては特に A D A M T S 4 遺伝子の参照配列 N M _ 0 0 5 0 9 9 . 2 の位置 6 3 5、8 2 0、8 3 5、2 5 6 4 または参照配列 A Y 0 4 4 8 4 7 . 1 の位置 1 0 5 7 0 付近の領域の分子生物学的分析による、染色体 D N A レベルでの遺伝子変異の直接的検出によって、

b) A D A M T S 4 m R N A の発現の測定による検出を通じて

c) A D A M T S 4 タンパク質内、本発明においては特に A D A M T S 4 ポリペプチド鎖の位置 7 7 および / または 7 2 0 におけるタンパク質多型の検出によって、

d) タンパク質化学的方法による細胞、組織、または体液中に存在する A D A M T S 4 タンパク質の量および / または活性の測定による間接的検出によって、検出され得る。

【 0 0 3 7 】

上記参照配列の一つにおける上記位置の一つにおける A D A M T S 4 遺伝子の核酸レベル (本発明においては染色体 D N A) での遺伝子変異または多型は、例えば、

1) A D A M T S 4 遺伝子の前記領域の核酸配列の配列決定に基づく方法 (例えばピロシーケンス法、放射標識もしくは蛍光色素標識ヌクレオチドを用いる、または前記核酸配列の質量分析を通じた配列決定) ；

2) A D A M T S 4 遺伝子の前記領域の核酸配列のハイブリダイゼーションに基づく方法 (例えば「 D N A マイクロアレイ」によるもの) ；

3) A D A M T S 4 遺伝子の前記領域の核酸配列の増幅産物の分析に基づく方法 (例えば T a q M a n 分析)、

によって検出され得る。

【 0 0 3 8 】

上記参照配列の一つにおける上記位置の一つまたはそれ以上における A D A M T S 4 遺伝子の核酸レベル (本発明においては染色体 D N A) での遺伝子変異または多型はまた、例えば、

1) A D A M T S 4 遺伝子の核酸配列のハイブリダイゼーションに基づく方法 (例えば「 D N A マイクロアレイ」、「ノーザンプロット分析」によるもの) ；

2) A D A M T S 4 遺伝子の核酸配列の増幅産物の分析に基づく方法 (例えば「 T a q M a n 分析、ディファレンシャル R N A ディスプレイ、レプリゼンテーションアルディファレンス分析 (r e p r e s e n t a t i o n a l d i f f e r e n c e a n a l y s i s))、

を通じた発現された A D A M T S 4 m R N A の測定に基づき検出され得る。

【 0 0 3 9 】

さらに、上記参照配列の一つにおける上記位置の一つまたはそれ以上における遺伝子変異または多型は、A D A M T S 4 タンパク質の量および / または活性の分析を通じて検出され得る。A D A M T S 4 タンパク質の量および / または活性は、例えば、

1) A D A M T S 4 タンパク質の量の定量的検出に基づく方法 (例えばウェスタンプロット分析、E L I S A 試験)、

2) インビトロ試験系を通じた、例えばヒト細胞、動物細胞、細菌および / または酵母細胞における A D A M T S 4 タンパク質の活性の機能的検出に基づく方法、に基づき検出され得る。

【 0 0 4 0 】

10

20

30

40

50

A D A M T S 4 タンパク質内の、参照配列 N M _ 0 0 5 0 9 9 . 3 (配列番号 3) に係るタンパク質で言うところの位置 7 7 または 7 2 0 の一方または両方におけるタンパク質多型は、例えば、A D A M T S 4 タンパク質内の、例えば位置 7 7 のアラニンもしくはスレオニンまたは位置 7 2 0 のプロリンまたはアラニンを区別することができる特異的抗体によって検出することができる。

【 0 0 4 1 】

A D A M T S 4 遺伝子内の上記位置の一つにおける遺伝子変異または多型の検出は、例えば、(a) 心血管障害および末梢血管障害、例えば：末梢血管疾患、高血圧、脳卒中 / P R I N D / T I A、不安定狭心症、若年発症心筋梗塞 (p r e m a t u r e m y o c a r d i a l i n f a r c t i o n)、心筋梗塞、および / または冠状動脈性心疾患の危険度を評価するための遺伝子マーカーとして、(b) 対応する遺伝子変異のキャリアにおける心血管障害および末梢血管障害、例えば：末梢血管疾患、高血圧、脳卒中 / P R I N D / T I A、不安定狭心症、若年発症心筋梗塞、心筋梗塞、および / または冠状動脈性心疾患の予防的処置のためのマーカーとして、(c) 心血管障害および末梢血管障害、例えば：末梢血管疾患、高血圧、脳卒中 / P R I N D / T I A、不安定狭心症、若年発症心筋梗塞、心筋梗塞、および / または冠状動脈性心疾患に対して薬学的有効物質の投与すべき用量を適合させるためのマーカーとして、(d) 心血管障害および末梢血管障害、例えば：末梢血管疾患、高血圧、脳卒中 / P R I N D / T I A、不安定狭心症、若年発症心筋梗塞、心筋梗塞、および / または冠状動脈性心疾患に対して薬学的に有効な物質を同定するための高スループットスクリーニングストラテジーを決定するためのマーカーとして、(e) 心血管障害および末梢血管障害、例えば：末梢血管疾患、高血圧、脳卒中 / P R I N D / T I A、不安定狭心症、若年発症心筋梗塞、心筋梗塞、および / または冠状動脈性心疾患に対する薬学的物質の適合性、安全性、および有効性を試験するための臨床研究に関連する個体または患者を同定するためのマーカーとして、ならびに (f) D N A、R N A、またはタンパク質レベルで A D A M T S 4 遺伝子における遺伝子変異を分析するための試験系を開発するための基礎として使用され得る。

10

20

【 0 0 4 2 】

本発明者らの上記の分析は、A D A M T S 4 の多型と心血管障害および末梢血管障害の発症の素因との間の相関を初めて証明した。

【 0 0 4 3 】

従って、本発明の別の側面は、試験しようとする個体から採取した生物学的サンプルにおいて心血管障害および末梢血管障害を、または心血管障害および末梢血管障害が発症する危険度の高さを同定するための A D A M T S 4 タンパク質もしくは核酸またはそれらのフラグメントの使用に関する。

30

【 0 0 4 4 】

本発明のさらに別の側面は、個体から採取したサンプルを、A D A M T S 4 遺伝子の一方または両方の対立遺伝子の位置 6 3 5、8 2 0、8 3 5、2 5 6 4、および 1 0 5 7 0 の一つまたはそれ以上に存在する、その個体が心血管障害および末梢血管障害に罹患するまたはそれらが発症する危険度の指標となるヌクレオチドのタイプについて試験することを含む、個体における心血管障害および末梢血管障害を、または心血管障害および末梢血管障害が発症する危険度の高さを同定する方法に関する。

40

【 0 0 4 5 】

従って本発明はまた、個体から採取したサンプルを、A D A M T S 4 タンパク質のポリペプチド鎖の位置 7 7 および 7 2 0 の一方または両方に存在する、その個体が心血管障害および末梢血管障害に罹患するまたはそれらが発症する危険度の指標となるアミノ酸のタイプについて試験することを含む、個体における心血管障害および末梢血管障害を、または心血管障害および末梢血管障害が発症する危険度の高さを同定する方法に関する。

【 0 0 4 6 】

一つの実施態様によれば、本発明は、個体から採取したサンプルを、サンプル中に存在する A D A M T S 4 m R N A および / またはタンパク質の量が一つまたはそれ以上の参

50

照サンプルのそれらと異なるかどうかについて試験することを含む、個体における心血管障害および末梢血管障害を、または心血管障害および末梢血管障害が発症する危険度の高さを同定する方法に関する。

【0047】

参照サンプルは、例えば、以下のゲノムおよび/またはタンパク質の変異体：

a . A D A M T S 4 遺伝子の一方または両方の対立遺伝子におけるゲノム A D A M T S 4 配列の位置 6 3 5 におけるアデノシン以外のヌクレオチド、好ましくはグアノシン；

b . A D A M T S 4 遺伝子の一方または両方の対立遺伝子におけるゲノム A D A M T S 4 配列の位置 8 2 0 におけるアデノシン以外のヌクレオチド、好ましくはグアノシン；

c . A D A M T S 4 遺伝子の両方の対立遺伝子におけるゲノム A D A M T S 4 配列の位置 8 3 5 におけるチミジン以外のヌクレオチド、好ましくはシチジン；

d . A D A M T S 4 遺伝子の一方または両方の対立遺伝子におけるゲノム A D A M T S 4 配列の位置 2 5 6 4 におけるグアノシン以外のヌクレオチド、好ましくはシチジン；

e . A D A M T S 4 遺伝子の一方または両方の対立遺伝子におけるゲノム A D A M T S 4 配列の位置 1 0 5 7 0 におけるグアノシン以外のヌクレオチド、好ましくはアデノシン；

f . A D A M T S 4 タンパク質のポリペプチド鎖の位置 7 7 におけるアラニン以外のアミノ酸、好ましくはスレオニン；

g . A D A M T S 4 タンパク質のポリペプチド鎖の位置 7 2 0 におけるプロリン以外のアミノ酸、好ましくはアラニン；

の一方またはそれ以上を有する一またはそれ以上の個体から採取したサンプルであり得、量の違いの存在は、その個体が心血管障害および末梢血管障害に罹患するまたはそれらを発症する危険度の高さを示す。A D A M T S 4 の量の変化、すなわち A D A M T S 4 レベルの変化は、全ての発現レベル（転写、翻訳、スプライシング）、翻訳後修飾、タンパク質もしくはプロタンパク質の輸送、またはタンパク質安定性に対する影響に影響を及ぼすことが原因となって、および A D A M T S 4 発現に作用するシグナル伝達経路からの影響が原因となって引き起こされ得る。

【0048】

本発明のさらに別の側面は、単離された個体のサンプルを、上記の S N P またはタンパク質多型の一つまたはそれ以上の存在について分析すること、ならびに患者の年齢および A D A M T S 4 遺伝子の位置 6 3 5、8 2 0、8 3 5、2 5 6 4、および 1 0 5 7 0 の一つもしくはそれ以上または A D A M T S 4 タンパク質の位置 7 7 もしくは 7 2 0 に存在するヌクレオチドまたはアミノ酸のタイプに基づき危険度予測値を計算することを含む、心血管障害および末梢血管障害に罹患する危険度を決定する方法に関する。危険度判定の基礎となるのは、表 1 ~ 1 0、図 8 ~ 1 2 に示される結果であるが、実施例に記載されるような分析により得られる追加データから得ることもできる。

【0049】

本発明のあらゆる様々な実施態様および側面における心血管障害および末梢血管障害は、例えば、末梢血管疾患、高血圧、脳卒中 / P R I N D / T I A、不安定狭心症、心筋梗塞、若年発症心筋梗塞 (e a r l y h e a r t i n f a r c t i o n)、および冠動脈形成術の着手を必要とする任意の病理学的状態であり得る。

【0050】

本明細書中で示されるヌクレオチドの位置は、参照配列 N M _ 0 0 5 0 9 9 . 2 / 配列番号 1、N M _ 0 0 5 0 9 9 . 3 / 配列番号 1 6、または A Y 0 4 4 8 4 7 . 1 / 配列番号 2 におけるヌクレオチドの位置をいう。A D A M T S 4 のアミノ酸配列に関しては、アミノ酸の位置は、図 3 の参照配列 N M _ 0 0 5 0 9 9 . 3 / 配列番号 3 のそれをいう。位置は、参照配列の最初のアミノ酸またはヌクレオチドの 1 から始まるが、ヌクレオチド配列についてはヌクレオチドの数値の前に + または - が付く場合、そのヌクレオチドの位置は翻訳部位をもとに指定される。

【0051】

10

20

30

40

50

本明細書では、以下、ヌクレオチドおよびアミノ酸の同義語的に標準的な略記（すなわち三文字または一文字記号）が使用される。

【0052】

核酸は任意のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドであり得、用語「オリゴヌクレオチド」は2～25ヌクレオチドの核酸を表し、用語「ポリヌクレオチド」は26ヌクレオチド以上を有する核酸をさす。

【0053】

本願において、タンパク質配列、アミノ酸配列、およびポリペプチド配列は同義語的に使用され得る。

【0054】

今日まで、ヒトにおけるADAMTS4の変異と臨床効果を結びつけるデータは開示されていなかった。驚くべきことに、本発明者らの研究により、様々なADAMTS4の変異、特にADAMTS4遺伝子のG635A、A635A、G820A、A820A、C835T、C2564G、G2564G、A10570G、およびG10570G変異の存在と、心血管障害および末梢血管障害の素因を密接に関連付けることが可能となった。

【0055】

ADAMTS4遺伝子の遺伝子多型、特にG635A、A635A、G820A、A820A、C835T、C2564G、G2564G、A10570G、およびG10570Gの変異の一つまたはそれ以上、特に好ましくはA635A、A820A、C835T、G2564G、およびG10570Gの変異の一つまたはそれ以上の検出は、例えば、(a) 心血管障害および末梢血管障害、例えば末梢血管疾患、高血圧、脳卒中/PRIIND/TIA (PRIINDは、遷延性虚血発作を表し；TIAは一過性虚血発作を表す)、不安定狭心症、心筋梗塞、若年発症心筋梗塞、および冠動脈形成術の着手を必要とする任意の病理学的状態の発症を遅らせるもしくは予防するため、またはその後の経過および病理学的な続発症の重傷度を軽減もしくは停止させるための予防的処置および予防的手段（投薬、ライフスタイル）のための遺伝子マーカーとして、(b) 薬物の用量を調整するための遺伝子マーカーとして、または(c) 薬物スクリーニングを設計するための遺伝子マーカーとして、または(d) 同定するため、および適切な場合は特定の処置もしくは医学的研究において患者を選択するための遺伝子マーカーとして利用できる。

【0056】

本発明の方法は、心血管障害および末梢血管障害の素因の早期の同定を可能にし、それによって古典的な症状、例えば組織損傷の結果としての疼痛が顕れる前に予防的または治療的処置手段の早期利用を実現し；担当する熟練者による本発明の多型または定常時ADAMTS4レベルの変化の同定は、治療医または試験医に、すでに存在する血管または心組織に対する損傷をスクリーニングする、または予防薬を投与する、または対応する損傷もしくは疼痛が起こる前にライフスタイルの変更を提案する上での明確な適応を与える。

【0057】

さらに、前記変異と心血管障害および末梢血管障害の素因との間の関係に関する新規な知見は、特定の薬物の用量の変更で、または前記ADAMTS4遺伝子の変異を有さない患者における処置の変更の必要性で示唆を与えることにより、より効果的な処置の使用を可能にする。

【0058】

従って、本発明はまた、薬物の用量を、心血管障害および末梢血管障害の予防および/または処置に適合させるための、

a) ADAMTS4遺伝子における一つまたはそれ以上の一塩基多型(SNP)、

b) ADAMTS4タンパク質における一つまたはそれ以上のタンパク質多型、および/または

c) ADAMTS4タンパク質もしくは核酸またはそれらのフラグメント、の使用に関する。

【0059】

10

20

30

40

50

さらに、本発明は、薬物の用量を、個体における心血管障害および末梢血管障害の予防および/または処置に適合させる方法であって、これは、

個体から採取したサンプルを、

a) A D A M T S 4 遺伝子のいずれかまたは両方の対立遺伝子における位置 6 3 5、8 2 0、8 3 5、2 5 6 4、および 1 0 5 7 0 の一つまたはそれ以上に存在するヌクレオチドのタイプ、および/または

b) A D A M T S 4 タンパク質の位置 7 7 および 7 2 0 の一方または両方に存在するアミノ酸のタイプ、

について試験すること、上記用量を上記の位置の一つまたはそれ以上に存在するヌクレオチドまたはアミノ酸のタイプに基づき適合させること、を含む方法に関する。

10

【0060】

一つの実施態様は、A D A M T S 4 遺伝子のいずれかまたは両方の対立遺伝子が以下の S N P :

a) ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 6 3 5 におけるアデノシン；

b) ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 8 2 0 におけるアデノシン；

c) ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 8 3 5 におけるチミジン；

d) ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 2 5 6 4 におけるグアノシン；

e) ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 1 0 5 7 0 におけるグアノシン；

の一つまたはそれ以上を有するかどうかに関して個体から採取したサンプルを試験すること、薬物の用量をこれらの多型の一つまたはそれ以上の存在によって増減させることを含む。

20

【0061】

別の実施態様は、A D A M T S 4 遺伝子のいずれかまたは両方の対立遺伝子が上記位置の一つまたはそれ以上において上記以外のヌクレオチドを有するかどうかについて個体から採取したサンプルを試験すること、薬物の用量をその別のヌクレオチドの存在によって増減させることを含む。他のヌクレオチドは、好ましくは、

a) ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 6 3 5 および/もしくは 8 2 0 におけるグアノシン、

b) ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 8 3 5 および/もしくは 2 5 6 4 におけるシチジン、または

c) ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 1 0 5 7 0 におけるアデノシン、

である。

30

【0062】

本発明の別の実施態様によれば、薬物の用量を個体の心血管障害および末梢血管障害の処置および/または予防に適合させる方法は、個体から採取したサンプルを、該サンプル中に存在する A D A M T S 4 m R N A および/またはタンパク質が一つまたはそれ以上の参照サンプルと異なるかどうかに関して試験することを含む。参照サンプルは、例えば、以下のゲノムおよび/またはタンパク質の変異：

a. A D A M T S 4 遺伝子的一方または両方の対立遺伝子におけるゲノム A D A M T S 4 配列の位置 6 3 5 におけるアデノシン以外のヌクレオチド、好ましくはグアノシン；

40

b. A D A M T S 4 遺伝子的一方または両方の対立遺伝子におけるゲノム A D A M T S 4 配列の位置 8 2 0 におけるアデノシン以外のヌクレオチド、好ましくはグアノシン；

c. A D A M T S 4 遺伝子の両方の対立遺伝子におけるゲノム A D A M T S 4 配列の位置 8 3 5 におけるチミジン以外のヌクレオチド、好ましくはシチジン；

d. A D A M T S 4 遺伝子的一方または両方の対立遺伝子におけるゲノム A D A M T S 4 配列の位置 2 5 6 4 におけるグアノシン以外のヌクレオチド、好ましくはシチジン；

e. A D A M T S 4 遺伝子的一方または両方の対立遺伝子におけるゲノム A D A M T S 4 配列の位置 1 0 5 7 0 におけるグアノシン以外のヌクレオチド、好ましくはアデノシン；

f. A D A M T S 4 タンパク質のポリペプチド鎖の位置 7 7 におけるスレオニン以外

50

のアミノ酸、好ましくはアラニン；

g. A D A M T S 4 タンパク質のポリペプチド鎖の位置 7 2 0 におけるアラニン以外のアミノ酸、好ましくはプロリン；

の一つまたはそれ以上を有する個体から採取されたサンプルであり得、その用量は、個体から採取したサンプル中のタンパク質および/または m R N A の量が上記 a ~ g で列挙した変異の一つまたはそれ以上を有する一またはそれ以上の個体由来の参照サンプルまたは参照サンプル群のそれらと異なるかどうかに基づき適合される。

【 0 0 6 3 】

A D A M T S 4 遺伝子の変異、特に A D A M T S 4 G 6 3 5 A、A 6 3 5 A、G 8 2 0 A、A 8 2 0 A、C 8 3 5 T、C 2 5 6 4 G、G 2 5 6 4 G、A 1 0 5 7 0 G、および/または G 1 0 5 7 0 G の変異の存在は、インジケータ機能を有する。先行技術には、心血管障害および末梢血管障害の処置または予防用の多くの薬物が存在する。全ての薬物が同じ疾患を有する全ての患者に対して同じ効果を有する訳ではないので、初めて心血管薬による処置を受ける患者は通常、後で「調整」を受ける必要がある、すなわち、事実上、治療医が個々の患者に対してその薬物がどの程度の用量で所望の効果を有し同時に可能な限り副作用を小さくすることができるかに関して試験しなければならない。この場合、問題は、患者の症状が薬物投与（所定の用量で）によって軽減または停止するかどうかを事前にわからないという点にある。患者が望ましくない副作用に苦しめられるかどうかを正確に評価することも事前に行うことができない。

【 0 0 6 4 】

この点に関して、処置前にその患者を心血管障害または末梢血管障害に罹患する確かな可能性に関連する A D A M T S 4 遺伝子変異を有するまたはある量の A D A M T S 4 核酸もしくはタンパク質を有する患者として特定することは、特定の薬物による処置が成功する予測可能性を向上させ：A D A M T S 4 遺伝子の特定の変異と心血管障害および末梢血管障害の発症の関係は、この種の A D A M T S 4 の変異が、最終的に個体が他の個体よりも心血管障害および末梢血管障害に罹患するより高い可能性またはより低い可能性を有する結果となる個体の生理学的変化と一致することを示唆している。各薬物の効能が個体の違いにより異なるということは、このような個々の患者の異なる生理学的な定め（*physiological provision*）の背景を診察しなければならない。個体をこのような特定の生理学的背景を有する患者群に割り振ることで、臨床研究においてここで特に有効であることが証明されている特定の薬物をなるべく使用させ、その変異を有さない患者と比較してこの患者群において有効性が低いまたは望ましくない副作用に関連する可能性が高い薬物を最初から使用させないようにすることができる。

【 0 0 6 5 】

通常、処置前に個々の患者をこの種の分類に供するのは不可能である。本発明の基礎をなす多型と心血管疾患の発症との間の関係を知ることによってのみこれが可能となる。従って、臨床研究で同じ遺伝子変異を有する患者群の処置において良好な成績を示した薬物は、A D A M T S 4 遺伝子における変異を有する患者に対して好ましく使用され得るが、当該患者群において効果が小さいかまたは異なる遺伝子変異を有する患者群における場合よりも望ましくない副作用の可能性が高い薬物は最初から使用されないことになる。これにより、薬物に対して「調整」が行われた患者の危険が減少し、処置の成功の可能性が増加するであろう。

【 0 0 6 6 】

従って、本発明のさらなる側面は、心血管障害および末梢血管障害の処置および/または予防のための薬物に反応する個体を同定するための、

- a) A D A M T S 4 遺伝子における一つまたはそれ以上の一塩基多型（S N P）、
- b) A D A M T S 4 タンパク質における一つまたはそれ以上の多型、および/または
- c) A D A M T S 4 タンパク質もしくは核酸またはそれらのフラグメント、

の使用に関する。

【 0 0 6 7 】

10

20

30

40

50

このような同定は、例えば、個体から採取したサンプルを、

a) A D A M T S 4 遺伝子のいずれか一方または両方の対立遺伝子が、以下の変異 (該ヌクレオチドの存在が個体からのサンプルが薬物に反応することが得られている個体のインジケータである) の一つまたはそれ以上を有する、

1. ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 6 3 5 におけるアデノシン
2. ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 8 2 0 におけるアデノシン
3. ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 8 3 5 におけるチミジン
4. ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 2 5 6 4 におけるグアノシン
5. ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 1 0 5 7 0 におけるグアノシン

b) A D A M T S 4 遺伝子のいずれか一方または両方の対立遺伝子が、以下の変異 (その存在が個体からのサンプルが薬物に対して反応していることが得られている個体のインジケータである) の一つまたはそれ以上を有する、

1. ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 6 3 5 におけるアデノシン以外のヌクレオチド、好ましくはグアノシン
2. ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 8 2 0 におけるアデノシン以外のヌクレオチド、好ましくはグアノシン
3. ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 8 3 5 におけるチミジン以外のヌクレオチド、好ましくはシチジン
4. ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 2 5 6 4 におけるグアノシン以外のヌクレオチド、好ましくはシチジン

5. ゲノム A D A M T S 4 配列の位置 1 0 5 7 0 におけるグアノシン以外のヌクレオチド、好ましくはアデノシン

c) サンプル中の A D A M T S 4 mRNA および / またはタンパク質の量が一つまたはそれ以上の比較用 / 参照サンプル、例えば A D A M T S 4 遺伝子に関して既知の遺伝的背景 (例えば a または b に示される多型の一つまたはそれ以上) を有する一またはそれ以上の参照個体由来のサンプルと相違する (量の違いの存在が個体からのサンプルが薬物に対して反応することが得られている個体の指標である)、

d) A D A M T S 4 タンパク質が A l a 7 7、T h r 7 7、P r o 7 2 0、または A l a 7 2 0 の多型の一つまたは両方を有する、
かどうかにして試験することによって実施され得る。

他の同定方法および手法も考えられ得る。

【0068】

本発明の様々な側面におけるヌクレオチドのタイプの決定は、当該分野で公知の方法に従い行うことができる。これは、例えば、

a) ゲノム DNA を含む単離された生物学的サンプルを提供すること、または単離されたゲノム DNA を提供すること、

b) A D A M T S 4 遺伝子のゲノム配列の位置 6 3 5、8 2 0、8 3 5、2 5 6 4、および / または 1 0 5 7 0 の一つまたはそれ以上を含む核酸を増幅することのできるプライマーを用いて P C R 反応を行うことによって核酸を増幅すること、

c) b) において規定された核酸の配列決定を行うこと、
によって達成できる。

【0069】

ヌクレオチドのタイプを決定する上での別の選択肢は、例えば

a) ゲノム DNA を含む単離された生物学的サンプルを提供すること、または単離されたゲノム DNA を提供すること、

b) ゲノム DNA を適切な支持体に固定化すること、

c) 標準的な条件下で (ゲノム) A D A M T S 4 配列を有する核酸と特異的に結合することができかつ A D A M T S 4 遺伝子の位置 6 3 5、8 2 0、8 3 5、2 5 6 4、および / または 1 0 5 7 0 の一つまたはそれ以上における特定のヌクレオチドに対する特異性を有する一つまたはそれ以上のプローブを固定化された DNA にハイブリダイズさせるこ

と、
によるものである。

【0070】

別の選択肢では、ヌクレオチドのタイプは、ゲノムDNAを使用する代わりにRNAから生成したcDNAを使用することを除いて上記の二つの方法に基づき決定することもできる。

【0071】

mRNAの量は、例えば、

a. mRNAを含む生物学的サンプルを提供すること、またはa)のサンプル由来の単離されたmRNAを提供すること；

b. ADAMTS4 mRNAから得られた核酸を増幅する能力を有するプライマーを用いてRT-PCRにより核酸を増幅すること；

c. 増幅された核酸の量を定量すること、およびそれを少なくとも一つの参照サンプル(すなわちポジティブおよび/またはネガティブコントロールサンプル)において増幅された核酸の量と比較すること、
によって決定することができる。

【0072】

任意の所定の分析(生物学的、生化学的、または化学的)反応の結果を検証するためのポジティブまたはネガティブコントロールの概念は当業者によく知られている。それには、例えば、その実験の結果たる特定のシグナルをいわゆる「バックグラウンド」のシグナル(所定の分析方法により作出される人為的なシグナル)から区別するための、本来の分析実験と同じ様式により実施するが一つまたはそれ以上の規定の成分を除く(例えばADAMTS4タンパク質もしくはmRNAを除くまたは特異的ADAMTS4抗体を除く等)反応が含まれる(ネガティブコントロール)。それにはまた、本来の分析実験と同じ様式により実施するがその反応条件が全体として機能しているかを検証するために既知のシグナルを生じる追加の成分を用いる反応が含まれる(ポジティブコントロール)。

【0073】

mRNAの量を決定する上での別の選択肢は、例えば、

a. mRNAを含む生物学的サンプルを提供すること、または単離されたmRNAを提供すること；

b. mRNAを適切な支持体に移すこと；

c. 少なくとも一つの適切なプローブにより支持体上でADAMTS4 mRNAを検出し、および定量すること；

d. 一つまたはそれ以上の参照サンプル(例えばポジティブおよび/またはネガティブコントロールサンプル)由来のADAMTS4 mRNAの量と比較すること、
によるものである。

【0074】

さらに別の選択肢は：

a. 個体の組織学的サンプルを提供すること；

b. 適切なmRNAプローブとのハイブリダイゼーション反応を行い、ハイブリダイズしたプローブを検出しおよび定量してADAMTS4 mRNAの量を検出すること、

c. ADAMTS4 mRNAの量を一つまたはそれ以上の参照サンプル(例えばポジティブおよび/またはネガティブコントロールサンプル)におけるそれと比較すること

、
を含む方法である。

【0075】

タンパク質の量の測定またはタンパク質多型の同定は、例えば、

a. タンパク質を含む、試験しようとする個体の生物学的サンプルを提供すること；

b. 好ましくはa)のサンプルからタンパク質を単離すること；

c. タンパク質を適切な支持体に移すこと；

10

20

30

40

50

d . A D A M T S 4 タンパク質に特異的または特定の A D A M T S 4 タンパク質多型に特異的な少なくとも一つの抗体によってタンパク質を検出すること；および

e . そのシグナルを定量すること、およびそれを少なくとも一つの参照サンプル（すなわちネガティブコントロールおよび/またはポジティブコントロールサンプル）から得たシグナルと比較すること、
により達成することができる。

【 0 0 7 6 】

タンパク質の量を測定または特定のタンパク質多型を同定する上での別の選択肢は：

a . 個体の組織学的サンプルを提供すること；
b . 適切な A D A M T S 4 抗体との結合反応を行い、その量を検出しおよび定量することにより A D A M T S 4 タンパク質の量を検出すること；

c . A D A M T S 4 タンパク質の量と一つまたはそれ以上の参照サンプル（例えばポジティブおよび/またはネガティブコントロールサンプル）におけるそれを比較すること、
を含む方法である。

【 0 0 7 7 】

特定のタンパク質多型の決定は、例えば、

a . そのポリペプチド鎖の位置 7 7 にスレオニンを有する A D A M T S 4 タンパク質に対して、そのポリペプチド鎖の位置 7 7 に別のアミノ酸、特にアラニンを有する A D A M T S 4 タンパク質に対するよりも検出可能な程度高い結合親和性を有する、および/または

そのポリペプチド鎖の位置 7 2 0 にアラニンを有する A D A M T S 4 タンパク質に対して、そのポリペプチド鎖の位置 7 2 0 にアラニンを有さない、特にプロリンを有する A D A M T S 4 タンパク質に対するよりも検出可能な程度高い結合親和性を有する、

A D A M T S 4 タンパク質に対する抗体を用いることによって達成することができる。これに関して、サンプルまたは採取もしくは単離したサンプルという用語は、患者から採取された生物学的材料を意味する。生物学的材料には、特に、組織もしくは臓器もしくは体液の細胞もしくは標本もしくは一部（例えばリンパ、唾液、血液、皮膚、結合組織）、または細胞、好ましくは摘出が容易な細胞、例えば粘膜細胞などが含まれ得る。この種の生物学的材料は、一般的技術、例えばスワブの入手、血液サンプルの採取、組織穿刺、または外科的技術（例えば生検）により取得され得る。サンプルは、好ましくは、組織学的検体、細胞標本、細胞、例えば粘膜細胞、細胞組織、精製された D N A、m R N A、もしくはタンパク質、または体液、例えば唾液、リンパ、もしくは血液、またはそれらのサンプルの抽出物もしくは標本である。細胞または組織および細胞標本または組織抽出物の天然分子の精製は当業者によく知られている（以下で列挙する標準的な文献の例も参照のこと）。D N A / R N A またはタンパク質調製物は、一般的技術によりそれらから得ることができる。

【 0 0 7 8 】

A D A M T S 4 の多型が、心血管障害および末梢血管障害と関連するものとして本願において初めて確認されたので、相互に関連する本発明群はまた、心血管障害および末梢血管障害を処置および/または予防するための有効物質を発見するための A D A M T S 4 タンパク質もしくは核酸またはそれらの機能的フラグメントの使用に関係する。

【 0 0 7 9 】

本発明の様々な側面の一つの実施態様によれば、A D A M T S 4、その誘導体またはフラグメントが単離された分子として使用され得る。

【 0 0 8 0 】

本発明との関係において、特に A D A M T 4 S に関して、用語「単離された分子」は、天然源から精製された（すなわちそれらの自然環境から取り出された）A D A M T S 4 核酸もしくはポリペプチドまたはそれらのフラグメント、ならびに精製された組換え分子を意味する（精製という用語には部分精製および完全精製が含まれる）。核酸の単離は当該

分野でよく知られている（以下の標準的な実験手順に関する文献も参照のこと）。天然源からのタンパク質の単離または組換えタンパク質の単離も当該分野で公知である。可溶性の活性なアグリカナーゼを天然源から得る方法は、JBC 1999 Vol. 274, P. 6594 - 6601にも記載されている。

【0081】

本発明に係る使用により、心血管障害および末梢血管障害の予防および/または処置のための新規物質の同定が可能となる。本発明に係る使用には、所望の特徴を有する物質の同定ならびに心血管の予防および/または処置に有用であることがすでに確認されている物質のさらなる特徴付けが含まれる（すなわち、本発明に係る使用は、例えば化合物スクリーニングおよび化合物プロファイリングに有用である）。

10

【0082】

本発明の様々な側面において利用される物質は、生化学的または分子生物学的方法により精製、部分精製、合成、または製造された、任意の生物学的もしくは化学的物質または天然産物抽出物であり得る。

【0083】

本発明の様々な側面という意味で心血管障害および末梢血管障害の予防または処置において有効であるとみなされる物質は、生物系においてADAMTS4の機能の一つ、またはADAMTS4の発現、量、もしくは定常レベルに影響する任意の物質であり得る。

【0084】

この目的の達成するため、その物質はADAMTS4の機能（例えば上記または下記で定義されるもの）のいずれかを調節することができる。ADAMTS4タンパク質の活性は、その物質によって、例えばADAMTS4ポリペプチド/タンパク質またはそれらのフラグメントの機能との直接的相互作用および干渉によって調節され得る。その物質はまた、ADAMTS4の発現を、例えば転写（開始、伸長、終結）、転写もしくは翻訳プロセッシング（特にプレプロまたはプロタンパク質から活性型への翻訳後プロセッシング、これはまたプロペプチドドメインを欠く全長タンパク質のc末端切断も含む）、転写もしくは翻訳安定性、または翻訳のレベルで調節することができる。さらに、その物質は、ADAMTS4の翻訳後プロセッシング、修飾、タンパク質フォールディング等を調節することができる。その物質は、直接的または間接的に上記効果を発揮し得る（すなわち、間接的には、ADAMTS4機能/タンパク質活性/発現等に影響する天然のシグナル伝達カスケードに（正または負の）干渉をすることによるものを意味する）。ADAMTS4機能の内因性の阻害因子には、例えば、組織メタロプロテイナーゼ-3阻害因子（TIMP-3；J Biol Chem 2001, 276: 12501 - 12504）またはアルファ-2-マクログロブリン（アルファ2M；Curr Opinion in Pharmacology 2002, 2: 322 - 329）が含まれる。ADAMTS4のアグリカナーゼ機能に対して正の効果を発揮する潜在的な内因性シグナル分子には、例えば、サイトカイン（例えばIL-1、TNFアルファ、IL-6、IL-17）、レチノイン酸、およびフィブロネクチンフラグメントが含まれ；n-3脂肪酸はIL-1刺激の際にアグリカナーゼ機能に対して負の影響を及ぼすようである（概観するには、Curr Opinion in Pharmacology 2002, 2: 322 - 329およびその引用文献のこと）。さらに、その物質は、ADAMTS4機能を模倣する（すなわちその機能/役割を引き継ぐ）ことができる。

20

30

40

【0085】

ADAMTS4のフラグメントは、対応する野生型よりも短い、例えば配列番号1もしくは2、16の核酸に示されるホモサピエンス（hp）ADAMTS4または配列番号3に示されるそのポリペプチドよりも短い任意のポリペプチドまたは核酸であり得る。ADAMTS4の機能的フラグメントは、ADAMTS4の機能（例えば以下に列挙する機能）の少なくとも一つを示す任意のフラグメント（ポリペプチドまたは核酸のいずれか）である。ADAMTS4の構造の全体像は、例えばCurr Opinion in Pharmacology 2002, 2: 322 - 329またはJ Biol Chem

50

1999, Vol. 274: 23443 - 23450, esp. p. 23446 から得ることができる。機能的フラグメントの例には、ADAMTS 4 の様々なドメイン（およそ位置 1 ~ 位置 212 のプロドメイン；位置 213 ~ 436 の触媒ドメイン、位置 437 ~ 520 のディスインテグリンドメイン、位置 521 ~ 576 のトロンボスポンジンドメイン、位置 577 ~ 685 のシステインリッチドメイン、および位置 686 ~ 837 のスペーサードメイン（J. Biol. Chem. 2002, 277: 42775 - 42780 を参照のこと）、例えば潜在的システインスイッチ、触媒ドメイン、もしくはトロンボスポンジン様モチーフ、またはアグリカン GAG 鎖の結合に関与するそれらの一部を含むプロペプチドドメイン（例えば、特に Tsp モチーフの領域を表すペプチドについては J. Biol. Chem. 2000, 275: 25791 - 25797 を、または ADAMTS 4 の自己触媒フラグメントおよび ADAMTS 4 のシステインリッチスペーサードメインに存在するコンセンサス GAG 結合配列を含むペプチド：GSKKKFDKCM、SFRKFRYG、LRRRPWAGRK については J. Biol. Chem. 2002, 277: 42775 - 42780 を参照のこと）の一つまたはそれ以上を含むまたはそれらからなるフラグメントが含まれる。

【0086】

ADAMTS 4 または ADAMTS 4 フラグメントの誘導体は、ADAMTS 4 核酸、ポリペプチド、またはそれらのフラグメントの任意の修飾体であり得る。誘導体は、例えば、アミノ酸もしくはヌクレオチド配列の修飾または任意の他の種の修飾、例えば化学的または生物学的修飾、例えばポリペプチドもしくは核酸に安定性を与える修飾（例えばホスホチオエート修飾または他の種の核酸バックボーンの修飾もしくはアミノ酸間の結合の変換等）、またはポリペプチドもしくは核酸を特定の細胞に対して特異的に標的化できる、またはその細胞内進入もしくは細胞による取り込みを促進する修飾（例えば細胞浸透性ホスホペプチド、細胞浸透性ペプチドベクターへのオルトカップリング、例えばアンテナペディア/ペネトラチン、TAT、およびシグナルペプチド系配列に基づくもの；または特異的な輸送体もしくは輸入体 (importers) に対するリガンドの一部へのカップリング) を含む。ADAMTS 4 の「機能的誘導体」という用語は、少なくとも ADAMTS 4 の機能の一つを有する、ADAMTS 4 のその天然型（ポリペプチドまたは核酸のいずれか）に対する任意の種の修飾を含む。本発明はまた、ADAMTS 4 のフラグメントの機能的誘導体を包含する。ADAMTS 4 の機能には、上記の機能、例えば他のタンパク質またはタンパク質フラグメントに結合しそれらをタンパク質分解的に切断する、例えばアグリカン (Science 1999, 284: 1664 - 1666) もしくは ADAMTS 4 と相互作用しもしくはそれにより切断され得るそのフラグメント（すなわち、インターグローブドメイン (IGD) を含む残基 Glu373 ~ Ala374 の部分を含むおよび/またはグローブ (G) ドメイン 2 と 3 (G2 と G3) の間のコンドロイチン硫酸リッチ領域の 4 つの ADAMTS 4 切断部位のうちの一つもしくはそれ以上を含むもしくは全長コンドロイチン硫酸リッチ領域を含むおよび/またはグリコサミノグリカンリッチ C 末端領域 (GAG 領域) を含むアグリカンフラグメント)、プレビカン (J. Biol. Chem. 2000, 275: 22695 - 22703) もしくは ADAMTS 4 と相互作用しもしくはそれにより切断され得るそのフラグメント、パーシカン (J. Biol. Chem. 2001, 276: 13372 - 13378) もしくは ADAMTS 4 と相互作用しもしくはそれにより切断され得、組織メタロプロテイナーゼ阻害因子 3 (TIMP-3, J. Biol. Chem. 2001, 276: 12501 - 12504) と相互作用しおよび/もしくはそれにより阻害され得る、またはアルファ-2-マクログロブリン (アルファ 2M; Curr. Opinion in Pharmacol. 2: 322 - 329) と結合しおよび/もしくはそれを切断する ADAMTS 4 タンパク質またはタンパク質フラグメントの能力が含まれる。ADAMTS 4 核酸またはそのフラグメントに関しては、ADAMTS 4 機能には、例えば、他の分子、例えば、特異的なハイブリダイゼーションプライマーまたはプローブと相互作用する能力、下流のコード配列の転写を制御する能力、ADAMTS 4 タンパク質をコードする能力等が含まれる。一般的

10

20

30

40

50

には、A D A M T S 4 の機能には、他の分子（タンパク質またはタンパク質フラグメント（すなわちアグリカン、プレビカン、パーシカン、またはそれらのフラグメント）、核酸（すなわち A D A M T S 4 核酸が他の核酸に特異的にハイブリダイズする）、合成分子（すなわち A D A M T S 4 タンパク質またはフラグメントが合成薬と特異的に相互作用する）を含むがこれらに限定されない）と相互作用する A D A M T S 4（タンパク質もしくは核酸）またはそのフラグメントの能力も含まれる。上記の機能については、C u r r O p i n i o n i n P h a r m a c o l 2 : 3 2 2 - 3 2 9、特に 3 2 2 ページ、右カラムの第二段落～ 3 2 3 ページの最初の段落および 3 2 3 ページ、右カラムの第二段落～ 3 2 4 ページ、右カラムの第二段落を参照のこと。

【 0 0 8 7 】

有効物質の同定は、例えば、本明細書の以下に記載される方法の一つまたはそれ以上によって行うことができる。例えば：

a . A D A M T S 4 タンパク質またはその機能的フラグメントもしくは誘導体を試験物質と接触させること、

b . 試験物質が A D A M T S 4 タンパク質またはその機能的フラグメントもしくは誘導体の活性を調節するかどうかを決定すること、

を含む心血管障害および末梢血管障害を予防または処置する上で有効な物質を同定する方法。

【 0 0 8 8 】

a . 検出可能な量または活性の A D A M T S 4 またはその機能的フラグメントもしくは誘導体を有する細胞を試験物質と接触させること、

b . 試験物質が細胞中に存在する A D A M T S 4 またはその機能的フラグメントもしくは誘導体の量または活性を調節することができるかどうかを決定すること、

を含む心血管障害および末梢血管障害を予防または処置する上で有効な物質を同定する方法。

【 0 0 8 9 】

本発明の様々な側面において利用される物質 / 試験物質 / 有効物質は、生化学的または分子生物学的方法により精製、部分精製、合成、または製造された任意の生物学的もしくは化学的物質または天然産物抽出物であり得る。

【 0 0 9 0 】

ここで、A D A M T S 4 の量または活性を検出可能な程度に調節することができる物質は、心血管障害および末梢血管障害を予防または処置する上で有効な物質であるとされる。検出可能な量の A D A M T S 4 は、検出可能な量の A D A M T S 4 核酸（mRNA、cDNA、もしくはゲノムDNA）および / またはタンパク質（プレプロ / プロ / 成熟タンパク質）のいずれかであり得る。検出可能な活性は、A D A M T S 4 DNA / mRNA またはタンパク質の転写および / または翻訳および / またはタンパク質活性のいずれかであり得る。

【 0 0 9 1 】

本発明の様々な側面および実施態様において、調節（modulation）という用語は、活性化または阻害を意味する。

【 0 0 9 2 】

別の例は：

a . A D A M T S 4 タンパク質またはその機能的フラグメントもしくは誘導体をコードする核酸を転写有効系において試験物質と接触させること；

b . その系においてその物質の存在下で A D A M T S 4 タンパク質またはその機能的フラグメントもしくは誘導体をコードする mRNA の量を測定すること；

c . その系においてその物質の非存在下で A D A M T S 4 タンパク質またはその機能的フラグメントもしくは誘導体をコードする mRNA の量を測定すること；

d . その物質がその系に存在する A D A M T S 4 タンパク質またはその機能的フラグメントもしくは誘導体をコードする mRNA の量を調節することができるかどうかを決定

10

20

30

40

50

すること、

を含む心血管障害および末梢血管障害を予防または処置する上で有効な物質を同定する方法である。ここで、前記系に存在する A D A M T S 4 mRNA の量を調節することができる物質は、心血管障害および末梢血管障害を予防または処置する上で有効な物質であるとされる。

【0093】

転写有効系 (transcriptionally active system) は、少なくとも転写ユニットの転写反応を実行する能力を有する任意の生化学系または細胞系である。このような系は当該分野でよく知られており、細胞 (例えば通常の研究用菌株または細胞株および真核生物または原核生物細胞の初代培養物) ならびにインビトロ転写系またはキット (例えば細胞抽出物に基づくもの) が含まれ、これらは市販されてもいる。本発明においては、これは、A D A M T S 4 mRNA (例えば NM_005099.3 に示される mRNA) を発現するまたは機能的 A D A M T S 4 フラグメントをコードする mRNA を発現する生化学系または細胞系であり得る。

10

【0094】

その系に存在する mRNA 量の決定は、当該分野でよく知られている技術に従い行うことができる (例えば、放射標識もしくは蛍光標識による生産物の直接標識または特異的なプライマーもしくはプローブを使用する生産物の検出等)。

【0095】

別の例は：

20

- a. A D A M T S 4 タンパク質またはその機能的フラグメントもしくは誘導体をコードする核酸を翻訳有効系において試験物質と接触させること；
 - b. その系においてその物質の存在下で A D A M T S 4 タンパク質またはその機能的フラグメントもしくは誘導体の量を測定すること；
 - c. その系においてその物質の非存在下で A D A M T S 4 タンパク質またはその機能的フラグメントもしくは誘導体の量を測定すること；
 - d. その物質がその系に存在する A D A M T S 4 タンパク質またはその機能的フラグメントもしくは誘導体の量を調節することができるかどうかを決定すること、
- を含む心血管障害および末梢血管障害を予防または処置する上で有効な物質を同定する方法である。

30

【0096】

ここで、その系において A D A M T S 4 タンパク質、誘導体、またはフラグメントの量を調節することができる物質は、心血管障害および末梢血管障害を予防または処置する上で有効な物質であるとされる。

【0097】

翻訳有効系は、少なくとも転写物の翻訳反応を実行する能力を有する任意の生化学系または細胞系である。このような系は当該分野でよく知られており、細胞 (例えば通常の研究用菌株または細胞株および真核生物または原核生物細胞の初代培養物) ならびにインビトロ翻訳系 (例えばキットとして市販されてもいる) が含まれる。核酸のインビトロ翻訳には、核酸を適切なベクターにサブクロニングし、その後適切な緩衝液および細胞抽出物 (例えば網状赤血球溶解産物) 中でポリペプチドを発現させる。ベクター、必要な試薬、およびプロトコル、ならびに適当な条件は当該分野で公知であり、市販されている。

40

【0098】

本発明との関係において、用語「ポリペプチド」は、ペプチド結合によって相互に結合されたアミノ酸を含み、かつ直線的な様式で少なくとも 10 個の相互に結合されたアミノ酸を含む分子を意味する。この種の分子でそれよりも短いものはペプチドという。用語「タンパク質」は、少なくとも一つのポリペプチド鎖を含むが相互に会合または結合した二つまたはそれ以上のポリペプチド鎖をも含み得る分子を意味する。従って、用語「タンパク質」は用語「ポリペプチド」を包含する。

【0099】

50

前記系に存在する A D A M T S 4 タンパク質の測定は、当該分野でよく知られた技術（例えば翻訳産物の直接的な放射標識もしくは蛍光標識、または特異的な抗体の利用、タンパク質へのタグ付加およびそのタグの検出等）に従い行うことができる。

【0100】

別の例は：

a . レポーター遺伝子またはその機能的フラグメントに有機的に結合された A D A M T S 4 遺伝子のプロモーターまたはその機能的フラグメントを含む核酸ベクターでトランスフェクションされた細胞を提供すること；

b . 機能的な A D A M T S 4 プロモーターに有機的に結合されていないレポーター遺伝子またはその機能的フラグメントを含むコントロールベクターでトランスフェクションされた細胞を提供すること；

c . 試験物質の存在下で a) および b) に係る細胞のレポーター遺伝子活性を測定すること；

d . 試験物質の非存在下で a) および b) に係る細胞のレポーター遺伝子活性を測定すること、

を含む心血管障害および末梢血管障害を予防または処置する上で有効な物質を同定する方法に関する。

【0101】

ここで、a) に係るレポーター遺伝子の活性を有意に調節する（すなわち増減させる）ことができるが、b) のレポーター遺伝子活性は有意に調節しない（すなわち A D A M T S 4 プロモーター活性を特異的に高めることができる）物質は、心血管障害および末梢血管障害の予防または処置において有効な物質であるとされる。

【0102】

有意な調節とは、標準偏差よりも高い任意の調節（すなわち増減）であり；好ましくは標準偏差の少なくとも二倍の高さのものである。

【0103】

本発明の上記の側面は、当該分野で一般的に知られている典型的なレポーター遺伝子アッセイに基づくものである。この目的のために、選択されたプロモーターを選択された宿主細胞のタイプに適した発現ベクターの、選択されたレポーター遺伝子の上流に挿入して、プロモーターが活性化場合にレポーター遺伝子が発現されるようにする。その後、この構築物を選択された宿主細胞に導入する。適する形質転換またはトランスフェクションの方法は当該分野でよく知られており、細胞培養条件およびレポーター遺伝子の発現の検出についても同様である（以下で列挙する標準的な文献を参照のこと）。適切な条件は当該分野でよく知られており、ベクター、レポーター遺伝子、および必要な試薬も同様によく知られており、これらは市販もされている。

【0104】

ベクターは、適切な細胞または生物内で核酸フラグメント（例えば他のベクターから切り出されたまたは P C R によって増幅されクローニングベクターに挿入された）を用いて特異的に増幅させることのできる環状または直鎖状の核酸分子、例えば D N A プラスミド、バクテリオファージ、またはコスミドである。発現ベクターは、宿主細胞または生物内で、目的遺伝子（例えばレポーター遺伝子）の異種発現を実現する。細胞または生物のタイプは目的に大きく依存し、その選択は当業者の知識の及ぶ範囲である。核酸の増幅に適した生物は、例えば、大部分の増殖率の高い単細胞生物、例えば細菌または酵母等である。適切な生物はまた、多細胞組織から単離および培養された細胞、例えば様々な生物から生成された細胞株等（例えば *S p o d o p t e r a F r u g i p e r d a* 由来の S F 9 細胞等）であってよい。適切なクローニングベクターは当該分野で公知であり、様々な生物学系業者、例えば *R o c h e D i a g n o s t i c s*、*N e w E n g l a n d B i o l a b s*、*P r o m e g a*、*S t r a t a g e n e* 等から市販されている。適切な細胞株は、例えば *A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n* (A T C C) から販売されている。

10

20

30

40

50

【0105】

タンパク質またはポリペプチドの異種発現には、細胞は、核酸ベクターによるトランスフェクションおよび目的遺伝子、例えばレポーター遺伝子の発現に適した任意の原核生物または真核生物細胞であり得る。その可能性のある例は、例えば元々は多細胞生物または組織から取得された（例えばHeLa、CHO、COS、SF9、もしくは3T3）もしくはそれ自体が単細胞生物、例えば酵母細胞（例えばS.pombeまたはS.cerevisiae）である初代細胞もしくは培養細胞、好ましくは真核生物細胞培養物、または原核生物細胞培養物、もしくはPichiaもしくはE.coliである。組織由来の細胞およびサンプルは、当該分野の公知技術（例えば血液サンプルの採取、組織穿刺、または外科的技術）によって取得され得る。自然界でADAMTS4を産生する、適切な場合はそれを分泌する単離された細胞、例えば内分泌K細胞もまた、本発明のADAMTS4の使用で使用するのに適しており、その場合、産生されるADAMTS4の量を増減させる心血管薬の能力を直接的に測定することが可能である。

10

【0106】

本願との関係において、用語「トランスフェクション」は、核酸ベクターを（原核生物または真核生物の）宿主細胞に導入することを意味し、従って用語「形質転換」を包含するものである。該トランスフェクションは安定的なものと一過的なものがあり、これらは一般的方法に基づき行うことができる。

【0107】

ADAMTS4プロモーター領域は、目的の遺伝子のコード配列を適切なベクターのプロモーター/エンハンサーの下流に機能的にクローニングし適切な宿主細胞をトランスフェクションした場合に、目的の遺伝子産物の転写を制御することのできるADAMTS4遺伝子の一部分である。ADAMTS4プロモーターの機能的フラグメントは、所定の条件下で同様に下流のコード配列の転写を制御することができるADAMTS4プロモーターフラグメントである。適するフラグメントの特定は当業者の技術の及ぶ範囲である。

20

【0108】

レポーター遺伝子は、その遺伝子産物の定量を容易にする任意の遺伝子であり得る。真核生物または原核生物宿主用の多数の様々なレポーター遺伝子ならびに検出方法および必要な試薬が当該分野において公知であり市販されている。これらには、例えばベータラクタマーゼ（LacZ）、ルシフェラーゼ、緑色もしくは青色蛍光タンパク質（GFPまたはBFP）、DsRed、HIS3、URA3、TRP1、もしくはLEU2、またはベータガラクトシダーゼが含まれる。これらの遺伝子は、可視的な（発色または発光）反応によって容易に検出することができるタンパク質（例えばLacZ、ルシフェラーゼ）をコードする。これらには、可視的（着色もしくは発光）反応によって容易に検出することができる遺伝子産物または発現された場合にアンピシリンもしくはカナマイシン等の抗生物質に対する耐性を付与する遺伝子産物が含まれる。他のレポーター遺伝子産物は、例えば栄養素要求遺伝子のように、発現細胞を特定条件下で成長させることができる。

30

【0109】

レポーター遺伝子の機能的フラグメントは、その遺伝子産物の定量を容易にする所定のレポーター遺伝子の任意のフラグメントである。

40

【0110】

本発明の上記側面との関係において、コントロールベクターは、レポーター遺伝子またはその機能的フラグメントを含むが、ここでレポーター遺伝子の発現が（機能的な）ADAMTS4プロモーターによって駆動されない任意の適切なベクターであり得る。このことは、例えば、レポーター遺伝子またはその機能的フラグメントが機能的なADAMTS4プロモーターに有機的に結合されていない（すなわち、ADAMTS4プロモーターを完全に欠いているか、非機能的なADAMTS4プロモーターもしくはプロモーターフラグメントを含むか、またはここでプロモーターとレポーターの結合が機能的でないかのいずれか）ことを意味し得る。このことはまた、レポーター遺伝子またはその機能的フラグメントがADAMTS4プロモーター以外の別のプロモーター（例えばSV40または別

50

の標準的なプロモーター)に有機的に結合されていることを意味し得る。機能的ベクターおよびコントロールベクターで同じ細胞をトランスフェクションすることもあるが、この場合、レポーター遺伝子が相違する必要がある。

【0111】

本発明の別の側面は、有効物質を同定するための上記の新規方法の一つに係る方法に基づく高スループットスクリーニングに関する(このような方法は「アッセイ」と呼ばれることもある)。

【0112】

規定の標的分子(いわゆる標的、大部分はタンパク質または核酸である)の活性または濃度を医薬化合物候補の有効性のパラメータとして測定するのに使用される分析法または分析系、いわゆるアッセイは、技術水準内でよく知られている。アッセイには、例えば、医薬化合物候補の有効性を試験することができる、規定のスペースおよび時間内に反応混合物としてひとまとめにされる単離または部分単離された成分を用いる生化学的分析法または分析系(例えば上記の方法)が含まれる。プロテアーゼ活性を測定する場合、これらには、例えば、標識メンバーと非標識メンバーの相互作用(例えば、標識基質と非標識プロテアーゼの相互作用、この場合、基質の切断によって標識基質の一部が遊離し;従って、所定の時間内に遊離した標識メンバーを検出またはその量を定量することによってプロテアーゼ活性を測定することができる)を測定するための放射性同位元素または蛍光アッセイが含まれる。他のアッセイの例には、細胞ベースのアッセイ(例えば、上記のレポーターアッセイまたはフェノタイピングアッセイ、この場合、ある物質の活性を細胞の表現型の変化により観察することができる)が含まれる。

10

20

【0113】

様々なタイプのアッセイが技術水準内で一般的に知られており、これらは業者から市販されている。

【0114】

本発明の様々な側面のさらなる実施態様によれば、位置635、820、835、2564、および10570の一つまたはそれ以上を含む配列を含むADAMTS4核酸が使用されるか、または位置77および720の一方または両方を含むADAMTS4ポリペプチドが使用される。

【0115】

心血管障害および末梢血管障害の発症と最も有意に結びつくものと同定されているADAMTS4遺伝子およびタンパク質の変異がG635A、A635A、G820A、A820A、C835T、C2564G、G2564G、A10570G、およびG10570G、Thr77およびAla720であるので、本発明の好ましい実施態様は、例えば本発明に係る方法の一つまたはそれ以上を実施するための、上記の多型の一つもしくはそれ以上または上記の多型の一つもしくはそれ以上を有するADAMTS4核酸もしくはポリペプチドの使用に関する。

30

【0116】

通常、研究しようとする対象の遺伝子の野生型配列における個々のSNPは、標的遺伝子(「分子標的」)の使用による活性化化合物のスクリーニングにおいて考慮されない。本願によって、心血管障害および末梢血管障害の発症と結びつくものとしてADAMTS4の変異が同定されたので、この種の変異の使用(特に、これに付随する細胞の特定の生理学的構成の背景に対しての使用)により、心血管障害および末梢血管障害を処置および/または予防するのに適した活性化化合物を発見する可能性が高まるはずである。実際、この種の遺伝的・生理学的構成を有する(例えば、G635A、A635A、G820A、A820A、C835T、C2564G、G2564G、A10570G、およびG10570G、Thr77およびAla720の一つまたはそれ以上を有する)個体は、心血管障害および末梢血管障害に罹患する可能性も高いので、これによって発見される活性化化合物の大部分はこの患者群を正確に標的化するものである。他方、ADAMTS4のG635G、G820G、C835C、C2564C、A10570A、Ala77、およびP

40

50

r o 7 2 0 の変異を使用することで、特にこの遺伝子またはタンパク質変異を有する患者が反応する活性化化合物を発見できるはずである。従って、A D A M T S 4 の G 6 3 5 G、G 8 2 0 G、C 8 3 5 C、C 2 5 6 4 C、A 1 0 5 7 0 A、A l a 7 7、および P r o 7 2 0 の変異の使用は、本発明の別の実施態様に相当する。

【 0 1 1 7 】

さらに、A D A M T S 4 遺伝子における S N P は、A D A M T S 4 とは異なる標的を用いる活性化化合物スクリーニングに使用するのにも適しており；それによって、A D A M T S 4 以外の標的の機能および/または活性および/または量に影響を与える能力を有する心血管障害および末梢血管障害の処置および/または予防用の活性化化合物を発見するための細胞アッセイにおいて細胞、特に、そのゲノムが位置 6 3 5、8 2 0、8 3 5、2 5 6 4、および/または 1 0 5 7 0 に関する A D A M T S 4 遺伝子の規定の変異を有する細胞を使用することが可能となる。これによって、遺伝的背景（好ましくは処置しようとする疾患に関連するもの）に対して、変異型遺伝子以外の遺伝子の機能に介入する化合物であっても、心血管障害および末梢血管障害を予防または処置する上で有効な化合物を特異的にスクリーニングすることができる。

10

【 0 1 1 8 】

本発明のさらなる側面は、試験しようとする個体の身体から採取した生物学的サンプルを分析することにより心血管障害および末梢血管障害または心血管障害および末梢血管障害の素因を診断するための A D A M T S 4 の検出手段の使用に関する。

【 0 1 1 9 】

これに関連して、好ましくは、以下の変異の一つまたはそれ以上の存在が、危険度が高いことを示す：G 6 3 5 A、A 6 3 5 A、G 8 2 0 A、A 8 2 0 A、C 8 3 5 T、C 2 5 6 4 G、G 2 5 6 4 G、A 1 0 5 7 0 G、G 1 0 5 7 0 G、T h r 7 7、A l a 7 2 0。

20

【 0 1 2 0 】

A D A M T S 4 の検出手段は、生物学的サンプル中の A D A M T S 4 タンパク質または核酸を検出するのに適した任意の手段であり得る。

【 0 1 2 1 】

検出手段は、例えば、サンプル中の A D A M T S 4 m R N A またはタンパク質を検出するための手段；例えばサンプル中の A D A M T S 4 m R N A またはタンパク質の量の定量に基づく手段（例えば、適当なプライマー、プローブ、抗 A D A M T S 4 抗体等；例えば、標準的な条件下で A D A M T S 4 m R N A もしくは c D N A に特異的にハイブリダイズすることができる核酸プローブ、例えばノーザンプロットもしくはマイクロアレイにおいて使用するためのプローブ、または定量逆転写酵素（R T）ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）用のプライマーセット）であり得る。別の例は、A D A M T S 4 遺伝子の胃 t 位置 6 3 5、8 2 0、8 3 5、2 5 6 4、および 1 0 5 7 0 の一つまたはそれ以上におけるヌクレオチドのタイプを決定する手段、例えば P C R 配列決定において使用すべき適切な P C R プライマーセット（例えばゲノムまたは c D N A プライマー）、プローブ（例えばサザンプロットまたはチップもしくはアレイハイブリダイゼーションにおいて使用すべきもの）、または例えば当該分野で公知の免疫（組織）化学、免疫蛍光、または放射免疫化学技術において使用すべき特異的抗 D N A 抗体に関する。さらに別の例は、A D A M T S 4 タンパク質の位置 7 7 および 7 2 0 の一方または両方に存在するアミノ酸のタイプを決定する手段、例えば特定のタンパク質多型に特異的な抗体に関する。

30

40

【 0 1 2 2 】

一つの実施態様によれば、検出手段は、生物学的サンプル中の A D A M T S 4 m R N A の量を検出する手段、例えば配列番号 5、6、8、9、11、12、14、および 15 に示されるプライマーの一つまたはそれ以上である。

【 0 1 2 3 】

別の実施態様によれば、検出手段は、A D A M T S 4 遺伝子の位置 6 3 5、8 2 0、8 3 5、2 5 6 4、および 1 0 5 7 0 の一つまたはそれ以上におけるヌクレオチドのタイプを決定する手段、例えば配列番号 5、6、8、9、11、12、14、および 15 に示さ

50

れるプライマーの一つまたはそれ以上である。

【0124】

適切なプライマーの設計および合成は当該分野で公知であり；そのようなプライマーは商業的にも入手できる。好ましい実施態様によれば、これらは配列番号5、6、8、9、11、12、14、および15に示されるプライマーである。核酸は、従来的な型通りの方法によって、例えば、Life Technologies、Applied Biosystems、BioRadのような会社から販売されている従来的な研究用ロボットを使用することによって配列決定される。

【0125】

適切なプローブの設計および調製も同様に当該分野で公知である（例えば列挙されている標準的な文献を参照のこと）。

10

【0126】

本発明に係る使用または方法の一つのさらに好ましい実施態様において、タンパク質量の変化またはADAMTS 4タンパク質内の所定のタンパク質多型の決定は、少なくとも一つの抗体を用いて決定される。この場合の好ましい検出方法は、ELISA、ウェスタンブロット、プロテインチップ、および分光法である。

【0127】

適切な抗体またはその機能的フラグメントの調製は当該分野で公知であり、例えば、哺乳動物、例えばウサギをADAMTS 4タンパク質またはそのフラグメントを用いて、適切な場合は適切なアジュバント（フロイントアジュバントまたは水酸化アルミニウムゲル、例えば、Diamond, B. A. et al. (1981) The New England Journal of Medicine: 1344 - 1349を参照のこと）の存在下で免疫することによる。免疫学的応答の結果、その動物内で産生されるポリクローナル抗体は、その後公知の方法によって、例えばカラムクロマトグラフィによって単離および精製され得る。モノクローナル抗体は、例えば、WinterおよびMilstein (Winter, G. & Milstein, C. (1991) Nature, 349, 293 - 299) による公知の方法に従い取得できる。モノクローナル抗体を調製および精製するのに適した方法は先行技術で公知である（標準的な文献を参照のこと）。ADAMTS 4検出用の公知の抗体の例は：Santa Cruz Biotechnology Inc. Cat. No. : sc-25582、sc-16534、または Chemicon International Cat. No. : AB19166、AB19165、またはABCAM Cat. No. : ab11567、またはAffinity Bioreagents Cat. No. : PA1-1750である。

20

30

【0128】

この関連発明群との関係において、抗体または抗体フラグメントという用語はまた、組換え生産された抗体またはその抗原結合部位をも意味し、これらはまた、適切な場合は修飾された抗体、例えばキメラ抗体、ヒト化抗体、多機能抗体、二特異性もしくはオリゴ特異性抗体、またはF(ab)もしくはF(ab)₂フラグメントであり得る（例えば、EP-B1-0368684、US 4,816,567、US 4,816,397、WO 88/01649、WO 93/06213、またはWO 98/24884を参照のこと）。

40

【0129】

抗体反応を検出するための従来的な免疫化学または放射免疫方法は当業者によく知られている。一般的な方法は、例えば、同定しようとする抗原に対する特異的な一次抗体の結合に基づくものでありこれには、二次抗体（これは通常は一次抗体上の種特異的なエピトープを認識する）が結合する。この場合、該二次抗体の結合は、検出可能なシグナル（例えば放射標識二次抗体を用いる場合は放射性のシグナル、または蛍光物質結合型二次抗体を用いる場合は蛍光シグナル、または例えば酵素結合型二次抗体を用いる場合は比色分析により測定可能なシグナル等）を生成させるために利用される。標準的な方法に関しては、以下に列挙する文献も参照のこと。

50

【0130】

相互に関連する本発明群はさらに、生物学的サンプル中のADAMTS4を検出するすくなくとも一つの手段を含む、心血管障害および末梢血管障害の素因を検出するための診断キットに関する。

【0131】

本発明との関係において、用語「キット」(キット・オブ・パーツ(kit of parts))は、組み合わせることによって、所定の作業(ここでは、心血管障害および/もしくは末梢血管障害またはそれらの素因の診断)を行うための空間的・機能的に結び付けられた単位を形成するために組み合わせられる、本発明において特定された要素の任意の組み合わせを意味し、これはさらに追加の部品を含み得る。

10

【0132】

本発明に係る診断キットは、生物学的サンプル中のADAMTS4を検出する少なくとも一つの手段を含む。キットは、適切な緩衝液ならびに/またはADAMTS4を検出するためおよび/もしくはサンプルを調製および方法実施(preparing and methoding)するための追加の試薬、ならびに、適切な場合は特定の検出方法を実行するための説明書をさらに含むのが適切である。

【0133】

本発明に係る使用または方法の好ましい実施態様によれば、ADAMTS4遺伝子における変異の一つまたはそれ以上の存在は、PCRおよび適切な場合はその後配列決定を行うことによって、およびゲノム核酸プローブを用いることによって検出される。

20

【0134】

PCRまたは適切なプローブ、例えば適切な支持体(例えばメンブレンまたはチップ)上に固定化されたゲノムDNAに結合するプローブを用いるハイブリダイゼーションに適したプロトコルおよび試薬は、当該分野でよく知られている。

【0135】

核酸分子は、一本鎖型の双方の分子が適切な反応条件(周囲の培地の温度およびイオン濃度)下で相互に結合して、新しい二本鎖核酸分子を形成する場合、互いに「ハイブリダイズ」する。ハイブリダイズするために、相互に結合する核酸分子は、相補的な配列を有さなければならない。しかし、選択されたストリンジェンシー条件によっては、結合を止めない塩基のミスマッチも存在し得る。用語「ストリンジェンシー」は、二つの一本鎖核酸分子が相互に結合する場合のハイブリダイゼーションの特異性に影響する、従って結合時に二つの分子間でいくつのミスマッチまたはどの程度の強度のミスマッチが許容されるかを決定する反応条件を表す。この場合、ストリンジェンシーつまり反応の特異性は、特に、温度および緩衝液の条件に依存する。二つの所定の核酸分子が結合するのに十分なストリンジェンシー条件はまた、核酸分子の長さ、タイプ、および相補性の程度にも依存する。前記パラメーターおよび所定の分析法に適した条件の決定については当業者によく知られており、標準的な研究法の文献においても見出され得る(例えば、“Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6)。

30

【0136】

相互に関連する本発明群の好ましい実施態様において、個体は、グルコース代謝障害を有する患者、好ましくは糖尿病患者、特に好ましくはII型糖尿病患者である。さらに、個体はまた、高血圧であり得、および/またはすでに心筋梗塞にかかっている場合もある。心血管障害は、好ましくは、冠状動脈性心疾患(>50%狭窄)、冠動脈疾患、心筋梗塞、若年発症心筋梗塞、急性冠不全症候群、または狭心症(特に不安定狭心症)である。

40

【0137】

本発明の方法、使用、または試験キットにおいて使用される単離されたサンプルは好ましくはヒトサンプルであり、試験しようとする個体は好ましくはヒトである。サンプルは特に：組織学的サンプル、生検サンプル、細胞(例えば粘膜細胞)、細胞抽出物、細胞性組織、体液、好ましくは血液、唾液、リンパ、または尿であり得る。

50

【0138】

本発明はさらに、配列番号1、2、または16に示されかつ以下のSNP：

- a. ゲノムADAMTS4配列の位置635におけるアデノシン、
- b. ゲノムADAMTS4配列の位置820におけるアデノシン、
- c. ゲノムADAMTS4配列の位置835におけるチミジン、
- d. ゲノムADAMTS4配列の位置2564におけるグアノシン、および/または
- e. ゲノムADAMTS4配列の位置10570におけるグアノシン、

の一つまたはそれ以上を含む配列を有する単離されたADAMTS4核酸またはそのフラグメントに関する。

【0139】

本発明はさらに、以下のタンパク質多型：

- a. ADAMTS4タンパク質のポリペプチド鎖の位置77におけるスレオニン；
- b. ADAMTS4タンパク質のポリペプチド鎖の位置720におけるアラニン；

の一方または両方を有する単離されたADAMTS4タンパク質に関する。配列番号3、17、または18の一つに示される配列を有する請求項90に記載の単離されたADAMTS4タンパク質。

【0140】

本発明の別の側面は、配列番号5、6、8、9、11、12、14、および15に示されるプライマーもしくはプライマーセットの一つもしくはそれ以上または配列番号4、7、10、もしくは13に示される核酸（これは、例えば、核酸プローブとして利用できる）の一つもしくはそれ以上に関する。

【0141】

以下、本発明を、図面および表と共に実施例に基づきより詳細に例証するが、これらの実施例は限定として解釈されるべきではない。

【0142】

参考文献：

研究方法に関する標準的文献：

（そうでないことが明記されない限り、本明細書中で言及されている研究方法は以下に列挙する標準的文献に従うものまたはこれに従い実行できるものである）

Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 545 pp;

Current Protocols in Molecular Biology; regularly updated, 例えはVolume 2000; Wiley & Sons, Inc; Editors: Fred M. Ausubel, Roger Brent, Robert Eg. Kingston, David D. Moore, J. G. Seidman, John A. Smith, Kevin Struhl.

Current Protocols in Human Genetics; regularly updated; Wiley & Sons, Inc; Editors: Nicholas C. Dracopoli, Honathan L. Haines, Bruce R. Korf, Cynthia C. Morton, Christine E. Seidman, J. G. Seigman, Douglas R. Smith.

Current Protocols in Protein Science; regularly updated; Wiley & Sons, Inc; Editors: John E. Coligan, Ben M. Dunn, Hidde L. Ploegh, David W. Speicher, Paul T. Wingfield.

Molecular Biology of the Cell; third edition; Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D.; Garland Publishin

10

20

30

40

50

- g, Inc. New York & London, 1994 ;
 Short Protocols in Molecular Biology, 5th
 edition, by Frederick M. Ausubel (Editor),
 Roger Brent (Editor), Robert E. Kingston (Ed
 itor), David D. Moore (Editor), J. G. Seidman (E
 ditor), John A. Smith (Editor), Kevin Struhl
 (Editor), October 2002, John Wiley & Sons
 , Inc., New York
- Transgenic Animal Technology A Laborator
 y Handbook. C. A. Pinkert, editor; Academic P
 ress Inc., San Diego, California, 1994 (ISBN
 : 0125571658) 10
- Gene targeting: A Practical Approach, 2nd E
 d., Joyner AL, ed. 2000. IRL Press at Oxford
 University Press, New York;
- Manipulating the Mouse Embryo: A Laborato
 ry Manual. Nagy, A, Gertsenstein, M., Vinters
 ten, K., Behringer, R., 2003, Cold Spring Har
 bor Press, New York;
- ADAMTS 4に関する文献： 20
- Prediction of the Coding Sequences of Un
 identified Human Genes. X. The Complete Se
 quences of 100 New cDNA Clones from Brai
 n Which Can Code for Large Proteins in v
 itro. Ishikawa, K., Nagase, T., Suyama, M., Miy
 ajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N. an
 d Ohara, O. DNA Res. 5: 169 - 176, 1998.
- ADAMTS: a novel family of extracellular m
 atrix proteases. Tang, B. L., Int J. Biochem.
 Cell Biol. 33 (1): 33 - 44, 2001. 30
- Aggrecanase-mediated cartilage degradati
 on. Arner, E. C., Curr Opin in Pharmacol
 2: 322 - 329, 2002.
- Brain-enriched Hyaluronan Binding (BEHAB)
 /Brevican Cleavage in a Glioma Cell Line
 Is Mediated by a Disintegrin and Metall
 oproteinase with Thrombospondin Motifs (A
 DAMTS) Family Member. Matthews, R. T., Gary, S
 . C., Zerillo, C., Pratta, M., Solomon, K., Arne
 r, E. C. and Hockfield, S. J. Biol. Chem 2000, 2 40
 75: 22695 - 22703
- Generation and Characterization of Aggre
 canase, Arner, E. C., Pratta, M. A., Trzaskos, J
 . M., Decicco, C. P., Tortorella, M. D., J. Biol.
 Chemistry, 1999, Vol. 274, No. 10, p. 6594 - 6601
 ;
- Altered Proteolytic Activities of ADAMTS
 -4 Expressed by C-terminal Processing; Ka
 shiwagi, M., Enghilod, J. J., Gendron, C., Hug
 hes, C., Catterson, B., Itoh, Y., Nagase, H., 200 50

4, J. Biol. Chemistry, Vol, 279, No. 11, p. 10109 - 10119;

Induction of Aggrecanase 1 (ADAMTS4) by Interleukin-1 Occurs Through Activation of Constitutively Produced Protein; Pratta, M. A., Scherle, P. A., Yang, G., Lui, R.-Q., Newton, R. C., 2003, Arthritis & Rheumatism; Vol. 48, p. 119 - 133;

【0143】

図および表の説明

10

図：

図1：NCBI番号NM__005099.2のヒトADAMTS4遺伝子の一部の核酸配列（配列番号1）。

図2：(2a)NCBI番号AY044847.1のヒトADAMTS4のコード配列（配列番号2）および(2b)NCBI番号NM__005099.3のヒトADAMTS4のmRNA配列（配列番号16）。

図3：3a)NCBI番号NM__005099.3の核酸配列由来のヒトADAMTS4のタンパク質配列（配列番号3）であって、位置77にスレオニンおよび720にプロリンを有する配列（ADAMTS4 Thr77Pro720）。

3b)位置77にアラニンおよび720にプロリンを有する、NCBI番号NM__005099.3の核酸配列由来のヒトADAMTS4のタンパク質配列（ADAMTS4 Ala77Pro720）。

20

3c)位置77にスレオニンおよび720にアラニンを有する、NCBI番号NM__005099.3の核酸配列由来のヒトADAMTS4のタンパク質配列（ADAMTS4 Thr77Ala720）。

3d)位置77および720にアラニンを有する、NCBI番号NM__005099.3の核酸配列由来のヒトADAMTS4のタンパク質配列（ADAMTS4 Ala77Ala720）。

図4：参照配列NM__005099.2の位置2564に遺伝子変異C Gを含むヒトADAMTS4遺伝子の配列ストレッチ（位置2529～2599、配列番号4）（ADAMTS4 - C2564G）。この遺伝子のこの領域を分析するため、配列番号5および6に示されるプライマーを含むプライマーセットを使用した。

30

図5：参照配列NM__005099.2の位置820に遺伝子変異G A（ADAMTS4 - G820A）および/または参照配列NM__005099.2の位置835に遺伝子変異C T（ADAMTS4 - C835T）を含むヒトADAMTS4遺伝子の配列ストレッチ（位置792～874、配列番号7）。ADAMTS4遺伝子のこの領域を分析するため、配列番号8および9に示される配列を有するプライマーを含むプライマーセットを使用した。

図6：参照配列AY044847.1の位置10570に遺伝子変異A Gを含むヒトADAMTS4遺伝子の配列ストレッチ（位置10535～10607、配列番号10）（ADAMTS4 - A10570G）。ヒトADAMTS4遺伝子のこの領域を分析するため、配列番号11および12に示される配列を有するプライマーセットを使用した。

40

図7：参照配列NM__005099.2の位置635に遺伝子変異G Aを含むヒトADAMTS4遺伝子の配列ストレッチ（位置588～664、配列番号13）（ADAMTS4 - G635A）。この遺伝子のこの領域を分析するため、配列番号14および15に示される配列を有するプライマーセットを使用した。

図8：分析した患者コホートにおける末梢血管障害（ここでは末梢血管疾患）の発症（年齢）に対する、NM__005099.2に示される参照配列の位置2564におけるADAMTS4遺伝子型（ADAMTS4 - C2564G）の影響。図8から得られるように、より若年期に末梢血管障害を経験することの公算（likelihood）は、G2

50

5 4 6 C または C 2 5 4 6 C (最も高頻度の変異) のいずれかの遺伝子型を有する患者よりも G 2 5 4 6 G 遺伝子型を有する患者において高い。

図 9 : 分析した患者コホートにおける最初の心臓発作 (M I = 心筋梗塞) の発症 (年齢) に対する、NM__005099.2 に示される参照配列の位置 8 2 0 における A D A M T S 4 遺伝子型 (A D A M T S 4 - A 8 2 0 G) の影響。図 8 から得られるように、より若年期に最初の心筋梗塞を発症する公算は、G 8 2 0 G または A 8 2 0 A を有する患者よりも A 8 2 0 G 遺伝子型を有する患者において高い。

図 10 : 分析した患者コホートにおける最初の P T C A (経皮的経管的冠動脈形成術) の実施 (年齢) に対する、NM__005099.2 に示される参照配列の位置 8 2 0 における A D A M T S 4 遺伝子型 (A D A M T S 4 - A 8 2 0 G) の影響。図 10 から得られるように、より若年期に P T C A に着手する危険度は、G 8 2 0 G または A 8 2 0 G を有する患者よりも A 8 2 0 A 遺伝子型を有する患者において高い。

10

図 11 : 分析した患者コホートにおける最初の P T C A (経皮的経管的冠動脈形成術) の実施 (年齢) に対する、NM__005099.2 に示される参照配列の位置 6 3 5 における A D A M T S 4 遺伝子型 (A D A M T S 4 - G 6 3 5 A) の影響。図 11 から得られるように、より若年期に P T C A に着手する危険度は、G 6 3 5 G または G 6 3 5 A を有する患者よりも A 6 3 5 A 遺伝子型を有する患者において高い。

図 12 : 分析した患者コホートにおける末梢血管障害 (末梢血管疾患) の発症 (年齢) に対する、A Y 0 4 4 8 4 7 . 1 に示される参照配列の位置 1 0 5 7 9 における A D A M T S 4 遺伝子型 (A D A M T S 4 - A 1 0 5 7 0 G) の影響。図 12 から得られるように、より若年期に末梢血管疾患を発症する危険度は、G 1 0 5 7 9 A 変異または最も高頻度の変異である A 1 0 5 7 9 A を有する患者よりも G 1 0 5 7 9 G 遺伝子型を有する患者において高い。

20

【 0 1 4 4 】

表 :

表 1 : 分析した患者コホートにおける、NM__005099.2 に示される参照配列を有するヒト A D A M T S 4 遺伝子の位置 2 5 6 4 における遺伝子変異 (A D A M T S 4 - C 2 5 6 4 G) の頻度および分布。この表から得られるように、最も高頻度の変異は C 2 5 4 6 C である。

表 2 : 分析した患者コホートにおける、NM__005099.2 に示される参照配列を有するヒト A D A M T S 4 遺伝子の位置 8 3 5 における遺伝子変異 (A D A M T S 4 - C 8 3 5 T) の頻度および分布。この表から得られるように、最も高頻度の変異は C 8 3 5 C であり ; T 8 3 5 T 変異は分析した患者集団において見出されなかった。

30

表 3 : 分析した患者コホートにおける、NM__005099.2 に示される参照配列を有するヒト A D A M T S 4 遺伝子の位置 8 2 0 における遺伝子変異 (A D A M T S 4 - G 8 2 0 A) の頻度および分布。この表から得られるように、最も高頻度の変異は G 8 2 0 G である。

表 4 : 分析した患者コホートにおける、A Y 0 4 4 8 4 7 . 1 に示される参照配列を有するヒト A D A M T S 4 遺伝子の位置 1 0 5 7 0 における遺伝子変異 (A D A M T S 4 - A 1 0 5 7 0 G) の頻度および分布。この表から得られるように、最も高頻度の変異は A 1 0 5 7 0 A である。

40

表 5 : 分析した患者コホートにおける、NM__005099.2 に示される参照配列を有するヒト A D A M T S 4 遺伝子の位置 6 3 5 における遺伝子変異 (A D A M T S 4 - G 6 3 5 A) の頻度および分布。この表から得られるように、最も高頻度の変異は G 6 3 5 G である。

表 6 : 分析した患者コホートにおける末梢血管障害、高血圧 (収縮期血圧 \geq 1 4 0 m m H g および / または拡張期血圧 \geq 9 0 m m H g) および / または脳卒中 / P R I N D / T I A (P R I N D = 遷延性可逆性虚血性神経脱落症状 ; T I A = 一過性脳虚血発作) の発症に対する、NM__005099.2 に示される参照配列の位置 2 5 6 4 の A D A M T S 4 遺伝子型 (A D A M T S 4 - C 2 5 6 4 G) の影響。この表から得られるように、

50

G 2 5 6 4 G 遺伝子型を有する患者は、末梢血管疾患、高血圧、および/または脳卒中 / P R I N D / T I A にかかる可能性が、他の二つの遺伝子型の一つを有する患者よりも有意に高い。C 2 5 6 4 G 遺伝子型を有する患者は、C 2 5 6 4 C 遺伝子型を有する患者よりも、末梢血管疾患または脳卒中 / P R I N D / T I A にかかる可能性がやや高い。

表 7 : 分析した患者コホートにおける不安定狭心症および/または若年発症心筋梗塞 (男性は < = 5 5 歳、女性は < = 6 0 歳) の発症に対する、NM__005099.2 に示される参照配列の位置 8 3 5 の A D A M T S 4 遺伝子型 (A D A M T S 4 - C 8 3 5 T) の影響。この表から得られるように、不安定狭心症または若年発症心筋梗塞にかかる可能性は、C 3 8 5 C 遺伝子型を有する患者よりも C 8 3 5 T 遺伝子型を有する患者において有意に高い。

表 8 : 分析した患者コホートにおける冠動脈形成術の実施ならびに/または心筋梗塞および/もしくは若年発症心筋梗塞 (男性は < = 5 5 歳、女性は < = 6 0 歳) の発症に対する、NM__005099.2 に示される参照配列の位置 8 2 0 の A D A M T S 4 遺伝子型 (A D A M T S 4 - G 8 2 0 A) の影響。この表から得られるように、心筋梗塞および/もしくは若年発症心筋梗塞にかかるならびに/または冠動脈形成術が着手する可能性は、他の二つの遺伝子型を有する患者よりも A 8 2 0 A 遺伝子型を有する患者において有意に高く、最も高頻度の G 8 2 0 G 変異を有する患者よりも G 8 2 0 A 遺伝子型を有する患者においていくぶん高い。

表 9 : 分析した患者コホートにおける末梢血管障害の発症に対する、A Y 0 4 4 8 4 7 . 1 に示される参照配列の位置 1 0 5 7 0 の A D A M T S 4 遺伝子型 (A D A M T S 4 - A 1 0 5 7 0 G) の影響。この表から得られるように、末梢血管疾患にかかる可能性は、他の二つの遺伝子型の一つを有する患者よりも G 1 0 5 7 0 G 遺伝子型を有する患者において有意に高く、最も高頻度の A 1 0 5 7 0 A 変異を有する患者よりも A 1 0 5 7 0 G 遺伝子型を有する患者においていくぶん高い。

【実施例】

【0145】

実験例 :

1 . 配列決定および配列決定結果の分析による S N P の検出

1 . a) A D A M T S 4 遺伝子内の D N A 領域の増幅

D N A 増幅用のオリゴヌクレオチド (プライマー) :

A D A M T S 4 遺伝子の位置 6 3 5 に存在するヌクレオチドの検出に、以下のプライマーを使用した :

プライマー 1 : 5 ' - T C G T G T T T C C A G A G A A G C T C A A C - 3 ' (配列番号 1 4 、参照配列 NM__005099.2 の位置 5 8 8 ~ 6 1 0)

プライマー 2 : 5 ' - C T G C A A G C G G C A C A A C A G - 3 ' (配列番号 1 5 、参照配列 NM__005099.2 の位置 6 6 4 ~ 6 4 7)

A D A M T S 4 遺伝子の位置 8 2 0 に存在するヌクレオチドの検出に、以下のプライマーを使用した :

プライマー 1 : 5 ' - C T G G C A C C A T C A A T G G A G A T C - 3 ' (配列番号 8 、参照配列 NM__005099.2 の位置 7 9 2 ~ 8 1 2)

プライマー 2 : 5 ' - C C G A T A T T G T A A C A C G C C T A A C A G - 3 ' (配列番号 9 、参照配列 NM__005099.2 の位置 8 7 4 ~ 8 5 1)

A D A M T S 4 遺伝子の位置 8 3 5 に存在するヌクレオチドの検出に、以下のプライマーを使用した :

プライマー 1 : 5 ' - C T G G C A C C A T C A A T G G A G A T C - 3 ' (配列番号 8 、参照配列 NM__005099.2 の位置 7 9 2 ~ 8 1 2)

プライマー 2 : 5 ' - C C G A T A T T G T A A C A C G C C T A A C A G - 3 ' (配列番号 9 、参照配列 NM__005099.2 の位置 8 7 4 ~ 8 5 1)

A D A M T S 4 遺伝子の位置 2 5 6 4 に存在するヌクレオチドの検出に、以下のプライマーを使用した :

10

20

30

40

50

プライマー 1 : 5' - GGGCCACCCACATTCCTTGT - 3' (配列番号 5、
参照配列 NM_005099.2 の位置 2529 ~ 2547)

プライマー 2 : 5' - CAGCTTCAGGGCCAAGTAGATG - 3' (配列番号 6、参照配列 NM_005099.2 の位置 2599 ~ 2578)

ADAMTS 4 遺伝子の位置 10570 に存在するヌクレオチドの検出に、以下のプライマーを使用した：

プライマー 1 : 5' - CACTCTCCATATGCACTTGAAGGT - 3' (配列番号 11、参照配列 AY044847.1 の位置 10535 ~ 10558)

プライマー 2 : 5' - GAACGGACCCTGAGGATAAAGG - 3' (配列番号 12、参照配列 AY044847.1 の位置 10607 ~ 10586)

【0146】

増幅のための PCR プロトコル：

使用した試薬は Applied Biosystems (Foster City, USA) から入手した：

ゲノム DNA 20 ng ; TaqGold DNA ポリメラーゼ 1 ユニット ; 1 x Taq
ポリメラーゼ 緩衝液 ; 500 μM dNTP ; 2.5 mM MgCl₂ ; 各増幅プライマ
ー対 (1.A. の配列) 200 nM ; H₂O で 5 μl に。

【0147】

ジェノタイピングのための PCR 増幅プログラム：

95 、 10 分間 × 1 サイクル；

95 、 30 秒間

70 、 30 秒間 × 2 サイクル；

95 、 30 秒間

65 、 30 秒間 × 2 サイクル；

95 、 30 秒間

60 、 30 秒間 × 2 サイクル；

95 、 30 秒間

56 、 30 秒間

72 、 30 秒間 × 40 サイクル；

72 、 10 分間

4 、 30 秒間 × 1 サイクル

【0148】

SNP の同定

ミニシーケンスおよび SNP の検出のためのプロトコル

全ての試薬は Applied Biosystems (Foster City, USA) から入手した。精製した PCR 産物 2 μl、BigDye ターミネーターキット 1.5 μl、200 nM 配列決定用プライマー (その配列については 1.A. の配列を参照のこと)、H₂O で 10 μl に。

【0149】

配列決定のための増幅プログラム：

96 、 2 分間 × 1 サイクル

96 、 10 秒間

55 、 10 秒間

65 、 4 分間 × 30 サイクル

10

20

30

40

50

72、7分間
4、30秒間 × 1サイクル

【0150】

配列決定結果の分析：

これらの配列を、最初に「Sequenz Analyse Software」(Applied Biosystems, Foster City, USA)を用いて分析して生データを取得し、次いでPhred, Phrap, Polyphred and Consed法を用いた。Phred, Phrap, Polyphred and Consedは、Washington UniversityのPhil Green氏が書いたソフトウェアである(<http://www.genome.washington.edu>)。

10

【0151】

実施例2：同定されたSNPの統計学的分析

新しく同定された参照配列NM_005099およびAY044847.1のADAMTS4多型を、約1400名の患者において臨床学的パラメータとの関連性について分析した。様々な同定された多型の頻度および分布は表1~5から得ることができる。参照配列NM_005099の位置635、820、835、2564、および参照配列AY044847.1の位置10570において同定されたG/A変異と分析した患者群における臨床エンドポイントの関連性が、図8~12および表6~10から見出すことができる。全ての統計学的分析は、SASバージョン8.2(SAS Institute GmbH, Heidelberg, Germany)を用いて行った。

20

【0152】

p値は、観察された関連性の統計学的有意性に関するパラメータであり、RR(リスク比)は、特定のADAMTS4多型を有する患者において示された臨床エンドポイントが発生する危険度の高さに関するパラメータである。RRは、患者群を年齢、性別、喫煙、血圧、およびコレステロールレベルに関して調整した上で算出した。

【0153】

分析した患者群から、ADAMTS4-G2564CおよびADAMTS4-C2564Cと比べて、ADAMTS4-G2564G遺伝子型を有する患者において、末梢血管障害の早期発症との統計学的に有意な年齢依存的な関連性が明らかになった(図8)。さらに、末梢血管障害、高血圧、および脳卒中/PRIIND/TIAを発症する危険度は、ADAMTS4-G2564CおよびADAMTS4-C2564Cと比べて、ADAMTS4-G2564G遺伝子型のキャリアにおいて有意に高かった(図8)。

30

【0154】

ADAMTS4-A820A遺伝子型のキャリアにおいては、最初の心筋梗塞および最初のPTCAが、ADAMTS4-G820AまたはADAMTS4-G820G遺伝子型のキャリアよりも有意に若年期で発生し(図9)、さらに、これらの患者は、冠動脈変性/障害の徴候ならびに若年発症心筋梗塞および心筋梗塞の発症によりPTCAに着手する必要性が生じる危険度が、他の二つの遺伝子型のキャリアと比較して統計学的に有意に高かった。

40

【0155】

PTCAの着手は、ADAMTS4-G635AまたはADAMTS4-G635Gと比べて、ADAMTS4-A635A遺伝子型を有する患者において、有意に若年期に見られた(図10)。

【0156】

末梢血管障害は、ADAMTS4-G10570AおよびADAMTS4-A10570A遺伝子型と比べて、ADAMTS4-G10570G遺伝子型のキャリアにおいて、有意に若年期に発症した(図12)。

【0157】

50

A D A M T S 4 - C 8 3 5 T 遺伝子型のキャリアは、不安定狭心症および若年発症心筋梗塞を発症する危険度が、A D A M T S - C 8 3 5 C 遺伝子型のキャリアと比べて有意に高かった(図13)。A D A M T S 4 - T 8 3 5 T 遺伝子型のキャリアは分析した患者コホートにおいては検出することができなかったが、おそらくは、これは、A D A M T S 4 - C 8 3 5 T 遺伝子型の影響が比較的強いことから考えて、この遺伝子型の表現型作用が特に重症であることに起因するのかもしれない。

【0158】

本研究の一つの成果として、総括すると：

A D A M T S 4 遺伝子の一方または両方の対立遺伝子のゲノム A D A M T S 4 配列の位置 6 3 5 におけるアデノシンは、特にゲノム A D A M T S 4 配列の位置 6 3 5 にアデノシンを有さない、特にグアノシンを有する個体よりも若年期において、冠動脈形成術に着手することが必要な障害に罹患またはそれを発症する高い危険度を示す、

10

A D A M T S 4 遺伝子の一方または両方の対立遺伝子のゲノム A D A M T S 4 配列の位置 8 2 0 におけるアデノシンは、心筋梗塞および/または冠動脈形成術に着手する必要のある障害を起こす、特に A D A M T S 4 遺伝子の位置 8 2 0 にアデノシンを有さない、特にグアノシンを有する個体よりも若年期に上記障害の一つまたはそれ以上に罹患する高い危険度を示す、

A D A M T S 4 遺伝子の一方の対立遺伝子のゲノム A D A M T S 4 配列の位置 8 3 5 におけるチミジンは、不安定狭心症および/または心筋梗塞に罹患する、特に A D A M T S 4 遺伝子の位置 8 3 5 にチミジンを有さない、特にシチジンを有する個体よりも若年期に上記障害の一方または両方を起こす高い危険度を示す、

20

A D A M T S 4 遺伝子の一方または両方の対立遺伝子のゲノム A D A M T S 4 配列の位置 2 5 6 4 におけるグアノシンは、末梢血管疾患および/または心筋梗塞および/または高血圧および/または脳卒中/P R I N D / T I A に罹患する、特に A D A M T S 4 遺伝子の位置 2 5 6 4 にグアノシンを有さない、特にシチジンを有する個体よりも若年期に上記疾患の一つまたはそれ以上に罹患する高い危険度を示す、

A D A M T S 4 遺伝子の一方または両方の対立遺伝子のゲノム A D A M T S 4 配列の位置 1 0 5 7 0 におけるグアノシンは、末梢血管疾患に罹患する、特に A D A M T S 4 遺伝子の位置 1 0 5 7 0 にグアノシンを有さない、特にアデノシンを有する個体よりも若年期に末梢血管疾患に罹患する高い危険度を示す、

30

A D A M T S 4 タンパク質のポリペプチド鎖の位置 7 7 におけるスレオニンは、冠動脈形成術に着手することが必要な疾患に罹患する、特に A D A M T S 4 タンパク質のポリペプチド鎖の位置 7 7 にスレオニンを有さない、特にアラニンを有する個体よりも若年期に上記疾患に罹患する高い危険度を示す、

A D A M T S 4 タンパク質のポリペプチド鎖の位置 7 2 0 におけるアラニンは、末梢血管疾患および/または心筋梗塞および/または高血圧および/または脳卒中に罹患する、特に A D A M T S 4 タンパク質のポリペプチド鎖の位置 7 2 0 にアラニンを有さない、特にプロリンを有する個体よりも若年期にこれらの疾患の一つまたはそれ以上に罹患する高い危険度を示す、

ということが言える。

40

【0159】

臨床エンドポイントと A D A M T S 4 核酸および/またはタンパク質の遺伝子変異の間の関連性は、心血管障害および末梢血管障害、例えば冠状動脈性心疾患の発症、血管におけるうっ血の発生、ならびに血管の閉塞障害の起こり易さに対する A D A M T S 4 の遺伝子変異の影響をはっきりと示している。従って今回初めて実証された、A D A M T S 4 の変異と上記臨床エンドポイントの発生との統計学的に有意な関連性は、本発明の重要な基礎をなす。

【0160】

【表 1】

表 1

ADAMTS4-C2564G					
ADAMTS4-C2564C		ADAMTS4-C2564G		ADAMTS4-G2564G	
n	%	n	%	n	%
1208	85,01	202	14,22	11	0,77

【 0 1 6 1 】

【表 2】

10

表 2

ADAMTS4-C835T			
ADAMTS4-C835C		ADAMTS4-C835T	
n	%	n	%
1354	94,95	72	5,05

【 0 1 6 2 】

【表 3】

表 3

20

ADAMTS4-G820A					
ADAMTS4-G820G		ADAMTS4-G820A		ADAMTS4-A820A	
n	%	n	%	n	%
901	63,67	445	32,16	59	4,17

【 0 1 6 3 】

【表 4】

表 4

30

ADAMTS4-A10570G					
ADAMTS4-A10570A		ADAMTS4-A10570G		ADAMTS4-G10570G	
n	%	n	%	n	%
1169	84,82	202	14,33	12	0,85

【 0 1 6 4 】

【表 5】

表 5

ADAMTS4-G635A					
ADAMTS4-G635G		ADAMTS4-G635A		ADAMTS4-A635A	
n	%	n	%	n	%
1148	81,19	253	17,89	13	0,92

40

【 0 1 6 5 】

【表 6】

表 6

	ADAMTS4						p 値
	ADAMTS4-C2564C		ADAMTS4-C2564G		ADAMTS4-G2564G		
	n	%	n	%	n	%	
末梢血管障害、高血圧、 脳卒中 / PRIND / TIA	94	7,78	21	10,40	4	36,36	0,0016
	637	52,73	105	51,98	10	90,91	0,0395
	85	7,04	17	8,42	3	27,27	0,032

【 0 1 6 6 】

10

【表 7】

表 7

	ADAMTS4				p 値
	ADAMTS4-C835C		ADAMTS4-C835T		
	n	%	n	%	
不安定狭心症、 早期心筋梗塞	413	30,5	31	43,03	0,025
	248	18,31	20	27,78	0,0452

【 0 1 6 7 】

20

【表 8】

表 8

	ADAMTS4						p 値
	ADAMTS4-G820G		ADAMTS4-G820A		ADAMTS4-A820A		
	n	%	n	%	n	%	
冠動脈形成術、心筋梗塞、 早期心筋梗塞	224	25,11	111	25,28	25	43,86	0,0069
	348	38,62	206	45,27	30	50,85	0,0198
	162	17,98	90	19,78	19	32,2	0,0247

【 0 1 6 8 】

30

【表 9】

表 9

	ADAMTS4						p 値
	ADAMTS4-A10570A		ADAMTS4-A10570G		ADAMTS4-G10570G		
	n	%	n	%	n	%	
末梢血管障害	93	7,78	21	10,40	4	33,33	0,0034

【図面の簡単な説明】

【 0 1 6 9 】

【図 1 - 1】NCBI 番号 NM_005099.2 のヒト ADAMTS4 遺伝子の一部の核酸配列 (配列番号 1)。

【図 1 - 2】図 1 - 1 の続き。

【図 2 a - 1】NCBI 番号 AY044847.1 のヒト ADAMTS4 のコード配列 (配列番号 2)

【図 2 a - 2】図 2 a - 1 の続き。

【図 2 a - 3】図 2 a - 2 の続き。

【図 2 a - 4】図 2 a - 3 の続き。

【図 2 a - 5】図 2 a - 4 の続き。

【図 2 b - 1】NCBI 番号 NM_005099.3 のヒト ADAMTS4 の mRNA 配列 (配列番号 16)。

40

50

【図 2 b - 2】図 2 b - 1 の続き。

【図 2 b - 3】図 2 b - 2 の続き。

【図 3 - 1】3 a) N C B I 番号 N M _ 0 0 5 0 9 9 . 3 の核酸配列由来のヒト A D A M T S 4 のタンパク質配列 (配列番号 3) であって、位置 7 7 にスレオニンおよび 7 2 0 にプロリンを有する配列 (A D A M T S 4 Thr 7 7 Pro 7 2 0)。 3 b) 位置 7 7 にアラニンおよび 7 2 0 にプロリンを有する、N C B I 番号 N M _ 0 0 5 0 9 9 . 3 の核酸配列由来のヒト A D A M T S 4 のタンパク質配列 (A D A M T S 4 Ala 7 7 Pro 7 2 0)。

【図 3 - 2】3 c) 位置 7 7 にスレオニンおよび 7 2 0 にアラニンを有する、N C B I 番号 N M _ 0 0 5 0 9 9 . 3 の核酸配列由来のヒト A D A M T S 4 のタンパク質配列 (A D A M T S 4 Thr 7 7 Ala 7 2 0)。 3 d) 位置 7 7 および 7 2 0 にアラニンを有する、N C B I 番号 N M _ 0 0 5 0 9 9 . 3 の核酸配列由来のヒト A D A M T S 4 のタンパク質配列 (A D A M T S 4 Ala 7 7 Ala 7 2 0)。

【図 4】参照配列 N M _ 0 0 5 0 9 9 . 2 の位置 2 5 6 4 に遺伝子変異 C G を含むヒト A D A M T S 4 遺伝子の配列ストレッチ (位置 2 5 2 9 ~ 2 5 9 9、配列番号 4) (A D A M T S 4 - C 2 5 6 4 G)。この遺伝子のこの領域を分析するため、配列番号 5 および 6 に示されるプライマーを含むプライマーセットを使用した。

【図 5】参照配列 N M _ 0 0 5 0 9 9 . 2 の位置 8 2 0 に遺伝子変異 G A (A D A M T S 4 - G 8 2 0 A) および / または参照配列 N M _ 0 0 5 0 9 9 . 2 の位置 8 3 5 に遺伝子変異 C T (A D A M T S 4 - C 8 3 5 T) を含むヒト A D A M T S 4 遺伝子の配列ストレッチ (位置 7 9 2 ~ 8 7 4、配列番号 7)。A D A M T S 4 遺伝子のこの領域を分析するため、配列番号 8 および 9 に示される配列を有するプライマーを含むプライマーセットを使用した。

【図 6】参照配列 A Y 0 4 4 8 4 7 . 1 の位置 1 0 5 7 0 に遺伝子変異 A G を含むヒト A D A M T S 4 遺伝子の配列ストレッチ (位置 1 0 5 3 5 ~ 1 0 6 0 7、配列番号 1 0) (A D A M T S 4 - A 1 0 5 7 0 G)。ヒト A D A M T S 4 遺伝子のこの領域を分析するため、配列番号 1 1 および 1 2 に示される配列を有するプライマーセットを使用した。

【図 7】参照配列 N M _ 0 0 5 0 9 9 . 2 の位置 6 3 5 に遺伝子変異 G A を含むヒト A D A M T S 4 遺伝子の配列ストレッチ (位置 5 8 8 ~ 6 6 4、配列番号 1 3) (A D A M T S 4 - G 6 3 5 A)。この遺伝子のこの領域を分析するため、配列番号 1 4 および 1 5 に示される配列を有するプライマーセットを使用した。

【図 8】分析した患者コホートにおける末梢血管障害 (末梢血管疾患) の発症 (年齢) に対する、N M _ 0 0 5 0 9 9 . 2 に示される参照配列の位置 2 5 6 4 における A D A M T S 4 遺伝子型 (A D A M T S 4 - C 2 5 6 4 G) の影響。図 8 から得られるように、より若年期に末梢血管障害を経験することの公算は、G 2 5 4 6 C または C 2 5 4 6 C (最も高頻度の変異) のいずれかの遺伝子型を有する患者よりも G 2 5 4 6 G 遺伝子型を有する患者において高い。

【図 9】分析した患者コホートにおける最初の心臓発作 (M I = 心筋梗塞) の発症 (年齢) に対する、N M _ 0 0 5 0 9 9 . 2 に示される参照配列の位置 8 2 0 における A D A M T S 4 遺伝子型 (A D A M T S 4 - A 8 2 0 G) の影響。図 8 から得られるように、より若年期に最初の心筋梗塞を発症する公算は、G 8 2 0 G または A 8 2 0 A を有する患者よりも A 8 2 0 G 遺伝子型を有する患者において高い。

【図 1 0】分析した患者コホートにおける最初の P T C A (経皮的経管的冠動脈形成術) の実施 (年齢) に対する、N M _ 0 0 5 0 9 9 . 2 に示される参照配列の位置 8 2 0 における A D A M T S 4 遺伝子型 (A D A M T S 4 - A 8 2 0 G) の影響。図 1 0 から得られるように、より若年期に P T C A に着手する危険度は、G 8 2 0 G または A 8 2 0 G を有する患者よりも A 8 2 0 A 遺伝子型を有する患者において高い。

【図 1 1】分析した患者コホートにおける最初の P T C A (経皮的経管的冠動脈形成術) の実施 (年齢) に対する、N M _ 0 0 5 0 9 9 . 2 に示される参照配列の位置 6 3 5 における A D A M T S 4 遺伝子型 (A D A M T S 4 - G 6 3 5 A) の影響。図 1 1 から得られ

10

20

30

40

50

るように、より若年期にPTCAに着手する危険度は、G635GまたはG635Aを有する患者よりもA635A遺伝子型を有する患者において高い。

【図12】分析した患者コホートにおける末梢血管障害（末梢血管疾患）の発症（年齢）に対する、AY044847.1に示される参照配列の位置10579におけるADAMTS4遺伝子型（ADAMTS4-A10570G）の影響。図12から得られるように、より若年期に末梢血管疾患を発症する危険度は、G10579A変異または最も高頻度の変異であるA10579Aを有する患者よりもG10579G遺伝子型を有する患者において高い。

【図1-1】

1 cacagacaca tatgcaagag agagacagag gaggaagag acagagacaa aggcacagcg
61 gaagaaggca gagacagggc aggcacagaa gcggcccaga cagagtccca cagaggagaa
121 ggccagagaa gctgcaaga acacagggag ggagagacaa agatccaggga aaggaggggt
181 caggagaga gtttgagaa gccacagccc tgggacccc tcccaagccc aaggactaag
241 ttctctccat ttctcttaac ggtccctcagc cctctcgaac actttgctc tgaacctgge
301 aggagtcaca gcccccagcc tacagagagg agctttccaa agctagggtg tggaggactt
361 ggtgccctag acggcctoag ttctctccag ctgcagatcc agtgcactgt cccagacagg
421 ctgcoactcc gggaggggct tggcaggggc ctggctgtgg ggagcccacc cctgctctct
481 gctcccattt gtgccgctct ctggctgtgt gtggctgctt ctgctaactgc tggcctctct
541 cctgccctca gcccgctgg ccagcccctt ccccggggag gaggagatcg tgtttccaga
601 gaagctcaac ggcagcgtcc tgctggctcc gggcaccctt gccagcctgt tgtgccctt
661 gcagcctttt ggggagacgc tgactactga gctggagcag gactccgctg tgcagctcga
721 ggggctgaca gtgcagtacc tgggcccagg cctggagcgt ctgggtggag cagagcctgy
781 caactacctg actggcacc tcaatggaga tccggagctg gtcgcatctc tgcactggga
841 tgggggagcc ctgttggcgg tgttacaata tgggggggct gaactccacc tccagcccct
901 gggaggagc accctcaact ctgttggggg acctggggct cactccctac gccggaagag
961 tctgccaagc ggtcaaggtc ccactgtgaa cgtcaaggct cctcttggaa gcccccagcc
1021 cagacccca agacccaagc ctttggcttc actgagtaga ttgtggaga cactgggtgt
1081 ggacagtagc aagatgccgc cactccacgg tgggggcta aagcctacc tgcataactt
1141 gatggcagca gcagccaagg ccttcaagca cccaagctc cgcactctg tcaactggtt
1201 ggtgactcgg ctagtatgcc tggggtcagg cagggagggg ccccagtggt gggccagctc
1261 tgcccagacc ctgcccagct tctgtgctgt gcagcggggc ctaaacaccc ctgaggactc
1321 ggaacctgac cactttgaca cagccattct gtttaccctg caggacctgt gtaggctctc
1381 caacttgcaac acgctgggta tggctgatgt gggcaccctg tgtgaccogg ctcgagctg
1441 tgcatttgtg gaggatgatg ggtccagtc agcctcaact gctgctcatg aactgggtca
1501 tgccttcaac atgctccatg acaactccaa gccatgcact agttgaatg ggcctttag
1561 caactctcgc catgtcatgg cctctgtgat ggtcctatgt gatcctgagg agcctggctc
1621 cccctgaggt gccctctca tcaactgaet cctggacaa ttgctatggt gctatgggct actgtctctt
1681 agacaacca gaggctccat tgcactctgc tgtgacttcc cctggcaagg actatgatgc
1741 tgaccgccag tgcagctgca ccttogggoc cactcaagc catgtccacc agctgcggcc
1801 gccctgtgct gccctctggt gctctggcca cctcaatgpc catgccaatg gccagccaa
1861 caactcggcc tggggcagat gcacacccgt cggggcccga caggctcga tgggtggtc
1921 ctgcccctca atggaccagc tccaggactt caatattcca caggctggtg gctgggtcc
1981 ttggggacca tgggggtgact gctctcggac ctgtgggggt ggttccagat tctcctccc
2041 agactgcaag aggcctgtcc cccggaatgg tggcaagtac tgtgagggcc gccgtaccgc
2101 ctctcctccc tgaacaactg aggaactgcc aactggctca gccctgacct tcccggaga
2161 gcaagtgtgt gctcaaac ccgcacacga cctcttcaag agcttcccag gggccatgga
2221 ctgggttccc cgtacacagc gcttggcccc ccaggaacag tgcacaactca cctgcccagg
2281 cggggcactg gctactaact atgctctgga gccccgggtg gtagatggga ccccctgtc
2341 ccgggacagc tctcgggtct gctgcccagg ccgatgcact cctctgctct gtagatgcat
2401 cactgctccc aagaagaagt ttgacaagtg catggtgtgc gggaggggagc gttctggtg
2461 cagcaagcag tcaagctctc tcaggaaatt caggtacgga taacaacatg tggctcaatc
2521 ccccggggcc gcccccaca ttctgtccc gcagcaggga aacctgtgccc accggagcat
2581 ctaacttggcc ctgaagctgc cagatggctc ctatgcccct aatggtgaa acagctgat
2641 gccctcccc acagatgtgg tactgctggt ggcagtcagc ttgctgtaaa gggggggcac
2701 tgaagctcca gagacactgt caggccatgg gccactggcc cagccttga cactgcaagt
2761 ctagtggctt ggaaccccc aggacaacgc cctccgatac agctctctg tgcocggccc
2821 gaccccttca acgccaagcc ccaactccca ggaactggct caccgaagag cacagattct
2881 ggaatcctt cggggggccc cctggggggg caggaaataa cctcactatc cgggtgccc
2941 ttctgggga cgggggctcc ggaactagct gggagaaaga gagagctctt gttgctgctc
3001 catgctcaag ctgagtgggg aggggtgtgt ggtctgagac ctgcccctcc tctctgccc
3061 aatggcaagc ctggcctgct cctgggttcc tggcctggga ggcagatgat ggttagtga
3121 tggagggggc tgacagacag cctccatctt aaactgccc cctgcccctg cgggtcaagc
3181 gagggggggg gaaggcaggg agggcctggg ccccagttgt atttatttag tatttattca
3241 cttttattta gcaaccagga aggggacaag gactagggtc ctggggaaac tgaccctgca

【図1-2】

3301 cccctcatg cctcaccct ggggctagga aatccagggt ggtggtgata ggtataagtg
3361 gttgtgtgat gctgtgtgt gttgtgtgta aaatgtgtgt gtgcttatg atgaggtaaa
3421 acctgtctgt ctttctctct cctgaaatct attttttggg aaaagaaaag tcaagggtag
3481 ggtgggctct caggagatga gggatattct tttttttttt ttcttctctt ctttctctt
3541 ttttttttgg acagaaatct gctctgtcgc ccaggctgga gtgcaatggc acaactctgg
3601 ctaactgcat cctccgctc ccgggttcaa gtagattcca tgcctcagcc tctctgtag
3661 ctgggattac agctcctgc caccagccc agtaattttt tgtttgtttt tgtttggaga
3721 cagagtctct ctattgtcac cagggtgga atgatttca ctaactgcaa ccttggccac
3781 ctgggttcca gcaattctcc tgcctcagcc tcccagtag ctgagattat aggcacctac
3841 caccagccc ggtcaatttt tgiattttta gttagagcgg ggtttcaaca tgttggccag
3901 gctggtctgc aactcctgac cttaggtgat ccaactgctt tcatctcca aagtctggg
3961 attacagggc tgagccacc tgcctggcca cgcaccaacta attttttagt ttttagtaga
4021 gacagggttt caccatgtgt gccaggtcgc tcttgaact ctgacctcag gtaactgacc
4081 tgccctggcc tcccaagtg ctgggattac aggtgtgagc caccagccc ggtacattt
4141 ttttaattg aattcacta tttatgtgat ccttttggag tcaagacagat gtaggtgat
4201 cctaactcca tgtctctgag cattagattt cctatttggc aataataata cctccttag
4261 aagtttgggt tgaggattaa ataatgtaa taaagaacta gcataac

(配列番号1)

【 図 2 a - 1 】

ADAMTS4 AY044847.1 (AY044847) の完全コード配列

1 accctaattt cccatattgc acaatgtgtg ctccaccctc tccctgcccc agggagaaatt
61 aaaaagaaaa gatgactaga tattccagga accactgggt tctcagagca aggtgggggtg
121 gatgtgggga gccaggtggg gattctccca gattgatact ggggtgaattc ggggttccgta
181 gagcaagtct tgcctatgct gggggctggc tgaactgagg ctggggggag gtttcagggca
241 gttgggagtg ggtaggagca gggccaaaag cctgggggaa gctactggga gctggggccag
301 gaaatgggg agtcaggag agtggggggg gaacctggg gggaaatgga ggcggaatgg
361 ctgttctggg ctttgagggg ggtgggtagt gtaactcag gaagggggat cctgaggggag
421 agaaggagcg ttagaanaaa ggaagtgcca cctctggatc gctctctata aaagaaaag
481 tctgtaacc ctctgctct gtcctctgoc gctctctgta tgttcaatcc aagcaggatc
541 atoctacttt tgggcagtca actccctgat cactgtctcc ttgctctccc caatgtctg
601 ccttttttac tcttcccag tgctcagtc tctctcagc catgtcaagc taactctttt
661 atgttctct cctctctct gctcctctac ctgttctccta cctctctttc tcaggagcga
721 cactcagtc cctcagcctt gcaaaaccag cactagggcc aaaggccagc atgaggggagc
781 cttgagaaaa gagaagccat ggtaggtagt actataagag caggaatctt cccagagaccg
841 tgaatctatc tgtgcatgoc ggcagagccc ttctctcac tctctgctcc tctgagggctg
901 ctgtcccacc aaaaagggaa agagagagct gagggtctgt tgtgggggtt gggaaaagggc
961 tatgtcatca gctggcccag gctccttatb ccatctggct gctagagatt cctctcccct
1021 gggcaagctc cacttttttg gaaagcagtg atacacctat ctgagtcoca ccagcagagc
1081 tcaagctgag ggcttagaga tcagccaatc aatcgagag gctcaacctg cttaaaaagag
1141 ctggcgcgga gaggagctgg ggaagaccca caggagagacc cacagacaca tttgcaagag
1201 agagacagag gaggaaaag agagagacaa aggcacagcg gaagaaggca gagcagagggc
1261 aggcacagaa gggcccaca cagagctcta cagagggaga ggcagagaa gctgcagaag
1321 acacagggca gtagagacaa agatcccaga aaggagggct caggagagga gtttggagaa
1381 gccagaccoc tgggcactoc tcccagccc aaggactaag tttctccat tctcttaac
1441 ggtcctcagc cctctgaaa actttgctc tgaccttggc agggatccaa gccccagggc
1501 tacagagagg agctttccaa agctagggtg tggaggactt ggtgcctag acggcctcag
1561 tctctcccag ctgcagatcc agtgcatgtt cccagacagc ctgcactccc gggaggggctg
1621 tggcagggcg ctggctgttg ggaagccaac cctgctcctt gctcccactt gtcgctctct
1681 cctgctgggt tggctgcttt ctgctactgc tggcctctct cctgcctcca gcccggctgg
1741 ccagccccct cccccggag gaggagatg tgtttccaga gaagctaac ggcagcgtcc
1801 tgcctcctc gggcgccctt gccagctgtg tgtgcctctt gcaggccttt gggagagacc
1861 tgcactaga cctggagctt ctgctactgc tgcaggtcga ggggctgaca gtcagctcc
1921 tggggcaggg cctgtagctg ctgggtggag cagagcctgg cactcactg actggcacc
1981 tcaatggaga tccggagctt gtagcactcc tgcactggga tgggggagcc ctgttagggc
2041 tgttacaata tccgggggct gtaagctccc tccagcccc gaggggagcc accctcaatg
2101 ctgctggggg acctggggct cacactctac gccgaaagag tctctccagc ggtcaaggtc
2161 ccatgtgcaa cgtcaaggtt cctcttgaaa gcccccagcc cagccccga agagccaaag

【 図 2 a - 2 】

2221 taggcatctc tggagctgtg gtctctcggt gtctctccc catgtctgtc ctactgacc
2281 ctattcaacc tctctccacc cacttaact tctggcogbt ctgtctccct cctctctgcc
2341 tgcctttctc tctctcaatg gctccttttc tggtaagcg tcaggcctct cctctcaacc
2401 ctctctctag ccagaccacc caggggttct cagaggttgc tcacagactc tgggctggga
2461 ataactgctc cctctcccca ccccaccctt cctggccgat tctgtctcct actgacacag
2521 tccccagcag taaaggtctc ctaacagccc cttggccttg gctctttctc ctgtcccaaa
2581 tttgatttct atccccact cccagctata ggaatcaggt ttgagggcct agggcttggg
2641 gtctggcttc tgaigtctgc tttaaaatca ctgtggcaaa ctgcaacta ctgcaagagt
2701 ggcaagagag ggaaggtatc ccatactctc tctgtgcaa tcccctcacc actctgtggc
2761 cggactgoga ggtgctgcta ggtccactcc tttctccct cccactctg gtctccccct
2821 tctctctct cctctccct cctctctct cctctctct tagctttaa ctgaccagca cgtctctcc
2881 acaaccgcca cgtgagctc tggcctggc octagctgct gactgaatg tctctcaac
2941 cacacagggc agacagcttg cagcccagcc ctctagcctt gttcccatag cccccagcca
3001 cactcagggc tggagaaacc caaagctcct cctgacggca gtcgagctg cttcaactcc
3061 tggggctccc gcagcctgg gatgtggctt cctctctcc tcccctctt agaaccagct
3121 gctgactctc cagagtacc acaaaagccc tggagattgg cgtggggga agggcccacc
3181 caagaccgac caggagctag gaatccctg ggggtgtggt gggccagctg actatgtgga
3241 gttccagacc caggaagtga gggattggag aatcgaccga cccatgggtc ttagagggta
3301 tttcaggatc tctctctcc tttttctcta cagcgtcttc ctctactgag tagatttggg
3361 gagacactgg tgggtggcga tgacaagatg gccgacttc acctgtggg cctgtggcgc
3421 taactgctaa cagtgtgag agcagcagcc aaggcctca agcaccagc cctcccgact
3481 cctgtcagct tgggtgtgac tggctagtgt atctgggggt caggcgagga gggcccccaa
3541 gtggggccca gtgctgcca gacctgcgc agcttctgt ctgggagcg gggcctcagc
3601 accctgagc actcggacc tgaccacttt gacacagcca tctgtttac cctgacagct
3661 agggccagct cagcaccgca gccactgac tgcaaatc taagaagcgc cactacatct
3721 actatgatgc aaatgatgtt cctggagtgt tgtgacatgg tgccttccc cagccacact
3781 gctcgtgtgt gctactagc cctgcaact gctggctct cagtggcag cagtcccagg
3841 atctggatct caaccatg gccaccagtg tctgtgtgt ctatgcaact tctatgatcc
3901 ctctccacag gacctgtgt gagtctcac ttgcaacag ctgggtatgg ctgatgtggg
3961 caccgtctgt gaccggctc ggaagctggt catgtggag gatgatgggc tccagctcagc
4021 ctctactgct gctcatgac tgggtaagt aggggtggt gagaaggtta ttagggagga
4081 gaaggtggg gagggggtg caagttaacc acagtgttaa tgggggtcc aaggtattct
4141 tccccagcag ctaggatag ggtattact cctctctgt ctagggagc ctagcactt
4201 acattttct ataaataaa ttagttgttc gaaactactg tgaactctc tgtgtgtgtg
4261 tgtgtgtgt tgtgtgtgt tgtgtgtgt tatttggag gggagtcaga gacaatgggt
4321 ggggtcacag tgggaaagt tggctataag gaaagtggt tagggagga cctgagat
4381 atttgggga agaggagaca gagaagaga cggggctaca tactgggagc cctgagatg
4441 ccaataagga aaggactgg ggcaggggta ggtgggtaat ggtctgtatc atccacagct
4501 gcagccagat ttattatgga gctctcagg geatggggaa gggaccctca gatcctatca

【 図 2 a - 3 】

4561 gggcctttgc tcccacaggt catgtcttca acatgctcca tgacaactcc aagccatgca
4621 tcaattttaa tgggctttgt agcaactctc gccatgctat ggcctctgtg atggctcatg
4681 tggatcctga ggaagccttg tcccctgca gtgcccgtt cactactgac tctctggaca
4741 atggctatgg taagcagatg gcacttaact tctcctgggt agcactcaat tctgtctctc
4801 cagggcaact tccctccgc tgaattctgc atggaccaaa ttgctcccc caagtgtgct.
4861 tctctctgag tgtgggaagg ggtgagaat gctgctgtct ttgtgtagtt ctcaactctc
4921 cccagaataa atagcatagc tagagagggc gaatttggc tcagttagat tagaactgac
4981 tttctgaggg ccagaactgt ccacoactgg aatgggctgg ctatgaagga ggtgattacc
5041 ttgtcaagca gtagagtagt caagaatagc aggatgactg ccaactagga gagatgttga
5101 tgaagaagca actcaaat tctatagttg gttagaatag gcagaatgga gttcctatcc
5161 ttaactctgt ttgtttgtt ttgtttgtt ttaataagc atgtgtgctc actgtgttgc
5221 ctaggctgt ctgcaactc taggctcaag caatctccc acctcaagct tccaaagtgc
5281 tgggattaca gacattaagc caoatgctt ggcctcttat tctgttcttt aagcaggtgt
5341 agatgtgta ctgtaagttt cttcaactct ctggtttgtt agttgatagt tcaagatagt
5401 ataatagcgc taactatct atagtattt ccgcatgata aatagtgctg tccaagactg
5461 tagccaatgc toactctca atagatctc aataaactat agctgcccac taaagctctc
5521 tacagggcta ggcacagtg cttacacctg taatcccaat gcttggggag gctaaaggtg
5581 gaggattgct tgagaccagg agtttgagat tagcctggac aacatagca gacttatca
5641 ctacaaaaaa tccaaaaaa tttagctggc atggccatg cctgtaatcc cagctactca
5701 ggaagccagc gcaagagagt tgcctgagcc cagaagtgtt agctgtagt gagcctatg
5761 ctgcccactg taactgagcc tgagcggaca gagcaagact ctgctctcag aaaaaaaa
5821 aaaaagtagt aataaaaaa aaaaataaa atacaaaaaa ttaaatctct cttatagctc
5881 taggattgtt ttatagagct ccaatcagcc ccaggagca taagctttct gctggcaact
5941 ctgaatgctc cctcaagcc gttgtgact ttgtgcccac accctctcc cagggcactg
6001 tctcttagac aaaccagag ctccattgca tctgctgtg actttctctg gcaaggaact
6061 tgaatgtgac cycaactgoc agctgacctt cgggcccagc tcaagccatt gctcaagact
6121 gcgcgcgccc tgtgtgccc cttgtgctct tggcccactc aatggccatg ccaatgtgcca
6181 gaccaaaac tcgcccctgg ccgatggcac accctgggg ccgcacagc cctgcaatgg
6241 tggctgctgc ctccactgg accagctcca ggaactcaat gtagactctt agggcagggg
6301 tggggtaaag gcccggggg tgtggggact ggccttaagc ccagagagga gttcaactat
6361 gccccaactc cgttctgtg ctttgcaagt tccacaggtt ggtgctggg gctcctgggg
6421 accatggggt gactgtctc ggaactgtgg ggggtggctc agttctctc cccagagactg
6481 caagagggct gtcccccga atgggtggca gtaactgtg ggcggcgtt cccgcttccg
6541 ctctcccaac actgagact gcccaactg ctcaagtgag gagtggggg gctcctgggg
6601 cttggggagg gacagttagc caggaagac tgcctctgta gtagcaagcc aaggggggtg
6661 tgattcccc gctgtgtgtg ggaatgctt taactctgtt gaattgtctt tggcctctg
6721 cagggaagag cagagctgtg ctgctagag tctcagggg ttgggtggag gnatgtggg
6781 tgaatgtagg aaggaagag gggctctgac tgttttacc ctccagcctt gaactctccg
6841 gaggagcagt gtcgtctca caaccaccgc accgactctt tcaagactt ccaagggccc

【 図 2 a - 4 】

6901 atggaactgg tctctgcta cacagcgctg gccccccag accagtgcac actcaactgc
6961 caggccccag cactgggcta ctactatgt ctgagccac ggggtagggt caggaacacc
7021 ccaggccctg tctatgcta cacacaccg cagtgtctcc tctgtctct gatacaaaag
7081 atccccaaa gtaacctgtt tctactagcc acgcccagcc agtcagagat tccaactaga
7141 ctatctgtga ctgggtatc aggaaaagca gcccccagcc cagccatagt ggcacatagg
7201 tctctctgag ctactctat tctcctggtt tctttctct tgactcccca tcttctaag
7261 ctgacttgg tgagactgca atgtgtgccc tttgggaca gtcctcacc cctctctcat
7321 gggctctct ctcaaatat agtgggtgtt tcaactagct agtggagga cagtcctcca
7381 atggaacgce ctctggaga tgaactgagt cctcactcc cctctctgt atagggtgtt
7441 ggggtgaagg ctgcaaaaag aaaaacaagc cccagcagca tttgtctcc ttgcccaca
7501 cctagaaatt tcaacagct ggtgcccct tagctctcat ttgggacag tgcactcaag
7561 gtttagggct tgggtgctgg accagacaga ctgcaactcc catcttgctt cctctgctg
7621 caattgtgt ggtcttggga caggttcttt agcttttcta aacctcaagc ttcaactccc
7681 aaaaactcca aatagtggtg gtagattta ctttgtgtt tataaaaac ttaagaatgct
7741 gctgattca tactcagtc tctgaaaatg ctgctagat gttatagtgt ataataata
7801 ttattgttat gattatcac cacatgggtg ccggcactca cccatcaac tccctactt
7861 catccaact tccgacaa atgtctccc tgaaggaca tgggtotgt ttgatttacc
7921 aacctcttt gacttaggag gaaactcag catgtgtct tctctttcc tgaaggtgta
7981 gatgggacc cctgtctccc ggaagctcc tggctgtgt tccagggcag atgactccat
8041 gctggctgt atcgcactat tggctccaag aagaagttg acaagtgcat ggtgtgctga
8101 ggggaccggt ctggttgcag caagcagta gctctctca ggaatcag gttcttccac
8161 catcattct cctctactt tctgtgact tctgtgact tctgtgact agttagcag aggggaactc
8221 agcactggt cactctcaa agagctcaca gctcagcgg agatagaca gtaggcagct
8281 acagtccgtt tcccactgta tctaccga gttggaacag ggtgtgtgta gtcctctgt
8341 gggcatcagg gaagctctc ttggaggtga cctctgactt gactctaga agggggtag
8401 gaattagaca ggtaccaagg aagtggggct tggaaagga actcaataag ggggcaagt
8461 ggttaaaggt ccagagataa gaggcagtag ggcacagtgt gcttagctc ctgcaagc
8521 cgaacagctc acatagatt ggtgacagc catctacaca catgtacaca catcagtca
8581 cataagcaca gctcagaagg ctgaggggat tcaggtgata ctgactgccc catctactc
8641 tttccacag ctgagcagac aacaatgtg tcaactccc cggggggccc acccaactc
8701 ttgtccgga caggggaaa cctggcccac gtagactata cttggccctg aagctgccc
8761 atggtctcta tgcctcaat ggtgaataa cgtctgctc ctccccaca gatgtgtatc
8821 tgcctggggc agtcaagctt cgtcagcgg gggcagctg agctcaag acactgtcag
8881 gccatgggct actgcccag cctttgac tgcaagctct agtggctggc aacccccag
8941 acacagcct cagatagag tctctgtgc cccggccag cctcaaac ccaagccaca
9001 ctccccaga ctggtgca cgaagagcag gaaactctg gatcctgg cggcgcctc
9061 gggcgggag gaaataacct cactatccc gctgcccct ctgggcccag gggcctcga
9121 cttagctggg aagaagagag agctctgct gctgcccct gtaagact agtggggag
9181 gctgtgggct gtagacctg cctctctct ctgcccact ggcagagctt gcccctgct

【 図 2 a - 5 】

9241 ggtttctctgc cctggaggagc agtggatgggt tagtggatgg aaggggctga cacagacgccc
9301 tccatctaaa ctgccccttc tgccctcggg gtcacagagag ggagggggaa ggcagggagg
9361 gctcggggccc cagttgtatt tatttagtat ttattcaact ttatttagca ccagggaagg
9421 ggacaaggac tagggctcgt gggaaactga cccctgaccc ctcatagccc tcacctctgg
9481 gctaggaagt ccagggtggt ggtgataggt ataagtgggt tgtgtatgct gttgtgtgtg
9541 tgtgaaatgt tgtgtgtgct tatgtatgag gtacaaacct ttctgtcttc ctctctctga
9601 attttatttt ttgggaaaaa aaaagtcaag ggtagggtgg gccttcaggg agtgagggat
9661 tatctttttt ttttttttct tctttcttcc tttttttttt ttgagacaga atctcgctct
9721 gtgcccaggc ctggagtgca atggcaaca ctccgctcac tgcacctccc gctcccgggg
9781 ttcaagtgat tctcatgctc cagctcctct agtagctggg attacaagct cctgccacca
9841 cgcggcgcta atttttgtt ttgtttgttt ggagacagag tctcgctatt gtcacccctt
9901 ctggaatgat ttccagctac tgcacaacttc gccacctggg ttccagcaat tctctgctt
9961 cagctcccgc agtagctgag attataggca cctaccacca cgcgggcta atttttgtat
10021 ttttagtaga gacggggttt cccatctgtt gccagctgg tctcgaact ctgaccttag
10081 gtgatccact cgcctctatc tcccaagtg ctgggattac aggcgtgagc caccgtgctt
10141 gcccagggcc aactaatttt tttattttta gtatagacag ggtttcaaca ttttggccag
10201 gctgctcttg aactctgac ctcaggtaat cagactgctt cggcctccca aagtgtctgg
10261 attacaggtg tgagccacca cgcgggttac atatttttta aattgaattc tactatttat
10321 gtgatccctt tggagtcaga cagatgtggt tgcactctaa ctccatgctc ctgagactta
10381 gattttctat ttgccaataa taatactccc cttagaagtt tgttgtggag attaataaat
10441 gtaataaagc aactagacta acactagcca cctaccacca cgcgggcta atttttgtat
10501 ttttaactac ttttaactaa tttctgtcca cctccactct ccatatgac ttgaaggttg
10561 caagatoca caacctggtt gctctgcttt atcctcaggg tccgttctct tggttggcag
10621 accctatccc tgggttctga gggaccaaca gagaaggaaa aattccatcc ctcaactctc
10681 gaagttccca atccacagaa ggaacatag taagcacgtg gctacaataa caattgacaa
10741 gaacatgaag gtgcaggata acaaga

【 図 2 b - 2 】

481 gggagcccaa cctgctctcc tgcctcccat tgtgcccttc tcttggctgg tgtggctgt
541 tctgtaactg ctggcctctc tcttcccttc agcccggctg gccagccccc tcccgggga
601 ggagagatc gtgtttccag agaagctcaa cggcagctc ctgcttggct cgggcgcccc
661 tgccaggctg tbtgtccgct tgcaggctt tggggagagc ctgctactag agctggagca
721 ggaactccgt gtgcaggtcg aggggctgac agtgcagtag ctgggcccag cgcctgagct
781 gotgggtgga gcagagcctg gcacttaect gactggcacc atcaatggag atccggagtc
841 ggtgcatct ctgcaactgg atgggggagc cctgttaggc gtgttacaat atcggggggc
901 tgaactccac ctccagcccc tggaggaggg caccctaac tctgctgggg gacctggggc
961 tcaatccta cgcgggaaga gctctgccag cgtcaaggtt ccatgtgca acgtcaaggc
1021 tctcttggga agcccagcc cagagcccgc aagagcccaag cgtttgtctt cactgagttag
1081 atttgtggag acactgtgtg tggcagatga caagatggcc gcaatccagc gtgcccggct
1141 aaagcgtac ctgtaaacg ttagtggcagc agcagccaag gcttcaagc acccaagcat
1201 ccgcaactct gtcagcttgg tggtagctcg gctagtatc ctggggcagc gcgaggaggg
1261 gccccaagt gggcccagtg ctgccagacc cctgcccagc tctctgctct gcaagcgggg
1321 cctcaaaccc cctgaggact cggacctga ccaactttag acagccattc tgtttaccg
1381 tccagagcctg tgtggagctc ccaacttgcga cagctgggtt atgctgatg tggcaccgt
1441 ctgtgaccg gctcggagct gtgcaattgt gggagatgat gggctccagt cagcttcaac
1501 tctgtctcat gaactgggtc atgtcttcaa ctgcttccat gacaactcca agccatgat
1561 cagtttgaat gggccttga gcaectctcg caatgtcatg gccctctgta tggctcatg
1621 ggaactctgag gacccctgtt cccctctcag tgccccttc atcaactgat tctgtgacaa
1681 tggctctggg cactgtctct tagacaaaac agagctcca tgcactctc ctgtgacttt
1741 cctgtgcaag gactatgat ctgacggcca gtcaccgctg aactctggcc cagactcaag
1801 ceattgtcca cagctgcgce gcacctgtgc tgccccttg tgcctggcc acctcaatg
1861 ccaatgctag tgcagaccca aacactcgc ctggggcagat ggcacacctc gcyggcccgc
1921 acaggctcgt atgggtggtc gctgctcca catgcaacc ctccaggact tcaatattc
1981 acagctggtt ggtgggggtc cttggggacc atggggtagc tgcctctgga cctgtggggg
2041 tgggtctccag ttctctccc gagactgca caggcctgct ccccggaagt gtgcaagta
2101 ctgtgagggc cgcctgacc gcttccgctc ctgcaaacct gaggactgcc caactggctc
2161 agccctgacc tcccgagag agcagtgctg tgcctcaaac caccgacgc accttctaa
2221 gacttctcca gggccatgg actgggttcc tctgtaaca ggcgtggccc cccagaccca
2281 gtgcaaacct acctgcccag cccgggactt gggctactac tatgtctgg agccaccgggt
2341 ggtgatgggg acccctgtt ccccgagac ctctctggct tgtgtccagc gccatgat
2401 ccaatgctgc tgtgatgca tcaatggctc caagaagaag ttgcaaacg cctggtgtg
2461 cggaggggac ggttctggtt gcagcaagca gtcagctcc ttcaggaat tcaagtcagg
2521 atacaacaat gtggtcacta tcccggcggg ggcaccacca atctctgccc ggcagcaggg
2581 aaacctggcc caccggagca tctacttggc cctgaagctg ccaatgtgct cctatgctc
2641 caatggtgaa tacacgtgta tgcccctccc cacagactg gtaactgctc gcyggcctag
2701 cttgogctac agcggggcca ctgacgctc agagacactg tcaggccatg ggcactggc
2761 ccagctctt acactgcaag tcttagtggc tggcaacccc gaggacacac gctccgata

【 図 2 b - 1 】

ADAMTS4 の mRNA 配列 (NM_005099.3; 配列番号16)

1 gggagaaccc acaggagac ccacagacac atatgcacga gagagacaga ggaggaaaga
61 gacagagaca aaggcacagc ggaagaagcc agagacaggg caggcacaga agcggcccaag
121 acagagctcc acagaggag agggccagaga agctgcagaa gacacagcca gggagagaca
181 aagatccagg aaaggaggcc tcaggaggag agtttgagga agccagaccc ctgggacct
241 ctcccgaagc caaggactaa gttttctcca tttcttttaa cgttctcag cctctgtgaa
301 aactttgctc ctgaccttgg caggagtcca agcccacag ctacagagag gagctttcca
361 aagctagggt tgggaggact tgggtccctc gacggcctca gtcctccca gctgcagtac
421 cagtgcctag tcccagacag gctcgcctcc cgggaggggc ttggcagggc gctgctgctg

【 図 2 b - 3 】

2821 cagcttcttc gtgcccggcc cgaccccttc aacgccagc cccactcccc aggactggct
2881 gcaaccaga gcaacagatt tgcagagact cctggccgccc ccttggggcc gcaagaaata
2941 acctcactat cccgctgccc ctttctgggc accggggcct cggacttagc tgggagaaag
3001 agagagcttc tgttctgccc tcatgctaag actcagtggg gaggggctgt gggcgtgaga
3061 cctgcccctc ctctctgccc taatgcccag gctggccctg ccttggtttc ctgcccctgg
3121 aggcagtgat gggttagttg atggaaaggg ctgacagaca gccctccatc taaactgccc
3181 cctctgccc ctgagtcaca ggaagggagg ggaagggcag gaggcctgg gccccagttg
3241 tatttattta gtattattc acttttattt agcaccaggg aaggggacaa ggactagggt
3301 cctgggggac ctgaccctcg accctcaata gccctcacc tggggctagg aaatccaggg
3361 tgggtggtat aggtataagt ggtgtgtgta tgcgtgtgtg tgtgtgtgaa aatgtgtgtg
3421 tgcctatgta tgaggtacaa cctgtctctc tttctctctc ctgaatttta ttttttggga
3481 aaagaaaagt caagggtagg gtgggcccct agggagttag ggattatctt tttttttttt
3541 tctttcttct tttctttttt ttttttgaga cagaatctgc ctctgtgccc caggctggag
3601 tgaatggca caactcggc tcactgcatc ctccgctccc cgggttcaag tgattctcat
3661 gctcagcct cctgagttag tgggattaca ggcctctgccc accacggccc gctaattttt
3721 gttttgtttt gtttggagc agagctctgc tattgtcaac agggctggaa tgatttcagc
3781 tcaactgcaac ctccgccacc tgggttccag caattctctc gctcagcct cccgagttagc
3841 tgagaltata ggcacctacc accacggccc gctaattttt gtaatttttag tagagcggg
3901 gtttccacct gttggccagg ctggctctga actcctgacc ttaggtgac cactgcctct
3961 catctcccaa agtgctggga ttacaggcgt gagccaccgt gctggccac gcccaactaa
4021 tttttgtatt ttttagtag acaggggttc accatgttgg coaggctgct ctgaaactc
4081 tgacctcagg taatcgacct gctcctggct cccaaagtgc tgggattaca ggtgtgagcc
4141 accacggccc gtaactattt ttaaatgta atctactat ttagttagc cttttggagt
4201 cagacagatg tggttgcatc ctaactccat gctctgagc attagatttc tcaattgcca
4261 ataataatc ctcccctaga agtttgtgtt gaggattaaa taatgtaaat aaagaactag
4321 cataacactc aaaaaaaaaa aa

【 図 3 - 1 】

3a

MSQTGSHPRGLRAGRWLWGAQPCLLLPVPLSLWLVWLLLLLALLSLLPSARLASPLPREEEIVFPEKLNGLVLPFGSGT
PARLLRLQAFGETLLELEQDSGVQVEGLTVQYLQGAPELLGGAEPGYTLTGTINGDPESVSLHWDGGLLGLVQ
YRGAELHLQPLEGGTSPNSAGGPGAHILRRKSPASGQGFPMCNVAPLGSPPRRPRARFASLSRFVETLVVADDKMA
AFHGALKRYLLVMMAAAKAFKHPISIRNPVSLVTVLVLGSGEELQVPSAAQTLRSPCAQRGLNTPEDSDPD
HFDTAILFRQDLGVSTCDTLGNADVTVCDPARSCAIVEDDGLQSAFTAHELGHVFNMLHDNSKPCISLNGPLD
TSRHMVAPVMAHVDPEEPWSPCSARFIDFLDNGYGHCLLDKPEAPLHLVPTFGKDYDADRQCLTFPGDPSRHCPC
LPPPCALWCSGHLNGLHAMCQTKHSPWADGTPCGFAQACMGGRCLHMDQLDFNIPQAGGWPWPGWDCSRTCCGG
VQFSSRDCTPRVPRNGKYCBGRRTFRSNTEDCTPGSALTFRBEQCAAYNHRDLDLFSKFPFGMDWVPRYTVGAPQ
DQCKLTQARALGYVLEPRVVDGTPCSPDSSVCVQRCIHAGCDRIIGSKKFKDKMVCVGGDGGSCSKQSGFR
KFRYGYNNVVTIPAGATHILVRQQNPGHRSIYLALKLPDGSYALNGEYTLMPSPDVLPGAVSLRYSGATAASET
LSHGPLAQPLTLQVLVAGNPDTRLRYSFFVFRPPTSPTRPQDLHRRQAILELRRRPNWGRK

(配列番号 3)

3b (配列番号 17)

MSQTGSHPRGLRAGRWLWGAQPCLLLPVPLSLWLVWLLLLLALLSLLPSARLASPLPREEEIVFPEKLNGLVLPFGSGA
PARLLRLQAFGETLLELEQDSGVQVEGLTVQYLQGAPELLGGAEPGYTLTGTINGDPESVSLHWDGGLLGLVQ
YRGAELHLQPLEGGTSPNSAGGPGAHILRRKSPASGQGFPMCNVAPLGSPPRRPRARFASLSRFVETLVVADDKMA
AFHGALKRYLLVMMAAAKAFKHPISIRNPVSLVTVLVLGSGEELQVPSAAQTLRSPCAQRGLNTPEDSDPD
HFDTAILFRQDLGVSTCDTLGNADVTVCDPARSCAIVEDDGLQSAFTAHELGHVFNMLHDNSKPCISLNGPLD
TSRHMVAPVMAHVDPEEPWSPCSARFIDFLDNGYGHCLLDKPEAPLHLVPTFGKDYDADRQCLTFPGDPSRHCPC
LPPPCALWCSGHLNGLHAMCQTKHSPWADGTPCGFAQACMGGRCLHMDQLDFNIPQAGGWPWPGWDCSRTCCGG
VQFSSRDCTPRVPRNGKYCBGRRTFRSNTEDCTPGSALTFRBEQCAAYNHRDLDLFSKFPFGMDWVPRYTVGAPQ
DQCKLTQARALGYVLEPRVVDGTPCSPDSSVCVQRCIHAGCDRIIGSKKFKDKMVCVGGDGGSCSKQSGFR
KFRYGYNNVVTIPAGATHILVRQQNPGHRSIYLALKLPDGSYALNGEYTLMPSPDVLPGAVSLRYSGATAASET
LSHGPLAQPLTLQVLVAGNPDTRLRYSFFVFRPPTSPTRPQDLHRRQAILELRRRPNWGRK

【 図 3 - 2 】

3c (配列番号 1 8)

MSQTGSHPRGLAGRWLWGAQPCLLLPVPLSLVWLLLLLLLSPSARLASPLPREEEIVFPEKLNQSVLPSSG...
PARLLCRLQAQFETLLLELEQDSGVQVEGLTVQYLGQAPPELLGGAEPGTLYLTGTINGDPESVASLHWGGALLGVLQ...
YRGAELHLQPLEBGTSPNSAGGPGAHILRRKSPASGQGPCMNVKAPLGSPPRRRAKRFASLSRFVETLVVADDKMA...
AFHGAGLKRLLTVMAAAAKAFKHPISIRNFVSLVTRVLVILSGSEBGPQVGPSSAAQTLRSFCAWQRLNTPEDSDPD...
HFDTAILFTRQDLQGVSTCDTLGMADVGTCDPARSCAIVEDDGLQSAFTAHELGHVFNMLHDNSKPCISLNGPLS...
TSRHVMAFVMAHVDPEEPWSPCSARFITDFLDNGYGHCLLDKPEAPLHLVPTFGKDYADRCCQLTFGPDSTRHCPQ...
LPPPCAAALWCSGHLNGHAMCQTKHSFWADGTPCGPAQACMGRCCLHMDQLQDFNIPQAGGWGWPWGDCSRCTCGG...
VQFSSRDCTRPVPRNGKGYCEGRRTFRSCNTEDECPTGSALTFRBEEQCAAYNHRDLPKSPFGPMDWVFRYTGVAQ...
DQCKLTCQARALGYVYVLEPRVVDGTPCSPDSSVVCVQGRCIHAGCDRIIGSKKFKDKMVCVGGDGSCKQSGSFR...
KFRYGVNVVVTIPAGATHILVRQGNAGHRSIYLALKLPDGSYALNGEYTLMPSPDTPVLPQAVSLRYSGATAASET...
LSGHGPLAQPLTLQVLVAGNPQDTRLRYSFFVPRPTPSTPRPTPDQWLHRRRAQILEILRRRPWAGRK

3d (配列番号 1 9)

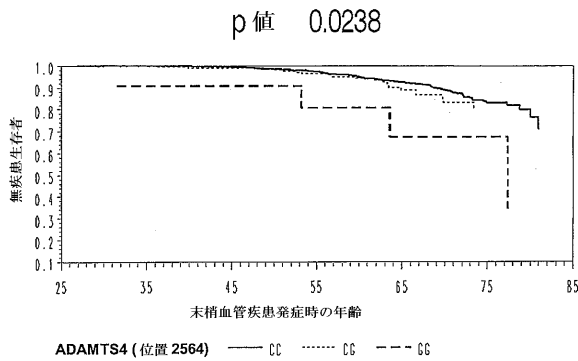
MSQTGSHPRGLAGRWLWGAQPCLLLPVPLSLVWLLLLLLLSPSARLASPLPREEEIVFPEKLNQSVLPSSG...
PARLLCRLQAQFETLLLELEQDSGVQVEGLTVQYLGQAPPELLGGAEPGTLYLTGTINGDPESVASLHWGGALLGVLQ...
YRGAELHLQPLEBGTSPNSAGGPGAHILRRKSPASGQGPCMNVKAPLGSPPRRRAKRFASLSRFVETLVVADDKMA...
AFHGAGLKRLLTVMAAAAKAFKHPISIRNFVSLVTRVLVILSGSEBGPQVGPSSAAQTLRSFCAWQRLNTPEDSDPD...
HFDTAILFTRQDLQGVSTCDTLGMADVGTCDPARSCAIVEDDGLQSAFTAHELGHVFNMLHDNSKPCISLNGPLS...
TSRHVMAFVMAHVDPEEPWSPCSARFITDFLDNGYGHCLLDKPEAPLHLVPTFGKDYADRCCQLTFGPDSTRHCPQ...
LPPPCAAALWCSGHLNGHAMCQTKHSFWADGTPCGPAQACMGRCCLHMDQLQDFNIPQAGGWGWPWGDCSRCTCGG...
VQFSSRDCTRPVPRNGKGYCEGRRTFRSCNTEDECPTGSALTFRBEEQCAAYNHRDLPKSPFGPMDWVFRYTGVAQ...
DQCKLTCQARALGYVYVLEPRVVDGTPCSPDSSVVCVQGRCIHAGCDRIIGSKKFKDKMVCVGGDGSCKQSGSFR...
KFRYGVNVVVTIPAGATHILVRQGNAGHRSIYLALKLPDGSYALNGEYTLMPSPDTPVLPQAVSLRYSGATAASET...
LSGHGPLAQPLTLQVLVAGNPQDTRLRYSFFVPRPTPSTPRPTPDQWLHRRRAQILEILRRRPWAGRK

【 図 4 】

5'-GGGCCACCCACATTCTTGTCCGGCAGCAGGAAACC/GCTGGCCACCGGAGCATCTACTTGGCCCTGAAGCTG-3' (配列番号 4)

GGGCCACCCACATTCTTGT (配列番号 5)
CATCTACTTGGCCCTGAAGCTG (配列番号 6)

【 図 8 】



【 図 5 】

5'-CTGGCACCATCAATGGAGATCCGGAGTCG/AGTGGCATCTCTGCAC/TTGGGATG...
GGGGAGCCCTGTTAGGCGTGTACAATATCGG-3' (配列番号 7)

CTGGCACCATCAATGGAGATC (配列番号 8)
CTGTTAGGCGTGTACAATATCGG (配列番号 9)

【 図 6 】

5'-CACTCTCCATATGCACCTTGAAGGTGGCAAAGATCCA/GCAACCATGGT...
GCCTGCCTTTATCCTCAGGG TCCGTTTC -3' (配列番号 10)

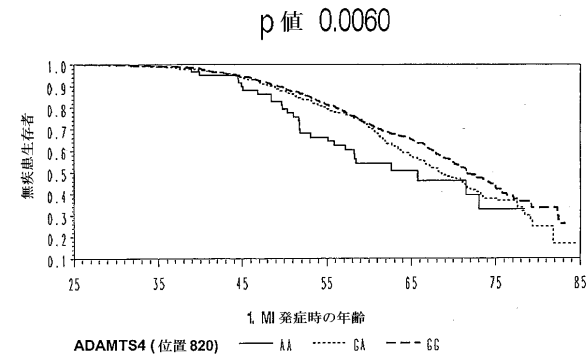
CACTCTCCATATGCACCTTGAAGGT (配列番号 11)
CCTTTATCCTCAGGG TCCGTTTC (配列番号 12)

【 図 7 】

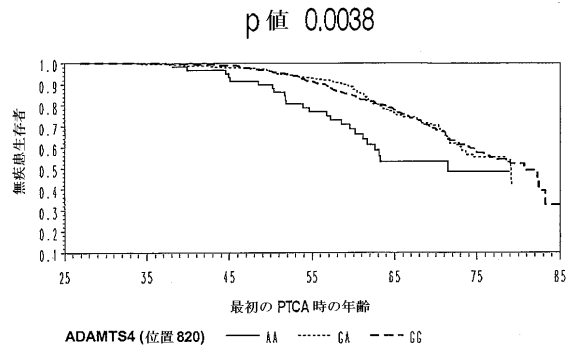
5'-TCGTGTTTCCAGAGAAGCTCAACGGCAGCGTCCTGCCTGGCTCGGGC...
G/A (配列番号 13)
CCCCTGCCAGCGCTGTTGTGCCCTTGCAG-3'

TCGTGTTTCCAGAGAAGCTCAAC (配列番号 14)
5'-CTGCAAGCGGCACAACAG-3' (配列番号 15)

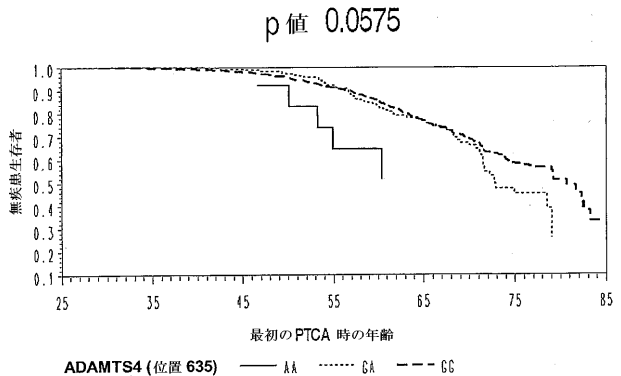
【 図 9 】



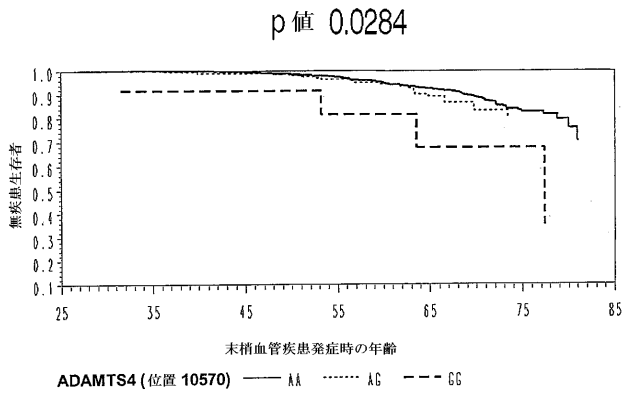
【 図 10 】



【 図 11 】



【 図 1 2 】



【 配列表 】

2009537123000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/004095

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation, to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE, FSTA, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/32926 A (CURAGEN CORP [US]; GENENTECH INC [US]; MEHRABAN FUAD [US]; GERRITSEN M.) 10 May 2001 (2001-05-10) abstract; claim 9; example 19 page 19, line 18 - line 31; figure 14; table 4 page 45, line 12 - page 46, line 16	2,3, 6-40,42, 46-48
X	WO 2004/011637 A (WYETH CORP [US]; CORCORAN CHRISTOPHER JOHN [US]; FLANNERY CARL R [US];) 5 February 2004 (2004-02-05) SEQ ID NO: 1 abstract page 22, line 29 - page 25, line 12; examples 1,9,10 -/--	2,3, 6-40,42, 44
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> 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 document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 9 November 2007		Date of mailing of the international search report 21/11/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 81 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer TILKORN, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/004095

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	& DATABASE GENESEQ [Online] XP002456450 retrieved from GSP Database accession no. ADS20209 abstract	45-48
X	----- DATABASE GENESEQ [Online] XP002456447 retrieved from GSP Database accession no. AAG78228 abstract	46-48
A	WO 03/066822 A (WYETH CORP [US]; GEORGIADIS KATHERINE [US]; CRAWFORD TARA K [US]; TOMK) 14 August 2003 (2003-08-14) the whole document	1-45, 48
X	& DATABASE Geneseq [Online] XP002456448 retrieved from GSP Database accession no. ADB85488 abstract	46-48
X	----- DATABASE EMBL [Online] XP002456449 retrieved from JPOP Database accession no. BD508090 abstract	46-48
A	US 6 753 176 B2 (ARNER ELIZABETH C [US] ET AL) 22 June 2004 (2004-06-22) SEQ ID NO: 2 the whole document	1-44
X	& DATABASE USPTO PROTEINS [Online] retrieved from USPOP Database accession no. AAV19427 abstract	45-48
A	----- WIGHT THOMAS N: "The ADAMTS proteases, extracellular matrix, and vascular disease: waking the sleeping giant(s) " ARTERIOSCLEROSIS, THROMBOSIS, AND VASCULAR BIOLOGY JAN 2005, vol. 25, no. 1, January 2005 (2005-01), pages 12-14, XP002456444 ISSN: 1524-4636 page 12, column 2, paragraph 3 page 13, column 1, paragraph 2	1-49
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/004095

G(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>GLASSON SONYA S ET AL: "Characterization of and osteoarthritis susceptibility in ADAMTS-4-knockout mice." ARTHRITIS AND RHEUMATISM AUG 2004, vol. 50, no. 8, August 2004 (2004-08), pages 2547-2558, XP002456445 ISSN: 0004-3591 abstract page 2555, column 1, paragraph 3 - page 2556, column 1, paragraph 3 page 2557, column 1, paragraph 2</p>	1-49
A	<p>SANDY JOHN D ET AL: "Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 276, no. 16, 20 April 2001 (2001-04-20), pages 13372-13378, XP002456446 ISSN: 0021-9258 abstract</p>	1-49
X,P	<p>KENAGY ET AL: "Versican Degradation and Vascular Disease" TRENDS IN CARDIOVASCULAR MEDICINE, ELSEVIER SCIENCE, NEW YORK, NY, US, vol. 16, no. 6, August 2006 (2006-08), pages 209-215, XP005550663 ISSN: 1050-1738 abstract page 210, column 1, paragraph 1 page 213, column 1, paragraph 2 - page 214, column 1, paragraph 1</p>	2,3, 6-40,42, 46-48

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2006)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/004095

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0132926	A	10-05-2001	AU 784338 B2	16-03-2006
			AU 1449301 A	14-05-2001
			AU 2006202570 A1	06-07-2006
			CA 2389751 A1	10-05-2001
			JP 2003525595 T	02-09-2003
WO 2004011637	A	05-02-2004	AU 2003261269 A1	16-02-2004
			BR PI0313083 A	17-07-2007
			CA 2492444 A1	05-02-2004
			CN 1681920 A	12-10-2005
			EP 1525307 A2	27-04-2005
			JP 2005534308 T	17-11-2005
			MX PA05000959 A	16-05-2005
WO 03066822	A	14-08-2003	AU 2003215070 A1	02-09-2003
			CA 2475329 A1	14-08-2003
			EP 1472364 A2	03-11-2004
			JP 2005516614 T	09-06-2005
US 6753176	B2	22-06-2004	US 2003108998 A1	12-06-2003

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
G 0 1 N 37/00 1 0 2

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, 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, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 デトレフ・コツィアン
ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ - アベンティス・ドイツ
ラント・ゲー・エム・ペー・ハー

(72) 発明者 マティーアス・ヘルマン
ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ - アベンティス・ドイツ
ラント・ゲー・エム・ペー・ハー

(72) 発明者 カール - エルンスト・ジークラー
ドイツ連邦共和国 6 7 0 6 9 ルートヴィヒスハーフェン・ホルスト - ショルク - シュトラッセ 1 9

(72) 発明者 ジャン - フランソワ・ドゥルーズ
フランス国 9 2 1 6 0 アントニ・アヴェヌレモンアロン 2 0 . サノフィ - アベンティス・エス・
アー

(72) 発明者 シールヴェン・リカール
フランス国 9 2 1 6 0 アントニ・アヴェヌレモンアロン 2 0 . サノフィ - アベンティス・エス・
アー

(72) 発明者 サンドラン・マセ
フランス国 9 2 1 6 0 アントニ・アヴェヌレモンアロン 2 0 . サノフィ - アベンティス・エス・
アー

F ターム (参考) 4B024 AA11 BA14 CA02 CA09 DA03 HA12
4B050 CC01 DD11 LL03
4B063 QA01 QA13 QA17 QA19 QQ42 QQ53 QQ58 QR08 QR32 QR55
QR62 QR82 QS25 QS34

专利名称(译)	使用ADAMTS4基因和蛋白质多态性		
公开(公告)号	JP2009537123A	公开(公告)日	2009-10-29
申请号	JP2009510325	申请日	2007-05-09
[标]申请(专利权)人(译)	赛诺菲		
申请(专利权)人(译)	赛诺菲 - 安万特		
[标]发明人	デトレフコツィアン マティーアスヘルマン カールエルンストジークラー ジャンフランソワドゥルーズ シールヴェンリカール サンドランマセ		
发明人	デトレフ・コツィアン マティーアス・ヘルマン カール-エルンスト・ジークラー ジャン-フランソワ・ドゥルーズ シールヴェン・リカール サンドラン・マセ		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 C12N9/64 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/156 C12Q2600/158 G01N33/6893 G01N2800/32		
FI分类号	C12N15/00.A C12Q1/68.ZNA.A C12N9/64 G01N33/53.D G01N33/53.M G01N37/00.102		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA14 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/DA03 4B024/HA12 4B050/CC01 4B050/DD11 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ58 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS34		
优先权	102006023253 2006-05-18 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

使用ADAMTS4基因的单核苷酸多态性 (SNP) 来鉴定心血管和外周血管疾病，或者从要检查的个体获取的生物样品中发生心血管和外周血管疾病的风险增加;ADAMTS4用于鉴定有效预防和/或治疗心血管和外周血管疾病的物质的方法和使用方法。

