

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 504088

(P2003 - 504088A)

(43)公表日 平成15年2月4日(2003.2.4)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 0 1 K 67/027	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027		A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 45/00		A 6 1 P 9/14	4 B 0 6 3
A 6 1 P 9/14		27/02	4 C 0 8 4
27/02		29/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 (全184数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 510848(P2001 - 510848)

(86)(22)出願日 平成12年2月22日(2000.2.22)

(85)翻訳文提出日 平成13年8月16日(2001.8.16)

(86)国際出願番号 PCT/US00/04592

(87)国際公開番号 W001/006262

(87)国際公開日 平成13年1月25日(2001.1.25)

(31)優先権主張番号 60/120,822

(32)優先日 平成11年2月19日(1999.2.19)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/120,668

(32)優先日 平成11年2月19日(1999.2.19)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ザ ユニヴァ-シティー オブ アイオワ
リサーチ ファンデ-ション
アメリカ合衆国 アイオワ州 52319 アイ
オワ シティー オークデイル リサーチ
キャンパス テクノロジー イノヴェイ
ション センター 214

(72)発明者 ハ-グマン, グレゴリー エス.
アメリカ合衆国 アイオワ 52241, コー
ラルビル, オーバーン ヒルズ ドライブ
500

(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 黄斑変性に関する診断および治療

(57)【要約】

本発明は、黄斑変性についての診断および治療および動物モデルに関する。特に、本明細書中に記載される黄斑変性と動脈壁破裂障害との間の関連に関する。1つの実施形態において、本発明は、黄斑変性を診断するためのキットおよび方法を提供し、これらは、動脈瘤を含む動脈壁破裂障害に関するマ-カーを同定する工程を包含する。1つの実施形態において、本発明は、黄斑変性を処置するための治療法を提供し、これは、動脈瘤を含む動脈壁破裂障害を処置するために有用な薬剤を被験体に送達する工程を包含する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 被験体において発症する黄斑変性に対する素因を診断、または判定するための方法であって、該方法は、患者における動脈壁破裂障害についての1つ以上のマーカーを検出する工程を包含し、ここで、該マーカーは、黄斑変性、または発症する黄斑変性に対する素因の表示である、方法。

【請求項2】 請求項1に記載の方法であって、ここで、前記動脈壁破裂障害が、大動脈瘤、末梢動脈瘤、内臓動脈瘤および頭蓋内動脈瘤からなる群より選択される、方法。

【請求項3】 請求項1に記載の方法であって、ここで、前記動脈壁破裂障害が解離性動脈瘤である、方法。

【請求項4】 請求項2に記載の方法であって、前記大動脈が腹大動脈（AAA）である、方法。

【請求項5】 請求項2に記載の方法であって、ここで、前記大動脈瘤が胸大動脈瘤（TAA）である、方法。

【請求項6】 請求項1に記載の方法であって、ここで、前記黄斑変性が加齢性黄斑変性（AMD）である、方法。

【請求項7】 請求項1に記載の方法であって、ここで、前記黄斑変性が、滲出性または新生血管（湿潤）形態であって、該黄斑変性が円板状瘢痕および/または脈絡新生血管形成（DS/CNV）もしくは滲出性前駆体表現型によって特徴付けられる、方法。

【請求項8】 請求項1に記載の方法であって、ここで、前記マーカーが物理的知見を含む、方法。

【請求項9】 請求項1に記載の方法であって、ここで、前記マーカーが放射線学的知見を含む、方法。

【請求項10】 請求項1に記載の方法であって、ここで、前記マーカーが以下：イムノグロブリン類、アミロイドA（1アミロイドA）、アミロイドP成分、C5およびC5b-9末端複合体、HLA-DR、フィブリノゲン、第X因子、ならびにプロトロンビン、補体3、補体5および補体9、補体反応性タンパク質（CRP）、イムノグロブリン および 軽鎖、第X因子、HLA-DR

、アポリポタンパク質A、アポリポタンパク質E、アンチキモトリプシン、²ミクログロブリン、第X因子、フィブリノゲン、プロトロンビン、トロンボスポンジン、エラスチン、コラーゲン、ビトロネクチン、ICAM-1、LFA1、LFA3、B7、IL-1、IL-6、IL-12、TNF- α 、GM-CSF、熱ショックタンパク質、コロニー刺激因子(GM-CSF、M-CSF)、TNF およびIL-10からなる群より選択される、方法。

【請求項11】 請求項1に記載の方法であって、ここで、動脈壁破裂障害のための前記マーカーの検出が、遺伝子の発現を検出する工程を包含する、方法。

【請求項12】 請求項1に記載の方法であって、ここで、動脈壁破裂障害のための前記マーカーの検出が、免疫媒介性事象を検出する工程を包含する、方法。

【請求項13】 請求項12に記載の方法であって、ここで、前記免疫媒介性事象の検出が、自己抗体を検出する工程、サイトカインを検出する工程、コラーゲン合成における増加を検出する工程および免疫関連分子の上方制御を検出する工程からなる群より選択される、方法。

【請求項14】 請求項1に記載の方法であって、ここで、動脈壁破裂障害のための前記マーカーの検出が、自己抗体を検出する工程を包含する、方法。

【請求項15】 請求項1に記載の方法であって、ここで、動脈壁破裂障害のための前記マーカーの検出が、線維症関連反応を検出する工程を包含する、方法。

【請求項16】 請求項1に記載の方法であって、ここで、動脈壁破裂障害のための前記マーカーの検出が、遺伝子型のマーカーを検出する工程を包含する、方法。

【請求項17】 被験体において黄斑変性に対する素因を診断、または判定するための方法であって、該方法は、以下：

(a) 被験体から核酸を単離する工程、および

(b) 該核酸を遺伝子型決定する工程、

を包含し、

ここで、黄斑変性関連ハプロタイプ由来の少なくとも1つの対立遺伝子が、黄斑変性の増加する危険性を予測する、方法。

【請求項18】 被験体において黄斑変性に対する素因を診断、または判定するための方法であって、該被験体は、動脈壁破裂障害と診断された家族構成員を有し、該方法は、以下：

a) 被験体から核酸を単離する工程；

動脈壁破裂障害についての多型マーカーに対応する染色体の領域を増幅するプライマーを用いて該核酸を増幅する工程；および

c) 該増幅産物を分析する工程、
を包含し、

ここで、動脈壁破裂障害に連動する対立遺伝子型を表す多型の存在は、黄斑変性に連動する対立遺伝子型または発症する黄斑変性に対する素因の指標である、方法。

【請求項19】 被験体において黄斑変性に対する素因を診断、または判定するための方法であって、該被験体は、動脈壁破裂障害と診断された家族構成員を有し、該方法は、以下：

(i) 被験体からゲノム核酸を単離する工程；

(ii) 該ゲノムDNAにおける短いタンDEM反復配列を増幅して遺伝子型を得る工程；

(iii) 該遺伝子型と公知のDNA配列の遺伝子型とを比較して、ヌクレオチド配列多型を検出する工程；および

(iv) 該被験体のゲノムDNAにおける多型の存在または非存在を判定する工程；

を包含し、

ここで、動脈壁破裂障害に連鎖する対立遺伝子型を示す多型の存在は、動脈壁破裂障害に連鎖する対立遺伝子型または動脈壁破裂障害を発症させるための素因を示す、方法。

【請求項20】 請求項16、17または18のいずれか1つに記載の方法であって、ここで、前記被験体は哺乳動物である、方法。

【請求項21】 請求項20に記載の方法であって、ここで、前記被験体がヒトである、方法。

【請求項22】 請求項16、17または18のいずれか1つに記載の方法であって、ここで、前記動脈壁破裂は、大動脈瘤、末梢動脈瘤、内臓動脈瘤および頭蓋内動脈瘤からなる群より選択される、方法。

【請求項23】 請求項16、17または18のいずれか1つに記載の方法であって、ここで、前記動脈壁破裂障害が解離性動脈瘤である、方法。

【請求項24】 請求項22に記載の方法であって、ここで、前記大動脈瘤がAAAである、方法。

【請求項25】 請求項22に記載の方法であって、ここで、前記大動脈瘤がTAAである、方法。

【請求項26】 請求項16、17または18のいずれか1つに記載の方法であって、ここで、該黄斑変性がAMDである、方法。

【請求項27】 黄斑変性を診断するためのキットであって、以下：

a) 動脈壁破裂障害を示す多型を有する染色体の領域を増幅するためのプライマー；

b) DNA増幅を実施するための試薬；および

c) 該増幅された核酸を分析するための試薬、

を包含する、キット。

【請求項28】 被験体において発症する黄斑変性に対する素因を診断、または判定するための方法であって、該方法は、動脈壁破裂障害の指標である遺伝子産物に特異的な抗体を使用して、前記被験体由来のサンプルで免疫アッセイを実施する工程を包含し、ここで、結合した抗体の存在の検出は、該被験体が動脈壁破裂障害または動脈壁破裂障害を発症させるための素因を有し、従って、黄斑変性または発症する黄斑変性に対する素因を有するということを示す、方法。

【請求項29】 発症する黄斑変性に対する素因を診断、または検出するためのキットであって、請求項28に記載の免疫アッセイを実施するための試薬を包含する、キット。

【請求項30】 被験体において黄斑変性の発症を処置、または予防するた

めの方法であって、薬学的有効量の動脈壁破裂障害治療剤を被験体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項31】 請求項30に記載の方法であって、ここで、該動脈壁破裂障害治療剤が抗炎症剤である、方法。

【請求項32】 黄斑変性を処置または予防するために有用な薬学的組成物であって、薬学的有効量の動脈壁破裂障害治療剤および治療学的に受容可能なキャリアを包含する、薬学的組成物。

【請求項33】 請求項32に記載の方法であって、ここで、前記動脈壁破裂障害が大動脈瘤である、方法。

【請求項34】 請求項33に記載の方法であって、前記大動脈瘤がAAAである、方法。

【請求項35】 請求項33に記載の方法であって、前記大動脈瘤がTAAである、方法。

【請求項36】 請求項32に記載の方法であって、前記黄斑変性がAMDである、方法。

【請求項37】 被験体において黄斑変性を処置または予防するための薬剤を同定するための方法であって、以下：

(a) 動脈壁破裂障害のための非ヒトモデルを薬剤と接触させる工程；および

(b) 1つ以上の動脈壁破裂障害のマーカーをモニターする工程、

を包含し、

ここで、1つ以上の該マーカーの非存在または消失が黄斑変性の阻害を示す、方法。

【請求項38】 請求項37に記載の方法であって、ここで、前記動脈壁破裂障害が大動脈瘤である、方法。

【請求項39】 請求項38に記載の方法であって、前記大動脈瘤がAAAである、方法。

【請求項40】 請求項38に記載の方法であって、前記大動脈瘤がTAAである、方法。

【請求項41】 請求項37に記載の方法であって、前記黄斑変性がAMD

である、方法。

【請求項42】 動脈壁破裂障害を発症させるための素因を有するかまたは素因を与えられた動物を含む黄斑変性に関する動物モデルであって、ここで、該動物において、動脈壁破裂障害の存在、動脈壁破裂障害の危険性、または動脈壁破裂障害に対する素因が、黄斑変性の存在、黄斑変性の危険性、または黄斑変性に対する素因を示す、動物モデル。

【請求項43】 請求項42に記載の動物であって、前記動物がトランスジェニック動物である、動物。

【請求項44】 請求項43に記載の動物であって、前記動物が動脈壁破裂障害を発症するように処置された、動物。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の分野)**

本発明は、黄斑変性についての診断および治療ならびに動物モデルに関する。特に、それらは、黄斑変性と動脈壁破裂障害との間において、本明細書中に記載される関連に関する。

【0002】**(発明の背景)**

黄斑変性は、臨床用語であり、これは、ブルーフ膜、神経網膜および網膜色素沈着上皮の異常に関連する中心視力の進行性の喪失によってすべてが特徴付けられる種々の疾患を記載するために使用される。臨床的には、黄斑変性は、視野の中心部分における視力の進行性の減退、色視の変化、および異常な暗適応および感受性が伴う (Steirunetzら、1993; Brown & Lovie-Kitchin、1983; Brownら、1986; Sunnessら、1985; Sunnessら、1988; Sunnessら、1989; Eisnerら、1987; Massofら、1989; Chenら、1992)。黄斑変性の発症は、50歳以上で生じるときには、この障害は、加齢性黄斑変性 (AMD) と呼ばれる。

【0003】

AMDは、北米および西欧における法的失明の原因の首位であり (Hyman、1992)、そして50歳を超える個体の割合が増加するにつれ、顕著な健康問題となってきた。Beaver Dam、Wisconsinの集団では、AMDの発症は、40歳を超えるヒトについて9.2%と見積もられる (Kleinら、1995)。Framingham Eye Studyでは、AMDの全体の発症率が8.8%であると見出された。ここで、27.9%の発症は、75~85歳の集団に起こっていた (Kahnら、1977; Leibowitzら、1980)。豪州の研究では、85歳を超える人の18.5%がAMDに罹患しているが見積もられる (O'Shea、1996)。見積もられる発症における変動は、異なる研究におけるAMDの診断について異なる基準が使用さ

れた結果であるようであるか、または、それらが研究された種々の集団の間の異なる危険因子から生じ得るからである。

【0004】

AMDの2つの主な臨床症状が記載されている。これらは両方とも、同じ患者において生じ得る(GreenおよびKey、1977)。これらは、乾燥すなわち萎縮性形態および湿潤すなわち滲出性形態と呼ばれる(SarksおよびSarks、1989; ElmanおよびFine、1989; Kincaid、1992)。乾燥形態において、RPEおよび網膜は、同時の新生血管形成なしに変性する。生じる萎縮性の領域は、地図状萎縮(geographic atrophy)と呼ばれる。萎縮性AMDは、代表的には、滲出性ほどは重篤ではないと考えられる。なぜなら、その発症がそれほど突発性ではないからである。しかし、その進行を停止または遅延させるに有効な処置はない。あまり一般的ではないがより重篤な滲出性形態では、脈絡膜血管に由来する新生血管「膜」が、ブルーフ膜に侵入し、漏れさせ、そしてしばしば、RPEまたは新形成網膜の剥離を生じさせる(ElmanおよびFine、1989)。この事象は、短期間で生じ得、そして迅速かつ恒久的な中心視力の喪失をもたらし得る。片方の眼球に罹患した場合、別の方の眼球が脈絡膜新生血管膜をその初期事象から5年以内に発症する確率が高い程度存在する(Macular Photocoagulation Study、1977)。新生血管AMDの重要な臨床症状は、灰色-緑色新生血管膜、ドーム型RPE剥離、および円盤状瘢痕(線維膠細胞および網膜神経芽細胞の増殖により生じる)を含み、これらは、蛍光血管造影においてその過剰蛍光により最も良好に可視化される(ElmanおよびFine、1989)。多数の研究によって、黄斑結晶腔が萎縮性AMDおよび新生血管AMDの両方の発症についての強力な危険因子であることが実証された(Gass、1973; Lovie-KitchinおよびBowman、1985; Lewisら、1986; Sarks、1980; Sarks、1982; Smallら、1976; Sarksら、1985; Vinding、1990; Bresslerら、1994; Bresslerら、1990; Macular Photocoagulation Study)。Pauleikhoffら(1

990)は、結晶腔の融合性 (confluency) の大きさ、数、密度および程度が、AMDの危険性の重要な決定因子であることを実証した。両側に結晶腔を有する患者における新生血管合併症の発症の危険性は、1年あたり3~4%であると見積もられている (Mimounら, 1990)。Macular Photocoagulation Study Groupからの最近の研究によって、5以上の結晶腔を有する眼において脈絡膜新生血管を発症する相対危険度は2.1であることが示され、そして1つ以上の大きな結晶腔を有する眼においては1.5の危険度であることが示された (Macular Photocoagulation Study, 1997)。結晶腔とAMDとの間の相関は、充分顕著であり、多くの研究者および臨床医が、失明がない状態で、斑における柔らかな結晶腔の存在に関して、「早期AMD」 (Mideaら, 1997; Tolentinoら, 1994)、または「早期加齢性黄斑障害」 (Birdら, 1995) と呼んでいる。黄斑結晶腔に加えて、Lewisら (1986) は、黄斑該の結晶腔野程度もまたAMDの発症についての有意な危険因子であることを見出した。

【0005】

多数の集団ベースの研究によって、異なる人種集団におけるAMDの率およびAMDの家族性集中の程度の調査に基づいて、AMDが遺伝性成分を有することが示されている (Hymanら, 1983)。例えば、コーカサス人は、ヒスパニック起源の個人よりも危険性が高いようである (Cruickshanksら, 1997)。さらに、バルバドスにおける黒人集団は、進行性AMDの発症率が、現地のコーカサス集団よりも低かった (Schachatら, 1995)。双子および他の兄弟姉妹を含む研究によって、2つの個体がより近い関係にあると、その2つの個体は、AMDを発症する危険性が同じ程度であるようであることが実証された (Heibaら, 1994; Kleinら, 1994; MeyersおよびZacchary, 1988; Meyers, 1994; Meyersら, 1995; Piguetら, 1993; Seddonら, 1997; Silvestriら, 1994)。これらの知見によって、遺伝がAMDの発症の個人での危険性に顕著に寄与することが示唆されるが、原因遺伝子は、まだ同定

されていない。最近の研究によって、光受容体ABC Rの縁(rim)タンパク質における変異が米国のAMD症例を15%まで増加させることが示唆され(Allikinet sら、1997)、より最近のデータによって、これはそうでないことが示された(De La Pazら、1998; Stoneら、1998)。従って、すべてのAMDについて原因となる遺伝子は同定されていない。

【0006】

他の黄斑障害(代表的には、AMDよりも早い発症を伴う)が記載されている。これらには、ノースカロライナ黄斑ジストロフィー(Smallら、1993)、ソーズビー底ジストロフィー(Caponら、1989)、シュタルガルト病(Parodi、1994)、パターンジストロフィー(MarmorおよびByers、1977)、ベスト病(Stoneら、1992)、優性結晶腔(DeutmanおよびJansen、1970)、および放射状(radial)結晶腔(「malattia leventinese」)(Heonら、1996)が含まれる。これらの遺伝性障害のいくつか(異なる染色体遺伝子座にマッピングされているか、またはその遺伝子が同定されているものを含む)は、結晶腔(または、下位RPEの空間において他の細胞外沈着)の存在によって特徴付けられている。この情報に基づいて、以下であるようである:(1)AMDは単一の遺伝性疾患ではないこと(なぜなら、異なる染色体遺伝子座を有する異なる遺伝子疾患が形態上の差異を共有するからである)(Holzら、1995a; Manserghら、1995);および(2)結晶腔が多数の異なる傷害によって誘導される生物学的経路の結果としてか、遺伝的にか、または他の方法で発祥し得ること。AMDは、実際には、いくつかの疾患であり、その殆どは遺伝性であるが、環境的因子もその発症に何らかの役割を果たしている。

【0007】

多数の遺伝子座が黄斑変性に対する素因を示すとして報告されている:1p21-q13(劣性シュタルガルト病または黄色斑眼底について)(Allikinet s、R.ら Science 277:1805-1807、1997; Anderson, K.L.ら、Am. J. Hum. Genet. 55:1477、1994; Cremer s、F.P.M.ら、Hum. Mol. Gene

t.7:355-362、1998; Gerber, S.ら, Am. J. Hum. Genet. 56:396-399、1995; Gerber, S.ら、Genomics 48:139-142、1998; Kaplan, J.ら、Nat. Genet. 5:308-311、1993; Kaplan, J.ら、Am. J. Hum. Genet. 55:190、1994; Martinez-Mir, A.ら、Genomics 40:142-146、1997; Nasonkin, I.ら、Hum. Genet. 102:21-26、1998; Stone, E.M.ら、Nat. Genet. 20:328-329、1998); 1q25-q31 (劣性加齢性黄斑変性について) (Klein, M.L.ら、Arch. Ophthalmol. 116:1082-1088、1998); 2p16 (優性放射性結晶腔、優性ドインの蜂巣状脈絡膜症またはMalattia Leventineseについて) (Edwards, A.O.ら、Am. J. Ophthalmol. 126:417-424、1998; Heon, E.ら、Arch. Ophthalmol. 114:193-198、1996; Heon, E.ら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37:1124、1996; Gregory, C.Y.ら、Hum. Mol. Genet. 7:1055-1059、1996); 6p21cen (優性黄斑変性、成人性卵黄様変性について) (Felbor, U.ら、Hum. Mutat. 10:301-309、1997); 6p21.1 (優性錐体ジストロフィーについて) (Payne, A.M.ら、Am. J. Hum. Genet. 61:A290、1997; Payne, A., M.ら、Hum. Mol. Genet. 7:273-277、1998; Sokol, I.ら、Mol. Cell. 2:129-133、1998); 6q (優性錐体杆体ジストロフィーについて) (Kelsell, R.E.ら、Am. J. Hum. Genet. 63:274-279、1998); 6qII-q15 (優性黄斑変性、シュタルガルト様疾患について) (Griesinger, I.B.ら、Am. J. Hum. Genet. 63:A30、1998; Stone, E.M.ら、Arch. Ophthalmol. 112:765-772、1994); 6q14-q16.2 (優性黄斑変性、ノースカロライナ型について) (Kelsell, R.E.

ら、Hum. Mol. Genet. 4:653-656、1995; Robb、M. F. ら、Am. J. Ophthalmol. 125:502-508、1998; Sauer、C. G. ら、J. Med. Genet. 34:961-966、1997; Small、K. W. ら、Genomics 13:681-685、1992; Small、K. W. ら、Mol. Vis. 3:1、1997); 6q25-q26 (優性網膜錐体ジストロフィー1について) (Online Mendelian Inheritance in Man(TM). Center for Medical Genetics, Johns Hopkins University, and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/omim>(1998); 7p21-p15 (優性嚢胞様黄斑変性について) (Inglehearn、C. F. ら、Am. J. Hum. Genet. 55:581-582、1994; Kremer、H. ら、15 Hum. Mol. Genet. 3:299-302、1994); 7q31-32 (優性第三色盲タンパク質である青色錐体オプシンについて) (Fitzgibbon、J. ら、Hum. Genet. 93:79-80、1994; Nathans、J. ら、Science 193:193-232、1986; Nathans、J. ら、Ann. Rev. Genet. 26:403-424、1992; Nathans、J. ら、Am. J. Hum. Genet. 53:987-1000、1993; Weitz、C. J. ら、Am. J. Hum. Genet. 50:498-507、1992; Weitz、C. J. ら、Am. J. Hum. Genet. 51:444-446、1992); not 8q24 (優性黄斑変性異型卵黄様変性について) (Daiger、S. P. ら、「Degenerative Retinal Diseases」、LaVail ら編. Plenum Press、1997; Ferrell、R. E. ら、Am. J. Hum. Genet. 35:78-84、1983; Leach、R. J. ら、Cytogenet. Cell Genet. 75:71-84、1996; Sohocki、M. M. ら、Am. J. Hum. Genet. 61:

239-241, 1997); 11p1213 (優性黄斑変性、ベスト型(ベストロフィン(bestrophin))について)(Forsman, K.ら、Clin. Genet. 42:156-159, 1992; Graff, C.ら、Genomics, 24:425-434, 1994; Petrukhin, K.ら、Nat. Genet. 19:241-247, 1998; Marquardt, A.ら、Hum. Mol. Genet. 7:1517-1525, 1998; Nichols, B.E.ら、Am. J. Hum. Genet. 54:95-103, 1994; Stone, E.M.ら、Nat. Genet. 1:246-250, 1992; Wadeilus, C.ら、Am. J. Hum. Genet. 53:1718, 1993; Weber, B.ら、Am. J. Hum. Genet. 53:1099, 1993; Weber, B.ら、Am. J. Hum. Genet. 55:1182-1187, 1994; Weber, B.H., Genomics 20:267-274, 1994; Zhaung, Z.ら、Am. J. Hum. Genet. 53:1112, 1993); 13q34 (優性黄斑変性、シュタルガルト型について)(Zhang, F.ら、Arch. Ophthalmol. 112:759-764, 1994); 16p12.1 (劣性バッテン病(セロイド脂褐素沈着症(ceroid-lipofuscinosis)、ニューロン性3)若年性; タンパク質; バッテン病タンパク質について)(Batten Disease Consortium, Cell 82:949-957, 1995; Eiberg, H.ら、Clin. Genet. 36:217-218, 1989; Gardiner, M.ら、Genomics 8:387-390, 1990; Mitchison, H.M.ら、Am. J. Hum. Genet. 57:312-315, 1995; Mitchison, H.M.ら、Am. J. Hum. Genet. 4:654-662, 1995; Mitchison, H.M.ら、Genomics 40:346-350, 1997; Munroe, P.B.ら、Am. J. Hum. Genet. 61:310-316, 1997); 17p (優性輪紋状脈絡膜ジストロフィーについて)(Lotery, A.J.ら、Ophthalmol. Vis. Sci. 37:1124, 1996); 17p13-p12 (優性錐体ジストロ

フィー、進行性について) (Balciuniene, J.ら, Genomics 30:281-286, 1995; Small, K.W.ら, Am. J. Hum. Genet. 57A203, 1995; Small, K.W.ら, Am. J. Ophthalmol. 121:13-18, 1996); 17q (錐体杆体ジストロフィーについて) (Klystra, J.A.ら, Can. J. Ophthalmol. 28:79-80, 1993); 18q21-q21.3 (錐体杆体ジストロフィー、ドグルーシー (de Grouchy) 症候群について) (Manhant, S.ら, Am. J. Hum. Genet. 57A96, 1995; Warburg, M.ら, Am. J. Med. Genet. 39:288-293, 1991); 19q13.3 (優性錐体杆体ジストロフィー; 劣性、優性および「デノボ」レーバー先天性黒内障; 優性RP; タンパク質: 錐体杆体otx様光受容体ホメオボックス転写因子について) (Bellingham, J.ら, 「Degenerative Retinal Diseases」、LaVailら編、Plenum Press, 1997; Evans, K.ら, Nat. Genet. 6:210-213, 1994; Evans, K.ら, Arch. Ophthalmol. 113:195-201, 1995; Freund, C.L.ら, Cell 91:543-553, 1997; Freund, C.L.ら, Nat. Genet. 18:311-312, 1998; Gregory, C.Y.ら, Am. J. Hum. Genet. 55:1061-1063, 1994; Li, X.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:1876-1881, 1998; Sokocki, M.M.ら, Am. J. Hum. Genet. 63:1307-1315, 1998; Swain, P.K.ら, Neuron 19:1329-1336, 1987; Swaroop, A.ら, Hum. Mol. Genet. In press, 1999); 22q12-q13.2 (優性ソースビー眼底ジストロフィー、メタロプロテアーゼ-3の組織インヒビター (TIMP3) について) (Felbor, U.ら, Hum. Mol. Genet. 4:2415-2416, 1995; Felbor, U.ら, Am. J. Hum. Genet. 60:57-62, 1997; Jacobson, S.E.ら, Nat. Genet. 11:27-

32、1995; Peters、A.ら、Retina 15:480-485、1995; St6hr、H.ら、Genome Res. 5:483-487、1995; Weber、B.H.F.ら、Nat. Genet. 8:352-355、1994; Weber、B.H.F.ら、Nat. Genet. 7:158-161、1994; Wijesvriya、S.D.ら、Genome Res. 6:92-101、1996); およびXp11.4 (X連鎖錐体ジストロフィーについて) (Bartley、J.ら、Cytogenet. Cell. Genet. 51:959、1989; Bergen、A.A.B.ら、Genomics 18:463-464、1993; Dash-Modi、A.ら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37:998、1996; Hong、H.-K.、Am. J. Hum. Genet. 55:1173-1181、1994; Meire、F.M.ら、Br. J. Ophthalmol. 78:103-108、1994; Seymour、A.B.ら、Am. J. Hum. Genet. 62:122-129、1998)) (これらの教示は、本明細書において参考として援用される)。さらに、ウェブサイト <http://HVIWW.SPH.UTH.TMC.EDU/RETNET/disease.htm> は、黄斑変性についておよび黄斑変性にも関連し得るさらなる網膜変性についての遺伝的多型を列挙する。しかし、上記遺伝子または多型のいずれも、代表的な後期発症黄斑変性の有意な割合について原因であるとは見出されていない。

【0008】

「環境」条件は、個体がAMDを発症する速度またはその疾患の重篤さを調節し得る。光暴露が可能な危険因子として提唱されている。なぜなら、AMDは、黄斑に最も重篤に影響を与えるからである。そこでは光暴露が高い (Young、1988; Taylorら、1990; Schalch、1992)。戸外で過ごした時間量は、ヒトにおける脈絡膜新生血管形成の危険性の増加と関連し、そして帽子をかぶることおよび/またはサングラスをかけることは、軟結晶腔の発症の減少に関連する (Cruickshanksら、1993)。マイクロ波照射に対する事故的暴露もまた、多数の結晶腔の発症と関連することが示されて

いる(Limら、1993)。白内障および虹彩色素沈着の除去もまた、いくつかの研究において危険因子であると報告されている(Sandbergら、1994)。このことは、以下を示唆する：1) 白内障の傾向のある眼球はAMDを発症するであろうであり得ること；2) 白内障除去の手術のストレスが、炎症または他の手術が誘導する因子に起因してAMDの危険性を増加させ得ること；あるいは3) 白内障は、過剰な光暴露が黄斑に入る込むのを妨害し、そしてAMDについてある意味で予防的であること。暗虹彩色素沈着が黄斑を光傷害から保護し得ることが可能であるが、虹彩色素沈着単独と、他の実際の危険因子であり得る他の同時分離する遺伝因子との間を識別することは困難である。

【0009】

食餌因子もまた、個体がAMDを発症する危険性に影響を与え得る。日本からの逸話的証拠によると、AMDの発症は、20年前には非常に低かったが、都市部の日本人が西洋式食餌および生活習慣を会得するにつれ、増加したことが示唆されている(Bird、1997)。化学物質への暴露(Hymanら、1983)、喫煙(Vingerlingら、1996)、心臓血管疾患/アテローム硬化(Hymanら、1983；Vingerlingら、1995；Blumenkranzら、1986)、高血圧(Christenら、1997)、太陽に暴露されていない皮膚における皮膚弾性症変性(Blumenkranzら、1986)、食餌脂肪摂取(Mares-Perlmanら、1995b)、低濃度の血清リコペン(Mares-Perlmanら、1995a)、およびアルコール消費(Ritterら、1995)が、湿潤および/または乾燥のAMDの発症のさらなる危険因子として同定された。1つの最近の希望的な食事研究によって、黄斑色素密度および/またはルテイン(lutein)およびゼアキサンチンの血清濃度を、食餌摂取によって上昇させることがしばしば可能であることが見出された(Hammondら、1997)が、黄斑疾患を調節するにおけるこの変更の意義は、まだ決定されていない。従って、いくらかの野菜の食餌消費(例えば、ホウレンソウ、コラード(collard)グリーン、緑葉カンラン(kale))は、AMDの発症の危険に逆に関連してい得る(Seddonら、1994)、これは、そのルテインおよびゼアキサンチンの内包にお

そらく起因する効果である。

【0010】

現在、AMDの変性進行を有意に遅延させ得る治療は存在せず、そして処置は、罹患した患者の10～15%に生じる網膜下新生血管膜のレーザー光凝固に限定されている。これは、疾患の進行を停止し得るが、傷害を修復もせず、視力を回復させることもない。いくつかの臨床的研究によって、レーザー光凝固の後に、結晶腔が減退し、そしていくつかの症例において視力が改善したことが示された(Sigelman、1991; Littleら、1997; Figueroaら、1994; Frenneson and Nilsson、1996)。予防的なレーザー処理は、幾人かの患者に有用であり得る(Littleら、1997)が、他の患者は、黄斑のレーザー処理に対して有害に反応するようである(Hyverら、1997)。さらに、光凝固の後に患者について長期の利益が存在し得るが、これらは、この手順に頻繁に関連する視力の喪失ほどの価値がないかもしれない。インドシアニン緑色血管造影は、レーザー治療から利益を得るかもしれない患者を同定することを補助し得る有望な造影ツールである。

【0011】

AMDの生物学のよりよい理解によって、この疾患の天然の履歴を変更し得る治療の開発が可能になり得、これは、その進行を停止または反転する役割を果たす。医学では、任意の治療的介入は、不可逆的な病理的变化が生じる前に行われる場合に、患者に有利な効果を有する様であることが理解される。しかし、AMDでは、その疾患を発症するかまたは絶え間のない進行を経験することについての危険にある個体を同定し得る、容易に行われるスクリーニング試験が存在しない。AMDの早期の同定はまた、確立されたかまたは実験的処置様相(光凝固または眼科学の当業者に周知の他の技術を含む)を用いて成功することについて高い確率で早期の介入を可能にし得る。局所処置の特定の方法に対して顕著によりよくかまたはより悪く応答する、AMDの種々の表現型を認識することで、処置がそれに従って選択され得る。AMDの特定の表現型についての生物学的基礎が同定され得る場合、予防手段がその疾患の発症を妨害するかまたはその進行を減弱化するためによように取られ得る。従って、当該分野において、その障害が治療

的介入を受け入れ得る段階になおもあり得る場合に、その障害の早期検出のために適合された診断方法に対する必要性が存在する。

【0012】

さらに、その疾患についての病理生理学的機構が明らかにされ得る場合、それらを統計学的に有意な頻度でAMDと同時に存在するようである疾患において効果のあるような機構と比較され得る。次いで同時に存在する疾患についての治療が同定され、同じ治療またはその類似物をAMDを処置するに適用するための合理的基礎が存在する。従って、AMDが他の疾患実体と共有する病理学的機構を決定するための必要性、および医学の他の分野における研究を用いてAMDの処置に適用するためのさらなる必要性が存在する。同時に存在する疾患についての共通する機構が理解されると、眼窩障害の発症を予防することまたはその進行を制限することのいずれかによって、同時に存在する疾患およびAMDに有利に影響を与える治療を処方することが望ましい。

【0013】

AMDについての危険性を診断するための方法は、食餌、環境または生活様式への介入を行うことを臨床医に可能にさせる。この介入は、その疾患の発症を予防し得るか、またはその進行を制限し得る。例えば、患者の生活様式から、喫煙および高血圧のような特定の危険因子を除去することによって、患者がAMDを発症する確率に正の影響を与え得るか、またはその疾患の重篤性を制限し得る。AMDを発症することについての危険性の増加を決定することによって、困難であるが健康な生活様式の選択を行うための動機が患者に提供されるか、またはその疾患を発症する危険性を最小限にするように患者の環境を改変する動機を提供する。さらに、AMDを発症する危険性の増加を決定することによって、患者には、他の栄養の改変または補充（野菜、ビタミン、ミネラルまたは栄養薬学成分（nutriceutical）の摂取の増加（これは、AMDの発症の確率を減少させ得るか、またはその進行の重篤性を減少させ得る））のための合理的な基礎が提供され得る。次いで、感受性のある個体は、健康増進の改善のためおよびこの無能にさせかつ高度に蔓延する障害についての障害予防手段のための標的とされ得る。

【0014】

(発明の要旨)

本発明は、動脈壁破裂障害（大動脈瘤、腹部動脈瘤などを含むがそれらに限定されない）の発症が加齢性黄斑変性（AMD）の発症と相関するという発見に関する。従って、本発明は、黄斑変性または黄斑変性の素因を診断するための新規の方法、被験体における黄斑変性の発症の処置または予防のための方法（その被験体に、薬学的有効量の動脈壁破裂障害治療剤を投与することによる）、ならびに試験化合物をスクリーニングして黄斑変性治療剤を同定するためのインビトロおよびインビボのアッセイを提供する。動脈壁破裂障害の発症とAMDの壮観を決定するために使用したデータは、腹部動脈瘤（AAA）を有するヒトを使用した。が、おそらく、例えば、身体他の部分に発症する動脈瘤（例えば、胸部大動脈、腸骨動脈、内臓動脈または末梢動脈（例えば、膝窩動脈、大腿骨動脈）もまた、AMDの発症と相関する。さらに、AMDに加えて黄斑変性の他の形態がAAAの発症と相関しているようである。好ましい実施形態において、動脈の炎症、変性または自己免疫と関連する動脈瘤の形態は、AMDの発症と相関し得る。いずれの特定の理論にも限定されないが、動脈瘤は、動脈硬化または感染によって少なくとも部分的に生じ得る。あるいは、動脈瘤は、遺伝された結合組織障害によって少なくとも部分的に生じ得る。

【0015】

1つの局面において、本発明は、被験体において黄斑変性を発症する素因を診断または判定するための方法を提供する。この方法は、黄斑変性または黄斑変性を発症する素因についての指標である動脈壁破裂障害についての1つ以上のマーカーを検出することによる。1つの実施形態において、動脈壁破裂障害についてのマーカーは、被験体の血液、尿、組織、DNAまたはRNAにおいて検出される。好ましい実施形態において、動脈壁破裂障害は、動脈瘤であり、より詳細には、腹部大動脈瘤（AAA）である。別の好ましい実施形態において、大動脈瘤は、胸部大動脈瘤（TAA）である。更に別の好ましい実施形態において、黄斑変性は、加齢性黄斑変性（AMD）である。

【0016】

本発明の好ましい実施形態において、動脈壁破裂障害についてのマーカーは、腹部における拍動量のような物理的知見であり、そして物理的試験、超音波検査、コンピュータ連動断層撮影（CTスキャン）、磁気共鳴画像法（MRI）、および血管造影からなる群より選択される技術を用いて検出される。

【0017】

別の好ましい実施形態において、そのマーカーは、サイトカイン、ケモカイン、プロテアーゼ、コラーゲン、コラーゲンフラグメント、エラスチン、エラスチン分解産物、エラスチン関連分子および免疫細胞である。ここで、大動脈瘤を有する被験体において、または大動脈瘤を発症する素因を有する被験体において、正常で健常な被験体と比較したときに、そのマーカーのレベルは異なる。別の好ましい実施形態において、そのサイトカインまたはケモカインは、腫瘍壊死因子（TNF）、インターロイキン-1（IL-1）、インターロイキン-6（IL-6）、インターロイキン-8（IL-8）、細胞内接着分子（ICAM）、可溶性ICAM（sICAM）または酸化型低密度リポタンパク質（LDL）である。別の好ましい実施形態において、そのプロテアーゼは、マトリクスメタロプロテアーゼ2および9（MMP2, MMP9）、プラスミン、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1（PAI-1）、ウロキナーゼプラスミノゲンアクチベーター（uPA）、組織型プラスミノゲンアクチベーター（tPA）、メタロプロテアーゼの組織型インヒビター（TIMP）または1-アンチトリプシンである。別の実施形態において、エラスチン関連分子は、血清アミロイド、エミリン（emilin）、フィブリリン1、フィブリリン2、フィブリリン3、フィブリン、ビトロネクチン、リシルオキシダーゼ、MFAPI、WAP2、MFAPI3、MFAPI4またはMAGP2である。別の実施形態において、免疫細胞は、T細胞、樹状細胞、B細胞またはマクロファージであり、好ましくは、樹状細胞である。

【0018】

別の実施形態において、そのマーカーは、以下からなる群より選択される：イムノグロブリン、アミロイドA（1アミロイドA）、アミロイド成分、C5およびC5b-9末端複合体、HLA-DR、フィブリノゲン、第X因子、およ

びプロトロンビン、補体3、補体5および補体9、補体反応性タンパク質(CRP)、イムノグロブリン および の軽鎖、第X因子、HLA-DR、アポリポタンパク質A、アポリポタンパク質E、アンチキモトリプシン、 α 2ミクログロブリン、第X因子、フィブリノゲン、プロトロンビン、トロンビスポジン、エラスチン、コラーゲン、ビトロネクチン、ICAM-1、LFAI、LFA3、B7、IL-1、IL-6、IL-12、TNF- α 、GM-CSF、熱ショックタンパク質、コロニー刺激因子(GM-CSF、M-CSF)、TNF- α 、およびIL-10である。

【0019】

別の局面において、本発明は、被験体において黄斑変性を診断またはその素因を判定するための方法を提供する。この方法は、被験体から核酸を単離すること、およびその核酸を遺伝子型決定することによる。ここで、動脈壁破裂障害に関連するハイブリダイゼーションプロタイプからの少なくとも1つの対立遺伝子は、黄斑変性の危険性の増加の指標である。1つの実施形態において、本発明は、動脈壁破裂障害と診断された家族の構成員を有する被験体において黄斑変性を診断またはその素因を判定するための方法を提供する。この方法は、被験体から核酸を単離すること、動脈壁破裂障害についての多型マーカーに対応する染色体の領域を増幅するプライマーを用いてその核酸を増幅すること、およびその増幅産物を分析することによる。ここで、動脈壁破裂障害に連鎖する対立遺伝子型の指標となる多型の存在は、黄斑変性に連鎖する対立遺伝子型または黄斑変性を発症することについての素因についての指標である。別の実施形態において、本発明は、動脈壁破裂障害と診断された家族構成員を有する被験体において黄斑変性を診断するかまたはその素因を判定するための方法を提供する。この方法は、被験体からゲノム核酸を単離すること、そのゲノムDNAにおける短縦列反復配列を増幅して遺伝子型を得ること、その遺伝子型を、公知のDNA配列の遺伝子型と比較してヌクレオチド配列多型を検出することおよびその被験体のゲノムDNAにおける多型の存在または非存在を判定することによる。ここで、動脈壁破裂障害に連鎖する対立遺伝子型の指標である多型の存在は、黄斑変性または黄斑変性を発症することについての素因に連鎖する対立遺伝子型の指標である。好ましい

実施形態において、その遺伝子型は、以下の1つにおける多型である：フィブリリン1、III型コラーゲン、1アンチトリプシン、COL3A1、TIMP(1)またはハプトグロブリンの遺伝子座。好ましい実施形態において、その被験体は哺乳動物であり、より好ましくはヒトである。更に別の実施形態において、大動脈瘤はAAAまたはTAAであり、そして黄斑変性はAMDであり、そして好ましくは円板状の癍痕および脈絡膜新生血管形成(DS/CNV)を含む。別の実施形態において、本発明は、被験体において黄斑変性を診断するか、またはその素因を判定するための方法を提供する。この方法は、その被験体から得られたサンプルにおいて、大動脈瘤の指標である遺伝子産物について特異的な抗体を用いてイムノアッセイを実施することによる。ここで、結合した抗体の存在の検出は、大動脈瘤または大動脈瘤を発症する素因をその被験体が有すること、そしてそれゆえ、黄斑変性または黄斑変性を発症することについての素因を有することを示す。本発明は、上記イムノアッセイを実施するためのキットを提供する。別の実施形態において、本発明は、黄斑変性を診断するためのキットを提供する。このキットは、大動脈瘤の指標となる多型を有する染色体の領域を増幅するためのプライマー、DNA増幅を行うための試薬、および増幅された核酸を分析するための試薬を備える。

【0020】

別の局面において、本発明は、被験体において黄斑変性の発症を処置または予防するための方法を提供する。この方法は、薬学的有効量の動脈壁破裂障害治療剤を投与することによる。1つの実施形態において、動脈壁破裂障害治療剤は、MMP2のインヒビター、MMP9、プロプラノロール、CD18、IL-1、IL-6、IL-8、TNF またはIFN である。別の実施形態において、その治療剤は、サイトカイン、ケモカイン、プロテアーゼ、コラーゲン、コラーゲンフラグメント、エラスチン、エラスチン分解産物エラスチン関連分子または免疫細胞である。好ましい実施形態において、そのサイトカインまたはケモカインは、TNF、IL-1、IL-6、IL-8、ICAM、sICAMまたは酸化されたLDLである。別の好ましい実施形態において、そのプロテアーゼは、選択されたMMP2、MMP9、プラスミン、PAM、uPA、組織プラ

スミノゲンアクチベーター (t P A)、メタロプロテアーゼの組織型インヒビター (T I M P) および 1 - アンチトリプシンである。別の好ましい実施形態において、そのエラスチン関連分子は、血清アミロイド、エミリン、フィブリリン1、フィブリリン2、フィブリリン3、フィブリン、ビトロネクチン、リシルオキシダーゼ、M F A P 4 または M A G P 2 である。この免疫細胞は、好ましくは、T細胞、樹状細胞、B細胞およびマクロファージであり、特に樹状細胞である。

【0021】

別の局面において、本発明は、黄斑変性を処置または予防するために有用な薬学的組成物に関する。この組成物は、有効量の動脈瘤治療剤および治療的に受容可能なキャリアを含む。動脈瘤は、好ましくは、A A A または T A A であり、そして黄斑変性はA M D、特に滲出性または新生血管形成 (湿潤) 形態であり、この形態は、円板状瘢痕および / または脈絡膜新生血管形成 (D S / C N V) を含む。

【0022】

別の局面において、本発明は、被験体において黄斑変性を処置または予防するための薬剤、またはその薬剤の効力を判定するための薬剤を同定するための方法を提供する。この方法は、被験体に、非毒性投薬量で薬剤を投与すること、および動脈瘤が拡大を停止するかまたは改善されたかどうかを判定することによる。別の実施形態において、本発明は、被験体において黄斑変性を処置または予防するための薬剤を同定するための方法を提供する。この方法は、動脈瘤についての非ヒトモデルを、薬剤と接触させること、および動脈瘤の1つ以上のマーカーをモニタリングすることによる。ここで、1つ以上のマーカーの非存在または消失は、黄斑変性の阻害の指標である。好ましくは、動脈壁破裂障害は、A A A または T A A であり、そして黄斑変性は、A M D、特に滲出性または新生血管形成 (湿潤) 形態である。この形態は、円板状瘢痕および / または脈絡膜新生血管形成 (D S / C N V) を含む。別の好ましい実施形態において、そのマーカーは、腹部における拍動量のような物理的知見であり、そして物理的試験、超音波検査、コンピュータ連動断層撮影 (C T スキャン)、磁気共鳴画像法 (M R I)、

および血管造影からなる群より選択される技術を用いて検出される。あるいは、そのマーカーは、サイトカイン、ケモカイン、プロテアーゼ、コラーゲン、コラーゲンフラグメント、エラスチン、エラスチン分解産物、エラスチン関連分子および免疫細胞である。ここで、大動脈瘤を有する被験体において、または大動脈瘤を発症する素因を有する被験体において、正常で健常な被験体と比較したときに、そのマーカーのレベルは異なる。別の好ましい実施形態において、そのサイトカインまたはケモカインは、腫瘍壊死因子（TNF）、インターロイキン-1（IL-1）、インターロイキン-6（IL-6）、インターロイキン-8（IL-8）、細胞内接着分子（ICAM）、可溶性ICAM（sICAM）または酸化型低密度リポタンパク質（LDL）である。別の好ましい実施形態において、そのプロテアーゼは、MMP2、MMP9、プラスミン、PAI-1、uPA、tPA、TIMPまたは1-アンチトリプシンである。別の実施形態において、エラスチン関連分子は、血清アミロイド、エミリン、フィブリリン1、フィブリリン2、フィブリリン3、フィブリン、ビトロネクチン、リシルオキシダーゼ、MFAP1、WAP2、MFAP3、MFAP4またはMAGP2である。別の実施形態において、免疫細胞は、T細胞、樹状細胞、B細胞またはマクロファージであり、好ましくは、樹状細胞である。

【0023】

別の局面において、本発明は、大動脈瘤を有するかまたはその発症の素因のある、黄斑変性についての動物モデルを提供する。ここで、損動物において、大動脈瘤についての存在、その重篤度、またはその素因は、黄斑変性についての存在、その重篤度またはその素因の指標である。好ましい実施形態において、その動物は、薬剤によって処置され、その結果、その動物は大動脈瘤を発症する。別の好ましい実施形態において、その動物は、トランスジェニック動物である。

【0024】

本発明の他の特徴および利点は、以下の図面、詳細な説明、および特許請求の範囲から明らかになる。

【0025】

（発明の詳細な説明）

本発明は、特定の動脈壁破裂障害の指標が加齢性黄斑変性（AMD）の発症と相関するという発見に関する。特に、本発明は、AMDを診断するためまたはAMDを発症する危険性を予想するため、または確立されたAMDにおける進行の危険性を判定するための方法およびキットに関する。ここで、AMDの診断またはAMDの危険性の予想または判定は、動脈壁破裂障害の診断と関連する。1つの実施形態において、その動脈壁破裂障害は、動脈瘤であり得る。1つの実施形態において、その動脈瘤は、腹部大動脈において存在し得る。

【0026】

本明細書において詳細に説明される1つの実施形態において、本発明は、動脈瘤障害の指標が加齢性黄斑変性の指標と相関することの発見に関する。本発明は、大動脈瘤障害を特に参照して記載されているが、これらの障害において相関付けられるそのような病理プロセスは、作用中、血管系内でより一般化された基本に基づいて存在すると理解される（Baxter BTら、「Abdominal aortic aneurysms are associated with altered matrix proteins of nonaneurysmal aortic segments」、J Vasc Surg、19（5）：792 - 802；考察 803 1994年5月）。動脈瘤障害についての他の位置は、関連分野における当業者にとって周知である。これらの位置のいくつかにおいて、大脳血管系内の動脈瘤形成において病理プロセスが同定されており、これは、大動脈瘤と関連するものに類似している（Gaetani Pら、「Metalloproteinases and intracranial vascular lesions」、Neurol Res、21（4）：385 - 90、1999年6月）。しかし、大動脈の解剖学的特徴（これは、コラーゲンおよびエラスチンのような構造エレメントのその変動する分布を伴う）は、この血管を特に例示するものとして研究するようにさせる。（Halloran BGら、「Localization of aortic diseases is associated with intrinsic differences in aor」J Surg Res、59（1）：17 - 22 1995年7月）。従って、本発明は、大動脈を参照する

ことによって例示されるが、本明細書において記載されるきつおよび方法は、体内の任意の動脈における動脈壁破裂障害の存在と関係し得ることが理解される。

【0027】

(4.1: 定義)

以下の詳細な説明および特許請求の版において使用される特定の用語および句の意味を以下のように定義する。

【0028】

用語「アゴニスト」とは、本明細書において使用される場合、遺伝子産物の産生または活性を増強または上方制御（例えば、増強または補充）する薬剤をいうことが意味される。アゴニストはまた、別の遺伝子産物、分子または細胞との遺伝子産物、分子または細胞の（例えば、遺伝子産物の、別の相補的もしくは異種の遺伝子産物との、または遺伝子産物とそのレセプターとの）相互作用を増加させる化合物であり得る。好ましいアゴニストは、遺伝子上流領域に対する転写因子の結合または活性化を増強または増加させ、それゆえその遺伝子を活性化する化合物である。遺伝子発現を活性化（例えば、RNAまたはタンパク質の合成を増加させることによるか、あるいはRNAまたはタンパク質の代謝回転を減少させることによる）するかまたは遺伝子産物活性を活性化する任意の薬剤は、その薬剤がその遺伝子または遺伝子産物に直接作用するか間接的に作用する（例えば、遺伝子制御経路の上流で）かにかかわらず、アゴニストであり得る。アゴニストは、RNA、ペプチド、抗体および低分子あるいはそれらの組合せであり得る。

【0029】

句「AMD関連血栓（fundus）の知見」とは、AMDの指標と異常な知見をいう。例えば、AMD関連血栓の知見は、末梢、灰色黄斑、乳頭周囲萎縮、脈絡膜新脈管膜および/または円板状瘢痕あるいは地図状萎縮（GA）の存在を包含し得る。AMD関連血栓の知見は、眼科学において公知の従来の光学的方法によるか、または血栓に対して非破壊的である他の方法によってインビボで検出される知見を包含し得る。

【0030】

用語「動物モデル」とは、本明細書において使用される場合、トランスジェニック動物、天然に存在する動物であって遺伝的変異を伴うもの、および非トランスジェニック動物であって1つ以上の薬剤を用いて処置されたもの、あるいはそれらの組合せ（例えば、重症複合免疫不全症（s k i d）マウス）を包含する。これらのうちいずれも、疾患（例えば、黄斑変性または大動脈瘤）についての実験モデルとして作用し得る。例えば、トランスジェニックマウスは、遺伝子がノックアウトされているか、または遺伝子が過剰発現されているマウスであり得る。

【0031】

用語「アンタゴニスト」とは、本明細書において使用される場合、遺伝子産物の産生または活性を下方制御（例えば、抑制または阻害）する薬剤をいうことが意味される。そのようなアンタゴニストは、遺伝子産物、分子または細胞と、別の遺伝子産物、分子または細胞との間の相互作用を阻害または減少する薬剤であり得る。好ましいアンタゴニストは、遺伝子上流領域に対する転写因子の結合または活性化を阻害または減少し、そしてそれによってその遺伝子の活性化をブロックする化合物である。遺伝子発現または遺伝子産物活性を阻害する任意の薬剤は、その薬剤がその遺伝子または遺伝子産物に直接作用するか、または間接的に作用する（例えば、その遺伝子制御経路における上流）かどうかにかかわらず、アンタゴニストであり得る。アンタゴニストはまた、遺伝子の発現を下方制御するか、または存在する遺伝子産物の量を（例えば、RNAまたはタンパク質の合成を減少すること、またはRNAまたはタンパク質の代謝回転をぞうかさせることによって）減少する化合物であり得る。アンタゴニストは、RNA、ペプチド、抗体および低分子、あるいはそれらの組合せであり得る。

【0032】

用語「動脈壁破裂障害（arterial wall disruptive disorder）」とは、動脈瘤の形成によるか、または閉塞のような明白な破裂の形成によって特徴付けられる動脈壁のような異常をいう。

【0033】

用語「関連（会合）（*associate*）」または「相互作用」とは、本明細書において使用される場合、分子の間の検出可能な関係または関連（例えば、生化学的な相互作用）（例えば、天然における、タンパク質同士の間相互作用、タンパク質 - 核酸の間の相互作用、核酸同士の間相互作用、タンパク質 - 炭水化物の間の相互作用、炭水化物同士の間相互作用、タンパク質 - 脂質の間の相互作用、脂質同士の間相互作用など、タンパク質 - 低分子の相互作用、または核酸 - 低分子の間の相互作用）を包含することが意味される。

【0034】

用語「樹状細胞」または「DC」とは、本明細書において使用される場合、その異常な樹状形態、その強力な抗原提示能力およびCD3、CD19、CD16、CD14のような系統特異的なマーカーの欠如によって特徴付けられる造血細胞をいう。ここで、そのマーカーは、T細胞、B細胞、NK細胞および単球から、それぞれ、それらを識別する。現在、樹状細胞発生について少なくとも2つの個体発生経路が存在する：骨髄性に向けられた造血前駆体細胞に由来する経路、およびリンパ球に向けられた造血前駆体細胞に由来する経路。顆粒球および単球を生じる、骨髄性に向けられた前駆体はまた、皮膚のランゲルハンス細胞および二次リンパ組織における骨髄性関連樹状細胞へと分化する（樹状細胞についての多数の概説につき、Lotze、M.T.およびThomson、A.W.（編）（1999）“Dendritic Cells”、Academic Press、San Diego、CAを参照のこと。この教示は、本明細書において参考として援用される）。

【0035】

用語「樹状細胞前駆体」または「DC前駆体」は、本明細書において使用される場合、分化および成熟の際に、樹状細胞が由来する細胞型をいう。樹状細胞前駆体は、骨髄幹細胞、リンパ細胞系統に向けられた細胞、骨髄性細胞に向けられた細胞であり得る、これらの細胞から、樹状細胞が、特定のDCRMへの暴露後に発生し得る。例えば、骨髄性系統のDC前駆体は、GM-CSFでの処置により、誘導されて、DCへと分化され得る。

【0036】

用語「樹状細胞突起 (p r o c e s s) 」とは、樹状細胞の部分を行い、これは、樹状細胞の中心から離れる方向に向って突出または伸長する。

【0037】

「疾患」とは、本明細書において使用される場合、臨床症状および臨床的徴候を含む臨床的事象によって特徴付けられる障害である。臨床症状とは、患者によって報告される経験であり、それは、臨床医にとって病原の存在を示す。臨床徴候は、内科医または試験検査における客観的知見であり、これは、臨床医にとって病理の存在を示す。

【0038】

「障害」とは、それが構造的であれ、組織的であれ、生化学的であれ、他の任意の異常であれ、器官の任意の異常を広くいう。

【0039】

用語「結晶腔 (d r u s e n) 」とは、本明細書において使用される場合、多数の表現型を包含する。そのすべてが、ブルーフ膜の内部コラーゲン層と、R P E 基板との間に発生する。硬い結晶腔は、均一な好酸性の材料から構成される小さく顕著な沈着であり、そして通常傾斜した境界伴わず、丸いかまたは半球状である。軟結晶腔は、より大きく、通常均一ではなく、そして代表的には、内包および球状のプロファイルを含む。いくつかの結晶腔は、石灰化されてい得る。用語「広汎性 (d i f f u s e) 結晶腔」または「基底線状沈着 (b a s a l l i n e a r d e p o s i t) 」とは、ブルーフ膜の内部コラーゲン層と網膜色素上皮 (R P E) との間の層を形成する非晶性材料を記載するために使用される。この材料は、それが盛り上がっていないことを除いて組織的には軟結晶腔であるようであり得る。

【0040】

用語「結晶腔関連マーカー」とは、結晶腔形成の発生と関連し、そして最終的には結晶腔関連眼疾患または眼障害の発生に關与する表現型または遺伝子型をいう。表現型マーカーの例としては以下が挙げられる：機能不全および/またはR P E の死、免疫媒介事象、樹状細胞増殖、遊走および分化、下位R P E 空間へのD C 突起の突出 (例えば、C D 8 8、C D 1 a およびS 1 0 0 のような樹状細胞

マーカーの存在またはレベルを検出することによる)、地理状萎縮または円板状癍痕の存在、脈絡膜新生血管形成および/または脈絡膜線維症の存在(特に黄斑における)。遺伝子型マーカーの例としては、以下が挙げられる:変異遺伝子および/または異なる遺伝子発現の異なるパターン(「結晶腔発生経路」)(これは、結晶腔生合成に関連する眼組織を形成する結晶腔において上方制御または下方制御される遺伝子を含む)。例えば、機能不全および/または死につつあるRPE細胞によって発現される遺伝子としては、以下が挙げられる:HLA-DR、CD68、ビトロネクチン、アポリポタンパク質E、クラスタリンおよびS-100、熱ショックタンパク質70、死タンパク質、プロテアゾーム、Cu/Znスーパーオキシドジスムターゼ、カテプシン、および死アダプタータンパク質RAIDD。免疫媒介事象に関与するマーカーとしては以下が挙げられる:自己抗体(例えば、結晶腔、RPEおよび/または網膜成分)に対して指向される)、白血球、樹状細胞、筋線維芽細胞、VI型コラーゲン、およびケモカインおよびサイトカインのメンバー。結晶腔に関連する分子としては以下が挙げられる:イムノグロブリン、アミロイドA、アミロイドP成分、HLA-DR、フィブリノゲン、第X因子、プロトロンビン、補体3、補体5、補体9、および補体5b-9、C反応性タンパク質(CRP)アポリポタンパク質A、アポリポタンパク質E、アンチキモトリプシン、2ミクログロブリン、トロンボスポジン、およびビトロネクチン自己抗体(例えば、結晶腔、RPEおよび/または網膜成分に対して指向された)、白血球およびVI型コラーゲン。結晶腔に関連する分子としては以下が挙げられる:アミロイドA(1アミロイドA)、アミロイドP成分、C5およびC5b-9末端複合体、HLA-DR、フィブリノゲン、第X因子、およびプロトロンビン、補体3、補体5および補体9、補体反応性タンパク質(CR-P)、イムノグロブリンの鎖および鎖、第X因子、HLA-DR、アポリポタンパク質A、アポリポタンパク質E、アンチキモトリプシン2ミクログロブリン、第X因子、フィブリノゲン、プロトロンビン、トロンボスポジン、エラスチン、コラーゲンおよびビトロネクチン。結晶腔関連樹状細胞のマーカーとしては以下が挙げられる:CD1a、CD4、CD14、CD68、CD83、CD86、およびCD45、PECAM、MMP14、ユビキチン、およ

びF G F。重要な樹状細胞関連補助分子であって、T細胞認識に關与するものとしては、以下が挙げられる：I C A M - 1、L F A 1、L F A 3、およびB 7、I L - 1、I L - 6、I L - 1 2、T N F - 、G M - C S Fおよび熱ショックタンパク質。樹状細胞発現に關連するマーカーとしては、以下が挙げられる：コロン刺激因子、T N F - 、およびI l - 1。樹状細胞増殖に關連するマーカーとしては、以下が挙げられる：G M - C S F、I L - 4、I l - 3、S C F、F L T - 3およびT N F - 。樹状細胞分化に關連するマーカーとしては以下が挙げられる：I L - 1 0、M - C S F、I L - 6およびI L - 4。

【0041】

用語「結晶腔関連眼疾患」とは、本明細書において使用される場合、結晶腔形成が起こり、そして結晶腔が黄斑変性を生じるかまたはそれに寄与する、任意の疾患をいう。結晶腔の蓄積は、物理的障害を作成し、これが脈絡毛細管板と網膜との間の老廃物の通常の代謝および拡散を妨害するようである。結果として、網膜およびR P Eの健康を維持するために必要な酸素、グルコース、および他の栄養素もしくは調節性血清関連分子の拡散が阻害される。

【0042】

「結晶腔関連分子」または「D R A M」とは、本明細書において使用される場合、任意の、タンパク質、炭水化物、糖結合体（例えば、糖タンパク質または糖脂質）、他の脂質、核酸または他の分子であって、結晶腔沈着と關連してまたは相互作用して見出されるものをいう。D R A Mは、それが、結晶腔によって影響を受けていない限り組織において沈着してまたはそれに關連して通常見いだされないか、またはその組織が結晶腔に罹患した組織および正常組織で等量では存在しない、細胞画分またはオルガネラを含み得る。

【0043】

用語「細胞外マトリクス（E C M）」とは、例えば、コラーゲン、プロテオグリカン、非コラーゲン性糖タンパク質、およびエラスチンのような、細胞を囲み、そして細胞のための構造的および機能的な支持を提供し、かつ、細胞接着、増殖、分化およびタンパク質合成のような細胞の種々の機能を維持するものをいう。当業者は、E C Mの正確な組成および物理的特性、ならびにその機能が、種々

の細胞型の間、種々の組織の間、および種々の器官の間で変動することを認識する。

【0044】

「線維症関連反応」とは、組織修復に関連する任意のプロセスであり、これには、新血管形成（新脈管形成（*angiogenesis*））、線維芽細胞の移動および増殖、細胞外マトリクスの沈着、ならびに線維性組織の成熟及び構成が含まれる。

【0045】

「免疫媒介事象」とは、急性または慢性の炎症のプロセスの部分として生じる事象をいう。急性および慢性の炎症の組織学的、生化学的および遺伝的なプロセスは、当業者には周知である。

【0046】

用語「阻害（する）」とは、本明細書において使用される場合、予防または妨害を意味し、そして完全な阻害、部分的阻害、減少または低減を含むことが意図される。

【0047】

用語「黄斑変性」とは、網膜黄斑が変性するかまたは機能不全になる多数上状態（例えば、黄斑の細胞の増殖の減少、黄斑の細胞（例えば、RPE細胞）の再構成または細胞死の増加、あるいはこれらの事象の組合せの結果として）のいずれかをいう。黄斑変性は、正常な黄斑の細胞の組織構造の統合性の喪失、および/または黄斑の細胞の機能喪失を生じる。黄斑の統合性または機能を変更または損傷する任意の状態（例えば、RPEまたはブルーフ膜に対する損傷）は、黄斑変性の定義内に入るとみなされ得る。細胞変性が相関付けられている他の例の疾患としては、網膜剥離、脈絡網膜変性、網膜変性、光受容器変性、RPE変性、ムコ多糖症、錐体杆体機能不全、錐体杆体ジストロフィーおよび錐体変性が挙げられる。

【0048】

用語「マーカー」とは、本明細書において使用される場合、障害または疾患の特徴である任意の表現型または遺伝子系をいう。この表現形としては、物理的知

見、生化学的成分、または障害または疾患において上方制御または下方制御される任意の分子または遺伝子産物を挙げられ得、そして、それゆえ、測定される場合、レベルが測定される場合、障害または疾患の指標である。マーカーとして作用し得る遺伝子型としては、特定の障害または疾患と関連する任意の多型または変異が挙げられる。

【0049】

用語「調節」、「変更」、「調節する」または「変更する」とは、本明細書において互換的に使用されて、活性の上方制御（すなわち、活性化または刺激（例えば、アゴナイズまたは増強））および下方制御（すなわち、阻害または抑制（例えば、アンタゴナイズ、減少または阻害））の両方をいう。例えば、調節される活性は、遺伝子発現であり得るか、または樹状細胞の増殖（growth）、増殖（proliferation）、移動または分化であり得る。「調節」または「変更」は、プロセスの上方制御または下方制御の両方を記載することが意図される。なぜなら、当業者に周知であるように、特定の刺激因子によって上方調節されるプロセスは、その刺激因子に対するアンタゴニストによって阻害され得るからである。逆に、特定の刺激因子によって下方制御されるプロセスは、その刺激因子に対するアンタゴニストによって阻害され得る。従って、例えば、誘導様式で、細胞応答を誘導し、細胞の挙動を調節または変更する薬剤を同定すると、その応答は、その薬剤のインヒビターによって阻害様式において（例えば、当該分野において十分に理解され、そして記載されるように）抗体またはアンチセンスRNAによって）調節され得ることが理解される。

【0050】

用語「核酸」とは、本明細書において使用される場合、デオキシリボ核酸（DNA）（および適切である場合、リボ核酸（RNA））のようなポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドをいう。この用語はまた、ヌクレオチドアナログから作られたRNAまたはDNAのいずれかの等価物、アナログとして、そして記載される実施形態に適用可能なものとして、一本鎖（センスまたはアンチセンス）および二本鎖のポリヌクレオチドが含まれることが理解され得る。

【0051】

用語「物理的知見 (physical finding)」とは、本明細書において使用される場合、保健看護提供者による患者の面接評価の間に明らかである、任意の徴候または症状をいう。次いで、物理的知見は、医療の履歴を受ける間に患者によって記載される症状（例えば、疼痛）を含み得る。物理的知見とは、患者の身体の観察、聴診、打診、または触診の間に同定される患者の解剖学的特徴のそれらの特徴をいい得る。物理的知見はまた、保健看護提供者によって直接操作される装置（例えば、内視鏡、聴診器、オトスコープ、および検視鏡）によって増幅される、観察、聴診、打診、または触診によって認識される患者の解剖学的特徴のそれらの局面をいい得る。他方、観察のためのより洗練された装置（例えば、細隙灯）は、この用語が本明細書において使用される場合、「物理的知見」を認識し得る。本発明の範囲内には、患者に直接会っている間、健康看護提供者の観察能力を増幅することによって生成されるそれらの知見が入る。例えば、フルオレセインの投与および所定の波長で細隙灯を用いてその組織への効果を観察することにより、本明細書において使用される場合、物理的知見のセットの決定がもたらされる。この定義に一致する他の型の物理的知見は関連分野の当業者には容易に明らかである。大動脈瘤についての物理的知見は、例えば、拍動性腹部塊、圧痛腹部塊、背中の疼痛、末梢拍動または腹部の雑音の変更が挙げられ得る。

【0052】

用語「多型」とは、遺伝子またはその部分（例えば、対立遺伝子変異体）の1つを超える形態の共存をいう。少なくとも2つの異なる形態（すなわち、2つの異なるヌクレオチド配列）が存在する遺伝子の一部は、「遺伝子の多型領域」と呼ばれる。多型領域は、一本鎖ヌクレオチドであり得、その同一性は、異なる対立遺伝子において異なる。多型領域はまた、いくつかのヌクレオチド長であり得る。「多型遺伝子」とは、少なくとも1つの多型領域を有する遺伝子をいう。

【0053】

用語「タンパク質」、「ポリペプチド」、および「ペプチド」とは、アミノ酸を含む遺伝子産物に言及する場合本明細書において互換的に使用される。用語「組換えタンパク質」とは、本発明のポリペプチドであって、組換えDNA技術に

よって産生されるものをいう。ここで、一般的に、ポリペプチドをコードするDNAは、適切な発現ベクターに挿入される。次いで、この発現ベクターを使用して宿主細胞を形質転換して、その異種タンパク質を産生させる。同様に、用語「組換え核酸」または「組換えDNA」とは、本発明の核酸またはDNAであって、組換えDNA技術によって産生されるものをいう。ここで、一般に、ポリペプチドをコードするDNAは、適切な発現ベクターに挿入される。次いで、この発現ベクターを使用して宿主細胞を形質転換して、その異種タンパク質を産生させる。さらに、句「～に由来する(から誘導される)」とは、組換え遺伝子に関して、「組換えタンパク質」の意味において、ネイティブポリペプチドのアミノ酸配列、またはそれに類似のアミノ酸配列を有するようなタンパク質であって、そのポリペプチドの天然に生じる形態の置換および欠失(短縮を含む)を含む変異によって生成されるものを含むことが意味される。

【0054】

「放射線学的知見」とは、本明細書において使用される場合、患者に対する電離照射または音波のある用量の診断的投与から生じる任意のデジタルまたは図形的表示をいう。放射線学的知見は、MRI、CTスキャン、IVコントラスト血管造影、従来のX線、超音波、心エコー検査、ドップラー血管造影または放射性核種スキャンを含む。他の型の放射線学的知見は、医療分野の当業者には明らかである。AAAに一致する放射線学的知見としては、例えば、側方腰仙棘フィルム(lateral lumbosacral spine films)における石灰化、超音波における塊の認識、または血管造影、CTスキャンもしくはMRIにおける腎臓下位大動脈の特徴的出現が挙げられる。

【0055】

「低分子(小分子)」とは、本明細書において使用される場合、約5kD未満の分子量、そしてより好ましくは約4kD未満の分子量を有する組成物をいう。低分子は、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣物、炭水化物、脂質(例えば、糖脂質および豚尾脂質)または他の有機物(炭素含有)または無機分子であり得る。多くの製薬企業が、化学物質および/または生物学的混合物(しばしば、真菌、細菌または藻類の抽出物)の広汎なライブラリーを有しており、こ

れらは、本発明の任意のアッセイを用いてスクリーニングされて治療化合物が同定され得る。

【0056】

「治療剤 (therapeutic) 」とは、本明細書において使用される場合、結晶腔関連マーカーの生物学的活性のアゴニストまたはアンタゴニストをいう。好ましい治療剤は、RPE細胞死、炎症応答に関与する因子、線維芽細胞の増殖および移動に関与する因子を減少または阻害して、線維性細胞および/または樹状細胞の増殖、移動または結晶腔への分化を生じる。他の好ましい治療剤は、大動脈疾患 (例えば、AAA) を処置または予防するにおいていくらかの効力が示された薬剤を含み、これらには、以下が挙げられる：抗炎症剤 (例えば、抗CD18抗体)、プロテアーゼインヒビター、エラストリシス性MMPのインヒビター (例えば、ヒドロキサメートベースのRS312908、バチマスタット (batimastat))、抗生物質 (例えば、ドキシサイクリン)、プロスタグランジン合成のインヒビターおよび ブロッカー (例えば、プロプラノロール) 。

【0057】

用語「転写調節配列」は、本明細書中において使用される包括的な用語であって、開始シグナル、エンハンサー、およびプロモーターのようなDNA配列をいい、これらは、それらが作動可能に連結されているタンパク質コード配列の転写を誘導または制御する。

【0058】

本明細書において使用される場合、用語「トランスフェクション」は、核酸媒介遺伝子移入による、核酸の、レシピエント細胞への導入 (例えば、発現ベクターを介する) を意味する。「形質転換」とは、本明細書において使用される場合、外因性DNAまたはRNAの細胞取り込みの結果として細胞の遺伝子型が変化するプロセスをいう。

【0059】

本明細書において使用される場合、用語「導入遺伝子 (トランスジーン) 」とは、細胞に導入された核酸配列 (例えば、本発明のポリペプチドのいつまたはそ

れに対するアンチセンス転写物をコードする)を意味する。導入遺伝子は、それが導入されるトランスジェニック動物もしくは細胞に対して部分的にまたは全体的に異種(すなわち、外来性)であり得るか、またはそれが導入されるが、それが挿入される細胞のゲノムを変更するような様式でその動物のゲノムに挿入されるように設計されているかまたは挿入された(例えば、天然の遺伝子のものとは異なるか、その挿入がロックアウトを生じるかまたは過剰発現を生じ得る位置に挿入されている)、トランスジェニック動物もしくは細胞の内因性遺伝子に対して相同性であり得る。導入遺伝子はまた、エピソームの形態で細胞に存在し得る。導入遺伝子は、1つ以上の転写調節配列または任意の他の核酸(例えば、5' UTR配列、3' UTR配列、またはイントロン)であって、選択された核酸の最適な発現に必要であり得るものを包含し得る。

【0060】

「トランスジェニック動物」とは、その動物の1つ以上の細胞が人的介入(例えば、当該分野で周知のトランスジェニック技術)によって導入された異種核酸を含む、任意の動物、好ましくは非ヒト動物、鳥類または両生類をいう。核酸は、直接、または細胞の前駆体に導入することによるか、意図的な遺伝子操作(例えば、マイクロインジェクションによる)か、もしくは組換えウイルスによる感染によって間接的に、その細胞へと導入される。用語遺伝子操作は、古典的交配、またはインビトロ授精は包含せず、組換えDNA分子の導入に関する。この分子は、染色体内に組み込まれ得るか、または染色体外で複製するDNAであり得る。本明細書において記載される一般的なトランスジェニック動物において、導入遺伝子は、細胞が特定の正常遺伝子産物を発現させなくして1つ以上のDRAMポリペプチドの組換え形態(例えば、アゴニスト形態またはアンタゴニスト形態)、またはDRAMもしくは樹状細胞の生合成、蓄積もしくは再吸収を調節する分子を発現する。例えば、樹状細胞の挙動(例えば、細胞増殖(growth)、増殖(proliferation)、移動、分化または遺伝子発現)に変化をもたらすトランスジェニックロックアウトが作製され得る。例えば、Rel-B(トランスフォーミング増殖因子b1(TGF- β 1)またはIkarsos遺伝子が破壊されているマウスは、種々の細胞系統から樹状細胞を欠如する

(Caux、C.ら、1999を参照のこと)。しかし、例えば、FLPまたはCREのリコンビナーゼ依存性構築物として、組換えDCRMまたはDRAM遺伝子がサイレントであるトランスジェニック動物もまた、意図される。さらに、「トランスジェニック動物」はまた、遺伝子破壊が人的介入によって(組換え技術およびアンチセンス技術の両方を含む)生じるような組換え動物を包含する。

【0061】

「処置(する)」または「処置」とは、本明細書において使用される場合、治療および状態または疾患の少なくとも1つの症状を改善することを包含することが意図される。動脈瘤に適用可能であるものとして、例えば、「処置」とは、存在する動脈瘤の拡張を予防すること、または動脈瘤の動脈壁の構造的安定性を増加させることをいい得る。

【0062】

用語「ベクター」、「クローニングベクター」または「複製クローニングベクター」とは、本明細書において互換的に使用され、そしてそれが連結される別の核酸を輸送し得る核酸分子をいう。1つの型の好ましいベクターは、エピソーム(すなわち、染色体外で複製し得る核酸)である。好ましいベクターは、それが連結された核酸の自律的な複製および/または発現をし得るものである。それらが作動可能に連結される遺伝子の発現を指向し得るベクターは、本明細書において、「発現ベクター」と呼ばれる。用語「発現系」とは、本明細書において使用される場合、mRNAが転写され得、そして/またはmRNAがタンパク質へと翻訳され得る条件下での発現ベクターをいう。発現系は、市販されているか、もしくは当該分野で公知の技術に従って容易に作製される、インビトロ発現系であり得るか、またはその発現ベクターを含む真核生物細胞もしくは原核生物細胞のようなインビボ発現系であり得る。一般に、組換えDNA技術において利用される発現ベクターは、しばしば、「プラスミド」の形態である。プラスミドは、一般に、二本鎖の環状DNAループをいい、このDNAループは、それらのベクター形態において、染色体には結合していない。本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は互換的に使用される。なぜなら、プラスミドが最も一般的に使用されるベクターの形態であるからである。しかし、本発明は、等価な機

能を果たし、そして続いて当該分野において公知となるような発現ベクターのそのような他の形態を含むことが意図される。

【0063】

用語「野生型対立遺伝子」とは、被験体において2コピーで存在する場合に、野生型表現型を生じる遺伝子の対立遺伝子をいう。特定の遺伝子についていくつかの異なる野生型対立遺伝子が存在し得る。なぜなら、ある遺伝子において特定のヌクレオチド変化は、ヌクレオチド変化を伴った2コピーのその遺伝子を有する被験体の表現型に影響を与えないかもしれないからである。

【0064】

(4.2:黄斑変性および動脈壁破壊障害の病態生理学)

1つの実施形態において、本発明の方法およびキットは、AMDに罹患する患者と動脈壁破壊障害(特に、AAA)に罹患する患者との間に、有意な病態生理学的類似性および生物学的類似性が存在するという、本明細書中に開示された新規な発見に依存する。これらの類似性のいくつかを、以下に要約する。

【0065】

【表1】

AAA/AMD 類似性

AAA 特徴	AMD	データ支持
遺伝性	X	
加齢性	X	
エラスチン破壊 & 他の ECM	X	University of Iowa データ
コラーゲンおよびエラスチンの 新生	X	University of Iowa データ
高血圧による増悪	?	
危険因子としての喫煙	X	
免疫関連	?	University of Iowa データ
大動脈血管新生	X	
アローム性動脈硬化症に関連	X	
COPDとの潜在的関連	?	University of Iowa データ
血管平滑筋細胞の 損失	?	University of Iowa データ
樹状細胞の流入	X	University of Iowa データ
慢性炎症 (マクロ)	?	University of Iowa データ
以下の上方調節: MMP2 & MMP9, t-PA, uPA, PAI-1, C3, IgG, TNFX, IL1, IL6, IL8	X	
TIMP, GAG, PGの下方調節	?	
α -1抗トリプシン 欠損 (マクロ)	?	University of Iowa データ

特定のこれらの関連は、本明細書中に援用される実施例においてより詳細に提示されるデータによって支持される。上記に示されない他の関連は、関連分野の当業者に容易に明らかである。以下に提示される、黄班変性および動脈壁破壊障害の疾患プロセスの記載によって、当業者は、本発明の範囲内にあるこれらの疾患プロセスの間の他の関連を、慣用的な実験のみで決定することが可能である。

【0066】

(4.2a:黄班変性)

(4.2a(i)一般)

黄班変性は、ブルーフ膜、神経網膜および網膜色素上皮(RPE)の異常に関連する中心視覚の進行性損失によって全て特徴付けられる、種々の疾患を説明するために使用される臨床用語である。これらの障害としては、高齢の患者を冒す非常に一般的な状態(加齢性黄斑変性、すなわちAMD)、ならびに、いくつかの場合において10歳代までに検出され得る、より稀な、早期発生性ジストロフィーが挙げられる(Best F.Z., *Augenheilkd.*, 13: 199-212, 1905; Sorsby, A. *Br J. Ophthalmol.* 33: 67-87, 1949; Stargardt, K., *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol.* 71: 534-550, 1909; Ferrell, R.E. *Am J. Hum Genet.* 35: 78-84, 1983; Jacobson, D.M. *Ophthalmology*, 96: 885-895, 1989; Small, K.W. *Genomics* 13: 681-685, 1992; Stone, E.M. *Nature Genet.* 1: 246-250, 1992; Forsman, K. *Clin Genet.* 42: 156-159, 1992; Kaplan, J.S. *Nature Genet.* 5: 308-311, 1993; Stone, E.M. *Arch Ophthalmol.* 112: 763-772, 1994; Zhang, K. *Arch Ophthalmol.* 112: 759-764, 1994; Evans, K. *Nature Genet.* 6: 210-213, 1994; Kremer, H. *Hum Mol Genet.* 3: 299-302, 1994; Kelsell, R.E. *Hum Mol Genet.* 4: 1653-1656, 1995; Nathans, J. *Science* 245: 831-838, 1989; Wells, J. *Nature Genet.* 3: 213-218, 1993; Nichols, B.E. *Nature Genet.* 3: 202-207, 1993a; Weber, B.H.F. *Nature G*

enet. 8: 352 - 355, 1994)。黄班変性疾患としては、例えば、加齢性黄班変性、ノースカロライナ黄班変性、ソーズビー底部ジストロフィー、シュタルガルト病、パターンジストロフィー、ベスト病、malattia leventiness、ドインの蜂巢状脈絡膜症、優性結晶腔および放射状結晶腔が挙げられる。

【0067】

組織病理学的に、この状態は、網膜色素上皮(RPE)基底膜の両側上の膜性細片の蓄積によって特徴付けられる。病態生理学的特徴としては、結晶腔の形成、RPE/脈絡毛細管板の萎縮、RPE剥離、および脈絡膜新血管(CNV)形成が挙げられる。組織病理学的研究は、高齢の個体および臨床的に診断されたAMDに罹患する患者の、RPE、脈絡膜および光受容体に関連する細胞外マトリクスにおける有意かつ広範な異常を実証した(Sarks, 1976; Sarksら、1988; Bird, 1992a; van der Schaftら、1992; GreenおよびEnger, 1993; Feeney-BurnsおよびEilersieck, 1985; Young, 1987; Kincaid, 1992)。最も顕著な細胞外マトリクス(ECM)異常は、結晶腔であり、これは、RPE基底膜とブルーフ膜の内部膠原性層との間に蓄積する沈着物である(図1)。結晶腔は、視覚を冒し、その後、視力を損失させるようであり；色のコントラスト感度(Frennessonら、1995; Holzら、1995b; Midenaraら、1994; Stangosら、1995; Tolentinoら、1994)、黄班回復機能、中心視野の感度および時空的なコントラスト感度(Midenaraら、1997)における変化が、報告されている。

【0068】

結晶腔はまた、RPE単層の外側への伸長およびRPEのその直接の血管供給部である脈絡毛細管板からの物理的置換を引き起こす。この置換は、正常な代謝物を妨げ得、そして脈絡毛細管板と網膜との間の拡散を衰弱させ得る、物理的障壁を作製する。おそらく、衰弱は、RPE近辺に集中され得、そして酸素、グルコース、ならびに網膜およびRPEの健常を維持するために必要とされる他の栄養性または調節性の血清関連分子の拡散が、阻害される。結晶腔が、杆状体およ

び網膜錐体に対して圧力を負荷することによって (Rones, 1937)、そして / または光受容体細胞の配列を歪めることによって (Kincaid, 1992)、光受容体細胞の機能を混乱させることもまた示唆されている。

【0069】

結晶腔表現型を区別するために最も一般的に使用される用語は、硬性および軟性であるが (例えば、Eagle, 1984; Lewisら, 1986; YanoffおよびFine, 1992; Newsomeら, 1987; Mimounら, 1990; van der Schaftら, 1992; SpraulおよびGrossniklaus, 1997)、多くの表現型が存在する (MullinsおよびHageman, Mol. Vision, 1999)。硬性の結晶腔は、均質な好酸性物質からなる小さい明確な沈着物である。組織学的に、これらは、球形または半球形であり、勾配性の境界を有さない。軟性の結晶腔は、より大きく、かつ勾配性の不明確な境界を有する。硬性の結晶腔とは異なり、軟性の結晶腔は、通常、均質でなく、そして代表的に、封入体性かつ球形のプロフィールを有する。多くの硬性 / 軟性の結晶腔を有する眼は、結晶腔を有さないか、または数個の小さな結晶腔を有する眼より、AMDの合併症を発症する危険性が有意により高い。用語「びまん性結晶腔」または「基底の線形沈着物」は、ブルー膜の内部膠原性層とRPEとの間に層を形成する、無定形物質である。この物質は、この物質が盛り上げられないことを除いて、軟性の結晶腔組織に類似するようであり得る。

【0070】

結晶腔組成の本発明者らの知見 (特に、表現型に関する) は、十分ではない。WolterおよびFalls (1962) は、結晶腔がオイルレッドOを染色することを観察し、これは、少なくともいくつかの結晶腔における中性脂質の存在を示す。Pauliekhoffら (1992) は、脂質ベースの組織化学染色アプローチを使用して、結晶腔の異なる表現型がリン脂質または中性脂質のいずれかを含むことを示した。これらの「疎水性」結晶腔はまた、抗フィブロネクチン抗体によって結合された。Pauliekhoffら (1992) は、リン脂質を含有するが、中性脂肪を含有しない結晶腔が、抗フィブロネクチン抗体反

応性であると結論付けた。他の研究者らは、フィブロネクチンの結晶腔との関連の観察を再現し得なかった(van der Schaftら、1993; Mullinsら、1999)。これらのデータは、結晶腔が疎水性または親水性のいずれかであること、そして異なる結晶腔クラスが、有意に異なる病理を示し得ることを示唆し、これは、単に形態学(すなわち、硬性および軟性)に基づくものでない、結晶腔の異なる組成のクラスの存在を示唆する。

【0071】

Farkasら(1971b)は、酵素消化法、有機抽出法、および組織化学的染色法によって、炭水化物および他の分子について結晶腔組成を分析した。彼らは、結晶腔が、シアロムチン(OGリコシル化連結オリゴサッカリドを有する糖タンパク質)ならびにセレブロシドおよび/またはガングリオシドからなると結論付けた。

【0072】

Newsomeら(1987)は、フィブロネクチンに対する抗体での軟性結晶腔の標識、ならびにIgGおよびIgMに対する抗体での硬性および軟性結晶腔の標識を記載する。さらに、アミロイドに対する抗体(Loefflerら、1995)、ならびに補体因子(C1q、C3c、C3dおよびC4)(van der Schaftら、1993)での結晶腔の弱い標識、およびユビキチンに対する抗体(LoefflerおよびMangini、1997)およびTIMP-3に対する抗体(Farissら、1997)での結晶腔の強い標識が、報告されている。他のECM分子(I型、III型、IV型およびV型コラーゲン、ラミニン、ならびに硫酸ヘパリンプロテオグリカンを含む)に対する抗体もまた、「びまん性、斑状または表在性の層状」パターンの結晶腔の成分であると報告されている(Newsomeら、1987)。

【0073】

上記の免疫組織化学的研究の結果間の矛盾は、結晶腔についての汎用性の分類系に対する不一致、凍結切片に対する、脱水した、パラフィン包埋組織(これは、いくつかの結晶腔成分の抽出を潜在的に生じる)の使用、および同じタンパク質の異なるエピトープに対する抗体の使用に起因するようである。さらに、死後

の短い期間内に固定化または凍結された組織の使用は、偽陰性（死後の自己分解および抗原性の損失に起因する）および偽陽性（死後の拡散および物理的障壁の損失に起因する）を減少する。

【0074】

結晶腔の脂質、タンパク質および炭水化物組成に加えて、いくらかの研究者らは、結晶腔中の形質膜または細胞性オルガネラを同定した。Farkasら（1971a）は、結晶腔中の多くの変性しているオルガネラ（リソソームと思われるものを含む）の存在を記載した。類似の物質が、結晶腔形成の前にブルーフ膜のRPE側に存在するという観察に基づいて、彼らは、結晶腔の成分が、RPEに由来すると示唆した。しかし、結晶腔内のリソソーム酵素活性は、確証されていない（Feeney-Burnsら、1987）。BurnsおよびFeeney-Burns（1980）は、小さい結晶腔中の「細胞質細片」の存在を記載し、彼らは、これらをRPE由来であることを推測した。Feeney-BurnsおよびEllersieck（1985）は、後に、結晶腔直下のブルーフ膜における細片の欠乏を記載し、そして結晶腔が、脈絡膜が結晶腔沈着の部位から細片を排除できないことから生じ得ることを示唆した。

【0075】

結晶腔は、多くの結晶腔関連分子（DRAM）を含み、これらには、アミロイドAタンパク質、アミロイドP成分、抗キモトリプシン、アポリポタンパク質E、2ミクログロブリン、補体3、補体C5、補体C5b-9末端複合体、第X因子、フィブリノーゲン、イムノグロブリン（および）、プロトロンビン、トロンボスポンジンまたはビトロネクチンが挙げられる。

【0076】

結晶腔生合成の総合的な理解が、欠失している。結晶腔生成について少なくとも12の経路が、文献に示唆されている（Dule-ElderおよびDobree、1967；WolterおよびFalls、1962；Ishibashiraら、1986a）。これらは、結晶腔が、RPEまたは脈絡膜のいずれに由来するかに基づく、2つの一般的カテゴリーに分かれる。結晶腔のRPE細胞からの誘導に関する理論は、以下の概念を含む：結晶腔が、RPEまたは光受容体由

来の異常性物質の分泌（「沈着理論」 - - Muller、1856；Ishibashiら、1986；Young、1987）；変性しているRPE細胞の結晶腔への転換（「転換理論」 - - Donders、1854；Rones、1937；Fine、1981；El Babaら、1986）、またはこれらの経路のいくつかの組み合わせから生じる。詳細には、いくらかの研究者らは、超微細構造データに基づいて、結晶腔が、RPEが、おそらく損傷されたサイトゾルを除去するための機構として（BurnsおよびFeeney Burns、1980）、その基底細胞質をブルーフ膜に放出する場合に形成される（Ishibashiら、1986a）と結論付けた。しかし、これらのプロセスの確証的想像は、ほとんど実証されていない。他者は、結晶腔が、異常なリソソーム酵素活性に起因する、RPEの自己分解によって形成されると仮定してきたが（Farkasら、1971a）、より最近の酵素組織化学的研究は、結晶腔中のリソソーム酵素の存在を実証していない（Feeny - Burnsら、1987）。他の機構（RPEのリポイド性変性（Fine、1981）および血管供給源からの誘導（Friedmanら、1963）を含む）もまた、仮定されている（Duke - ElderおよびDobree、1967に要約される）。

【0077】

Duvalら（1985）は、ブルーフ膜を細片排除下に維持することにおける、脈絡膜周皮細胞についての役割を示唆した。彼らは、周皮細胞の機能不全が、脈絡膜由来の物質の蓄積、またはRPEによって沈着された物質を除去できないことのいずれかによって、結晶腔の形成を導くことを示唆する。Killingsworthら（1990）は、AMDの血管新生段階におけるブルーフ膜の崩壊、および結晶腔の退行に關与するマクロファージを記載し、そして結晶腔のコアに類似する構造を示す、1つの電子顕微鏡写真を示す。DuvalおよびTso（1985）は、ブルーフ膜の領域における脈絡膜マクロファージが、サルスの眼における結晶腔の除去、その後のレーザー光凝固に關与することを示した。Penfoldおよび他者（Penfoldら、1985；Penfoldら、1986；OppenheimおよびLeonard、1989）は、「新生血管増殖の促進における（脈絡膜）白血球の關与についての環境的証拠」を提

供した。しかし、これらのデータは、形態学的観察のみに限定された。これらの観察に基づいて、研究者らは、マクロファージが、結晶腔形成の血管新生段階に関与することを示唆した。

【0078】

基底に観察されるAMDに関連する変化は、異なるAMD表現型に伴って変化し得る。少なくとも10の異なるAMD基底パターンが、University of Iowaで同定され、これらは、「The University of Iowa AMD/Drusen Classification」と称され得る。特定の基底パターンは、特定の動脈壁破壊障害に相関し得；例えば、AAAの発症の可能性の増加、または確立されたAAAにおいて拡大を発生させる可能性の増加に相関する、特定のパターンが同定され得るが、他の基底パターンは、TAAまたは解離性TAAを発症する可能性の増加を示し得る。異なる基底パターン（動脈壁破壊障害の異なる形態のような）は、異なる根本的な遺伝パターンと相関し得る。

【0079】

(4.2a(ii) 結晶腔生合成の実用的仮説)

本研究所および他の研究所において作製された、新規または以前に公開されたデータの大部分を援用することを試み、本明細書中に、結晶腔生合成の統一理論を、本明細書中に提供する。この理論は、多くのAMD表現型が存在し得るという認識から生じる。従って、提案された仮説のいくつかの局面のみが、任意の所定のAMD表現型に関与し得る。重要なことに、この理論は、樹状細胞が、結晶腔に関連するということを実証する、本研究所において作製されたデータに基づく。この観察は、最初、結晶腔生合成における細胞媒介性プロセスの直接的な役割についての潜在性を呼び起こす。従って、本発明者らは、結晶腔生合成および結晶腔関連眼性疾患の病因に関する任意の実用的仮説が、樹状細胞についての役割を含むはずであると考える。

【0080】

炎症性病変における樹状細胞の存在は、よく認識されている。樹状細胞が、炎症部位へ受動的に移動するよりもむしろ、漸増され、活性化され、そしてこれら

の部位へ移動するはずであることが明らかである。樹状細胞は、代表的に、種々の化学誘引物質、熱ショックタンパク質、DNAフラグメントなどによって、組織損傷部位に漸増される。脈絡膜樹状細胞突起は、最も小さい結晶腔に関連し、そしてしばしば、結晶腔がそれ自体で検出可能であるときより前に、ブルー膜に短絡されたRPE細胞の全体または部分に関連する、RPE下の空間において観察される。これらの観察に基づいて、脈絡膜樹状細胞が、局所的に損傷されたRPE細胞および/または致死下傷害性のRPE細胞によって、活性化および漸増される機構が、本明細書中に提案される。この考えは、樹状細胞、および従って、先天性の免疫系が、微環境組織損傷によって活性化され得ることを示す、最近のデータと一致する。この状況下で、これらの細胞は、組織損傷部位へ接近するために、ブルー膜を細胞突起を通して延ばす。この役割において、従って脈絡膜樹状細胞は、局所的細胞傷害に応答する能力を有する歩哨レセプターとして作用し得、そして最終的に免疫媒介プロセスの全体的な統合を提供し、これは、全体的な応答の結果を決定する。

【0081】

このモデルにおいて、傷害性RPEは、それ自体で（これが生じるあらゆる機構によって）、樹状細胞の漸増および活性化を惹起する可溶性サイトカインまたは他の刺激因子の供給源として作用し得る。本明細書中に提示されるデータは、年齢が一致するコントロールと比較した場合の、AMDを有するドナー由来の眼におけるRPE細胞死の加速をはっきりと支持する。他のシステムからの利用可能な情報、およびAMDの病因に関する以前の示唆に基づいて、RPE細胞死は、いくつかの機構によって生じ得、これらには、いくつか列挙すると、虚血、壊死、遺伝子媒介性傷害、ブルー膜誘導性機能不全、光または全身性因子（例えば、喫煙発生性化合物）からの酸化的傷害、リポフスチン蓄積、または自己免疫現象が挙げられる。既存のデータに基づいて、RPE細胞死は、アポトーシスよりもむしろ壊死に起因する可能性が最も高いようであり、なぜなら、アポトーシス性細胞死を受けている細胞は、樹状細胞を漸増しないからである。実際、これらのデータは、ヒトドナーの眼におけるアポトーシス性RPE細胞死の不在についての強力な証拠を提供する。

【0082】

いくつかの公知の経路が、樹状細胞前駆体と傷害組織との間のレセプター-リガンド相互作用を惹起し得る。これらには、サイトカイン（例えば、IL-1、IL-6、IL-12、TNF- α 、およびGM-CSF）、熱ショックタンパク質、フリーラジカル存在下での細胞表面タンパク質およびDNAの改変された発現が含まれる。結晶腔を有するドナー由来の眼のRPE細胞によるHLA-DR、CD68、ビトロネクチン、S-100、クラスタリン（clusterin）およびアポリポタンパク質Eのクローン発現の新たな観察は、この局面において特に有意であり得る。さらに、発症中の結晶腔およびAMDを有する眼のRPE/脈絡膜による、種々の細胞死関連分子および免疫関連分子の上方調節が、ディファレンシャルディスプレイ分析および遺伝子アレイ分析を使用して同定されている。さらに、フリーラジカル（RPE-網膜-脈絡膜の界面において高濃度で存在することが公知である）が、免疫刺激性であり得るという証拠が存在する。壊死細胞由来のセロイド（リポフスチンの潜在的成分）が、特定の自己免疫疾患の発生において、抗原として作用し得ることを示唆するデータもまた存在する。これは、酸化ストレスおよび/またはリポフスチンが、RPE機能不全およびAMDの発症を導き得るという、一般的な議論を説明し得る（Mainster, M.A., Light and macular degeneration: a biophysical and clinical perspective. Eye, 1987. 1 (Pt 2): 304-10頁）。

【0083】

一旦、この病変（別名、結晶腔）が内側に発生すると、次いで、樹状細胞は、多くの機構（免疫複合体形成、補体活性化、ならびに/または脈絡膜T細胞、他の食細胞、およびマトリクスタンパク質分解のインサイチュ活性化を含む）によってAMDの慢性（誘導性慢性炎症性病変）に寄与し得る。結晶腔における多くの免疫関連成分（イムノグロブリン、補体タンパク質、およびいくつかの急性期タンパク質）の存在は、このような事象によって説明され得る。一旦、局所的組織損傷が修復されて、耐性を回復すると、樹状細胞応答が下方調節されると予測し得る。この型の自己制限型制御は、代表的に、樹状細胞の代謝回転を介して他

の系において達成され；リンパ節への、新たな樹状細胞前駆体の流入、およびそれと同時の成熟樹状細胞の流入の減少は、代表的に、平衡を耐性にシフトし戻すのに十分である。他の場合において、ナチュラルキラー細胞が、成熟樹状細胞を標的として認識し、抗原提示に対するネガティブフィードバック効果を提供し、この系を耐性に強制する。しかし、AMDの場合において、本発明者らは、慢性炎症の状態が長年の間持続することを示唆する。このシナリオにおいて、RPE細胞死の周期的な事象が、長年の期間にわたって生じ得、これが、この系を耐性に戻させない。1つの例において、これは、RPE遺伝子変異の場合のような、遺伝的プレプログラミング (preprogramming) の結果として生じ得る。別の例において、RPE下の領域へ漸増された樹状細胞によって惹起された、RPE細胞による補体およびHLA-DR発現の局所的活性化は、クローン性のRPE細胞死を導き得、これによって、慢性炎症の状態を維持する。他のシナリオが、確実に想定され得、そして試験されるはずである。このプロセス全体のネガティブな結果は、ブルーフ膜および周囲の細胞外マトリクスが分解され得、脈管形成因子が生成され得、RPE下および網膜下の空間の日和見性の血管新生を生じることである。しかし、樹状細胞によるマトリクス分解酵素発現に関する文献に情報はほとんど存在しない。しかし、結晶腔コア内のMT-1-MMP発現が観察されており、これは、DC媒介性マトリクス分解に関する潜在的機構を示唆する。

【0084】

樹状細胞が局所的組織傷害によって活性化され得るという概念はまた、組織損傷中に曝露される網膜抗原および/またはRPE抗原に対する自己免疫応答を引き起こし得る。RPE細片/抗原の利用能および量は、ほとんどおそらく、その後のどの経路が関与するかを決定する。このような自己免疫応答は、心臓に対する虚血または傷害の結果として実証されており、そして本発明者らは、最近、35kDaおよび53kDaの網膜タンパク質およびRPEタンパク質に対する、AMDを有する個体の血清中の自己抗体を同定した。これは、異常な遅延型過敏症応答の結果として生じ得、これはおそらく、少なくともいくつかのAMD患者における血清自己抗体の存在を説明する。また、このプロセスについての基礎は

、RPE細胞の壊死によって若年期に引き起こされると考えられ、これは、本発明者らが予備研究において20歳代および30歳代において観察した、末梢RPE細胞の脱離(dropout)の波の結果を潜在的に説明する。

【0085】

本明細書中に提示されるモデルにおいて、RPE傷害事象の惹起の後に、結晶腔関連成分の連続的な沈着が生じる。初期のDRAMマトリクス複合体(例えば、免疫複合体)、または他の局所的リガンドは、さらなる自己凝集性のタンパク質および/または脂質の沈着についての「核形成部位」として作用し得る。これらの成分は、血漿および/または局所的細胞供給源のいずれかに由来する。多くのDRAMが循環中の血漿タンパク質であるという知見に基づき、おそらく、いくつかのDRAMが、脈絡膜血管を出て、そしてRPEに隣接する細胞外空間に入り、ここで、これらのDRAMは、老化した眼におけるブルーフ膜に関連する1以上のリガンドに結合する。これらのリガンドは、基底膜成分、形質膜レセプター、RPE細胞または脈絡膜細胞由来の分泌細胞、または細胞自己溶解の副産物であり得る。本明細書中に報告されるように、多くの結晶腔関連分子(アポリポタンパク質E、ビトロネクチン、フィブリノーゲン、C反応性タンパク質、およびトランスサイレチンを含む)が、RPEおよび/または網膜によって合成されている。予測されなかったが、これらのデータは、いくつかのDRAMが局所的に合成および分泌され得るという概念を支持する。局所的細胞によるDRAM合成の上方調節または下方調節が、結晶腔沈着および/またはAMDと相関するか否かはまだ決定されていない。これらの異常な沈着物のサイズが増加するにつれて、これらは、RPE単層を置き換え、結晶腔として臨床的に認識される。

【0086】

このモデルはまた、細胞外マトリクスの合成、分解および/または代謝回転における不均衡(これによって、脈絡膜血管新生(いくつかの形態のAMD、細胞増殖、細胞分化および間質性線維症の顕著な特徴)のような事象を導く)を予測し得る。多くの器官において、繊維形成は、組織傷害の一般的な合併症であり、これは、この傷害の最初の部位に非依存的である。免疫細胞の漸増、ならびに常在性の細胞によるそれらの活性化および/または調節は、最終的に線維症を導く

事象のカスケードにおける重要な工程を提示する。最近の研究はまた、異なる機能的な線維芽細胞表現型が、初期の線維症における中心的役割（免疫細胞の漸増を含む）を果たし得ることを示唆する。

【0087】

脈絡膜線維症は、ドナー眼のサブセットにおいて実証されている。脈絡膜線維症と年齢との間に有意な相関が存在する。さらに、予備的データは、脈絡膜線維症とAMD、大動脈瘤、大動脈狭窄、および潜在的なCOPDとの間に強い相関が存在することを示唆する。これらの脈絡膜は、通常は緩く充填された脈絡膜支質を満たす、新たに合成されたコラーゲン原線維およびエラスチン原線維、ならびに系状コラーゲンおよび細系の大量の蓄積によって、超微細構造的に特徴付けられる。主要なコラーゲン原線維は、平均直径0.042~0.063 μmであり、対して、強膜における原線維コラーゲンは、平均直径0.211~0.253 μmである。さらに、これらのドナーにおけるコラーゲン原線維は、長軸方向および断面において、古典的ならせん状形態を示す。らせん状コラーゲンは、原線維の脱凝集および/または未切断プロコラーゲン分子の組み込みから生じる。このコラーゲン表現型は、2、3の遺伝的結合組織疾患（エーレルス-ダンロー症候群；PXE；皮膚閉塞症（dermatoparaxis））、ならびに他の状態（コラーゲン線維症性（collagenofibrotic）系球体症、強皮症、アテローム性動脈硬化症、アミロイド、気腫、じゅく状斑）において観察される。活性なエラスチン合成の明らかな指示（拡大したREER、細系嚢、および新たに合成されたタンパク質の形態学的特徴を示すエラスチンを含む）はまた、減衰した線維芽細胞突起に沿って観察され、そしてコラーゲン原線維間に間隔を置いて見られる。

【0088】

公知のデータと一貫する事象の仮定の病原性順序は、1）RPE機能不全（例えば、遺伝的感受性および/または環境的曝露によって誘発される）；2）RPEにおける細胞内物質の蓄積（例えば、異常な基質物質の蓄積に対する、適切に酵素分解されない正常な基質物質）；3）細胞外物質（基底膜および基底の線形沈着物）の異常な蓄積；4）ブルー膜組成における変化（例えば、脂質沈着お

よびタンパク質架橋の増加) ; 5) 栄養分に対するブルーフ膜透過性の変化(例えば、ブルーフ膜を横切る水溶性血漿成分の拡散の障害) ; および6) 代謝困難性に対するRPEの応答(すなわち、対CNV増殖性萎縮(atrophy vs. CNV growth))。組織病理学および臨床的研究は、脈絡膜虚血の領域がしばしば、AMD患者のCNV近辺に観察されることを示す。酸素送達の減少/代謝「困難性」に応答して、RPEは、CNV増殖を導く物質を同化し得る。おそらく、RPE萎縮、その後の脈絡毛細管板および光受容体の萎縮は、細胞外細片の過度の蓄積の領域における、栄養分の減少/増加する代謝異常に応答する。AMDに対する未回答の問題としては、以下が挙げられる: 1) AMDが全身性疾患の眼性発現であるか、純粋に眼性疾患であるか; 2) 何が、RPE - 脈絡毛細管板 - 光受容体の対CNV性萎縮を発症させるか否かを決定するか; ならびに3) 何が、CNVの不活性化癍痕への成熟を誘導するか、および何が、多くのCNVの領域中心への増殖を制限するか。

【0089】

結晶腔は、一般に、種々の他の加齢性疾患に関連する異常沈着と共に、多くの分子成分を共有するので、結晶腔は、アミロイドーシス、弾力線維症、膜性増殖性糸球体腎炎および/またはアテローム性動脈硬化症の眼性発現を示し得る。異なる遺伝子および/または環境的影響によって調節されるが、これら全ての疾患は、生物学的応答の類似のセットを誘発することによって、類似であるが区別可能な病理学的表現型を生じ、これには、免疫系の炎症、凝固および活性化が挙げられる。従って、本発明は、それ自体を沈着物または班で発現する他の加齢性疾患と比較した、これらの類似性の価値ある認識を提供する。

【0090】

(4.2b: 動脈壁破壊障害)

動脈壁破壊障害は、腹大動脈を冒し得、腹大動脈動脈瘤(AAA)の形成を生じる。AAAは、腹部内に局在される大動脈において動脈瘤形成を引き起こす、動脈壁破壊障害の形態である。従って、AAAは、大動脈破壊性障害の形態である。これらの病変は、米国、オーストラリア、および欧州を含む先進国に共通して、増加傾向にある(MacSweeneyら、Brit J. Surg. 81:

935 - 941, 1994)。AAAの有病率は、一般的集団において約6% (2~9%)であり、そして主に約65歳を超える個体を冒す(Wilmink, A. B. およびQuick, C. R., Brit. J. Surg., 85:152 - 162, 1998)。65歳を超える集団の大きさは増加し続けているので、AAAおよび他の動脈壁破壊性疾患は、おそらく近い将来に、健常集団に対して大きな負荷を負わせる。

【0091】

大動脈壁破壊障害はまた、胸大動脈の動脈瘤を含む。これらの動脈瘤は、一般的に、横隔膜の下に延びる部分を有し、そのため、より正確には、胸腹動脈瘤(TAAA)と称される。これらは、その解剖学的程度に従って分類される(Crawford ESら、「Thoracoabdominal aortic aneurysms: preoperative and intraoperative factors determining immediate and long-term results of operations in 605 patients」J. Vasc. Surg. 3:389-404, 1986)。解離を有さない胸大動脈瘤は、以下の多くの因子によって引き起こされ得る：動脈硬化症性内側変性疾患、先天性障害(例えば、マルファン症候群およびエーレルス-ダンロー症候群)、真菌性病変および高安大動脈炎。大動脈壁破壊性疾患はさらに、動脈瘤形成に関連するか否かに関わらず、大動脈の解離を含む。動脈硬化症性の内側変性疾患(82%)および解離(17%)は、全てのTAAAの95%以上の原因である(Panneton JMら、「Non-dissecting thoracoabdominal aortic aneurysms: Part I」, Vasc. Surg. 9:503-514, 1995)。高血圧は、両群のTAAA患者において一般的に見出される。しかし、変性性(動脈硬化症性)動脈瘤を有する患者は、冠状動脈疾患、慢性腎不全、脳血管疾患および末梢血管疾患のより高い発生率を有する傾向がある。

【0092】

本発明のシステム、方法およびキットが、全ての解剖学的部位における動脈壁破壊障害に関連することが本明細書中で理解されるが、本発明は、AAAまたは

T A A Aにおいて最高に達する大動脈の破壊性障害に対する特定の参照によって例示される。

【0093】

(4.2b(i) 動脈壁の解剖学)

動脈は、これらの壁の解剖学に基づいて以下の3つの一般的カテゴリーに分けられる：弾性大動脈、中程度の筋性動脈、および小動脈。全ての動脈は、3つの層（内膜、中膜および外膜）を有する。中膜（内部および外部の弾性膜に結合される）は、コラーゲン、エラスチンおよびプロテオグリカンのマトリクスに包埋される平滑筋細胞を含む。外膜（外部弾性膜の外側に存在する）は、緩い結合組織、線維芽細胞、毛細血管、白血球および小さい神経線維からなる。動脈壁は、脈管の脈管と呼ばれる血管系によって栄養供給される。

【0094】

大きな弾力性のある動脈本体は、大動脈およびその主要な分岐を含む。中程度の筋肉の動脈は、器官に対して分布している血管のほとんどを含む。これらの2つのクラスの動脈は、中膜中に存在する弾性組織の量において主に異なる。大動脈壁中には、十分に定義された薄層ユニットが存在する。これは、共通して方向付けられ、そして伸張された平滑筋細胞およびそれらの周辺マトリックスからなる。マトリックスは、コラーゲンのメッシュワークおよびエラスチンの層を含む（Clark, J.M.ら、「Transmural organization of the arterial media: the lamellar unit revisited」、Arteriosclerosis 5:19、1985）。薄層ユニットは、大動脈壁の構造的および機能的なユニットを示す。薄層ユニットは、明確に定義されたエラスチンの薄層が点在する平滑筋細胞の層からなる。トロポエラスチンのモノマーは、通常は、繊維芽細胞および血管平滑筋細胞（SMC）によって産生され、そしてフィブリリン（fibrillin）および他のタンパク質の微細繊維性ネットワーク上に沈着し、そして、集中的な薄層に並べられる成熟した弾性繊維を形成するようにリジロオキシダーゼによって架橋される。

【0095】

(4.2b(ii) AAAの遺伝学)

動脈瘤を発症する家族的な傾向は、AAAを有する患者の約15~20%において十分に報告されている。このことは、いく人かの患者におけるAAAに対する遺伝的な素因、一親等の血縁関係における家族の病歴が、AAAを発症する有意な危険因子であることを示唆する(MacSweeneyら、Brit J. Surg. 81:935-941、1994)。家族におけるAAAの出現の最も可能性のある説明は、優性遺伝形質および低い表現度を示す単一の遺伝子である(Verloes, A.ら、J. Vasc. Surg. 21:646-655、1995)。他の動脈瘤についての家族的な関連もまた、注目されている(Kojima M.ら、「Asymptomatic familial cerebral aneurysms」、Neurosurgery, 43(4):776-81、1998年10月)。家族的な集積性が、これらの患者の同齡集団におけるHLA-DR B1対立遺伝子の同定に相関する、炎症性の動脈瘤について観察されている(Rasmussen TEら、「Genetic risk factors in inflammatory abdominal aneurysms: polymorphic residue 70 in the HLA-DR B1 gene as a key genetic element」、J Vasc Surg, 25(2):356-64、1997年2月)。遺伝的な因子は、フィブリリンの遺伝子型、血圧、および動脈瘤の形成に関連する1つの症例において、他の動脈瘤の症候群の発症に関連してきた(Powell JT.ら、「Interaction between fibrillin genotype and blood pressure and the development of aneurysmal disease」、Ann NY Acad. Sci. 800(-HD-):198-207、1996年11月18日。

【0096】

AAAの根底にある遺伝的な成分(単数または複数)を定義するための試みは、連関分析および候補遺伝子のアプローチの両方を含む、種々のストラテジーを使用した。AAAについてのいくつかの候補遺伝子(コラーゲン、1-抗トリ

プシン、フィブリン-2 (Kuivaniemiら、Eur. J. Hum. Gen. 6:642-646、1999)、タンパク質溶解性酵素、メタロプロテアーゼの組織インヒビター (TIMP)、およびハプトグロビンが、AAAの家族性の集積性を説明するために研究されている。有意には、エラスチン遺伝子における多型は、AAAを有する患者において実証されていない。フィブリリン-1およびIII型プロコラーゲン中の遺伝子の変異は、少数の患者 (例えば、それぞれ、Marfan's症候群およびEhler-Danlos症候群) においては動脈瘤の発症に関係することが見出されている。III型コラーゲンの鎖についての変異遺伝子は、50の家族のうち3家族において動脈瘤の疾患と同時に分離し、そしてIII型コラーゲン中の619位での単一の塩基変異が、1つの家族において記載されている (Kontusaari, S.ら、Ann. N. Y. Acad. Sci. 580:556-557, 1990)。大動脈の動脈瘤の約2%が、III型プロコラーゲン遺伝子中のgly136からargへの変異によって引き起こされると考えられる (Tromp, G.ら、J. Clin. Invest., 91:2539-2545)。1-抗トリプシンについての欠損対立遺伝子は、47人の患者のうち5人において見出された。そしてTIMP(1)についてのヌクレオチド置換が、6人の患者のうち2人において見出された。COL3A1遺伝子中の変異は、いくつかの家族性大動脈瘤の病因に関与している (Kuivaniemi, H.ら、J. Clin. Invest. 88:1441-1444、1991に総説されている)。MZ-1-抗トリプシン表現形は、AAAを有する個体において増大した頻度で見出されている (Cohen, J. R.ら、J. Surg. Res. 49:319-321、1990)。別の研究は、AAAが、ハプトグロビンの2-1遺伝子型および1-1遺伝子型の表現形に関連し得ることを示唆した (Norgard, O., Hum. Hered. 34:166-169、1984)。まとめると、入手可能なデータは、AAAは多くの症例において遺伝され得るが、AAAの症例のほとんどに関係している遺伝子 (単数または複数) は同定されていないままである。

【0097】

(4.2b(iii)他のAAAの危険因子)

不確定な遺伝的な成分を除いて、AAAの病因は、現在、アテローム性動脈硬化症、加齢、自己免疫プロセス、性別、人種、タバコの喫煙、および高血圧を含む種々の危険因子の間の、複雑な相互作用を通じて生じると考えられている。重篤な脈管内膜のアテローム性動脈硬化症はほとんど必ず、外科手術または検死のときにAAA中に見出され、そして他の循環性のベッド中のアテローム性動脈硬化症を有する患者は、増大したAAAの罹患率を有する。しかし、アテローム性動脈硬化症とは異なり、AAAは、弾力性のある中膜中での退行性の変更によって主に支配され、これは、種々の表皮学的な(epidemiological)特徴を示し、そして種々の遺伝的な危険因子を有する。従って、AAAは、閉塞的なアテローム性動脈硬化症とは異なる病理学的なプロセスを通じて生じると考えられ、そして大動脈のアテローム性動脈硬化症は、動脈瘤の発症に十分ではなく、必ずしも必要ではないとも考えられている。実際、いくつかの証拠は、アテローム性動脈硬化症のプラークの退行に関連する動脈壁の再モデル化が、動脈瘤の発症に関連し得ることを示唆した。現在の定説は、AAAは、閉塞的なアテローム性動脈硬化症とは異なる病理学的なプロセスによって生じることを示し、それでもなお、特定の研究は、それらの重複を指摘した(Robert L.ら、「Elastin-elastase-atherosclerosis revisited」、Atherosclerosis, 140(2):281-95、1998年10月)。

【0098】

男性の性別はまた、AAAの危険因子であると考えられている。いくつかの研究は、9:1程度の高さとして男性:女性の比を示している。女性においては動脈瘤の発症に対する相対的な生物学的な耐性が存在し得る可能性は、性別に関連する遺伝的な成分を示唆する。まだ明らかではない理由のために、白色人種ではない集団と比較して、白色人種においては大動脈の動脈瘤についての偏愛もまた存在するようでもある。

【0099】

持続的なタバコの喫煙とAAAとの間にもまた、約40年間のタイムラグを有して、強力な関係が存在する(MacSweeneyら、Brit J. Sur

g . 8 1 : 9 3 5 - 9 4 1、1 9 9 4)。いく人かの研究者らは、タール以外の煙の成分がこの疾患に寄与し得ることを示唆した (Mac Sweeney ら、前出)。例えば、血清コチニンの増大したレベルが 1 - 抗トリプシンの不活化に寄与し得ることが提案されている。これは、続いて、タンパク質溶解性の酵素による大動脈壁の崩壊を増強し得、それによって動脈瘤の拡張に寄与する。興味深いことに、肺気腫 / COPD の発症率は、AAA を有する患者においては高く、このことは、これらの患者における 1 - 抗トリプシンの不活化がさらに、大動脈の内腔の維持に必要なエラスチンの産生を崩壊させることを示唆する (Nicholls SC ら、「Rupture in small abdominal aortic aneurysms」、J . Vasc Surg , 2 8 (5) : 8 8 4 - 8、1 9 9 8 年 1 1 月)。

【0100】

高血圧もまた、AAA についての有意な危険因子であると考えられる。これは、増大した罹患率および増大した破裂の危険性の両方に関連する。7 5 mmHg 未満の拡張期の圧力を有する < 3 cm の動脈瘤の破裂の危険性はわずかに 2 % であるが、5 cm の動脈瘤および 1 0 5 mmHg より大きな拡張期の圧力については、破裂の危険性は 1 0 0 % まで増大し得る (Schwartz , S . I .、9 2 4 に前出)。

【0101】

(4 . 2 b (i v) AAA の病因)

AAA の病因は、エラスチンおよびコラーゲンの明らかな変更、慢性的な炎症、自己免疫に関連するプロセス、新血管形成、ならびに血管の平滑筋細胞の減少を含む、種々の生物学的なプロセスの複雑な相互作用を含む (Thompson , R . W .、Current Opinion Cardiology 1 1 : 5 0 4 - 5 1 8、1 9 9 6)。これらのプロセスは、長年にわたって作用し、そして最終的には、大動脈壁を弱くする (Cenacchi G . ら、「The morphology of elastin in non-specific and inflammatory abdominal aortic aneurysms . A comparative transmission , sca

ning and immunoelectronmicroscopy study」、J Submicrosc Cytol Pathol、27(1):75-81、1995年1月)。大動脈が弱くなることは、コラーゲンとエラスチンとの間での平衡の崩壊を含むことが明らかであるが、論証は、関連する機構およびそれらの相対的な重要性を視野に入れている(Anidjar S.ら、「Experimental study of determinants of aneurysmal expansion of the abdomen」、Ann Vasc Surg、9(2):127-36、1994年3月)。

【0102】

定量的な分析は、エラスチンが正常な大動脈の中膜の乾燥重量の35%を含むが、動脈瘤を有する患者の大動脈の中膜のわずかに8%しか含まないことを示す(Campa, JS. Atherosclerosis 65:13-21、1987)。外膜中のエラスチンもまた、AAAに影響を与え得る(White J Vら、「Adventitial elastolysis is a primary event in aneurysm formation」、J Vasc Surg、17(2):371-80; 考察380-1、1993年2月)。大動脈壁のエラスチンにおける変更の生化学的な影響は、予想される血液動態の影響を伴って、大動脈の罹患した領域の剛性を増大させることである(He CMら、「The composition and mechanical properties of abdominal aortic aneurysm」、J Vasc Surg、20(1):6-13、1994年7月)。

【0103】

正常な血管組織においては、エラスチンは、平滑筋細胞によって産生され、そしておそらく、線維芽細胞によって産生される。エラスチンはコラーゲンと同様に、トロポエラスチン分子としてプロデューサー細胞から分泌され、これはエラスチン原線維を形成するように結合する。創傷の治癒に関連する特定の因子(例えば、TGF-)は、エラスチンの細胞性の産生を増大し得る(Sauvag

e Mら、「Localization of elastin mRNA and TGF- β in rat aorta and caudal artery as a function of age」、Cell Tissue Res. 29:305-314、1998)。特定の他の因子（詳細には、TNFのような炎症性のサイトカイン）は、エラスチンの産生に有害な影響を与え得る（Kahari VMら、「TGF- β up-regulates elastin gene expression in human skin fibroblasts: evidence for post-transcriptional modulation」、Lab Invest 66:580-8、1992）。エラスチンの生成およびエラスチンの溶解は、理想的には定常状態のままである。

【0104】

動脈壁中でのエラスチンの崩壊とエラスチンの産生との間の関係に焦点をあてるアテローム性動脈硬化症のモデルが、提案されている（Robert Lら、「Elastin-elastase atherosclerosis revisited」、Atherosclerosis 140:281-295、1998）。このモデルに従うと、年齢に関連する血管壁の改変には、エラスチン溶解性の酵素のアップレギュレーションが含まれる。弾性組織中の脂質の進行性の沈着、ならびにリポタンパク質または脂質の細胞または器官培養物への添加は、マトリックスの生合成を改変し、そしてエラスターゼの発現をアップレギュレートすることが示されている。さらに、血管の平滑筋細胞上に存在するエラスチンラミニンレセプターは、若い被験体においてNO依存性の血管拡張作用およびコレステロール合成のダウンレギュレーションを誘発することが示されている。これらは、年齢とともに減少するかまたは消滅する機能である（Vargazら、「Age-dependent changes of K-elastin stimulated effector functions of human phagocytic cells: relevance for atherogenesis」、Exp Gerontol 32:653-62、1997）。これらの知見はまた、アテローム性動脈硬化症のプラーク中

に存在するTリンパ球に向かって伸びている。有意には、血管の損傷（例えば、バルーン血管形成術）の後、脈管内膜および中膜の平滑筋細胞の両方が増殖する（Strauss BHら、「Extracellular matrix remodeling after balloon angioplasty injury in a rabbit model of restenosis」、Circ Res 75:650-8、1994）。アテローム性動脈硬化症のプロセスに関連する血管の損傷においては、両方の細胞の型の同様の増殖が存在する。エラスチンの合成および平滑筋細胞の増殖は、動脈壁の損傷の修復の間にしっかりと調節されると考えられる（Aoyagi Mら、「Smooth muscle cell proliferation, elastin formation, and tropoelastin transcripts during the development of intimal thickening in rabbit carotid arteries after endothelial denudation」、Histochem Cell Biol 107:117、1997）。

【0105】

これがどの機構によって生じるかにはかかわらず、大動脈壁中のエラスチン含有量の減少は、動脈瘤の形成における重要なエレメントである。理論に束縛されるべきではないが、それにもかかわらず、本発明者らは、提案されている種々の機構を知る（Minion, DJ.ら、「Elastin is increased in abdominal aortic aneurysms」、J Surg Res, 57(4):443-6、1994年10月）。さらに、エラスチンの崩壊産物（EDP）は、大動脈壁をさらに崩壊させる炎症性のプロセスに寄与し得る。例えば、EDP（例えば、ペプチドVal-Gly-Val-Ala-Pro-Gly）を注入したラットは、弱められた大動脈を生じ、そして樹状細胞およびマクロファージについて走化性である（Senior, R. M.ら、J. Cell Biol., 99:870-874, 1984）。

【0106】

多数の観察は、エラスチンの酵素による分解が、動脈瘤の疾患の発生において

重要な役割を果たすことを示唆する。動脈瘤の壁中に見出される1つの型のエラスターゼは、ヒトのマクロファージに関連している (Curci JAら、「Expression and localization of macrophage elastase matrix metalloproteinase in abdominal aortic aneurysms」、*J. Clin. Invest.*, 102(11):1900-10、1998年12月1日)。実際、多数のタンパク質溶解性の酵素 (エラスターゼ、コラゲナーゼ、およびゼラチナーゼを含む) が、AAAを有する患者の大動脈の中膜中で増大した濃度で見出されている (Brophy, CMら、「*J Surg Research* 50:653-657、1991; VineおよびPowell、*Clinical Sci.*, 81:233-239、1991)。真菌性の動脈瘤においては、好中球に起源すると考えられるエラスターゼの増大が、動脈壁において確認されている (Buckmaster, MJら、「Source of elastin-degrading enzymes in mycotic aortic aneurysms: bacterial or inflammatory response?」、*Cardiovasc Surg*, 71:16-26、1999年1月)。エラスチンを崩壊させる能力を有する酵素である、MMP2、MMP3、およびMMP9が発現され、そしてAAAを有するヒトの大動脈中で増大した量で産生される (Sakalihasan, N.ら、「Activated forms of MMP2 and MMP9 in abdominal aortic aneurysms」、*J. Vasc. Surg.*, 24(1):127-33、1996年7月; Davis, V.ら、「Matrix metalloproteinase-2 production and its binding to the matrix are in abdominal aortic aneurysms」、*Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18(10):1625-33、1998年10月)。MMPの過剰発現と動脈瘤の形成との関係もまた、ラットのモデルにおいて観察されている (Allaire, E.ら、「Local overexpression of TIMP-1 prevents aor

tic aneurysm degeneration in a rat model」、J. Clin. Invest., 102(7):1413-20、1998年10月1日)。MMP-9を保有しているマクロファージもまた、一時的な動脈において同定されている。このことは、両方の状態において作用する病理学的なプロセスの間でいくらかの類似性が存在する可能性を生じる(Nikkari, ST.ら、「Macrophages contain 92-kd gelatinase (MMP-9) at the site of degenerated elastic lamina in temporal arteritis」、Am. J. Pathol., 149(5):1427-33、1996年11月)。

【0107】

最近の研究は、増大したエラスターゼ活性が、動脈瘤の形成に応答するよりも、第一の事象であるさらなる可能性が存在することを示唆した(Cohen, JRら、Annals Vascular Surgery 4:570-574、1990)。エラスチン組成における変更が、胸部の動脈瘤の解剖において観察されている。これはおそらく、破裂のための剥離の傾向にこの機構を関連付ける(Cattell, MA.ら、「Increased elastin content and decreased elastin concentration may be predictive factors in dissecting aneurysms of human thoracic aorta」、Cardiovasc Res., 27(2):176-81、1993年2月)。プラスミン(これは、潜在性のMMPの活性化を通じて直接および間接的に細胞外マトリックスを崩壊させ得る)もまた、AAA組織中で増大される。TIMPの低下した活性は、AAAの根底にある遺伝的な根拠として示唆されているが、DNA配列決定は、この主張を支持する証拠を提供していない(Tamarina NAら、「Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in aneurysms of the aorta」、Surgery、122(2):264-71; 考察271-2、1997年8月;

Elmore JRら、「Expression of matrix metalloproteinase and TIMPs in human abdominal aneurysms」、Ann Vasc Surg、12(3):221-8、1998年5月)。

【0108】

エラスチンの断片化を生じる因子が、AAAの病因において重要であり得るが、コラーゲンの合成および崩壊の平衡を調節する因子もまた、AAAの進行の速度を決定し得る(Halloran, B.G.およびBaxter, B.T., Sem. Vasc. Surg. 8:85-92、1995)。初期の研究は、コラーゲンが、AAAを有する患者中の大動脈の中膜の乾燥重量の増大した割合を含有することを示唆したが、他の研究は、正常なヒトの腹部の大動脈壁およびAAAを有する患者の腹部の大動脈壁が、同様のコラーゲンの量、ならびに同様のコラーゲン型間の比を含むことを示唆した(Menashi, S., J. Vasc. Surg., 578-582、1987)。しかし、動脈瘤の壁中でのコラーゲンの可溶性およびEDTAによって誘導される剥離に対するその過敏さは、AAA中では明らかに減少する(Sobolewski, K.ら、Act. Biocim. Polonica, 42:301-308、1995)。さらに、コラーゲンの代謝回転は、例えば、AAA患者の血液中のIII型プロコラーゲンのアミノ末端のプロペプチドの濃度、またはAAA患者の尿中のコラーゲンヒドロキシプロリンの濃度によって決定される場合に、AAA中で増大する。エラスチンのタンパク質溶解性の分解は、動脈瘤の拡張に最も特異的に関連するようであるが、コラーゲンの分解は最終的には、動脈瘤の破裂に必要とされることが、いく人かの研究者らによって考えられている(Dobrin, P.B.およびMrkvicka, R., Cardiovascular Surgery, 2:484-488、1994)。

【0109】

コラーゲンおよびエラスチンのレベルに加えて、AAA患者の腹部の大動脈中では、グリコサミノグリカンの量がわずかに減少され、コンドロイチン硫酸の割合が増大され、そして硫酸ヘパリンの割合が有意に減少される。さらに、ビグリ

カン (biglycan) mRNA レベルにおける明らかな減少は、アテローム性動脈硬化症および再狭窄と比較して、AAA について特有である。(Tamarinanaら、J. Surg. Research 74:76-80、1998)。腫瘍壊死因子、インターロイキン-1、インターロイキン-6、およびインターロイキン-8もまた、コントロールと比較してAAA組織中で増大されることが示されている(Hirose, H.ら、1997)。AAA中の炎症性のサイトカインの役割のさらなる議論が、次の節で提供される。

【0110】

大動脈壁の新血管形成もまた、AAAの顕著な成分である。AAAの内側の層中の微小血管の密度における有意な増大が、最近報告されている(Holmans, DRら、Gay Vasc. Surg. 21:761-772、1995)。研究は、AAAが明らかな脈管形成性の応答に関連することを実証した。これは、大動脈壁内の炎症の程度に関連する(Thompson, MM.ら、「Angiogenesis in abdominal aortic aneurysms」、Eur J Vasc Endovasc Surg, 11(4):464-9、1996年5月)。

【0111】

AAA組織は、有意に増大した亜硝酸イオンの濃度を有する。この濃度では、インビトロで弾力性のある線維の崩壊が公知である。AAAに関連する新血管のネットの内皮細胞は、マトリックス崩壊効果を有する窒素酸化物を産生し得る。まだ確立されてはいないが、これは、AAA組織中の亜硝酸塩の供給源が内因性(例えば、内皮細胞)または外因性(例えば、タバコの煙)、あるいはそれらの両方であり得ることを提案する論理である。エラスチンに対する亜硝酸塩の有害な影響が、種々の臨床的な条件下で観察されている。これは、成熟前の皮膚の加齢および肺性の肺気腫、ならびにAAAが挙げられ、これらの全ての状態は、タバコの喫煙と関係することが公知である(Paik DCら、「The nitrite/elastin reaction: implications for in vivo degenerative effects」、Connect Tissue Res, 36(3):241-51、1997)。気

腫 / COPD (これは、 - 抗トリプシンの欠損に関連する) が AAA の病状再燃または AAA の開始に関連するようであることは、興味深い。MZ - 1 - 抗トリプシン表現形は、1つの研究においては AAA を有する個体中で増大した頻度で見出されているが、これは、より大きなシリーズにおいては確認されていない (Cohen, J.R. ら、J Surg Research 49:319 - 321、1990)。

【0112】

(4.2b(v) AAA 中で免疫によって媒介されるプロセス)

種々の生物学的なプロセスの複雑な相互作用 (これは、長年にわたって作用し、最終的には大動脈壁を弱める) はまた、慢性的な炎症、自己免疫に関連するプロセス、新血管形成、および血管の平滑筋細胞の数における減少を含む。これらは、マトリックスを崩壊させるプロテイナーゼとそれらのインヒビターとの間 (中でも特に、マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) とプラスミノゲン活性化因子のファミリーとのメンバーの間) での平衡における少なくとも一部の変更を説明し得る。

【0113】

これらの種々の生物学的なプロセスの相互作用の顕著な例が、「炎症性の腹部の大動脈の動脈瘤」(IAAA) (大動脈壁から周辺組織へと伸びる、大量の炎症性細胞の浸潤によって特徴付けられる AAA) の外科手術を受けた患者において見出される。(Grange, J.J. ら、Cardiovasc. Surg., 5:256 - 265、1997)。AAA のこの発現は外科手術を受けた AAA 患者の 5 ~ 10% において見られる。この状況では、炎症性のプロセスは、大動脈の外膜から周辺の構造 (特に、腹膜後腔) を含むよう外側に拡大する。この状況は、外膜中のアレルギー型のプロセスによって生じ、これは局在化された炎症および線維症を刺激する最終的な影響を有すると仮定されている (Di Marzo ら、「Inflammatory aneurysm of the abdominal aorta. A prospective clinical study」、J Cardiovasc Surg (Torino)、40(3):407 - 12、1999年6月)。大動脈の周辺の組織中でのコラー

ゲンの増大した沈着が、IAAAにおいて観察されており、これは、AAAにおける確立された関係、および慢性的な炎症と線維症の刺激との間での他の設定と一致する(Gargiulo M.ら、「Content and turnover of extracellular matrix protein in human "nonspecific" inflammatory abdominal aortic aneurysms」、Eur J Vasc Surg, 7(5):546-53、1993年9月)。

【0114】

実際、AAAは多数の炎症性の疾患に関連する。これらには、Takayasu病(10~30%)および梅毒(66%)が含まれる(Pearce, W.H. およびKoch, A.E., Annals N.Y. Acad. Sci., 800:175-185、1996を参照のこと)。AAAはまた、大動脈壁の特定の成分を標的化する自己免疫プロセスに関連し得る。さらなる研究は、アポトーシスおよび細胞の老化の証拠を提供する。特定の炎症性のプロセスを罹患している、血管(動脈炎と呼ばれる)は、動脈瘤の形成を生じ得る。巨大な細胞の動脈炎およびTakayasu病は、血管に影響を与える炎症性のプロセスであり、これらの両方が、剥離を伴い得る胸部および腹部の大動脈の動脈瘤の潜在的な発症の傾向を有する(Joyce, JW、「Uncommon arteriopathies」、RB Rutherford編、Vascular Surgery、WB Saunders、1989、276-286頁)。両方の状態が、炎症性の単核細胞の浸潤および巨大な細胞を伴う局在化された動脈周囲炎によって特徴付けられる。これらは、動脈壁の弾性線維の破壊および断片化を伴う。両方の障害における動脈の炎症が開始し、そしてこれは、中膜中で最も顕著である。

【0115】

動脈炎の主な炎症性の障害中の動脈壁の崩壊の存在、および動脈壁の崩壊によって主に特徴付けられる障害中の炎症の存在は、炎症と血管壁に対する構造的な攻撃との間の相関関係に注目する。しかし、さらに、これらの状態と、異常な血管のパターンおよび血管周囲の線維症との間での関係が、観察されている。ま

めると、動脈壁破壊障害において観察される変更のスペクトルは、加速されたが、効果のない、慢性的な損傷および慢性的な炎症に対する創傷治癒応答（これは、大動脈壁に対して主に局在化される）を反映するようである。

【0116】

(4.2b(vi)AAAおよび動脈壁破壊障害中の線維症のプロセス)

通常の創傷の治癒は、炎症、結合組織マトリックスの崩壊および沈着、ならびに癒痕組織の形成の機構を含むと理解される。一般的には、創傷の治癒は、別個の連続して起こる段階（損傷に対する最初の応答（出血、血管狭窄、および浮腫の形成を伴う）、炎症（創傷への白血球の動員、および増殖因子の発現を伴う）、および線維増殖（コラーゲンの合成および架橋、マトリックス中の基質の産生、ならびに新血管の増殖を伴う）を含む）を通じて進行する。延長された（繰り返された外傷に起因して、および根底にある病理学的な状態に起因して）創傷の治癒は、慢性的な創傷を生じる。ここでは、創傷の修復の炎症の段階が継続し、それによって広範囲にわたる組織の損傷、および効果のない線維増殖を生じる。

【0117】

線維芽細胞は、創傷の治癒に関与している主な間葉性の細胞である。損傷した領域中の未分化の間葉性の細胞は、マクロファージ生成物によって刺激された場合に、線維芽細胞への分化を誘導され得る。より最近のデータは、介在性の線維芽細胞のサブクラスが、炎症性の細胞の直接的な動員、可溶性の媒介因子の放出、および/または線維芽細胞対免疫細胞の情報伝達の促進によって、免疫に関連するプロセスにおいて初期の役割を果たし得ることを示唆する。さらなる線維芽細胞は、走化性のサイトカインによって損傷した領域に対して付着させられる。PDGFは、例えば、線維芽細胞および平滑筋細胞の両方について走化性であることが、実証されている：(Seppa H.ら、「Platelet derived growth factor is a chemoattractant for fibroblasts」、J. Cell Biol. 92: 584-588、1984; Grotendorst GRら、「Platelet derived growth factor is a chemoattractant for vascular smooth muscl

e cells」、J. Cell Physiol 112:261-266、1982)。創傷中の間葉性の細胞の集団はさらに、存在している細胞および新しく生じた細胞の両方の増殖によって増大される。間葉性の細胞の増殖は、PDGF、TNF、IL-1、リンホカイン、インスリン、およびIGFによって刺激され得る。線維芽細胞は、創傷中でのコラーゲンの産生を担う。コラーゲン分子が線維芽細胞中で合成された後、これは、プロコラーゲンの形態で細胞外空間に分泌される。プロコラーゲンは、コラーゲン分子の鎖の持続的ならせん状ではない伸張によって同定され得る。細胞外空間での酵素によるこの直線状の伸張またはレジストレーションペプチドの切断によってトポコラーゲンが生じ、これは、コラーゲン原線維に凝集し得る。分子間架橋が、別々のコラーゲン分子間で形成される。これは、原線維の成熟としての共有結合によって置き換えられる。凝集していないトポコラーゲン分子は生理食塩水中で可溶性であるが、強酸および高温が、成熟によって架橋されたコラーゲンを可溶化するために必要とされる。細胞外結合組織マトリックスは、コラーゲン以外の成分(プロテオグリカン、接着タンパク質(例えば、フィブロネクチン)、マイクロフィラメント、およびエラスチンを含む)を含有する。エラスチンは、代表的には、炎症、創傷の治癒、または損傷の応答の一部としては合成されないが、これは、いくつかの場合においては、これらの状況から合成され得る。

【0118】

血管の損傷に対する応答は、特定の動脈壁破壊障害(詳細には、AAA)に共通して関連している障害である、アテローム性動脈硬化症の発症を説明することが可能であると理解される。アテローム性動脈硬化症のプロセスは、動脈壁中での脂質によって誘導される生物学的な変更を含み、これは、血管壁から離れた血液成分の液体相を維持する恒常性の崩壊を生じる。内皮に対する他の損傷もまた、アテローム性動脈硬化症に関係している。物理的な損傷、虚血、毒素、生物学的な損傷、機械的なストレス、および免疫学的な攻撃のような多様な損傷が、アテローム性動脈硬化症に関係している。少なくとも4つの細胞型が、損傷に対する血管壁の応答に関与している:内皮細胞、単核細胞、血小板、および平滑筋細胞。これらのそれぞれは、損傷した血管壁の再構成のために意図される、増殖因

子、ケモカイン、線維形成誘導性のペプチド、化学接着因子、および合成の生成物を放出し得る。

【0119】

アテローム性動脈硬化症の組織学的な進行は、最初の脈間内膜によって開始する。これは、内腔内の血液動態の変更に対する血管の適応を反映し得る。脈間内膜の肥厚、およびさらなる進行性のアテローム性動脈硬化症の病変は、代表的には、血管の分岐によって同定される。ここでは、内皮細胞に対する乱流および剪断ストレスが最も大きい。最初の肥厚の病変は、脂肪の条痕を形成するように進行し得る。ここでは、脂肪は、泡細胞と呼ばれる脂肪を積み込んだマクロファージによって生じた、脈間内膜の層中に微視的に見られる。脂肪の条痕は分解され得るが、より一般的には線維状のプラークを形成するように進行する。線維状のプラークは、血管壁のすぐ内皮下の領域に見られ、これは、線維状のキャップで覆われた組織化された平滑筋細胞のコンパクトでありそして層状になった層から構成される。最も進行したアテローム性動脈硬化症の病変、および血管壁の動脈瘤の拡張に関連するものは、顕著なカルシウムの沈着を有する密度の高い線維状の組織から構成される。

【0120】

組織の損傷に対する正常な応答は炎症であるので、アテローム性動脈硬化症の病変が、複合的な慢性的な炎症性の応答（単核細胞白血球の浸潤、細胞の増殖および移動、細胞外マトリックスの再組織化、および新血管形成を含む）を示すことが理解される。実際、アテローム斑は、炎症性の細胞および免疫細胞、線維状の組織、ならびに脂肪物質（例えば、低密度の脂質（LDL）およびそれらの改変体、ならびに - リポタンパク質）の混合物から構成される。アテローム斑の形成の原因および機構は完全には理解されていないが、多くの理論が存在する。アテローム性動脈硬化症の病因の1つの理論は、以下の段階を含む：（1）内皮細胞の不全および/または損傷、（2）単核細胞の動員およびマクロファージの形成、（3）脂質の沈着および改変、（4）血管の平滑筋細胞の増殖、ならびに（5）細胞外マトリックスの合成。

【0121】

その最初の段階においては、内皮細胞の損傷に対する炎症性の応答は、血管壁に対する白血球の接着によって特徴付けられる。損傷した内皮の表面に対する白血球の接着は、内皮および好中球の表面上のいくつかの複合的な糖タンパク質によって媒介される。これらの結合分子の2つが、十分に特徴付けられている：内皮白血球接着分子-1 (ELAM-1) および細胞内接着分子-1 (ICAM-1)。炎症段階の間には、関連する細胞の表面に対する好中球の接着は、大きく増大する。これは主に、これらの結合分子のアップレギュレーションおよび増強された発現に起因する。インターロイキン-1 (IL-1)、腫瘍壊死因子 (TNF)、リンホトキシン、および細菌の内毒素を含む物質が、組織の損傷に対する炎症性の応答の主な媒介因子と考えられる。これらの全てが、これらの結合物質の産生を増大する。

【0122】

損傷した血管壁への結合の後、白血球はその中に移動する。一旦血管の中の適所にくると、白血球 (特に、活性化されたマクロファージ) は、次いで、IL-1、TNF、プロスタグランジン E_2 (PGE $_2$)、bFGF、ならびに形質転換成長因子 および (TGF、TGF) を含むさらなる炎症媒介因子を放出する。これらの炎症媒介因子の全てが、損傷した領域に対してさらに炎症性の細胞を動員し、そして平滑筋のさらなる増殖および移動を調節する。単核細胞-マクロファージによって作られた周知の増殖因子は、単核細胞に由来する増殖因子 およびマクロファージに由来する増殖因子 (MDGF) であり、これは、平滑筋細胞および線維芽細胞の増殖の刺激因子である。MDGFは、血小板に由来する増殖因子 (PDGF) と類似であることが理解されている；実際、これらの2つの物質は同一であり得る。平滑筋細胞の増殖を刺激することによって、炎症は、筋芽脈間内皮 (myointimal) の過形成の発症および進行に寄与し得る。

【0123】

炎症の上記の化学的な媒介因子によって血管壁に付着させられた白血球は、局所的な損傷を悪化させ得るそして治癒応答を延長し得る、血管壁に対して直接的な影響を有する物質を生じる。最初に、炎症のプロセスによって活性化された白血

球は、コラーゲンおよび他の構造タンパク質を消化し得るリソソーム酵素を分泌する。血管壁中のこれらの酵素の放出は、その細胞外マトリックスの完全性に影響を与え得、SMC、および他の移動性の細胞が壁をより容易に通過することを可能にする。従って、これらのリソソームプロテアーゼの放出は、筋芽脈間内皮の過形成を導くプロセスを増強し得る。第2に、活性化された白血球は、それらの細胞膜に対するNADPH系の作用によってフリーラジカルを産生する。これらのフリーラジカルは、細胞性のエレメントを直接損傷し得、これによって局所的な損傷の拡大、または損傷 - 炎症 - 治癒のサイクルの延長を導き得る。

【0124】

この理論に従うと、アテローム性動脈硬化症の開始は、主に、おそらく、機械的なストレスまたは化学的なストレスによる損傷の形成に起因する。この損傷に対して体が応答する方法は、次いで、損傷がアテローム性動脈硬化症の病変に悪化するか否か、およびどの程度迅速に悪化するかを規定する。内皮の損傷後に、一連の修復機構が開始されることが公知である。損傷から数分以内に、血小板およびフィブリンの層が、損傷した内皮を被って沈着する。数時間から数日以内に、炎症性の細胞は、損傷した領域に対する浸潤を開始する。損傷後の24時間以内に、血管の中膜中に局在化された血管の平滑筋細胞(SMC)が、DNA合成を開始する。数日後、これらの活性化された合成のSMCは、内部の弾力性のある薄膜を通じて内腔の表面に対して移動する。新脈間内皮が、それらの持続的な複製および細胞外マトリックスのそれらの産生によって、これらの細胞によって形成される。脈間内皮の厚さにおける増大が、細胞性の増殖マトリックスの沈着を進行しながら生じる。血管の治癒のこれらのプロセスが過度に進行する場合には、病理学的な状態が生じる。平滑筋細胞および新脈間内皮の過増殖は、例えば、血管造影法の後の再狭窄の発症に関連する。

【0125】

上記の血管壁の損傷修復のサイクルが、内皮の損傷およびアテローム性動脈硬化症の発症に関して詳細に記載されているが、血管壁に対する他の損傷が、損傷の修復の匹敵するプロセスを誘発するようであることが理解される。例えば、血管壁の損傷の供給源は、血管壁中の免疫学的に活性化された細胞から、または炎

症性のサイトカインから、または異常なタンパク質から、または遺伝子の変異もしくは異常性から生じ得る。他の組織は、同様の組織の損傷と修復の間の相互作用を明らかにし、これは、炎症と線維症のプロセスとの関係を含む。肺の状態（例えば、突発性の肺の線維症）においては、これらのプロセスの相関関係が顕著であり得、病理学的な結果としての組織の線維症を伴う。別の例としての全身的な硬化は、散在性の組織の線維症によって特徴付けられる多発性の全身性の障害である。ここでは、免疫学的な機構、血管の損傷、および線維芽細胞の活性化が、重要な事象である。腎臓の腸管の線維症は、同様に、損傷の修復の免疫によって媒介される成分および非免疫によって媒介される成分の組合せが顕著である。創傷の治癒における炎症と線維症との相互作用の他の例は、医学の分野の当業者に容易に明らかである。線維症の状態の処置のための可能性のある治療の標的として、損傷修復プロセス中の種々の因子に影響を与える試薬、（例えば、 $\alpha 1 \beta 1$ インテグリンに影響を与える試薬（ここでは、 $\alpha 1 \beta 1$ は、コラーゲン遺伝子の発現のダウンレギュレーションを誘導するシグナルを媒介すると理解され、そして $\alpha 2 \beta 1$ は、MMP - 1 の発現を媒介すると理解される））、線維芽細胞の増殖に影響を与える試薬、マクロファージの活性化および動員に影響を与える試薬、平滑筋細胞の分化および増殖に影響を与える試薬、TGF - および他のサイトキナーゼおよびケモキナーゼに影響を与える試薬、ならびに遺伝子発現、導入遺伝子に影響を与える試薬などが挙げられる。代表的な治療標的として、CTGF、インターフェロン、リラキシン、TGF $\beta 3$ 、HGF、プロリルヒドロキシラーゼ、C - プロテイナーゼ、リジルオキシダーゼ、およびアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられるが、他の治療標的が、慣用的にすぎない実験を使用することなく関連分野の当業者によって同定される。

【0126】

表1は、「脈絡膜の線維症」中のその発現が評価されている分子のリストを示す。これらの分子は、損傷の修復および線維症の経過に影響を与えるための治療的な操作のさらなる標的を示す。線維症のプロセスと動脈壁破壊障害との間の関係の認識は、AAAのような動脈壁破壊障害の発症または進行に対する有用な影響を有するプロセスに対して指向された治療用の試薬の開発を可能にし得る。

【0127】

【表2】

表1

分子	脈絡膜の線維症対コントロール中での発現
B I G H 3	減少
b 1 - インテグリン	増大
コラーゲン 3 a 1	変化なし
コラーゲン 1 a 1	変化なし
コラーゲン 1 a 2	変化なし
コラーゲン 6 a 1	変化なし
コラーゲン 6 a 2	増大
コラーゲン 6 a 3	増大
エラスチン	増大
フィブリン-1	変化なし
フィブリン-2	変化なし
フィブリン-3	変化なし
フィブリン-4	変化なし
フィブリン-5	変化なし
FBN-2	変化なし
HLA-DR b	変化なし
HME	増大
I g K	変化なし
ラミニンレセプター	変化なし
L a m C 2	変化なし

従って、炎症、損傷、治癒、および関連する生物学的な現象の間での観察された関係に基づくと、AAAの研究の1つの主要なスラストは、炎症性のプロセスに向けられ、そしてその動脈壁のマトリックスの再モデル化の調節に向けられる(Grange, J. J.ら、Cardio. Vasc. Surg. 5: 256 - 265、1997)。動脈瘤の大動脈の中膜内の炎症性の細胞の存在が、マトリックス崩壊性のプロテイナーゼの産生を通じて、エラスチンおよびコラーゲンの崩壊において重要な役割を果たし得ることが、提案されている(Newman, K. M.ら、「Matrix metalloproteinases in abdominal aortic aneurysm: characterization, purification, and their possi

ble sources」、Connect Tissue Res., 30 (4): 265 - 76、1994)。動脈瘤の大動脈の中膜中の炎症性の細胞の存在は、マトリックス崩壊性のプロテナーゼの産生を通じて、エラスチンおよびコラーゲンの崩壊において重要な役割を果たし得る。炎症性のAAAに関連する主な免疫細胞は、活性化T細胞、そしてマクロファージ、樹状細胞、およびB細胞もまた、同定されている (Lebermann, J.ら、J. Vasc. Surg. 15: 569 - 572、1992)。免疫細胞はまた、AAAの拡大に関連している (Freestone, T.ら、「Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal a aneurysm」、Arterioscler Thromb Vasc Biol., 15(8): 1145 - 51、1995年8月)。血管の樹状細胞 (CD1aおよびS100ポジティブ) は、CD3、CD4、およびCD8ポジティブT細胞またはCD20ポジティブB細胞の間に接触して、動脈瘤の大動脈の中膜および外膜の両方に存在することが示されている (Bobryshev, Y. V.ら、Cardiovascular Surgery、6(3): 240 - 249、1998)。T細胞の炎症反応が動脈瘤の再配置後に解消するので、炎症性の応答を誘発する物質が動脈瘤の壁中に存在し得る。免疫応答が動脈瘤の前にあるかまたはそれらの結果であるかどうかは、さらなる研究が待ちうけている。

【0128】

他の研究者 (Coch, A. E.ら、Am. J. Path., 137: 1199 - 1213、1990) は、「炎症性のAAA」だけではなく非炎症性のAAAもまた、炎症により媒介される事象であることを示唆するデータを提供した。多数の観察が、AAAが大動脈壁の成分に対する自己免疫応答によって引き起こされ得るという主張を支持する。セロイド (「年齢色素」 (「大動脈の含有物」 (これは、AAA中の周辺組織に漏れる)) が、この状態を担う免疫原であり得ることが示唆されている (Coch, A. E.ら、AM. J. Path., 137: 1199 - 1213、1990; Beckman, E. N., AM. J. Clin. Pathol., 85: 21 - 24、1986; Ball, R. Y.ら

、*Arc. Pathol. Lab. Med.* , 111:1134-1140、1987; Brophy, C. M. ら、*Annals Vasc. Surg.* , 5:229-233、1991; Ball, R. Y. ら、*Arc. Pathol. Lab. Med.* , 111:1134-1140、1987)。セロイドは、一般的には色素のリポフスチン基に関連し、これは、不飽和の脂質または脂質-タンパク質複合体の以前の酸化に由来すると考えられる。これは、有機溶媒に不溶性でありそしてオイルレッドOのような脂質可溶性の色素に結合する自己蛍光材料である。AAAに関連する壊死の場合においては、セロイドは、死亡した細胞から漏出し得、そして続いてマクロファージによって食作用され得る。同様の状況がアテローム性動脈硬化症において生じ、ここでは、セロイドは、脈絡膜硝子朖および他の構造中のアテローム性動脈硬化症のアテローム斑中で豊富である (Yardley ら、*Arch. Pathol. Lab. Med.* 111:1134-1140、1987)。さらに、AAAの標本の組織学的な試験は、Russell 体の存在を明らかにする。これは、自己免疫疾患の特徴である。

【0129】

自己免疫障害のスペクトル中では、特定のHLA対立遺伝子が、種々の特異的な状態において自己抗原としての細胞-タンパク質の提示において重要な役割を果たす。最近の研究は、クラスII組織適合性の抗原が、ヒトのAAA中の血管の平滑筋細胞によって発現されること、およびこれらの変更された平滑筋細胞が大動脈のリンパ球の浸潤の標的であり得ることのデータを提供する (Kosierkiewicz, T. A. ら、*Surg. Forum* 46:365-367、1995)。さらに最近の研究は、HLA-DR2(15)が日本人の集団におけるAAAについての遺伝的な危険因子として重要な役割を有すること (Hirose, H. ら、*J. Vasc. Surg.* 27:500-503、1998)、および明確な遺伝的な危険性が、炎症性のAAAを有する患者のHLA-DRB1遺伝子座にマップされ得ることを示す (Rasmussen, T. E. ら、*J. Vasc. Surg.* 25:356-364、1997)。

【0130】

いくつかの免疫媒介性障害 (例えば、慢性関節リウマチおよび糸球体腎炎) に

において、イムノグロブリン沈降および補体活性化は組織の破壊に関連する。補体系は、走化性、マクロファージ活性化、および細胞死における役割を有する、炎症および免疫の重要な媒介物であると理解される。補体カスケードは、イムノグロブリンMおよびGによる古典的な経路で、あるいは組織を有する表面を活性化することによって活性化される。AAAにとって重要なことに、Capellaら(J. Surg. Research 65:31-33, 1996)は、AAAドナーの大動脈壁におけるC3およびIgGのレベルの上昇が存在することを実証し、これは、AAAについての免疫媒介性病態生理学の概念にさらなる裏付けを与える。AAAの変性している培地中の大量のIgGの存在は、さらに、特定の免疫応答がAAAの病因に寄与し得るという推測を導く。B細胞もまた同定された(Pasquinelli G,ら、「An immunohistochemical study of inflammatory abdominal aortic aneurysm」J Submicrosc Cytol Pathol, 25(1):103-12 1993年1月)。しかし、最近の研究の1つにおいて、AAAにおけるイムノグロブリン重鎖遺伝子のレポトリーを調査することが、アテローム硬化症のAAAの大多数において、B細胞富化外膜浸潤物が組織抗原の限られたレポトリーの自己免疫応答ではないことを示唆する、ということが指摘されている(Walton, L.J.ら, Atherosclerosis 135:65-71, 1997)。

【0131】

多くの研究者が、最近、AAAから単離されたIgGが、分離されたAAA大動脈抽出物のウエスタンブロットにおいて40kDa~80kDaで移動する主要なタンパク質バンドに対して反応することを実証した(Tilson, MD, Biochem. Biophys. Research Communication, 213:40-43, 1995; Xia, Sら, Biochem. Biophys. Research Communication, 219:36-39, 1996; Gregory AKら, Arc Surg, 131:85-88, 1996)。40kDaの自己抗原のさらなる研究は、それが細線維関連の糖タンパク質(MAGP)に対して高いアミノ酸配列相同性を有することを示す

。細線維は、弾性形成の間、トロポエラスチン沈降のための構築用骨格として作用するので、AAA中のエラスチンの酵素的分解は、細線維タンパク質関連の前もってマスクされたエピトープを暴露すると推測され得る。次にこのことは、これらのエピトープの認識および自己免疫応答の開始を導き得る。Tilsonおよび共同研究者(J. Vasc. Surg. 26:313-318, 1997)は、ヒト大動脈からウシ大動脈のMAGP-36に相同なタンパク質を精製した(AAAP-40と示される);このタンパク質は、AAAを有する患者の血漿および大動脈壁から精製されたIgGと免疫反応性である。AAAP-40(ならびにMAGP-36)は、フィブリノーゲン様およびビトロネクチン様のモチーフを有し、そしてファミリーのイムノグロブリンとの類似性を共有する。Tilsonおよび共同研究者はまた、いくつかの細菌性およびウイルス性の病原体(例えば、CMV、ヘルペスウイルス)が、AAAP-40の分子類似物であり得、自己タンパク質に対して自己免疫応答を開始し得ることを示唆した(Ozsvath, K.ら、Annals NY Acad. Sci., 800:288-293, 1996)。

【0132】

種々の炎症性サイトカイン、化学誘引物質、ペプチド増殖因子、および免疫細胞が、動脈瘤組織において見出されており、疾患の病原論における炎症性媒介物または免疫細胞についての可能なモデルを示唆する。腫瘍壊死因子(TNF)、インターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン-6(IL-6)、およびインターロイキン-8(IL-8)は、コントロールと比較した場合、AAA組織において上昇される。(Hirose, H.ら、J. Vasc. Surg. 26:313-318, 1997)。IL-1Bは、AAAと関連していた。(Keen RR, ら、「Interleukin-1 beta induces differential gene expression in aortic smooth muscle」J Vasc Surg, 20(5):774-84; discussion 784-6 1994年11月)。ことによると、上昇したIL-1レベルまたはTNF- α レベルの結果、ICAM-1発現の有意な上昇もまたAAAにおいて実証され、これは大動脈壁へ

の炎症性細胞の漸増を高め得る。(Davis, Cら、J. Vasc. Surg., 16: 474 - 475A, 1992; Pearce, W.H., 179で前出)。さらに、可溶性ICAMが、おそらく膜結合性ICAM-1の切断に起因して、AAA罹患組織の上清中で検出された。酸化されたLDLまたはエラスチンのフラグメントもまた、炎症性応答を開始し得る。

【0133】

大動脈中にマクロファージおよびリンパ球を誘引する特定の因子は報告されていないが、走化性の弾性溶解性(elastolytic)ペプチドおよび他のマトリックス結合した炎症の媒介物は、単球浸潤のための潜在的な刺激として作用し得る。(Senior, R.M.ら、J. Cell Biol., 99: 870 - 874, 1984)。さらに、ウロキナーゼ型(uPA)プラスミノゲン活性化因子および組織型(tPA)プラスミノゲン活性化因子の上昇したレベルは、AAA組織において記録されており、そしてAAAに特徴的な炎症性浸潤物内でマクロファージに局在化されていた。(Reilly, J.M., Annals NY Acad. Sci., 800: 151 - 156, 1996)。炎症性サイトカインとアテローム硬化症との間の関連性は、十分に確立されている。サイトカイン媒介性機構または免疫学的機構は、アテローム硬化症およびアテローム硬化性閉塞疾患と動脈壁破壊障害との間で重複し得る。

【0134】

(4.2b(vii) AAAへの薬理的介入)

AAAの処置が外科的であることは、当該分野において十分に確立されている。現在、臨床的に用いられる薬理的介入は存在しない。潜在的な病態生理学のプロセスの認識は、AAAを安定化し、そしてAAAの拡大を妨げるように、AAAの破壊を妨げるように、または必要に応じて、AAAの退化をもたらすようにAAAを処置する際に有用であり得る治療について、推測がなされることを可能にした。動脈瘤関連遺伝子の同定は、AAAの発生または進行に関連したDNA、mRNA、またはタンパク質の操作を可能にし得る。(Grange JJ, ら、「Pathogenesis of abdominal aortic aneurysm: an update and look toward

the future」*Cardiovasc Surg*, 5(3):256-65 (1997年6月)。あるいは、抗炎症薬またはプロテアーゼインヒビターの臨床試験が保証される。さらに、動脈瘤または他の動脈壁破壊障害を誘導するか、または悪化させる試薬の同定は、臨床医にとって重要であり得、その結果、彼らは、問題の試薬が無関係の有益な治療効果を有し得る場合でさえ、このような障害の発生または進行の危険性がある患者におけるそれらの試薬の使用を避けることについての決定をし得る。さらに、試薬が動脈壁破壊障害を処置する際の効力を有することが確認される場合、これらの試薬は、AMDの治療にもまた適用可能である。

【0135】

動脈瘤性疾患が他の自己免疫疾患と特徴を共有するという概念は、AAAの処置および予防への新しいアプローチのための道を開く。これらの処置様式は、代わって、AMDのような関連疾患に対して有益な効果を有し得る。大動脈の自己抗原に対する耐性が誘導されると、例えば、慢性関節リウマチを有する患者に用いられた様式と同様の様式で、大動脈の変性の進行を調節することが可能であり得る(Trentham, D.E., ら、*Science* 261:1727-1730, 1993)。白血球CD-18分子に対するモノクローナル抗体は、AAAに関連する炎症を減少させ、そしてその拡大を緩和することが実験的に示された。(Ricci MA, ら、「Anti-CD 18 monoclonal antibody slows experimental aortic aneurysm expansion」*J Vasc Surg*, 23(2):301-7 (1996年2月)。AAAの拡大における、免疫関連性の細胞表面分子および接着分子の役割のさらなる評価は、薬理的介入の同定がこれらのレセプター部位を調節することを可能にする。

【0136】

弾性溶解性MMP(特に、MMP9およびMMP2)が、増加した量でヒトAAAにおいて発現されかつ生成されるという発見は、これらの酵素がこの疾患における薬物療法のための理論上の標的として作用し得る可能性を導いた(Thompson, R.W. およびW.C. Parks *Annals N.Y. Ac*

ad. Sci., 800: 157-174, 1996)。実際、MMP活性の阻害は、AAAの動物モデルにおいて、インビボで、大動脈のエラスチン分解を抑制することを示した。(Thompson RW, ら、「MMP inhibition in abdominal aortic aneurysms. Rationale for a prospective randomized clinical trial」Ann NY Acad Sci, 878 (-HD-): 159-78 1999年6月30日)。実験的に誘導されたAAAに対して効力を有する多数のMMPインヒビターが、同定された。ヒドロキサム塩ベースのMMPアンタゴニストRS312908は、エラスターゼを阻害し、大動脈壁におけるエラスチンの維持を促進し、そしてそこでの前線維症の応答を高めることが見出された。(Moore G, ら、「Suppression of experimental abdominal aortic aneurysms by systemic treatment with hydroxamate-based matrix metalloproteinase inhibitor (RS 132908)」J Vasc Surg, 20(3): 522-32 1999年5月)。MMPインヒビターBB-94 (バチマスタット (batimastat) としても公知) は、MMPの直接的な阻害によって、および局所的な炎症応答のさらなる制御によって、実験用のAAAの拡大を制限する。(Bigatel DA, ら、「The matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 limits expansion of experimental abdominal aortic aneurysms」J Vasc Surg, 29(1): 130-8; discussion 138-9 1999年1月)。

【0137】

カルシウムチャネル遮断薬は、血管平滑筋細胞によって分泌されたメタロプロテイナーゼのタンパク質分解活性を増加することが示された。例えば、アムロジピンは、組織培養物において、エラスチン分解を高め、そしてMMP-9活性を増強する試薬であると同定された。(Boyle JR, ら、「Amlodip

ine potentiates metalloproteinase activity and accelerates elastin degradation in a model of aneurysmal disease」Eur J Vasc Endovasc Surg, 16(5): 408-14 (1998年11月)。この機構のさらなる精巧さによって、MMP活性を妨げ、従って動脈壁組織をさらなる変性から保護するための介入が可能になる。この発見はまた、動脈瘤形成の危険性が増加した患者における、他の心臓血管の状態のためのカルシウムチャネル遮断剤の使用を避けるように、臨床医を導き得る。動脈壁破壊障害(動脈瘤および解離を含む)の発生を開始するか、または増加させる他の物質の同定が期待され得る。一旦このような物質が同定されると、臨床医は、動脈壁破壊障害に罹患しているか、またはその危険性がある患者にそれらを使用することを避けるようである。これらの試薬は、同様に、AMDの発生または進行に対して有害な影響を及ぼすということが決定され得る。

【0138】

AAAの基礎科学のさらなる理解は、単核炎症性細胞に関連したプロテナーゼの操作ならびに関連した炎症性プロセスの操作を含む、さらなる治療的ストラテジーの開発を導くようである。(Thompson RW, 「Basic science of abdominal aortic aneurysms: emerging therapeutic strategies for an unresolved clinical problem」Curr Opin Cardiol, 11(5): 504-18 (1996年9月)。AAAの血管生物学のさらなる理解もまた、治療的な意味を有する予想外の発見を生じ得る。例えば、MMP阻害性を示す特定の抗生物質(例えば、ドキシサイクリン)は、実験的動脈瘤の拡大に対する阻害剤としての研究である。(Boyle JR, 「Doxycycline inhibits elastin degradation and reduces metalloproteinase activity in a model of aneurysmal disease」J Vasc Surg, 27(2): 354-61 (1998年2月)。1つの研究において、非抗生物質テトラサイクリンおよ

び一般的抗生物質ドキシサイクリンは、用量依存性の動脈瘤抑制効果を有することが確認され、この効果は、MMPの炎症性応答または動脈壁生成のいずれかを変えることなく、エラスチンの破壊の制限を生じた。(Curci JA,ら「Pharmacologic suppression of experimental abdominal aortic aneurysms: trial of doxycycline and four chemically modified tetracyclines」J Vasc Surg, 28(6):1082-93 1998年12月)。

【0139】

炎症の一般的な阻害は、AAAの拡大を制限することに対していくらかの効果をもつようである。AMDへの、関連する有益な効果が存在し得る。例えば、PGE₂の、大動脈平滑筋の生存能力およびサイトカインの分泌に対する有害な効果が当該分野において理解される。プロスタグランジン合成を阻害する薬物は、動脈瘤の処置または予防において有用であり得る。(Walton LJ,ら「Inhibition of prostaglandin E₂ synthesis in abdominal aortic aneurysms: implications for smooth muscle cell viability, inflammatory processes, and the expansion of abdominal aortic aneurysms」Circulation, 100(1):48-54 1999年7月6日)。ラットモデルにおいて、インドメタシンは、おそらくMMP-9のマクロファージ発現を減少させることによって、動脈瘤の生長を阻害することが示された。(Holmes DR,ら「Indomethacin prevents elastase-induced abdominal aortic aneurysms in the rat」J Surg Res, 63(1):305-9 1996年6月)。動脈瘤の生長を弱めることにおけるインドメタシンの役割は、PGE₂およびMMP-9を減少させる、シクロオキシゲナーゼのcox2アイソフォームによって媒介されると考えられる。(Miralles M,ら「Indomethacin inhibits e

expansion of experimental aortic aneurysms via inhibiting the cox2 isoform of cyclooxygenase」J Vasc Surg, 29(5): 884-92; discussion 892-3 (1999年5月)。

【0140】

プロプラノロール(Propranolol)(遮断薬)もまた、AAAのマウスモデルにおいて、動脈瘤の発達を抑制すると記録されており、作用の機構は結合組織性架橋の増強によると考えられる(Brophy, CMら、J. Surg. Research 46: 330-332, 1989)。プロプラノロールおよび関連した遮断薬はまた、動脈瘤の拡大を促進すると理解される全身性高血圧を減少することにおいて有効であることが知られている。遮断剤および他の抗高血圧剤は、動脈解離(代表的にはAAAに付随しない動脈壁破壊性障害の症状)の処置の主軸を形成する。(Dzau VJら、「Diseases of the aorta」1394-1398頁 AS Fauciら、編、Harrison's Principles of Internal Medicine, 第14版, McGraw-Hill 1998)。

【0141】

4.4 動脈壁破壊障害およびAMD

多数の驚くべき類似性が、眼球のRPE - ブルーフ膜 - 脈絡膜複合体の構造、組成、および病理学と、動脈壁のそれとの間に存在する。さらなる類似性が、これらの組織における病理学的変化によって引き起こされる疾患(すなわち、黄斑変性および動脈壁破壊障害)種々の公知の危険因子の間に観察される。これらの共有される危険因子には、遺伝率、高血圧による増悪(exacerbation)、喫煙、年齢、および慢性閉塞性肺疾患との潜在的な関連、a1アンチトリプシン欠損、およびアテローム性動脈硬化症が含まれる。

【0142】

RPE - ブルーフ膜 - 脈絡膜複合体は、コンフルエントな上皮細胞単層、ブルーフ膜と呼ばれる層状のコラーゲン - エラスチン - コラーゲンマトリックス、およびゆるく構成された線維芽細胞、平滑筋細胞、周皮細胞、毛細血管、コラーゲ

ン繊維の束（強膜結合部の近く）、およびその他の細胞外マトリックス構成要素から構成される脈絡間質から構成される。重なっている強膜は、大部分、密にパッケージされたコラーゲンといくらかのエラスチンから構成される。ブルーフ膜は、網膜のRPEと脈絡膜の一次網膜血管床（脈絡毛細管板）との間にある三重層の細胞外マトリックス複合体である。ブルーフ膜は、エラスチンから大部分なる中央ドメインに隣接する内部膠原層および外部膠原層と呼ばれる2つのコラーゲン層から構成される。網膜とその栄養素の主要供給源（脈絡膜脈管構造）との間のブルーフ膜の戦略的な配置は、正常な網膜機能にとって必須である（Marshallら、1998；GuymerおよびBird、1998）。免疫組織化学的研究により、ブルーフ膜固有層内にI型、III型、IV型、V型、およびVI型コラーゲンの存在が記録されている（Das、1990#670；Marshall、1992#671）。VI型は、弾性層と特に関連し、IV型およびV型は、脈絡毛細管板およびRPEの基底層、そしてI型およびIII型は、内部膠原層および外部膠原層と関連する。これらの組織におけるI型、III型、IV型、およびV型コラーゲンの存在は、生化学的に確認されている。組織化学的な研究は、ブルーフ膜におけるグリコスフィンゴ脂質の存在を示唆する（Farkas、1971#38）。これらの構造的および組成的な類似性に加えて、動脈壁破壊障害（AAA、TAA、TAAA、急性解離性動脈瘤、大動脈狭窄、アテローム性動脈硬化症）について記載されるものに類似する病原的機構は、RPE - ブルーフ膜 - 脈絡膜複体内に観察される。動脈疾患と関連する明確な病理的特徴には、タンパク質 - 脂質プラークの沈着および破壊；エラスチンおよびコラーゲンの分解；種々の細胞外マトリックスタンパク質および関連する構築物のアップおよび/またはダウンレギュレーション；炎症性細胞（樹状細胞を含む）の浸潤；血管壁の細胞外成分に対して指向された自己抗体の生成；「慢性炎症」；新血管新生；および繊維芽細胞および平滑筋細胞/周皮細胞の増殖が含まれる。多くの観点において、ブルーフ膜における多くの年齢関連変化は、アテローム性動脈硬化症の間に血管壁において観察されるものに匹敵する（Bilatto、1996#680）。

【0143】

老化、および、加齢に関連する疾患（AMDを含む）（動脈壁破壊性障害におけるものと類似する）においてブルーフ膜において生じることが知られている病理学的な変化には、以下が含まれる：結晶腔と呼ばれる異常な細胞外沈着物、基底層沈着物、および基底ライナー沈着物の沈着（Hageman, 1997; Marshallら、1998; GuymerおよびBird、1998）、進行性肥厚（Feeney - BurnsおよびEllersieck, 1985; Bird, 1992; Newsomeら、1987a, b; Ramrattanら、1994）、脂質およびその他の細胞外物質の蓄積（Pauleikhoffら、1990, 1992; Sheraidahら、1993; Holzら、1994a, b）、カルシウム沈着および断片化の程度の変化（SpraulおよびGrossniklaus、1997）、コラーゲンおよびエラスチンの改変および分解（FeherおよびValu, 1967）、進行したグリコシル化末端（AGE）産物ペントシジンおよびカルボキシメチルリジンの増加（Ishibashiら、1998; Hanadaら、1999）、斑における（しかし、末梢においてではない）非膠原タンパク質の量の増加（Hewittら、1989; Karatowskiら、1995）；および加齢に伴うブルーフ膜コラーゲンの可溶性の有意な減少（最初の10年における100%～9番目の10年における40～50%まで）（Wojciech）。機能的に、これらのプロセスは、加齢と伴に生じることが記録されている（Mooraら、1995; Staritaら、1996; Hodgettsら、1998a, b）ブルーフ膜の水の伝導性における指数関数的な減少を引き起こし得、これらは、直観的に、RPE - ブルーフ膜の界面の正常な機能を妨げなければならない。細片が内部膠原層に最初に蓄積する事実（Feeney - BurnsおよびEllersieck, 1985; Newsomeら、1987）は、弾性層が加齢に伴う透過性に対する抵抗性の重要な部位であることを示唆し得る。ブルーフ膜を介する巨大な流れのこの加齢に関連する妨害は、色素上皮の乖離を生じ得（Bird, 1992）、RPEの生理学に対する顕著な効果を有する。

【0144】

従って、ブルーフ膜の多くの基本的な構造および機能的な特性が、そのコラー

ゲンおよびエラスチン繊維の完全性および性質に依存する可能性が高いようである。脈絡膜の新血管新生は、浸出性の形態のAMDの一般的な徴候であり、代表的には、重篤な視覚の喪失を生じる。ブルーフ膜におけるコラーゲンおよびエラスチンの分解がこのプロセスの重要な工程を表すようである。実際に、MMP-2およびMMP-9（エラストリシス特性を有する2つのメタロプロテナーゼ）は、ブルーフ膜において加齢と伴に増加する（Guoら、1997）。これらのメタロプロテナーゼ（代表的には、炎症の部位で分泌される）は、気腫、アテローム性動脈硬化症、および関節炎のような疾患においてエラスチンの破壊を引き起こし、そしてブルーフ膜における類似の病理学の原因であり得る。さらに、TIMP-3は、RPEおよび脈絡膜上皮細胞によって合成されるべきであることが示されており、そしてブルーフ膜および結晶腔において比較的高濃度で見出される（Vrankaら、1997）。従って、メタロプロテナーゼのこのインヒビターは、ブルーフ膜におけるECMホメオスタシスを維持するにおける主要な役割を果たし得る。エラスチンの断片化は、マクロファージの移動を誘導し得ること（Kamishatoら、1997）、および血管形成/新血管新生の強力な刺激剤であることが公知である。従って、弾性層の破壊に導く任意のAMD関連プロセスもまた、脈絡膜新血管新生を誘導し得ることを提唱することは論理的である。

【0145】

斑の疾患における脈絡膜間質固有層において生じる変化に関しては、さらに知られていることは少ない。特に斑において、毛細血管上皮細胞の有意な損失が存在することは公知である。さらに、脈絡膜が加齢およびAMDと伴に薄くなるという、いくらかの示唆が存在しているが、これは、ほとんど文献に記録されていない。

【0146】

本発明者らの研究室において行われた研究は、斑の変性と動脈壁の破壊障害との間の類似性に対するさらに新しい洞察を提供する。これらには、以下が含まれる：

- 1) AAAと血管新生AMDとの間の強力な統計学的な相関 ($P < 0.0000$)

- 1) が、ヒトドナーの眼の大貯蔵所において記録されている。
- 2) 小さな臨床試験において、AAAを有する8人の患者のうちの5人が、検眼鏡で試験された場合、特徴的なAAA基底部表現型およびAMDで診断された。
- 3) AAAおよびAMDの両方について、過去5年間にわたるアイオワ大学において診られた患者の観察から、類似のAAA基底部表現型が明らかになる。
- 4) 結晶腔の綿密な組織化学的および生化学的分析は、結晶腔および動脈疾患のプラークが組成において類似していることを明らかにした。
- 5) 有意にも、結晶腔と樹状細胞との間の新規の関連性が同定されている。
- 6) AMDおよび種々の動脈壁破壊性障害(AAA、TAA、TAAA、急性解離性動脈瘤、大動脈狭窄、アテローム性動脈硬化症)を有するか、または有さない6時間齢から101歳の年齢までの151人のヒトドナーからの脈絡膜の超構造的および免疫組織化学的な検査は、これらの状態に関連する新規な病理学を明らかにした。これらの個体のうちの30の脈絡膜間質は、新たに合成されたコラーゲン、エラスチン、エラスチン関連微小繊維、および他の明確な構造タンパク質および原繊維で満たされている。予備的な免疫組織化学的分析に基づいて、この状態に関連するコラーゲンは、大部分、III型およびVI型であるようであり、代表的には、しばしば、特定の遺伝的および後天的疾患と関連する「らせん状」または「擦り切れた」形状を示す。この以前に記載されていない現象は、「脈絡膜線維症」と言われ、動脈壁破壊性障害と共通の多くの病理学的特徴を共有する。
- 7) 一連のコントロール(非疾患)および感作された(AMD/AAA、AMD、AMD/大動脈狭窄)ドナー由来のRPE脈絡膜複合体のRT-PCR分析は、2つのグループ間におけるアップレギュレートされた遺伝子およびダウンレギュレートされた遺伝子の発現の明確なパターンを明らかにした。これらは、b1インテグリン、エラスチン、コラーゲンVIa2、コラーゲンa3、PI-I(アンチトリプシン)、PI-2、ヒトメタロプロテイナーゼ(およびたぶんフィブリリン-2)の「アップレギュレーション」、およびBigH3の「ダウンレギュレーション」を包含する。コラーゲンIIIa1、コラーゲンIa2、コラーゲン6a1、フィブリリン-1、2、3、4、および5、HLA-DR、Igカ

ツバ、ラミニンレセプター、またはラミニンC2の発現レベルにおける検出可能な差異は観察されなかった。RT-PCRの制限のために、さらなる実時間定量的RT-PCR研究が、2つのグループにおけるこれらの遺伝子の正確なレベルを評価するために行われている。

8) 2つの特異的RPE、網膜(約35kDaおよび50kDa)、および結晶腔関連(約42kDa)タンパク質に対して指向された自己抗体は、AMDおよびAAAの両方を有する患者の血清において同定されており、AMDの機構と動脈の疾患の機構との間のさらなる類似性を示唆する。

9) AMDおよび/またはAAAを有するヒトドナーに由来するRPE/脈絡膜組織の遺伝子アレイ分析は、これらの障害の間で病原性の共有された機構(遺伝子発現プロファイル)について強制的な証拠を提供してきた。

10) 免疫組織化学分析は、AMDドナーの斑における弾性層が、斑外領域におけるものより薄く、そしてより断片化されていることを記録してきた。これらのデータは、斑におけるエラスチンの分解が、末梢におけるより強固であることを示す。反対に、ほとんどのエラスチン合成が、ヒトにおける妊娠の間に生じるため、斑において生じる任意の出生後のエラスチン合成が、初期に合成されるエラスチンと比較して、量および/または内容において有意に異なることが予想される。

【0147】

(4.4 診断アッセイ)

1つの局面において、本発明は、AAAについての増大したリスクと関連する1つ以上のマーカーを検出することによって、AMDを発症することに対する診断、またはそれに対する素因を決定するための方法を提供する。好ましい実施形態において、眼における黄斑変性についてのマーカーは、結晶腔の形成または結晶腔関連マーカー(例えば、結晶腔関連分子(DRAM))もしくは結晶腔関連分子病理の発生である。結晶腔関連分子病理の例には、以下が含まれる: 斑における円板状の癍痕および/または脈絡膜の新生血管形成および/または線維症(例えば、らせん状のコラーゲン、エラスチン原線維、および細糸)の存在、斑の色素沈着における変化、RPEにおける細胞死の発生、眼における特定の免疫媒

介事象の発生、およびRPE下空間(sub RPE space)における樹状細胞の増殖、移動、および分化の発生。

【0148】

結晶腔関連マーカーは、1つ以上の眼科学的な手順(例えば、眼底フルオレセイン血管造影(FFA)、眼底検眼鏡検査または写真(FP)、網膜電位図(ERG)、電気眼球図(EOG)、視野、スキャニングレーザー検眼鏡検査(SLO)、視力測定、暗順応測定、または他の標準的な方法)によって検出され得る。

【0149】

本発明の1つの方法において、結晶腔関連障害の発生は、患者の目が結晶腔の存在について検査される、従来の眼科学的方法によって検出される。結晶腔は、加齢性黄斑変性(AMD)に特徴的であるが、単独に関連しているのではない、網膜下の色素上皮沈着物である。加齢性黄斑変性は、異なる臨床的症状および異なる予後を有する2つの型の結晶腔に関連している。硬質な結晶腔は、小さい、斑点状の、黄色小結節として現れ、そして萎縮性AMDの発生を進行し得る。結晶腔が消滅につれて、網膜の色素上皮(RPE)、脈絡毛細管板、および外網膜の輪紋状萎縮が発生するが、結晶腔は萎縮の徴候なしに回帰し得る。軟質な結晶腔は、局在化した漿液性RPE分離に類似し得る、大きい(通常、直径が63ミクロンより大きい)、淡黄色または灰白色の、ドーム型の隆起として現れる。これらは、臨床的に明白なRPE分離および脈絡膜の新生血管形成の発生に先行する傾向がある。滲出性黄斑障害への進行に関連した結晶腔の性質としては、結晶腔の数(5以上)、結晶腔の大きさ(直径が63ミクロンより大きい)、および結晶腔の集合が挙げられる。斑における限局的な色素過剰および全身性高血圧はまた、脈絡膜新血管(CNV)が発生する危険性の増加に関連している。大きな結晶腔は、通常、基底線状沈着物(おそらくRPEから生じる小胞性物質)を有するブルーフ膜の広範な肥厚化の徴候であり、血漿中での水溶性成分に対する拡散バリアを構成し、ブルーフ膜の脂質化を生じ、そしてブルーフ膜(これを通してCNVが生長し得る)のRPE基底膜と内部膠原性層との間に潜在的な切断面を作製する。

【0150】

他の結晶腔関連分子の病状は、眼における明瞭な眼底の出現の発生（例えば、円板状黄斑変性を伴う白色から黄色の眼底斑（結晶腔から識別可能）または萎縮性黄斑変性と関連している黄色沈降物）を含む。これらのAMDに関連した眼底の所見としてはまた、地図状萎縮（GA、AMDの乾燥形態に特徴的である）および円盤状癍痕および脈絡膜の新生血管形成（DS/CNV、AMDの湿潤形態に特徴的である）が挙げられる。他の例において、AMDに関連した眼底の所見は、湿潤形態または乾燥形態を区別しない。

【0151】

好ましい実施形態において、マーカーは、結晶腔沈降物に関連する分子マーカー（すなわち、結晶腔関連分子（DRAM））である。結晶腔は、1つ以上のDRAM（例えば、アミロイドAタンパク質、アミロイドP成分、抗キモトリプシン、アポ脂質タンパク質E、b2ミクログロブリン、補体3、補体C5、補体C5b-9末端複合体、X因子、フィブリノーゲン、イムノグロブリン（および）、プロトロンビン、トロンボスポンジン、ビトロネクチン）の存在を検出することによって検出され得る。別の実施形態において、結晶腔関連マーカーは、その産生が結晶腔関連分子の病理学的プロセスにおいて変えられる分子である。例えば、結晶腔に関連した1つの病理学的プロセスは、網膜の色素上皮（RPE）における細胞死および/または機能不全である。多数の分子マーカーが、以下を含むこのような機能不全のRPE細胞と関連してきた：HLA-DR、CD68、ビトロネクチン、アポ脂質タンパク質E、clusterin、およびS-100。HLA-DR発現は（免疫反応の早期に細胞によって頻繁に発現されるが）、特に免疫応答性細胞に固有である。AMDに冒された眼の機能不全RPE細胞に関連した、さらに他の分子マーカーとしては、以下のような細胞死に関連した遺伝子産物が挙げられる：細胞死誘導タンパク質（death protein）、熱ショックタンパク質70、プロテアソーム、Cu/Znスーパーオキシドジスムターゼ、カテプシン、および細胞死誘導アダプタンパク質RAIDD。さらに、結晶腔の生合成は、種々の免疫媒介性の事象（例えば、AMD患者の血清中での自己抗体の作製）によって容易にされる。これらの自己抗体は、結

晶腔、RPE、および他の網膜の成分に対して指向される。従って、本発明は、このような自己抗体の存在および抗原特異性を当該分野で公知の方法によって検出するように設計された、診断アッセイ（標準的な免疫組織化学技術およびウェスタンブロット技術を含む）を提供する。Ig μ 鎖、Ig鎖、IgJ鎖、およびIg鎖を含む、さらに多数の免疫系関連分子は、結晶腔の形成と共に、RPE/脈絡膜においてアップレギュレートされる。従って、これらの免疫関連分子は、タンパク質に基づく診断アッセイ（例えば、抗体に基づく検出法）ならびに核酸を基にした診断アッセイ（例えば、ノーザン法およびRT-PCR法）について、別の標的を提供する。さらに他の結晶腔関連分子マーカーは、ブルー膜を破り、そして球状の、小嚢が詰まった、結晶腔の中心内の「核」として終止する、細胞のプロセスを有する脈絡膜細胞の部分母集団と共に見出されるマーカーである。これらの樹状細胞に関連した特異的なマーカー分子としては、以下：CD1a、CD4、CD14、CD68、CD83、CD86、およびCD45が挙げられる。結晶腔関連の樹状細胞核と関連しているようである他の分子マーカーとしては、以下：PECAM、MMP14、ユビキチン、およびFGFが挙げられる。本発明の別の局面において、結晶腔関連マーカーは、樹状細胞前駆体と損傷した組織との間のアクセプター-リガンド相互作用を介して結晶腔の発生を容易にする、サイトカインであり得る。このようなサイトカインとしては、以下：IL-1、IL-6、IL-12、TNF- およびGM-CSFが挙げられる。結晶腔の発生に関連した他の分子としては、GM-CSF、熱ショックタンパク質、およびDNAフラグメントが挙げられる。

【0152】

1つの実施形態において、被験体から得られたサンプルは、当該分野において標準的な方法に従って得られた血液または尿のサンプルである。別の実施形態において、サンプルは、生検によって得られ得る組織に由来する。あるいは、このサンプルは、例えば、血液もしくは他の液体に由来するか、または組織に由来する、DNAまたはRNAのサンプルであり得、そして標準的な分子生物学の方法に従って精製される。このマーカーは、標準的な技術によりタンパク質の存在を分析することによってか、または、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）に

より被験体のRNAを分析することによって検出され得、それによってDRAMのRNA発現レベルまたは他の結晶腔マーカーを決定する。

【0153】

別の実施形態において、本発明は、被験体における動脈壁破壊性障害を発生しやすい素因を診断または検出するための方法を提供する。この方法は、黄斑変性を示す遺伝子産物に特異的な抗体を使用して、被験体から得られたサンプルにイムノアッセイを行う工程を包含し、ここで、結合された抗体の存在の検出は、被験体が、黄斑変性または黄斑変性を発生しやすい素因を有し、従って、動脈壁破壊性障害または動脈壁破壊性障害への素因を有することを示す。抗体は、標準的な方法によって得られ得、そしてモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であり得る。

【0154】

別の実施形態において、動脈壁破壊性障害を診断するためのキットが提供され、このキットは、イムノアッセイを行うための試薬を含む。別の実施形態において、動脈壁破壊性障害を診断するためのキットは、黄斑変性を示す多型性を有する染色体の領域を増幅するための特定のプライマー、DNA増幅を行うための試薬、および増幅された核酸を分析するための試薬を含む。本明細書中に記載された方法は、例えば、黄斑変性を含む疾患または疾病の症状または家系を示す患者を診断するための臨床の設置条件において、従来通りに使用され得る、本明細書中に記載された、例えば、少なくとも1つのプローブ核酸、プライマーセット；および/または抗体試薬を含む、予め包装された診断用キットを使用することによって実施され得る。このキットは、1つ以上のDRAMタンパク質、RNA、または1つ以上のDRAMタンパク質もしくはRNAの破壊産物の、異常なレベル、形態、または活性を検出し得る。本発明の実施形態において、このキットは、DRAMタンパク質、ペプチド、または核酸に特異的な自己抗体を検出する。例えば、このキットは、生物学的サンプル中の標識された化合物またはDRAMタンパク質もしくはmRNAを検出し得る試薬；サンプル（例えば、血液、尿、または生検のサンプル）中のDRAMタンパク質の量を決定するための手段；および正常で健康な被験体由来のサンプルに対して、黄斑変性に罹患した被験体が

らのサンプル中のDRAMタンパク質の量を比較するための手段を含み得る。この化合物または試薬は、適切な容器中に包装され得る。このキットは、DRAM mRNAまたはタンパク質を検出するためのキットを使用するための、説明書をさらに含み得る。このようなキットは、例えば、DRAM遺伝子もしくはその対立遺伝子、またはその変異形態の少なくとも一部分に特異的にハイブリダイズし得る、1つ以上の核酸プローブを含み得る。おそらく、このキットは、1つ以上のヌクレオチドの違いを有する、正常DRAM遺伝子とDRAM遺伝子との間を区別し得る、少なくとも1つのオリゴヌクレオチドプライマーを含む。

【0155】

本発明の別の局面は、DRAMまたは結晶腔の他の成分に特異的に反応性である抗体に関する。例えば、HarlowおよびLane編、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, 1988を参照のこと。哺乳動物（例えば、マウス、ハムスター、またはウサギ）は、ペプチドの免疫原性形態（例えば、抗体応答を誘導し得る抗原性フラグメントまたは上記のような融合ペプチド）で免疫化され得る。タンパク質またはペプチドに免疫原性を与えるための技術としては、キャリアへの結合または当該分野で周知の他の技術が挙げられる。免疫化の進行は、血漿または血清中の抗体力価の検出によってモニターされ得る。標準ELISAまたは他のイムノアッセイは、抗体のレベルを評価するために、抗原としての免疫原と共に使用され得る。

【0156】

本発明は、同様の方法論を使用して、DRAMに指向した抗体を得るための方法を提供する。抗DRAM抗体は、結晶腔におけるDRAMの視覚化のため、DRAMの機能または蓄積を阻害するため、またはDRAMの分解を促進するために有用である。このような抗体を得るための手順は、当該分野において周知であり、そして以下に簡単に提供される。

【0157】

DRAMポリペプチドまたは別の結晶腔関連分子マーカの抗原性調製を用いる動物の免疫化後に、特定の抗血清が得られ得、所望の場合、ポリクローナル抗

体が血清から単離される。モノクローナル抗体を作製するために、免疫化された動物から抗体作製細胞（リンパ球）が収集され、そして不死化細胞（例えば、骨髓腫細胞）と共に標準的な体細胞融合手順によって融合され、ハイブリドーマ細胞を生じる。このような技術は当該分野において周知であり、そして例えば、ハイブリドーマ技術、KohlerおよびMilstein(1975)、Nature 256:495-497、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術、Kozbarら(1983)、Immunol.Today 4:72、ならびにヒトモノクローナル抗体を作製するためのEBVハイブリドーマ技術を含む。Coleら(1985)、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R, Liss, Inc. 77-96頁。ハイブリドーマ細胞は、樹状細胞に特異的に反応性である抗体の作製、本発明のDRAMポリペプチド、およびこのようなハイブリドーマ細胞を含む培養物から単離されたモノクローナル抗体について、免疫化学的にスクリーニングされ得る。

【0158】

本明細書中で使用される場合、用語、抗体は、同様に被験体の樹状細胞、DRAMポリペプチドのうちの1つに特異的に反応性である、そのフラグメントを含むことが意図される。抗体は、従来技術を使用して断片化され、そしてそのフラグメントは、抗体全体について上に記載したのと同じ様式で、有用性についてスクリーニングされ得る。例えば、F(ab)₂フラグメントは、抗体をペプシンで処理することによって生じ得る。生じたF(ab)₂フラグメントは、ジスルフィド架橋を減少させるように処理され、Fabフラグメントを生成し得る。本発明の抗体は、樹状細胞、この抗体の少なくとも1つのCDR領域によって与えられるDRAMタンパク質に対する親和性を有する、二特異的(bispecific)な、単鎖の、ならびにキメラおよびヒト化の分子を含むことがさらに意図される。好ましい実施形態において、この抗体は、抗体に結合され、そして検出され得る標識をさらに含む（例えば、この標識は、放射性同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子であり得る）。

【0159】

さらに、抗DRAM抗体を使用して、例えば、DRAMタンパク質レベルを、

個体において、例えば、検体が異常なDRAMタンパク質レベルに関連した疾患または状態を有するか否かを決定するために、またはこのような障害（動脈壁破壊性障害に関連する）に罹患した個々に与えられた処置レジメンの、有効性の決定を可能にするために、それぞれモニターし得る。DRAMポリペプチドのレベルは、体液（例えば、血液サンプル）中の細胞から測定され得る。DRAM組成物またはDRAMタンパク質のレベルにおける変化は、動脈壁破壊性障害または黄斑変性のために提供される試薬の有効性を示す。

【0160】

本発明のDRAM抗体の別の用途は、発現ベクター（例えば、gt11、gt18-23、ZAP、およびORF8）中に構築されたcDNAライブラリーの免疫学的なスクリーニングにある。正確なリーディングフレームおよび定位に挿入されたコード配列を有する、この型のメッセンジャーライブラリーは、融合タンパク質を産生し得る。例えば、gt11は、アミノ末端がガラクトシダーゼアミノ酸配列からなり、そしてカルボキシ末端が外来ポリペプチドからなる、融合タンパク質を産生し得る。次いで、DRAMタンパク質の抗原性エピトープ（例えば、特定のDRAMタンパク質の他のオルソログ（ortholog）または同じ種由来の他のパラログ（paralog））は、例えば、このような抗体に感染したプレートから持ち上げられたニトロセルロースフィルターを反応させる際に、抗体を用いて検出され得る。次いで、このアッセイによって検出された陽性ファージは、感染されたプレートから単離され得る。従って、DRAM相同体の存在は、ヒト由来のイソ型（スプライス改変体を含む）を代替し得るように、検出され、そして他の動物からクローン化され得る。

【0161】

本発明は、DRAMに対する自己抗体を同定するための方法を提供する。例えば、天然に存在する自己抗体は、DRAMまたは核酸に指向された抗体に関する自己免疫疾患によってもたらされ得る。本明細書中で開示されるDRAM核酸およびタンパク質は、特定のDRAM抗体の検出、単離、および特徴付けのためのアッセイ（例えば、イムノアッセイ）を提供する。例えば、DRAM自己抗体の特徴付けは、DRAM自己抗体の抗原またはエピトープの特徴付けおよび単離を

含む。

【0162】

(4.4.1 無細胞アッセイ)

無細胞アッセイは、結晶腔関連マーカー遺伝子産物または結合パートナーと相互作用し得る化合物を同定し、それによって結晶腔関連マーカー遺伝子タンパク質または結合パートナーの活性を改変するために使用され得る。このような化合物は、例えば、結晶腔関連マーカー遺伝子タンパク質または結合パートナーの構造を改変し得、それによって、その活性をもたらし得る。無細胞アッセイはまた、結晶腔関連マーカー遺伝子タンパク質と結晶腔関連マーカー遺伝子結合パートナー（例えば、標的ペプチド）との間の相互作用を調節する化合物を同定するために使用され得る。好ましい実施形態において、このような化合物を同定するための無細胞アッセイは、本質的に、結合パートナーの存在下または非存在下で、結晶腔関連マーカー遺伝子タンパク質および試験化合物または試験化合物のライブラリーを含む、反応混合物にある。試験化合物は、例えば、結晶腔関連マーカー遺伝子結合パートナーの誘導體（例えば、生物学的に不活性な標的ペプチド、すなわち小さな分子）であり得る。

【0163】

従って、本発明の1つの例示的なスクリーニングアッセイは、結晶腔関連マーカー遺伝子タンパク質もしくはその機能的フラグメントまたは結晶腔関連マーカー遺伝子結合パートナーを、試験化合物もしくは試験化合物のライブラリーに接触させる工程、および複合体の形成を検出する工程を包含する。検出の目的のために、分子は、特定のマーカーで標識され、そして試験化合物または試験化合物のライブラリーは異なるマーカーで標識され得る。次いで、試験化合物と結晶腔関連マーカー遺伝子タンパク質もしくはそのフラグメントまたは結晶腔関連マーカー遺伝子結合パートナーとの相互作用は、インキュベーション工程および洗浄工程の後に、2つの標識のレベルを決定することによって検出され得る。洗浄工程後の2つの標識の存在は、相互作用を示す。

【0164】

分子間の相互作用はまた、表面プラズモン共鳴（SPR）（光学的な現象）を

検出する、リアルタイムBIA (Biomolecular Interaction Analysis, Pharmacia Biosensor AB) を使用して同定され得る。検出は、生物特異的な (biospecific) 界面での高分子の質量濃度の変化に依存し、相互作用するものの標識を必要としない。1つの実施形態において、試験化合物のライブラリーは、例えば、微流セルの1つの壁を形成する、センサー表面上で固定化され得る。次いで、結晶腔関連マーカ-遺伝子タンパク質、その機能的フラグメント、結晶腔関連マーカ-遺伝子タンパク質アナログ、または結晶腔関連マーカ-遺伝子結合パートナーを含む溶液は、センサー表面の上に連続的に流される。シグナル記録に示されるような共鳴角における変化は、相互作用が生じたことを示す。この技術は、例えば、PharmaciaによるBIA technology Handbookにさらに記載される。

【0165】

本発明の別の例示的なスクリーニングアッセイは、以下の工程を包含する：(a) (i) 結晶腔関連マーカ-遺伝子ポリペプチド、(ii) 結晶腔関連マーカ-遺伝子結合パートナー、および (iii) 試験化合物を含む反応混合物を形成する工程；ならびに (b) 結晶腔関連マーカ-遺伝子と結晶腔関連マーカ-遺伝子結合タンパク質との相互作用を検出する工程。結晶腔関連マーカ-遺伝子ポリペプチドおよび結晶腔関連マーカ-遺伝子結合パートナーは、組換え的に産生されて、供給源 (例えば、血漿) から精製され得るか、または本明細書中に記載されるように化学的に合成され得る。試験化合物の非存在下における相互作用に対する、試験化合物の存在下の結晶腔関連マーカ-遺伝子と結晶腔関連マーカ-遺伝子結合タンパク質との相互作用における統計的に有意な変化 (増強作用または阻害作用) は、結晶腔関連マーカ-遺伝子の試験化合物に対する生物活性の、潜在的なアゴニスト (模倣物もしくは増強因子) またはアンタゴニスト (インヒビター) を示す。このアッセイの化合物は、同時に接触され得る。あるいは、結晶腔関連マーカ-遺伝子タンパク質が、最初に、適切な長さの時間の間、試験化合物と接触され得、次いで結晶腔関連マーカ-遺伝子タンパク質結合パートナーが反応混合物に添加される。化合物の有効性は、試験化合物の種々の濃度を使用し

て得られたデータから、用量応答曲線を生じさせることによって評価され得る。さらに、比較の基線を提供するために、コントロールアッセイが実施され得る。コントロールアッセイにおいて、単離され、そして精製されたMFGFポリペプチドまたは結合パートナーは、結晶腔関連マーカー遺伝子タンパク質結合パートナーまたは結晶腔関連マーカー遺伝子ポリペプチドを含む組成物に添加され、そして試験化合物の非存在下で、複合体の形成が定量化される。

【0166】

結晶腔関連マーカー遺伝子タンパク質と結晶腔関連マーカー遺伝子結合パートナーとの間の複合体形成は、種々の技術によって検出され得る。複合体の形成の調節は、例えば、検出可能に標識されたタンパク質（例えば、放射標識されたか、蛍光的に標識されたか、もしくは酵素的に標識された、結晶腔関連マーカー遺伝子タンパク質または結晶腔関連マーカー遺伝子結合パートナー）を使用するか、イムノアッセイによるか、あるいはクロマトグラフィー検出によって定量化され得る。

【0167】

代表的には、結晶腔関連マーカー遺伝子タンパク質またはその結合パートナーのいずれかを固定化して、これらのタンパク質の1つまたは両方の非複合体形態から複合体の分離を容易にすること、ならびに、アッセイの自動化を適応することが所望される。結晶腔関連マーカー遺伝子産物結合パートナーへの結晶腔関連マーカー遺伝子タンパク質の結合は、反応物質を包含するために適切な任意の容器内で達成され得る。例としては、マイクロタイタープレート、試験管、および微量遠心管が挙げられる。1つの実施形態において、タンパク質をマトリックスに結合させ得るドメインを付加する融合タンパク質が提供され得る。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質は、グルタチオンセファロースビーズ(Sigma Chemical, St. Louis, MO)またはグルタチオンを誘導したマイクロタイタープレート上に吸収され得る。次いで、これらを、結晶腔関連マーカー遺伝子結合パートナー（例えば、³⁵S標識化結晶腔関連マーカー遺伝子産物結合パートナー）および試験化合物と結合し、そして、混合物を、複合体形成を導く環境下（例えば、わずかによりストリ

ンジェントな条件が所望され得るが、塩およびpHについて生理的条件)でインキュベートする。インキュベーションに続いて、ビーズを洗浄して任意の未結合標識を除去し、そしてマトリックスを固定化し、放射標識を直接(例えば、シンチレーター内に置かれたビーズ)にか、または複合体の引き続く解離の後の上清中で判定する。あるいは、複合体は、マトリックスから解離され得、SDS-PAGEによって分離され、そしてビーズ画分中に見られる結晶腔関連マーカ-遺伝子産物タンパク質または関連結合パートナーのレベルは、添付の実施例に記載されるような標準電気泳動技術を使用して、ゲルから計量された。

【0168】

マトリックス上へのタンパク質の固定化についての他の技術はまた、目的のアッセイにおける使用のために入手可能である。例えば、結晶腔関連マーカ-遺伝子産物またはその同属の結合パートナーのいずれかは、ビオチンおよびストレプトアビジンの混合物を使用して固定化され得る。例えば、ビオチン化結晶腔関連マーカ-遺伝子は、当該分野において周知の技術(例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemicals, Rockford, IL)を使用してビオチン-NHS(N-ヒドロキシ-サクシニミド)から調整され得。そしてストレプトアビジンコート(96穴プレート(Pierce Chemical))のウェルに固定化され得る。あるいは、結晶腔関連マーカ-遺伝子産物に反応する抗体は、プレートのウェルに誘導体化され得、そしてMFGFは抗体結合によってウェルにトラップされる。上記のように、結晶腔関連マーカ-遺伝子結合タンパク質および試験化合物の調製物は、プレートの呈示するウェル内でインキュベートされ、そしてウェル内にトラップされた複合体の量は、計量され得る。GST固定化複合体についての上記の方法に加えて、このような複合体の検出についての例示的な方法は、結晶腔関連マーカ-遺伝子産物結合タンパク質に反応する抗体、または結晶腔関連マーカ-遺伝子タンパク質に反応しかつ結合パートナーに競合する抗体を使用する複合体の免疫検出法；ならびに、結合パートナーに関連する酵素活性(内因性活性または外因性活性のいずれか)の検出に依存する酵素結合アッセイを包含する。後者の例において、酵素は、化学的に結合され得るかまたは結晶腔関連マーカ-遺伝子結合パートナーとの融合タンパク質として提供

され得る。図示すると、結晶腔関連マーカー遺伝子産物結合パートナーは、西洋ワサビペルオキシダーゼと化学的に架橋され得るか、または遺伝的に融合され得、そして複合体中にトラップされるポリペプチドの量は、酵素の色素基質（例えば、3,3'-ジアミノベンジジン (benzadine) テラ塩酸塩または4-クロロ-1-ナフトール) を用いて評価され得る。同様に、ポリペプチドおよびグルタチオン-S-トランスフェラーゼを含む融合タンパク質を提供し得、そして複合体形成を、1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン (Habigら (1974) J Biol Chem 249:7130) を使用して、GST活性を検出することによって定量し得る。

【0169】

複合体中にトラップされたタンパク質の1つを定量するための免疫検出に依存するプロセスについて、このタンパク質に対する抗体（例えば、抗結晶腔関連マーカー遺伝子産物抗体）が使用され得る。あるいは、複合体中に検出されるべきタンパク質は、結晶腔関連マーカー遺伝子配列に加えて、抗体が容易に入手可能な（例えば、商業的供給源から）第二のポリペプチドを含む融合タンパク質の形態で「エピトープタグ」され得る。例えば、上記のGST融合タンパク質もまた、GST部分に対する抗体を使用して、結合の定量に使用され得る。他の有用なエピトープタグとして、c-myc由来の10残基配列を含むmycエピトープ（例えば、Ellisonら (1991) J Biol Chem 266:21150-21157を参照のこと）、ならびにpFLAGシステム (International Biotechnologies, Inc) またはpEZZ-プロテインAシステム (Pharmacia, NJ) が挙げられる。

【0170】

無細胞系アッセイもまた、結晶腔関連マーカー遺伝子タンパク質と相互作用し結晶腔関連マーカー遺伝子タンパク質の活性を調節する化合物を同定するために使用され得る。さらに、1つの実施形態において、結晶腔関連マーカー遺伝子産物タンパク質を、試験化合物と接触し、そして結晶腔関連マーカー遺伝子の触媒活性をモニターする。1つの実施形態において、結晶腔関連マーカー遺伝子産物の標的分子への結合能を決定する。結晶腔関連マーカー遺伝子の標的分子との結

合親和性を、当該分野において公知の方法に従って決定し得る。結晶腔関連マーカー遺伝子の酵素活性の決定を、Holmquistら(1979)Anal. Biochem. 95:540および米国特許第5,259,045号に記載の条件下で、基質フランアクリロイル(furanacryloyl)-L-フェニルアラニル-グリシル-グリシン(FAPGG)を用いて実施し得る。

【0171】

(4.4.2.細胞ベースのアッセイ)

上記のような無細胞系アッセイに加えて、本発明によって提供されるような結晶腔関連マーカー遺伝子タンパク質は、細胞ベースのアッセイ(例えば、低分子アゴニストまたはアンタゴニストを同定するための)の作製を容易にする。1つの実施形態において、その細胞膜の外側表面上に結晶腔関連マーカー遺伝子産物レセプタータンパク質を発現する細胞を、試験化合物単独の存在下、または試験化合物および結晶腔関連マーカー遺伝子タンパク質の存在下でインキュベートし、そして試験化合物と結晶腔関連マーカー遺伝子産物レセプタータンパク質との間、または結晶腔関連マーカー遺伝子タンパク質と結晶腔関連マーカー遺伝子産物レセプターとの間の相互作用を、例えば、微量生理機能測定器(McConnellら(1992)Science 257:1906)を使用することによって検出する。結晶腔関連マーカー遺伝子産物レセプタータンパク質と試験化合物もしくはMFGFタンパク質のいずれかとの間の相互作用を、微量生理機能測定器によって、培地の酸性化における変化として検出する。従って、このアッセイ系は、例えば、結晶腔関連マーカー遺伝子産物-レセプター相互作用を干渉することによって機能する分子アンタゴニスト、ならびに、例えば、結晶腔関連マーカー遺伝子レセプターを活性化することによって機能する分子アゴニストを同定するための手段を提供する。

【0172】

細胞ベースのアッセイもまた、結晶腔関連マーカー遺伝子の発現を調節する化合物、結晶腔関連マーカー遺伝子mRNAの翻訳を調節する化合物、または結晶腔関連マーカー遺伝子mRNAもしくはタンパク質の安定性を調節する化合物を同定するために使用され得る。さらに、1つの実施形態において、結晶腔関連マ

一カー遺伝子を産生し得る細胞（例えば、網膜上皮細胞）を試験化合物とインキュベートし、そして細胞培地中に産生される結晶腔関連マーカ一遺伝子の量を測定し、そして試験化合物と接触しなかった細胞から産生される結晶腔関連マーカ一遺伝子と比較する。結晶腔関連マーカ一遺伝子に関する化合物の特異性を、種々のコントロール分析（例えば、1つ以上のコントロール遺伝子の発現の測定）によって確認し得る。試験され得る化合物として、低分子、タンパク質、および核酸が挙げられる。特に、結晶腔関連マーカ一遺伝子アンチセンス分子またはリボザイムの効力を決定するために、このアッセイを使用し得る。

【0173】

別の実施形態において、結晶腔関連マーカ一遺伝子の転写における試験化合物の効力を、少なくとも結晶腔関連マーカ一遺伝子のプロモーターの一部に動作可能に連結されたレポーター遺伝子を用いるトランスフェクション実験によって決定する。遺伝子のプロモーター領域を、例えば、ゲノムライブラリーから当該分野において公知の方法に従って単離し得る。レポーター遺伝子は、容易に定量可能なタンパク質をコードする任意の遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ遺伝子またはCAT遺伝子）であり得る。このようなレポーター遺伝子は、当該分野において周知である。

【0174】

本発明はさらに、上記のスクリーニングアッセイによって同定された新規の薬剤および本明細書中に記載されるような処置のためのその使用に関する。

【0175】

（4.5 予想される医薬）

本発明はさらに、予想される医薬を特色とする。これは、少なくとも部分的には新規のAAA/AMD関連遺伝子の同定および遺伝子における変更および被験体におけるコードタンパク質の発現レベルおよび/または機能に影響する関連経路遺伝子の同定に基づく。例えば、本発明は、被験体由来の核酸を単離する工程および核酸を遺伝子型決定する工程を含む、被験体における動脈壁破裂障害の素因を診断または決定する方法を提供し、ここで、黄斑変性関連ハプロタイプ由来の少なくとも1つの対立遺伝子は、動脈壁破裂障害の増加する危険性を予想する

。別の実施形態において、本発明は、被験体由来の核酸を単離する工程、AMDに対する多型マーカーに対応する染色体領域を増幅するプライマーで核酸を増幅する工程、および増幅産物を分析する工程を含む、黄斑変性と診断された家族構成員を有する被験体における動脈壁破裂障害の素因を診断または決定する方法を提供し、ここで、黄斑変性に結合する対立遺伝子型の多型表示の存在は、動脈壁破裂障害に結合する対立遺伝子型の表示または発症する動脈壁破裂障害の素因の表示である。さらに別の実施形態において、本発明は、被験体由来の核酸を単離する工程、遺伝子型を得るためにゲノムDNA中の短いタンDEM反復配列を増幅する工程、この遺伝子型を公知のDNA配列と比較してヌクレオチド配列多型を検出する工程、および被験体のゲノムDNA中に多型の存在または非存在を決定する工程を含む、黄斑変性と診断された家族構成員を有する被験体における動脈壁破裂障害の素因を診断または決定する方法を提供し、ここで、黄斑変性に結合する対立遺伝子型の多型表示の存在は、動脈壁破裂障害に結合する対立遺伝子型の表示または発症する動脈壁破裂障害の素因の表示である。好ましい実施形態において、遺伝子型決定は、マーカーD2S2352およびD2S1364に隣接するヒト染色体2の短腕の領域に実質的に対応する。

【0176】

さらに好ましい実施形態において、動脈壁破裂障害の遺伝子型決定を、黄斑変性の推定部位を示すために当該分野において周知の、以下の1つ以上の染色体領域の多型を検出することによって実施し得る：1p21~q13、劣性シュタルガルト病または黄色斑眼底について(Allikments, R.ら、Science 277:1805-1807, 1997; Anderson, K.L.ら、Am. J. Hum. Genet. 55:1477, 1994; Cremers, F.P.M.ら、Hum. Mol. Genet. 7:355-362, 1998; Gerber, S.ら、Am. J. Hum. Genet. 56:396-399, 1995; Gerber, S.ら、Genomics 48:139-142, 1998; Kaplan, J.ら、Nat. Genet. 5:308-311, 1993; Kaplan, J.ら、Am. J. Hum. Genet. 55:190, 1994; Martinez-Mir, A.ら、Genomics

40:142-146, 1997; Nasonkin, I. ̄、Hum. Genet. 102:21-26, 1998; Stone, E.M. ̄、Nat. Genet. 20:328-329, 1998); 1q25~q31、劣性加齢性黄斑変性について(Klein, M.L. ̄、Arch. Ophthalmol. 116:1082-1088, 1998); 2p16、for 優勢放射状黄斑結晶腔、優勢Dooyne蜂巢状網膜変性またはMalattia Leventinese(Edwards, A.O. ̄、Am. J. Ophthalmol. 126:417-424, 1998; Heon, E. ̄、Arch. Ophthalmol. 114:193-198, 1996; Heon, E. ̄、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37:1124, 1996; Gregory, C.Y. ̄、Hum. Mol. Genet. 7:1055-1059, 1996); 6p21.2-cen、優勢黄斑変性、成人卵黄(vitelliform)について(Felbor, U. ̄、Hum. Mutat. 10:301-309, 1997); 6p21.1、優勢錐体ジストロフィーについて(Payne, A.M. ̄、Am. J. Hum. Genet. 61:A290, 1997; Payne, A.M. ̄、Hum. Mol. Genet. 7:273-277, 1998; Sokol, I. ̄、Mol. Cell. 2:129-133, 1998); 6q、優勢錐体-杆体ジストロフィーについて(Kelsell, R.E. ̄、Am. J. Hum. Genet. 63:274-279, 1998); 6q11~q15、優勢黄斑変性、シュタルガルト様について(Griesinger, I.B. ̄、Am. J. Hum. Genet. 63:A30, 1998; Stone, E.M. ̄、Arch. Ophthalmol. 112:765-772, 1994); 6q14-q16.2、優勢黄斑変性、ノースカロライナ型について(Kelsell, R.E. ̄、Hum. Mol. Genet. 4:653-656, 1995; Robb, M.F. ̄、Am. J. Ophthalmol. 125:502-508, 1998; Sauer, C.G. ̄、J. Med. Genet. 34:961-966, 1997; Small, K.W. ̄、Genomics 13:681-685, 1992; Small, K.W. ̄、Mol. Vis. 3:1, 1997); 6q25-q26

、優勢網膜錐体ジストロフィー1について(Online Mendelian Inheritance in Man(TM).Center for Medical Genetics, Johns Hopkins University, and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/omim>(1998); 7p21~p15、優勢類嚢胞黄斑変性(Inglehearn, C.F.ら、Am. J. Hum. Genet. 55: 581-582, 1994; Kremer, H.ら、Hum. Mol. Genet. 3: 299-302, 1994); 7q31.3-32、優勢第三色盲について、タンパク質:青色錐体オプシン(blue cone opsin)(Fitzgibbon, J.ら、Hum. Genet. 93: 79-80, 1994; Nathans, J.ら、Science 193: 193-232, 1986; Nathans, J.ら、Ann. Rev. Genet. 26: 403-424, 1992; Nathans, J.ら、Am. J. Hum. Genet. 53: 987-1000, 1993; Weitz, C.J.ら、Am. J. Hum. Genet. 50: 498-507, 1992; Weitz, C.J.ら、Am. J. Hum. Genet. 51: 444-446, 1992); 8q24以外(not 8q24)、優勢黄斑変性、非定型卵黄(atypical vitelliform)について(Daiger, S.P.ら、'Degenerative Retinal Diseases', LaVailら編、Plenum Press, 1997; Ferrell, R.E.ら、Am. J. Hum. Genet. 35: 78-84, 1983; Leach, R.J.ら、Cytogenet. Cell Genet. 75: 71-84, 1996; Soghocki, M.M.ら、Am. J. Hum. Genet. 61: 239-241, 1997); 11p12~q13、優勢黄斑変性、最良型について(bestrophin)(Forsman, K.ら、Clin. Genet. 42: 156-159, 1992; Graff, C.ら、Genomics, 24: 425-434, 1994; Petrukhin, K.ら、Nat. Genet. 19

: 241 - 247, 1998; Marquardt, A. ̄、Hum. Mol. Genet. 7: 1517 - 1525, 1998; Nichols, B. E. ̄、Am. J. Hum. Genet. 54: 95 - 103, 1994; Stone, E. M. ̄、Nat. Genet. 1: 246 - 250, 1992; Wadeilus, C. ̄、Am. J. Hum. Genet. 53: 1718, 1993; Weber, B. ̄、Am. J. Hum. Genet. 53: 1099, 1993; Weber, B. ̄、Am. J. Hum. Genet. 55: 1182 - 1187, 1994; Weber, B. H. ̄、Genomics 20: 267 - 274, 1994; Zhaung, Z. ̄、Am. J. Hum. Genet. 53: 1112, 1993); 13q34、優勢黄斑変性、シュツガルト型について (Zhang, F. ̄、Arch. Ophthalmol. 112: 759 - 764, 1994); 16p12.1、劣性Batten病について (セロイド-リポフシノーシス神経型3 (ceroid-lipofuscinosis, neuronal3))、幼弱; タンパク質: Batten病タンパク質 (Batten Disease Consortium, Cell 82: 949 - 957, 1995; Eiberg, H. ̄、Clin. Genet. 36: 217 - 218, 1989; Gardiner, M. ̄、Genomics 8: 387 - 390, 1990; Mitchison, H. M. ̄、Am. J. Hum. Genet. 57: 312 - 315, 1995, Mitchison, H. M. ̄、Am. J. Hum. Genet. 56: 654 - 662, 1995; Mitchison, H. M. ̄、Genomics 40: 346 - 350, 1997; Munroe, P. B. ̄、Am. J. Hum. Genet. 61: 310 - 316, 1997; 17p、優勢輪紋状脈絡膜性 (areolar choroidal) ジストロフィーについて (Lotery, A. J. ̄、Ophthalmol. Vis. Sci. 37: 1124, 1996); 17p13~p12、優勢錐体ジストロフィー、進行性について (Balciuniene, J. ̄、Genomics 30: 281 - 286, 1995; Small, K. W. ̄、Am. J. Hum. Genet. 57: A203, 1995; Small, K. W. ̄、Am. J. Ophthalmol. 121: 13 - 18,

1996); 17q、錐体杆体ジストロフィーについて (Klystra, J. A. ら、Can. J. Ophthalmol. 28:79-80, 1993); 18q21.1~q21.3、錐体-杆体ジストロフィーについて、de Grouchy syndrome (Manhant, S. ら、Am. J. Hum. Genet. 57:A96, 1995; Warburg, M. ら、Am. J. Med. Genet. 39:288-293, 1991); 19q13.3、優勢錐体-杆体ジストロフィー; 劣性、優勢および「デノボ」先天性黒内障; 優勢RP; 錐体-杆体otx様光受容器ホメオボックス転写因子 (Bellingham, J. ら、「Degenerative Retinal Diseases」、LaVail ら編、Plenum Press, 1997; Evans, K. ら、Nat. Genet. 6:210-213, 1994; Evans, K. ら、Arch. Ophthalmol. 113:195-201, 1995; Freund, C. L. ら、Cell 91:543-553, 1997; Freund, C. L. ら、Nat. Genet. 18:311-312, 1998; Gregory, C. Y. ら、Am. J. Hum. Genet. 55:1061-1063, 1994; Li, X. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:1876-1881, 1998; Sohocki, M. M. ら、Am. J. Hum. Genet. 63:1307-1315, 1998; Swain, P. K. ら、Neuron 19:1329-1336, 1987; Swaroop, A. ら、Hum. Mol. Genet. 印刷中、1999); 22q12.1-q13.2、優勢ソースビー底 (Sorsby's fundus) ジストロフィー (TIMP3) について (Felbor, U. ら、Hum. Mol. Genet. 4:2415-2416, 1995; Felbor, U. ら、Am. J. Hum. Genet. 60:57-62, 1997; Jacobson, S. E. ら、Nat. Genet. 11:27-32, 1995; Peters, A. ら、Retina 15:480-485, 1995; Stehr, H. ら、Genome Res. 5:483-487, 1995; Weber, B. H. F. ら、Nat. Genet. 8:352-355, 1994; Weber, B. H. F. ら、Nat. Genet. 7:158-161, 1

994; Wijesvriya, S. D. ら、Genome Res. 6: 92-101, 1996); ならびに、Xp11.4、X関連(X-linked) 錐体ジストロフィーについて(Bartley, J. ら、Cytogenet. Cell. Genet. 51: 959, 1989; Bergen, A. A. B. ら、Genomics 18: 463-464, 1993; Dash-Modi, A. ら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37: 998, 1996; Hong, H. - K., Am. J. Hum. Genet. 55: 1173-1181, 1994; Meire, F. M. ら、Br. J. Ophthalmol. 78: 103-108, 1994; Seymour, A. B. ら、Am. J. Hum. Genet. 62: 122-129, 1998); これらの全ては、黄斑変性に結合する多型または変異を保有するとして同定かつ特徴付けられた; 上記の参考文献は、本明細書中に援用される。従って、当該分野における多型の存在および変異対立遺伝子の遺伝子配列の存在にもかかわらず、当該分野は、黄斑変性を引き起こすかまたは黄斑変性に関連する任意の特定の 변異遺伝子についてのPCRを実施するための適切なプライマー対を設計するために有用なガイダンスを提供する。被験体における黄斑変性または黄斑変性の遺伝的素因を検出することによって、動脈壁破裂障害に対する被験体の遺伝的素因をまた、決定する。好ましい実施形態において、動脈壁破裂障害は、AAAまたはTAAAであり、そして黄斑変性は、DS/CNV型のAMDである。

【0177】

例えば、本明細書中に記載される診断アッセイを使用して得られる情報(単独または同一の疾患に關与する別の遺伝的欠陥の情報との結合)は、徴候を示す被験体(例えば、AMDについて徴候を示す被験体)は、特定の疾患または障害を引き起こすかまたは關与する遺伝的欠陥(例えば、AMD關連遺伝子または結晶腔關連マーカー遺伝子の発現を調節する遺伝子において)を有することを診断または確認するために有用である。あるいは、情報(単独または同一の疾患に關与する別の遺伝的欠陥の情報との結合)を、被験体における異常な活性またはタンパク質レベルによって引き起こされるかまたは關与する疾患または状態が徴候を示さない被験体において発症しそうか否かを予想するために予知的に使用し得る

。予知の情報に基づいて、個体における特定の疾患または状態の徴候を予防または延期するために有用なレジメン（例えば、食事もしくは運動）または治療プロトコルを、医者は推奨し得る。

【0178】

さらに、個体における不完全または不十分な遺伝子またはタンパク質を生じる特定の変更（単数または複数）の認識（遺伝的プロファイル）の単独または同一の疾患に關与する別の遺伝的欠陥の情報（特定の疾患の遺伝的プロファイル）との結合は、特定の疾患に關する治療を「ゲノム薬理学」の目標である個体の遺伝的プロファイルにカスタマイズし得る。例えば、個体のゲノムプロファイルまたは遺伝的变化が引き起こすかまたは關与する疾患または状態の遺伝的プロファイルによって、医者は、1）疾患または状態の分子基礎に到達する薬物のより効果的な処方；および、2）特定の薬物の適切な用量のよりよい決定、をなし得る。例えば、結晶腔關連分子マーカー遺伝子タンパク質の発現レベルの単独または同一の疾患に關与することが公知の他の遺伝子の発現レベルとの結合は、疾患の種々の段階で多くの患者において測定され、疾患の転写プロファイルまたは発現プロファイルを作製し得る。次いで、個々の患者の発現パターンを、疾患の発現プロファイルと比較して、患者に投与される適切な薬物または用量を決定し得る。

【0179】

AAA / AMD 遺伝的プロファイルに基づく最も高い臨床的利用を示すことが予期される標的集団の能力は：1）市販の結果が期待に反した市販の薬物の再ポジショニング；2）患者のサブグループに特異的な安全性または効力の限定の結果として臨床的発症が連続しない薬物の候補の救済；および3）薬物候補の促進する発達および高価ではない発達、ならびにより最適な薬物標識（例えば、マーカーとしての結晶腔關連分子マーカー遺伝子の使用が有効量の最適化に有用であるから）を可能にし得る。

【0180】

（4.6 トランスジェニック動物）

本発明は、種々の目的（例えば、AAA および AMD の共通の病因に關与する遺伝子座を同定するため、およびさらに、AMD および AAA の処置のための動

物モデルを作製するため)で使用され得るトランスジェニック動物を、さらに提供する。

【0181】

トランスジェニック動物は、レポーター遺伝子のような導入遺伝子を、結晶腔関連マーカージェニックプロモーターまたはそのフラグメントの制御下で含む動物であり得る。これらの動物は、例えば、結晶腔関連分子の産生を調節する(例えば、ビトロネクチン、第X因子、HLA-DR、IL-6またはエラスチンの遺伝子発現を調節することにより)薬物を同定するために、有用である。標的遺伝子プロモーターは、例えば、ゲノムライブラリーを適切なcDNAフラグメントでスクリーニングし、そして当該分野において公知の方法に従って特徴付けることによって、単離され得る。本発明の好ましい実施形態において、レポーター遺伝子を含むトランスジェニック動物を使用して、生物活性な分子のクラスを、それらが結晶腔関連分子マーカージェニック(例えば、DRAM)の発現を調節する能力に関してスクリーニングする。本発明の範囲内の、さらに他の非ヒト動物としては、内因性標的遺伝子の発現が変異されたかまたは「ノックアウト」された動物が挙げられる。「ノックアウト」動物は、特定の遺伝子(単数または複数)の、ホモ接合またはヘテロ接合の欠失を有する動物である。これらの動物は、標的の非存在が特定の表現型を生じるか否か、特に、これらのマウスが特定の疾患(例えば、AAAおよび/またはAMDに対する高い感受性)を有するかまたは発達させる傾向があるかを決定するために、有用であり得る。さらに、これらの動物は、以下に概説するように、AAA/AMDに関連する多型性遺伝子の変異から生じる疾患状態を軽減または低下させる薬物のスクリーニングにおいて、有用である。これらの動物はまた、標的遺伝子における、特定のアミノ酸の差異、または対立遺伝子改変の効果を決めるために、有用である。すなわち、標的のノックアウト動物は、例えば、AAA/AMDに関連する多型マーカージェニックを含む、標的遺伝子の変異形態または対立遺伝子改変を発現する、トランスジェニック動物と交配され得、これによって、変異タンパク質のみを発現し、野生型標的遺伝子産物を発現しない、動物を生じる。

【0182】

トランスジェニック動物およびノックアウト非ヒト動物を得るための方法は、当該分野において周知である。ノックアウトマウスは、「ノックアウト」構築物を、ノックアウトされるべき遺伝子をコードするマウス胚性幹細胞染色体に相同的に組込むことによって、生成される。1つの実施形態において、遺伝子の標的化（これは、動物のゲノムを改変するために相同的な組換えを使用する方法である）を使用して、培養した胚性幹細胞に変化を導入し得る。ES細胞において目的の特定の遺伝子を標的化することによって、これらの変化が動物の生殖細胞系に導入されて、キメラを生成し得る。遺伝子標的化手順は、組織培養細胞に、標的遺伝子座と相同性のセグメントを含み、またゲノム配列に対する意図した配列改変（例えば、挿入、欠失、点変異）を含む、DNA標的化構築物を導入することによって、達成される。次いで、処置された細胞は、正確な標的化に関してスクリーニングされて、適切に標的化された細胞を同定および単離する。

【0183】

胚性幹細胞における遺伝標的化は、実際に、1つ以上のTargetゲノム配列との相同組換えを起こすよう設計された、標的化導入遺伝子構築物の使用によって、標的遺伝子の機能を破壊するための手段として、本発明によって意図されるスキームである。標的化構築物は、Target遺伝子のエレメントとの組換えの際に、ポジティブ選択マーカがこの遺伝子のコード配列に挿入される（かまたは置換する）ように、配置され得る。挿入された配列は、このTarget遺伝子を機能的に破壊し、同時にまた、ポジティブ選択特性を提供する。例示的な標的化構築物は、以下にさらに詳細に記載される。

【0184】

一般に、ノックアウト動物を作製するために使用される胚性幹細胞（ES細胞）は、作製されるべきノックアウト動物と同一の種のものである。従って、例えば、ノックアウトマウスを作製するためには、マウス胚性幹細胞が一般に使用される。

【0185】

胚性幹細胞は、Doetschmanら（1985）J. Embryol. Exp. Morphol. 87: 27-45により記載されるような、当業者

に周知の方法を使用して、生成および維持される。任意のES細胞の細胞株が使用され得るが、選択される株は、代表的に、その細胞が、発達中の胚の生殖細胞系に取り込まれてその一部となり、ノックアウト構築物の生殖細胞系伝達を作製する能力に関して、選択される。従って、この能力を有すると考えられる任意のES細胞株が、本明細書中における使用に適する。ES細胞の産生のために代表的に使用される、1つのマウス株は、129J株である。別のES細胞株は、マウス細胞株D3である(American Type Culture Collection, カタログ番号CKL1934)。なお別の好ましいES細胞株は、WW6細胞株である(Ioffeら(1995)PNAS 92:7357-7361)。これらの細胞を、当業者に周知の方法(Robertson: Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson編, IRL Press, Washington, D. C. [1987]; Bradleyら(1986)Current Topics in Devel. Biol. 20:357-371; およびHoganら, Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY [1986]により記載される方法のような)を使用して、ノックアウト構築物を挿入するために、培養および調製する。

【0186】

ノックアウト構築物とは、幹細胞株に導入され、そして変異されるべき目的の遺伝子の染色体遺伝子座においてゲノムで組換えが可能である、独自に構成された核酸のフラグメントを言及する。従って、所定のノックアウト構築物は、破壊のために標的とされるべき所定の遺伝子に対して特異的である。それでもなお、多くの共通のエレメントがこれらの構築物の間に存在し、そしてこれらのエレメントは、当該分野において周知である。代表的なノックアウト構築物は、変異されるべき遺伝子をコードするゲノム遺伝子座の5'末端および3'末端の両方から、約0.5 kb以上または約10.0 kb以下の核酸フラグメントを含む。こ

れら2つのフラグメントは、ネオマイシン耐性遺伝子(neo^R)のようなポジティブ選択マーカをコードする核酸の介在フラグメントによって、分離される。ポジティブ選択マーカ(これは次に、目的のゲノム遺伝子座の先端の3'末端由来の核酸に連結される)をコードする核酸に連結する遺伝子座の先端の5'末端由来の核酸からなる、得られる核酸フラグメントは、目的の遺伝子に対するコード配列の大部分がロックアウトされることを省く。得られる構築物が、この遺伝子座で染色体と相同的に組換えられる場合には、ゲノム遺伝子座から省かれたコード配列(そうでなければ構造的遺伝子として公知である)の欠損を生じる。このような稀な相同組換え事象が生じた幹細胞は、ポジティブ選択マーカをコードする遺伝子の核酸のゲノムへの安定な組込み、および適切な薬物(この実施例においてはネオマイシン)の存在下でこのマーカ遺伝子を発現する細胞の引き続き選択に基づき、選択され得る。

【0187】

この基本的な技術のバリエーションがまた存在し、そして当該分野において周知である。例えば、「ノックイン」構築物とは、ポジティブ選択マーカ(これが次に、3'ゲノム遺伝子座フラグメントをコードする核酸に連結する)をコードする核酸に連結される5'ゲノム遺伝子座フラグメントをコードする核酸の同じ基本的な配置を表すが、この構築物は、コード配列のいずれも省かれず、従って使用される5'および3'のゲノムフラグメントが、ポジティブ選択マーカ遺伝子をコードする核酸の導入によって破壊される前に最初は連続的であったことが、異なる。従って、この「ノックイン」型の構築物は、変異されるべき遺伝子のゲノム遺伝子座の制限された領域(例えば、単一のエクソン)のみが、クローニングおよび遺伝子操作のために利用可能である場合には、変異トランスジェニック動物の構築のために非常に有用である。あるいは、「ノックイン」構築物を使用して、標的化された遺伝子の単一の機能的ドメインを特異的に排除し得、これによって、1つの機能を欠く標的化遺伝子のポリペプチドを発現し、一方でコードされたポリペプチドの他のドメインの機能を保持する、トランスジェニック動物を生じる。この型の「ノックイン」変異は、頻繁に、いわゆる「優先的にネガティブな」変異物の特徴を有する。なぜなら、ホモ多量化するタンパク質の

場合には特に、この変異が由来する野生型遺伝子のポリペプチド産物の作用（または「毒」）を特異的にブロックし得るからである。ノックイン技術のバリエーションにおいて、マーカー遺伝子が目的のゲノム遺伝子座に取り込まれ、その結果、このマーカー遺伝子の発現が、標的化遺伝子の転写調節エレメントの制御下で起こる。マーカー遺伝子とは、その活性が検出され得る酵素（例えば、 β -ガラクトシダーゼ）をコードする遺伝子であり、この酵素物質が適切な条件下で細胞に添加され得、そしてその酵素活性が分析され得る。当業者は、他の有用なマーカー、および所定の細胞におけるこれらの存在を検出する手段を、熟知している。このようなマーカーの全ては、本発明の教示の範囲内に含まれることが、意図される。

【0188】

上述のように、上記「ノックアウト」構築物および「ノックイン」構築物の相同組換えは非常に稀であり、そしてこのような構築物は頻繁に、欠失に関して標的化された遺伝子に影響を有さない場合、および他の点では変化されることが意図されない別の遺伝子を破壊するように潜在的に組換え得る場合に、このゲノムのランダム領域に非相同性を挿入する。このような非相同組換え事象は、上述のノックアウト構築物およびノックイン構築物を、これらがいずれかの末端においてネガティブ選択マーカーに隣接するように改変することによって、排除され得る（特に、チミジンキナーゼ遺伝子の2つの対立遺伝子改変物（このポリペプチド産物は、当該分野において周知の適切な組織培養培地（すなわち、5-ブromoデオキシウリジンのような薬物を含有する培地）において細胞株を発現することにおいて排除され得る）の使用による）。従って、本発明のこのようなノックアウト構築物およびノックイン構築物の好ましい実施形態は、ポジティブ選択マーカー（これが次に、同じゲノム遺伝子座の3'末端をコードする核酸に連結され、これが次に、ネガティブ選択マーカーをコードする第二の核酸に連結される）の核酸に連結されるゲノム遺伝子座の5'末端をコードする核酸に連結されるネガティブ選択マーカーをコードする、核酸配列からなる。得られるノックアウト構築物とゲノムとの間の非相同組換えは、通常、これらのネガティブ選択マーカー遺伝子の1つまたは両方の安定な組み込みを生じ、従って、非相同組換え

を起こした細胞は、適切な選択培地（例えば、5 - プロモデオキシウリジンのような薬物を含有する培地）における増殖によって、排除され得る。ポジティブ選択マーカの同時選択およびネガティブ選択マーカの排除は、変異されることが意図される遺伝子の遺伝子座においてロックアウト構築物が相同的に組換えられるクローンの大きな濃縮を生じる。得られるロックアウト幹細胞株の標的化遺伝子座における、予測された染色体変化の存在は、当業者に周知のサザンブロット分析技術によって、確認され得る。あるいは、PCRが使用され得る。

【0189】

細胞に挿入されるべき各ロックアウト構築物は、最初は、直鎖状形態でなければならない。従って、ロックアウト構築物がベクター（以下に記載する）に挿入された場合には、直鎖化は、DNAを、ベクター配列内でのみ切断し、ロックアウト構築物配列においては切断しないよう選択される、適切な制限エンドヌクレアーゼで消化することにより、達成される。

【0190】

挿入のために、ロックアウト構築物は、当業者に公知のように、選択された挿入方法のために適切な条件下で、ES細胞に添加される。例えば、ES細胞がエレクトロポレーションされるべきである場合には、ES細胞およびロックアウト構築DNAは、エレクトロポレーション機を使用し、そして製造業者の使用指導書に従って、電気パルスに曝露される。エレクトロポレーションの後に、ES細胞は、代表的に、適切なインキュベーション条件下で回収可能である。次いで、これらの細胞は、上で説明したように、ロックアウト構築物の存在に関してスクリーニングされる。1つより多い構築物がES細胞に導入されるべきである場合には、各ロックアウト構築物は同時に、または1つずつ、導入され得る。

【0191】

ロックアウト構築物を適切な位置に含む適切なES細胞が、上に概説した選択技術によって同定された後に、これらの細胞は、胚に挿入され得る。挿入は、当業者に公知の種々の方法で達成され得るが、好ましい方法は、マイクロインジェクションによる。マイクロインジェクションのために、約10～30の細胞が、マイクロピペットに収集され、そしてロックアウト構築物を含む外来ES細胞の

、発達中の胚への取り込みを可能にする、適切な発達段階にある胚に、注射される。例えば、形質転換されたES細胞が、未分化胚芽細胞にマイクロインジェクションされ得る。ES細胞の挿入のために使用される胚に適切な発達段階は、種に非常に依存するが、マウスについては、約3.5日である。胚は、妊娠した雌の子宮を灌流することによって、得られる。これを達成するための適切な方法は、当業者に公知であり、そして例えば、Bradleyら(前出)により記載される。

【0192】

適切な発達段階の任意の胚が使用に適するが、好ましい胚は、雄性である。マウスにおいて、好ましい胚はまた、ES細胞遺伝子によりコードされる毛色とは異なる毛色をコードする遺伝子を有する。この様式で、仔は、モザイクの毛色(ES細胞が発達中の胚に取り込まれたことを示す)を探ることによって、ノックアウト構築物の存在に関して容易にスクリーニングされ得る。従って、例えば、ES細胞株が白色の柔皮のための遺伝子を有する場合には、選択される胚は、黒色または褐色の柔皮のための遺伝子を有する。

【0193】

ES細胞が胚に導入された後に、この胚は、妊娠のために、偽妊娠した養母の子宮に移植され得る。任意の養母が使用され得るが、養母は代表的に、それが十分に繁殖および再生する能力について、ならびにそれが子の世話をする能力について、選択される。このような養母は、代表的に、精管切除した同じ種の雄性と交配させることにより、調製される。偽妊娠した養母の段階は、首尾よい移植のために重要であり、そして種に依存する。マウスに関しては、その段階は、偽妊娠の約2~3日である。

【0194】

この養母から生まれる仔は、最初に、毛色選択ストラテジー(上記および添付の実施例に記載のような)が使用されたモザイクの毛色に関してスクリーニングされ得る。さらに、または代替的に、仔の尾の組織由来のDNAを、サザンブロットおよび/またはPCRを上記のように使用して、ノックアウト構築物の存在に関してスクリーニングし得る。次いで、モザイクであることがわかった仔が、

その生殖細胞系にノックアウト構築物を有すると考えられる場合には、ホモ接合のノックアウト動物を生成するために、これらの仔を、互いに交配させ得る。ホモ接合は、この交配の産物であるマウス、ならびに既知のヘテロ接合体であるマウスおよび野生型マウス由来のゲノムDNAの当量のサザンブロットにより、同定され得る。

【0195】

ノックアウト仔を同定および特徴付けする他の手段が、利用可能である。例えば、ノーザンブロットを使用して、mRNAを、遺伝子ノックアウト、マーカー遺伝子のいずれか、あるいは両方をコードする転写物の存在または非存在に関して、プローブし得る。さらに、ウェスタンブロットを使用して、仔の種々の組織においてノックアウトされたTarget遺伝子の発現のレベルを、特定のTargetタンパク質に対する抗体、またはこの遺伝子が発現されるマーカー遺伝子産物に対する抗体でウェスタンブロットをプローブすることによって、評価し得る。最後に、仔由来の種々の細胞のインサイチュ分析（例えば、細胞の固定および抗体での標識化）および/またはFACS（蛍光活性化細胞選別）分析を、適切な抗体を用いて実施して、ノックアウト構築物遺伝子産物の存在または非存在を探し得る。

【0196】

ノックアウト動物または破壊トランスジェニック動物を作製するなその他の方法もまた、一般的に公知である。例えば、Manipulating the Mouse Embryo (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)を参照のこと。レコンビナーゼ依存性ノックアウトもまた、例えば、標的配列を挿入するための相同組換えによって生成され得、その結果、組織特異的および/またはTarget-遺伝子の不活化の一時的な制御が、レコンビナーゼ配列（以下に記載）によって制御され得る。

【0197】

1つより多いノックアウト構築物および/または1つより多い導入遺伝子発現構築物を含む動物は、いくつかの方法のいずれかにおいて、調製される。調製の

好ましい様式は、各々が所望のトランスジェニック表現型の1つを含む一連の哺乳動物を生成することである。このような動物は、一連の交配、戻し交配、および選択によって共に養育され、最終的に、全ての所望のノックアウト構築物および/または発現構築物を含む単一の動物を生成し、ここでこの動物は、ノックアウト構築物および/または導入遺伝子の存在を除いて、他の点では野生型と類遺伝子性（ほぼ同一）である。

【0198】

T a r g e t 導入遺伝子は、タンパク質の野生型形態をコードし得るか、またはそのホモログ（アゴニストおよびアンタゴニストの両方、ならびにアンチセンス構築物を含む）をコードし得る。好ましい実施形態において、導入遺伝子の発現は、特定の細胞、組織または利用する発達段階（例えば、所望のパターンでの発現を制御するシス活性配列）のサブセットに制限される。本発明において、T a r g e t タンパク質のこのようなモザイクの発現は、多くの形態の系列分析のために必須であり得、そして例えば、その他の点では正常な胚における組織の小さな斑点の発達を大きく変化させ得るT a r g e t の発現の欠損の効果を評価する手段を、さらに提供し得る。このために、ならびに組織特異的な調節配列および条件的調節配列を使用して、特定の空間的模式での導入遺伝子の発現を制御し得る。さらに、発現の一時的なパターンは、例えば、条件的組換え系または原核生物の転写調節配列によって、提供され得る。

【0199】

導入遺伝子の発現がインビボで部位特異的な遺伝操作によって調節され得ることを可能にする、遺伝技術は、当業者に公知である。例えば、標的配列の遺伝的組換えを触媒するレコンビナーゼの発現の調節を可能にする遺伝系が、利用可能である。本明細書中において使用する場合に、語句「標的配列」とは、レコンビナーゼによって遺伝的に組換えられるヌクレオチド配列をいう。標的配列は、レコンビナーゼ認識配列に隣接し、そして一般に、レコンビナーゼ活性を発現する細胞において、切断されるかまたは転化されるかのいずれかである。レコンビナーゼにより触媒される組換え事象は、標的配列の組換えが、被験体T a r g e t タンパク質の1つを発現を活性化させるかまたは抑制するかのいずれかを生じる

ように、設計され得る。例えば、組換えTarget遺伝子の発現と干渉する標的配列（例えば、拮抗ホモログまたはアンチセンス転写物をコードする配列）の切断は、この遺伝子の発現を活性化するよう設計され得る。タンパク質の発現とのこの干渉は、種々の機構（例えば、Target遺伝子の、プロモーターエレメントまたは内部終止コドンからの空間的分離）から生じ得る。さらに、導入遺伝子が作製され得、ここで、この遺伝子のコード配列は、レコンビナーゼ認識配列に隣接し、そして最初に、プロモーターエレメントに対して3'から5'の配向で細胞内にトランスフェクトされる。このような例において、標的配列の転化は、コード配列の5'末端を、プロモーターにより駆動される転写活性を可能にするプロモーターエレメントに対して配向させて配置することによって、被験体遺伝子を再配向する。

【0200】

本発明のトランスジェニック動物は全て、それらの複数の細胞内に、本発明の導入遺伝子を含み、この導入遺伝子は、細胞の増殖、死および/または分化の調節に関して、「宿主細胞」の表現型を変化させる。本明細書中に記載の1つ以上の導入遺伝子構築物を利用して、本発明のトランスジェニック生物を生成することが可能であるので、一般的な記載は、外因性遺伝物質を一般に参照することによって、トランスジェニック生物の生成に関して与えられる。この一般的な記載は、以下に記載する方法および材料を利用して、生物に特定の導入遺伝子配列を組み込むために、当業者により受け入れられ得る。

【0201】

例示的な実施形態において、バクテリオファージP1のcre/loxPレコンビナーゼ系(Laksora、(1992)PNAS 89:6232-6236;Orbanら(1992)PNAS 89:6861-6865)またはSaccharomyces cerevisiaeのFLPレコンビナーゼ系(O'Gormanら(1991)Science 251:1351-1355;PCT公開WO92/15694)のいずれかを使用して、インビボで部位特異的遺伝子組換え系を生成し得る。Creレコンビナーゼは、loxP配列間に位置する転化標的配列の部位特異的組換えを触媒する。loxP配列は、34塩

基対ヌクレオチド反復配列であり、これにCreレコンビナーゼが結合し、そしてCreレコンビナーゼにより媒介される遺伝的組換えのために必要である。loxP配列の配向は、Creレコンビナーゼが存在する場合に転化標的配列が切断されるか転化されるかを決定する(Abremskiら(1984) J. Biol. Chem. 259:1509-1514); loxP配列が直列反復として配向する場合には、標的配列の切断を触媒し、そしてloxP配列が逆方向反復として配向する場合には、標的配列の転化を触媒する。

【0202】

従って、標的配列の遺伝的組換えは、Creレコンビナーゼの発現に依存する。このレコンビナーゼの発現は、調節制御(例えば、過剰に添加される薬剤により組織特異的、発達段階特異的、誘導的または抑制的)に曝されるプロモーターエレメントによって、調節され得る。この調節される制御は、レコンビナーゼ発現がプロモーターエレメントによって媒介される細胞においてのみ、標的配列の遺伝的組換えを生じる。従って、組換えTargetタンパク質の発現の活性化は、レコンビナーゼ発現の制御によって、調節され得る。

【0203】

組換えTargetタンパク質の発現を調節するために、cre/loxPレコンビナーゼ系を使用することは、Creレコンビナーゼおよび被験体配列の両方をコードする導入遺伝子を含むトランスジェニック動物の構築を必要とする。Creレコンビナーゼおよび組換えTarget遺伝子の両方を含む動物は、「二重」トランスジェニック動物の構築によって、提供され得る。このような動物を提供するための好都合な方法は、各々が導入遺伝子(例えば、Target遺伝子およびレコンビナーゼ遺伝子)を含む、2体のトランスジェニック動物を交配させることである。

【0204】

レコンビナーゼにより媒介される発現可能フォーマットにおいて、Target導入遺伝子を含むトランスジェニック動物を最初に構築することから誘導される1つの利点は、被験体タンパク質(作用性であっても拮抗性であっても)が、このトランスジェニック動物の発現の際に欠失し得ることに由来する。このよう

な例において、創始者集団（ここで、被験体導入遺伝子はすべての組織において無症候性である）が、成長および維持され得る。この創始者集団の個体は、例えば、1つ以上の組織および/または所望の一時的なパターンにおいてレコンビナーゼを発現する動物と、交配され得る。従って、例えば、拮抗性Target導入遺伝子が無症候性である創始者集団の作製は、その創始者由来の子孫の研究を可能にし、ここで、特定の組織または特定の発達段階における、Targetにより媒介される誘導の破壊は、例えば、致死の表現型を生じる。

【0205】

類似の条件的導入遺伝子は、原核生物のプロモーター配列を使用して提供され得、これは、Target導入遺伝子の発現を容易にするために、原核生物のタンパク質が同時に発現されることを必要とする。例示的なプロモーターおよび対応するトランス活性原核生物タンパク質は、米国特許第4,833,080号に与えられる。

【0206】

さらに、条件的導入遺伝子の発現は、トランス活性タンパク質（例えば、レコンビナーゼまたは原核生物タンパク質）をコードする遺伝子が組織に送達され、そして例えば細胞型に特異的な様式で発現される、遺伝子治療様の方法により誘導され得る。この方法によって、TargetA導入遺伝子は、トランスアクチベーターの導入によって「作動される（turned-on）」まで、成体であることに無症候性のままであり得る。

【0207】

例示的な実施形態において、本発明の「トランスジェニック非ヒト動物」は、導入遺伝子を非ヒト動物の生殖細胞系に導入することによって、生成される。種々の発達段階における胚の標的細胞を使用して、導入遺伝子を導入し得る。胚の標的細胞の発達段階に依存して、異なる方法が使用される。本発明を実施するために使用される任意の動物の特異的株（単数または複数）は、一般的な良好な健康、良好な胚の収率、胚における良好な前核可視性、および良好な生殖適正に関して選択される。さらに、ハプロタイプが、重要な因子である。例えば、トランスジェニックマウスを生成する場合に、C57BL/6またはFVBのような株

が、しばしば用いられる (Jackson Laboratory、Bar Harbor、ME)。好ましい株は、C57BL/6またはDBA/1のような、H-2^b、H-2^dまたはH-2^qハプロタイプを有する株である。本発明を実施するために使用される株は、それ自体がトランスジェニックであり得、そして/またはノックアウトであり得る (すなわち、1つ以上の遺伝子が部分的または完全に抑制された動物から得られる)。

【0208】

1つの実施形態において、導入遺伝子構築物は、単一段階の胚に導入される。この接合体は、マイクロインジェクションのための最良の標的である。マウスにおいて、雄性の前核は、直径約20マイクロメートルの大きさに達し、これは、再現性のある1~2p1のDNA溶液の注射を可能にする。接合体を遺伝子移入のための標的として使用することは、ほとんどの場合において、注射されるDNAが、最初の分割の前に宿主遺伝子に組込まれるという、主要な利点を有する (Brinsterら (1985) PNAS 82:4438-4442)。その結果として、トランスジェニック動物の全ての細胞が、組込まれた導入遺伝子を有する。このことはまた、一般に、導入遺伝子の、創始者の仔への効果的な伝達に反映される。なぜなら、生殖細胞の50%が、導入遺伝子を収容する (harbor) からである。

【0209】

通常は、受精した胚は、前核が現れるまで適切な培地中でインキュベートされる。おおよそこの時点において、導入遺伝子を含むヌクレオチド配列が、以下に記載されるように、雌性または雄性の前核に導入される。マウスのようないくつかの種においては、雄性の前核が好ましい。外因性の遺伝物質が、接合体の雄性DNA補体に付加され、その後、卵核または接合体の雌性前核によりプロセッシングされることが、もっとも好ましい。卵核または雌性前核は、恐らく雄性DNAの前核をヒストンと置換することによって雄性DNA補体に影響を与える分子を放出し、これによって、雌性および雄性のDNA補体の組合せを容易にして、二倍体の接合体を形成すると考えられる。

【0210】

従って、外因性の遺伝物質が、DNAの雄性の補体またはDNAの他の任意の補体に付加され、その後、雌性前核の影響を受けることが、好ましい。例えば、外因性の遺伝物質は、雄性前核の形成の可能な限り直後（これは、雄性および雌性の前核が十分に隔離されており、そして両方が細胞膜の近くに位置するときである）の、初期の雄性前核に付加される。あるいは、外因性の遺伝物質は、精子が凝縮するよう誘導された後に、精子の核に付加され得る。次いで、外因性の遺伝物質を含む精子が卵に添加され得るか、または凝縮した精子が卵に添加され得、可能な限りその直後に、導入遺伝子構築物が付加される。

【0211】

導入遺伝子ヌクレオチド配列の胚への導入は、例えば、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、またはリポフェクションのような、当該分野において公知の任意の手段によって、達成され得る。導入遺伝子ヌクレオチド配列の胚への導入に続いて、この胚は、種々の量の時間にわたってインビトロでインキュベートされ得るか、または代理宿主に再移植され得るか、あるいはその両方である。成熟のためのインビトロでのインキュベーションは、本発明の範囲内である。1つの通常の方法は、胚を、種に依存して約1～7日間インビトロでインキュベートし、次いでこれらを代理宿主に再移植することである。

【0212】

本発明の目的のために、接合体は、本質的に、完全な生物に発達し得る二倍体細胞の形成である。一般に、接合体は、配偶子（単数または複数）由来の2つのハプロイド核の融合によって、天然にかまたは人工的にかのいずれかで形成された核を含む卵から構成される。従って、配偶子核は、天然に適合性の核（すなわち、機能的生物への分化および発達を起こし得る生存接合体を生じる核）でなければならない。一般に、正倍数性の接合体が好ましい。異数体の接合体が得られる場合には、染色体の数は、いずれかの配偶子が起源である生物の正倍数性の数に対して1より大きく変化するべきではない。

【0213】

類似の生物学的考察に加えて、物理的考察もまた、接合体の核または接合体の核の一部を形成する遺伝物質に添加され得る外因性の遺伝物質の量（例えば、容

量)を支配する。遺伝物質が除去されない場合には、添加され得る外因性の遺伝物質の量は、物理的に破壊されずに吸収される量により、制限される。一般に、挿入される外因性の遺伝物質の容量は、約10ピコリットルを超えない。付加の物理的効果は、接合体の生命力を物理的に破壊するほどに大きくてはならない。DNA配列の数および変動の生物学的制限は、特定の接合体および外因性の遺伝物質の機能に依存して変動し、そして当業者に容易に明らかである。なぜなら、得られる接合体の遺伝物質(外因性の遺伝物質を含む)は、接合体の機能的生物への分化および発達を、生物学的に開始および維持し得なければならないからである。

【0214】

接合体に付加される導入遺伝子構築物のコピーの数は、付加される外因性の遺伝物質の総量に依存し、そして遺伝的な形質転換が生じ得る量である。理論的には、1つのみのコピーが必要とされる；しかし、一般に、1つのコピーが機能的であることを保証するために、導入遺伝子構築物の多数のコピー(例えば、1,000~20,000のコピー)が利用される。本発明に関しては、外因性DNA配列の表現型発現を増強するために、挿入された外因性DNA配列の各々の1つより多い機能的コピーを有することが、しばしば有利である。

【0215】

外因性の遺伝物質を核遺伝物質に付加することを可能にする任意の技術が、この技術が細胞、核膜、または他の存在する細胞もしくは遺伝子の構造に対して破壊的ではない限り、利用され得る。この外因性の遺伝物質は、好ましくは、マイクロインジェクションによって、核遺伝物質に挿入される。細胞および細胞構造のマイクロインジェクションは、当該分野において公知であり、そして使用される。

【0216】

再移植は、標準的な方法を用いて達成される。通常は、代理宿主が麻酔され、そして胚がその卵管に挿入される。特定の宿主に移植される胚の数は種によって変動するが、通常は、その種が天然に生じる仔の数に匹敵する。

【0217】

代理宿主のトランスジェニック仔は、任意の適切な方法によって、導入遺伝子の存在および/または発現に関して、スクリーニングされ得る。スクリーニングはしばしば、導入遺伝子の少なくとも一部に相補的であるプローブを使用して、サザンブロット分析またはノーザンブロット分析によって、達成される。導入遺伝子によりコードされるタンパク質に対する抗体を使用する、ウェスタンブロット分析は、導入遺伝子産物の存在に関するスクリーニングのための代替的方法または追加の方法として、使用され得る。代表的に、DNAは尾の組織から調製され、そして導入遺伝子に関してサザン分析またはPCRによって分析される。あるいは、最も高いレベルで導入遺伝子を発現すると考えられる組織または細胞が、サザン分析またはPCRを使用して、導入遺伝子の存在および発現に関して試験されるが、任意の組織型または細胞型が、この分析のために使用され得る。

【0218】

導入遺伝子の存在を評価するための代替的方法またはさらなる方法としては、限定しないが、適切な生化学アッセイ（例えば、酵素および/または免疫学的アッセイ）、特定のマーカーまたは酵素活性のための組織学的染色、フローサイトメトリー分析などが挙げられる。血液の分析はまた、血液中の導入遺伝子産物の存在を検出するため、ならびに種々の型の血球および他の血液成分のレベルに対する導入遺伝子の効果を評価するために有用であり得る。

【0219】

トランスジェニック動物の子孫は、トランスジェニック動物を適切なパートナーと交配させるか、またはトランスジェニック動物から得られた卵子および/または精子の体外受精により得られ得る。パートナーとの交配が行われる場合、パートナーは、トランスジェニックおよび/またはノックアウトであっても、そうでなくてもよく；パートナーがトランスジェニックである場合、同じ導入遺伝子もしくは異なる導入遺伝子、またはその両方を含み得る。あるいは、パートナーは、親系統であり得る。体外受精が使用される場合、受精された胚は、代理宿主に移植され得るか、もしくはインビトロでインキュベートされ得るか、またはその両方であり得る。いずれかの方法を使用して、子孫は、上記の方法または他の適切な方法を使用して、導入遺伝子の存在について評価され得る。

【0220】

本発明に従って作製されたトランスジェニック動物は、外因性遺伝物質を含む。上記のように、外因性遺伝物質は、特定の実施形態において、標的タンパク質（アゴニストまたはアンタゴニストのいずれか）の産生、およびアンチセンス転写、または標的変異体を生じるDNA配列である。さらに、このような実施形態において、この配列は、好ましくは特定の型の細胞における導入遺伝子産物の発現を可能にする転写制御エレメント（例えば、プロモーター）に連結される。

【0221】

レトロウイルス感染はまた、導入遺伝子を非ヒト動物に導入するために使用され得る。発育する非ヒト胚は、インビトロで胚盤胞段階まで培養され得る。この期間、卵割球はレトロウイルス感染の標的であり得る（Jaenich、R.（1976）PNAS 73：1260-1264）。卵割球の効果的な感染は、透明帯を除去するための酵素処理により得られる（Manipulating the Mouse Embryo, Hogan編（Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1986））。導入遺伝子を導入するために使用されるウイルスベクター系は、代表的には導入遺伝子を輸送する複製欠損レトロウイルスである（Jahnerら、（1985）PNAS 82：6927-6931；Vander Puttenら、（1985）PNAS 82：6148-6152）。トランスフェクションは、単層のウイルス産生細胞上で卵割球を培養することにより、容易にかつ効果的に得られる（Vander Putten（前出）；Stewartら、（1987）EMBO J. 6：383-388）。あるいは、感染はより後の段階で行われ得る。ウイルスまたはウイルス産生細胞は、分割腔内に注入され得る（Jahnerら、（1982）Nature 298：623-628）。取りこみはトランスジェニック非ヒト動物を形成する細胞のサブセットにおいてのみ起こるため、創始者（founders）の大部分は導入遺伝子についてモザイクである（mosaic）。さらに、この創始者は、一般的に子孫において分離する、ゲノム中の異なる位置において、導入遺伝子の種々のレトロウイルス挿入を含み得る。さらに、妊娠中期（mid g

estation)の胚の子宮内レトロウイルス感染により、導入遺伝子を生殖細胞系に導入することはまた可能である(Jahnerら、(1982)前出)。

【0222】

導入遺伝子導入のための標的細胞の第3の型は、胚性幹細胞(ES)である。ES細胞は、インビボで培養されて胚と融合された、着床前期(pre-implantation)胚から得られる(Evansら、(1981)Nature 292:154-156;Bradleyら(1984)Nature 309:255-258;Gosslerら、(1986)PNAS 83:9065-9069;およびRobertsonら、(1986)Nature 322:445-448)。導入遺伝子は、DNAトランスフェクションまたはレトロウイルス媒介形質導入により、ES細胞に効率的に導入される。このような形質転換されたES細胞は、その後非ヒト動物由来の胚盤胞細胞と組合せ得る。このES細胞は、その後、胚とコロニー形成(colonize)し、そして生じたキメラ動物の生殖細胞系に寄与する。概説については、Jaenisch, R. (1988)Science 240:1468-1474を参照のこと。

【0223】

(4.7 治療法)

別の局面では、本発明は、薬学的有効量の黄斑変性治療薬(therapeutic)を投与することにより、被験体における動脈壁破裂障害の発症を、処置または予防するための方法を提供する。黄斑変性治療薬は、抗炎症剤であり得、好ましくはTNF-a、IL-1、GM-CSF、IL-4またはIL-13のアンタゴニストであり得る。この治療剤はまた、IL-10、M-CSF、IL-6およびIL-4またはそれらのアゴニストであり得る。結晶腔形成またはDS/CNVを低減するのに役立つ任意の治療薬は、同時に起こる動脈壁破裂障害もまた処置し得るので、使用され得る。好ましい実施形態では、この薬剤は、サイトカイン、ケモカインおよびそれらのアゴニストおよびアンタゴニストからなる群から選択される。有用な治療薬は、炎症を阻害する薬剤を含む。

【0224】

別の実施形態では、黄斑変性治療薬は、1つ以上のDRAM（例えば、アミロイドAタンパク質、アミロイドP成分、抗キモトリプシン、アポリポタンパク質E、b2ミクログロブリン、補体3、補体C5、補体C5b-9末端複合体、第X因子、フィブリノゲン、イムノグロブリン（および）、プロトロンビン、トロンボスポンジン、またはビトロネクチン）の発現のインヒビターである。別の実施形態では、本発明は、DRAMの産生を調節すること（例えば、DRAMの遺伝子発現または活性を阻害するかまたは拮抗すること）により、結晶腔関連疾患を処置するための方法を提供する。結晶腔におけるアミロイドPおよび1-抗キモトリプシン（セリンプロテアーゼのインヒビター）の蓄積は、RPEまたは脈絡膜細胞によって結晶腔をタンパク質分解で取除こうという試みを相殺するように作用し得る。例えば、アミロイドPはまた、アテローム硬化関連非アミロイド沈着物（Niculescuら、1987）、ケラチン中間フィラメント凝集物（Hintnerら、1988）、および糸球体腎症（glomerulonephropathy）関連電子高密度沈着物（dense deposits）（Yangら、1992）において、見出される。アミロイドPは、弾性線維に関連し、そしてインビボでプロテアーゼインヒビターとして作用し得る（LiおよびMcAdam, 1984; Vachinoら、1988）。またブルー膜の正常成分であり、この場合酵素分解に対して弾性板を保護し得る（Kiveläら、1994）。従って、これらのタンパク質の生合成のダウンレギュレーションは、結晶腔形成を阻害するため、または結晶腔のクリアランスまたは融解を促進するために重要である。結晶腔形成の阻害または結晶腔クリアランスもしくは融解の促進は、以下のような多くのレジメンにより達成され得る：1つ以上のDRAMについてRNA合成の阻害、（2）1つ以上のDRAMのRNA代謝回転または分解の増強、（3）1つ以上のDRAMのタンパク質への翻訳の阻害、（4）1つ以上のDRAMのタンパク質プロセッシングまたは輸送の阻害；（5）結晶腔沈着を生じるDRAMの会合に必要な、分子間および分子内結合に関与する1つ以上の因子上の、特定のタンパク質結合部位をブロックすることによる、結晶腔形成の阻害；（6）（例えば、酵素を使用する）タンパク質沈着物

の消化または摂動 (p e r t u r b a t i o n) ; (7) (例 えば、酵 素 - 抗 体 技 術 を 使 用 す る) イ ン サ イ チ ュ で の D R A M の 標 的 化 お よ び 破 壊 。 D R A M は、例 えば、光 反 応 性 レ ー ザ ー 治 療 ま た は、当 該 分 野 で 周 知 の、イ ン サ イ チ ュ で タ ン パ ク 質 を 標 的 化 お よ び 破 壊 す る た め の 他 の 手 段 に よ り、標 的 化 さ れ 得 る。こ の よ う な 手 段 と し て は、プ ロ テ ア ー ゼ、あ る い は 活 性 化 さ れ た 場 合 に 個 々 の 成 分 を 切 断 も し く は 変 性 す る か、ま た は 2 つ 以 上 の 成 分 の 相 互 作 用 を 妨 害 す る 化 学 物 質 の よ う な 反 応 性 の グ ル ー プ に 接 合 し た 抗 体 が 挙 げ ら れ 得 る。

【0225】

別の実施形態では、結晶腔関連疾患のための治療薬としては、1つ以上のDRAMの発現を調節する因子の遺伝子発現を変更する薬剤が挙げられる。このような薬剤は、DRAMの生合成を直接的か間接的のいずれかで、阻害する「アンタゴニスト」であり得る。この薬剤は、例えば、DRAMの転写または翻訳を特異的に阻害し得る。あるいは、天然に存在する治療剤の合成を増加する遺伝子(単数または複数)を、好ましくは直接的かまたは間接的にアップレギュレートし得る。例えば、1つ以上のDRAMを分解するタンパク質分解酵素もしくはサイトカインの増加した遺伝子発現、または免疫応答を調節する薬剤が所望され得る。

【0226】

従って、本発明はまた、結晶腔治療薬または予防処置の有効性、コア形成の不在、治療薬または処置の有効性の証拠を与える結晶腔もしくは結晶腔コアの消失をモニタリングするために有用である。

【0227】

1つの局面では、本発明の治療薬は、アンチセンス治療に関する。本明細書中で使用される場合、「アンチセンス」治療は、細胞内条件で1つ以上のDRAMをコードする細胞性mRNAおよび/またはゲノムDNAと特異的にハイブリダイズ(例えば、結合する)するオリゴヌクレオチド分子またはそれらの誘導体の、これらのタンパク質の発現を(例えば、転写および/または翻訳を阻害することにより)阻害するための、投与またはインサイチュ生成に関する。この結合は、従来の塩基対相補性、または例えば、DNA二重鎖への結合の場合、二重らせんの主要な溝における特異的相互作用による結合であり得る。一般に、「アンチ

センス」治療は、一般的に当該分野で使用される範囲の技術をいい、そしてオリゴヌクレオチド配列への特異的結合に依存する任意の治療を含む。

【0228】

本発明のアンチセンス構築物は、例えば、細胞において転写された場合に、DRAMタンパク質をコードする細胞性mRNAの少なくとも独特な部分に相補的なRNAを産生する、発現プラスミドとして送達され得る。あるいは、アンチセンス構築物は、エキソビボで生成され、そして細胞内に導入される場合に、mRNAおよび/またはDRAM遺伝子のゲノム配列にハイブリダイズすることにより、発現の阻害を引き起こす、オリゴヌクレオチドプローブであり得る。このようなオリゴヌクレオチドプローブは、好ましくは内因性ヌクレアーゼ（例えば、エキソヌクレアーゼおよび/またはエンドヌクレアーゼ）に耐性があり、従ってインビボで安定な、改変されたオリゴヌクレオチドである。アンチセンスオリゴヌクレオチドとしての使用のための例示的な核酸分子は、DNAのホスホラミデートアナログ、ホスホチオエートアナログおよびメチルホスホネートアナログである（米国特許第5,176,996号、同第5,264,564号および同第5,256,775号もまた参照のこと）。アンチセンス治療において有用なオリゴマー構築へのアプローチは、当該分野で周知である。アンチセンスDNAに関しては、翻訳開始部位（例えば、目的の結晶腔関連成分ヌクレオチド配列の-10と+10領域との間）由来のオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

【0229】

アンチセンスアプローチは、DRAM mRNAまたはそれらのアゴニストもしくはアンタゴニストに相補的なオリゴヌクレオチド（DNAまたはRNAのいずれか）の設計を含む。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、対象mRNA転写物に結合し、そしてその転写物の翻訳を妨害するか、または分解を促進する。絶対的な相補性が好ましいが、必要ではない。二重鎖アンチセンス核酸の場合、従って二重鎖DNAのうち的一本鎖が、試験され得るか、または三重鎖形成がアッセイされ得る。ハイブリダイズする能力は、相補性の程度およびアンチセンス核酸の長さの両方に依存する。一般に、ハイブリダイズ核酸が長いほど、より多くのRNAとの塩基ミスマッチを含み得、そしてなお安定な二重鎖（場合によって

は三重鎖)を形成する。当業者は、ハイブリダイズした複合体の融点を測定するための標準的な手段の使用により、ミスマッチの寛容性の程度を確かめ得る。

【0230】

アンチセンスまたはリボザイムを調製および使用する他の特徴、ストラテジーおよび方法は、U.S.S.N.09/183,972において見出され、その教示は、本明細書中で参考として援用される。

【0231】

別の実施形態では、本発明は、有効量の黄斑変性治療薬および治療学的に受容可能なキャリアを含む、動脈壁破裂障害を処置または予防するために有用な薬学的組成物を提供する。薬学的調製物を調製するためのこのようなキャリアおよび方法は、U.S.S.N.09/183,972において見出され、そしてこれは本明細書中に参考として援用される。

【0232】

別の局面では、本発明は、非毒性投薬量で薬剤を被験体に投与こと、および結晶腔形成または新生血管形成が阻害されたか否かまたは融解されたか否かを決定することにより、被験体における動脈壁破裂障害を処置または予防するための薬剤、またはその薬剤の効力を決定するための方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、黄斑変性についての非ヒトモデルを薬剤に接触させ、そして黄斑変性の1つ以上のマーカーをモニタリングすることにより、被験体における動脈破裂障害を処置または防止するための薬剤を同定するための方法を提供し、ここで1つ以上のこのマーカーの不在または消失は、動脈壁破裂障害の阻害を示す。上記のように、このマーカーは、タンパク質または核酸を検出するための当該分野で公知の任意の多数の方法によってモニタリングされ得る。黄斑変性を検出するために使用されるマーカーは、サブRPE空隙における結晶腔または1つ以上のDRAM(例えば、アミロイドAタンパク質、アミロイドP成分、抗キモトリプシン、アポリポタンパク質E、b2ミクログロブリン、補体3、補体C5、補体C5b-9末端複合体、第X因子、フィブリノゲン、イムノグロブリン(および)、プロトロンビン、トロンボスポンジン、またはビトロネクチン)の存在であり得る。

なお別の局面では、本発明は、AAAを診断するか、またはAAAの処置に指向されるがAMDもまた処置する薬物を試験するために使用され得るAAAについての動物モデルを提供する。AMDについての動物モデルは、小さいAAAの臨床的進行（または後退）を調節するための治療を提供する。実施例4は、AMDについてのサルモデルを提供し、そしてそのためにAAAについての動物モデルを提供する。実施例5は、AMDについてのラットモデルを提供し、そしてそのためにAAAについての動物モデルを提供する。好ましくは、斑を有する任意の動物が、動物モデルを作製するために使用され得る。

【0233】

本発明の実施は、他に示されなければ、当該分野の技術範囲内である、細胞生物学、細胞培養、遺伝学、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学の従来技術を使用する。例えば、Molecular Cloning A Laboratory Manual, 第2版、Sambrook, FritschおよびManiatis (編) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, 第I巻および第II巻 (D.N. Glover編、1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait編、1984); Mullisら、米国特許第4,683,195号; Nucleic Acid Hybridization (B.D. HamesおよびS.J. Higgins編、1984); Transcription And Translation (B.D. HamesおよびS.J. Higgins編、1984); Culture of Animal Cells (R.I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press、1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); (論文) Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.H. MillerおよびM.P. Calos編、1

987、Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, 第154巻および155巻(Wuら、編)、Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology(MayerおよびWalker編、Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, I~IV巻(D.M.WeirおよびC.C.Blackwell編、1986); Manipulating the Mouse Embryo(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986); Rossner, B., Fundamentals of Biostatistics, Duxbury Press, Belmont, CA, 370-377, 199; Lewin, B. 編、Genes VI, Oxford University Press, UK, 1998を参照のこと。

【0234】

(例示)

(実施例1: 腹大動脈瘤/AMD関連: 1998データベース)

2000対より多くのヒトドナーの眼(1日齢~106年齢までの範囲)からなるヒト貯蔵所(repository)(死亡(mortem)時刻後平均3.2時間以内に処理されている)を、AMDについて眼を分析するために使用した。医療および眼の病歴、家族質問表、ならびに血液および血清もまた、AAAおよびAMDの存在を決定するために、大部分のドナーから得られた。全ての眼を網膜専門医による肉眼検査に供し、そして光学顕微鏡(4%パラホルムアルデヒド)および電子顕微鏡(2.0%ホルムアルデヒドおよび2.5%グルタルアルデヒド)、免疫組織化学、ならびに当該分野で公知の種々の生化学分析および分子生物学分析のために処理した。従って、DNA、RNA、固定された組織および凍結された組織が、貯蔵所中の全ての眼について利用可能であった。さらに、RPE細胞株を樹立し、そしてAMDを有するか有さない全ての年齢および人種の選択されたドナーから凍結した。収集した眼の約18%が、AMDの顕著な

サイン（円板状癍痕、黄斑下（submacular）血管新生膜、異常な色素沈着、および/または地図状萎縮）および/または臨床上記録されたAMDの病歴を示す。他の眼および全身の疾患（緑内障、糖尿病、ほかの網膜および黄斑変性、アルツハイマー病、パーキンソン病、および種々の発生異常を含む）はまた、貯蔵所中に示される。ドナーの眼貯蔵所は、AMDの原因に關与する特定の生物学的プロセス、遺伝子型 - 表現型相関、ならびにAMDおよび他の黄斑ジストロフィーの原因に關連する「候補」分子および遺伝子の研究に有用である。

【0235】

1998貯蔵所からの眼が例として適する。ドナーの医療記録が、最も幅広いのでこのデータベースを選択した。1998年に得られた全207人のドナー（「The 1998 Database」）のうち、33人（全体の15.9%）がAMDを有し、12人のドナー（全体の1.9%）がAAAを有していた。33人のAMDドナーのうち、4人が地図状萎縮（GA、これはAMDの乾性形態の特徴である）を有し（全体の1.9%）、11人が円板状癍痕および脈絡膜新生血管形成（DS/CNV、これはAMDの湿性形態の特徴である）を有し（全体の5.3%）、そして他の18人は、診断が湿性形態と乾性形態との間で識別されないAMDを有した（全体の8.7%）（表2）。

【0236】

全207人のドナーのうち、12人のドナーはAAAを有した。12人のAAAドナーのうち、8人はAMDも有した（AAAドナーのうち66.7%）。AMDを有する8人のドナーのうち、6人がDS/CNV形態を有し（AAAドナーのうち50%）、そして2人がGA形態を有した（16.7%）（表2）。表3および4は、この研究の分析を示し、そして期待され、そして観察された、AAAおよびAMDの発生および同時発生を提供し、これらの2つの疾患が、全体の個体数から期待された頻度より10倍大きい頻度であることを証明する：

（表2：AAAおよび/またはAMDおよび/またはDS/CNVを有する眼のドナーのデータの要約）

207人の全ドナー

33人のAMDを有したドナー =

4人の地図状萎縮 (GA)

11人の円板状瘢痕および脈絡膜新生血管形成 (DS / CNV)

18人その他 / 不明

12人のAAAを有したドナー :

8人のAMD (= 6人のDS / CNVおよび2人のGA)

1998データベースのw / AMDの% : 15.9%

1998データベースのw / DS / CNVの% : 5.3%

1998データベースのw / AAAの% : 5.8%

AAAドナーのw / AMDの% : 66.7%

AAAドナーのw / DS / CNVの% : 50%

(表3 : AAAおよび / またはAMDの有病率)

【0237】

【表3】

	<u>AMD-</u>	<u>AMD+</u>	<u>合計</u>
<u>AAA+</u>	4	8	12
<u>AAA-</u>	170	25	195
合計	174	33	207

a) 臨床的に診断されたAMDを有するドナーについて、AAAもまた有している可能性はいくらか?

貯蔵所全体におけるAAA : 12 / 207 (5.8%)

AMDを有さないドナーにおけるAAA : 4 / 174 (2.3%)

AMDを有するドナーにおけるAAA : 8 / 33 (24%)

【0238】

【表4】

	<u>DS/CNV-</u>	<u>DS/CNV+</u>	<u>合計</u>
<u>AAA+</u>	6	6	12
<u>AAA-</u>	190	5	195
合計 : 196	11	207	

b) DS / CNVを有するAMDドナーについて、AAAもまた有している可能性はいくらか？

貯蔵所全体におけるAAA : 12 / 207 (5.8%)

DS / CNVを有さないドナーにおけるAAA : 6 / 196 (3.1%)

DS / CNVを有するドナーにおけるAAA : 6 / 11 (54.5%)

(表4 : 実測のAMD、CNV / DSおよびAAAならびに期待されたAMD、CNV / DSおよびAAA)

【0239】

【表5】

	<u>Obs. AMD+</u>	<u>Exp. AMD+</u>	<u>Obs. AMD-</u>	<u>Exp. AMD-</u>
AAA+	8	1.91 ^a	4	10.09 ^c

	<u>Obs. AAA+</u>	<u>Exp. AAA+</u>	<u>Obs. AAA-</u>	<u>Exp. AAA-</u>
AMD+8		1.91 ^a	25	31.09 ^d

	<u>Obs. DS/CNV+</u>	<u>Exp. DS/CNV+</u>	<u>Obs. DS/CNV-</u>	<u>Exp. DS/CNV-</u>
AAA+	6	0.64 ^b	6	11.36 ^e

ここで : Obs. = 実測値 ; Exp = 期待値 ;

【0240】

【表6】

- a) $\text{Exp. AMD+/AAA+} = (\% \text{AMD+} / \text{全体}) (\% \text{AAA+} / \text{全体}) (\text{全ドナー}) = (15.9\%) (5.8\%) (207) = 1.91$
- b) $\text{Exp. DS/CNV+/AAA+} = (\% \text{CNV+} / \text{全体}) (\% \text{AAA+} / \text{全体}) (\text{全ドナー}) = (5.3\%) (5.8\%) (207) = 0.64$
- c) $\text{Exp. AMD-/AAA+} = \text{全 AAA(+)} - \text{Exp. AMD+/AAA+} = 12 - 1.91 = 10.09$
- d) $\text{Exp. AAA-/AMD+} = \text{全 AMD(+)} - \text{Exp. AAA+/AMD+} = 33 - 1.91 = 31.09$
- e) $\text{Exp. DS/CNV-/AAA+} = \text{全 AAA(+)} - \text{Exp. DS/CNV+/AAA+} = 12 - 0.64 = 11.36$

【0241】

(結果)

表4は、DS/CNVとAAAとの同時発生が、207ヒトドナーの上記の個体数から期待されるよりも9.4倍高いことを示す。AMDとAAAとの同時発生は、207のヒトドナーの眼の上記の個体数から期待されるよりも4.2倍高い。2つの変数の同時発生の統計的分析を、フィッシャーの直接確率検定 (Rossner, B., Fundamentals of Biostatistics, Duxbury Press, Belmont, CA, 370-377, 1995) により決定した。AAAおよびDS/CNVの同時発生のフィッシャーの直接確率検定については、 $p < 0.00001$ であった。これは、AMDの発生率とAAAの発生率との統計学的に有意な相関であり、この疾患が、病因または同じ遺伝子座を共有しているということを示唆する。

【0242】

(実施例2：胸大動脈瘤におけるAMDの発生率)

実施例1にしたがって得られた207のヒトドナーのうち、8人のドナーの眼が、胸大動脈瘤(TAA)を有し、それらの全てが、AMD関連底の所見を有した。1人のTAAドナーはまた、AAAとともにDS/CNVを有した。

【0243】

(実施例3：AMD関連病理学)

本明細書に表5として添付されるデータベースにおいて、同定される医療状態を記載するデータベースを提供する。

【0244】

【表7】

表 5

トナ-	AAA	AMD	大動脈硬化	緑内障	死因	医歴病歴
004-97	X	X			肺炎	CVA,MI,GI 出血,CHF,COPD
19-97	X				1-時心不全 1-心停止	腸動脈瘤 RF,AVR
26-97			X		1-心停止	先天性心臓弁反流
31-97			X		1-CPA 2-CHD	CHF,COPD
34-97		X			CHF	HTN,CHF
38-97		X			MSF	
39-97		X			1 R/A 2-COPD	RF,COPD
43-97		X ?			末期 COPD	CHF,肺炎
60-97	TAA				腸動脈瘤破裂	創-全身性CA
62-97	X ?	X ?			COPD	COPD,中程度加量,吸引
87-97	X				ICB	CHF,CAD,HTN,
98-97			X		MI	CHF,IDD,RRNF
100-97		X			MI	CPA
102-97			X		ICB	TIA's,院作 障害
109-97		X		X	CHF	?
110-97		X ?			?	?
111-97		X		X	CVA	HTN,CAD
113-97		X			不明 MI	CPA
125-97		X			心不全,肺炎	CHF,心不全,末梢循環不全
132-97		X			GI 出血	HTN,GI 出血,脳動脈瘤
117-97	X				CPA	COPD,癌
136-97		X			MI	?
145-97		X ?			心停止	IDD,糖尿病
150-97		X ?			不明,肺炎	?
152-97		X ?			肺線維症	前立腺,HTN,肺,HTN,肺間質性肺炎
161-97		X ?			MI	CHF,左心不全
154-97		X F			CHF,MI	?
160-97			X,FD		ICB	HTN,不明MI
162-97		X			COPD	CHF,COPD,MI
172-97	X				MI	AAA 偽瘤
173-97			X		破裂 AAA	a-fib,早死不全
174-97	X	X	X		破裂 AAA	CAD,末梢血管疾患
181-97			X		動脈瘤,球白血病	FABM3,CVA,ARDS,HTN
182-97		X F			MI	HTN,CHF,工腎 糖尿病
189-97	X ?	X			CHF,院作	CHF,CAD,HTN,心不全

【0245】

【表8】

表 5

ドナー	AAA	AMD	大動脈狭窄	線肉腫	死因	医療病歴
004-97	X	X			肺炎	CVA,MIGI 出血,CHF,COPD
19-97	X				肺死	機軸肺病
26-97		X	X		1-呼吸不全, 2-COPD	RF,AVR
31-97		X	X		1-心停止, 2-脳死 TAA	先天性心臓病及腫
34-97		X			1-GPA 2-CHD	CHF,COPD
38-97		X			CHF	HTN,CHF
39-97		X			MSF	RF,COPD
43-97		X?			1/RA 2-COPD	CHF, 肺炎
60-97	TAA	X?			末期 COPD	前全身性 CA
62-97		X?			胸動脈瘤破裂	COPD, 中程度虚衰, 呼吸
67-97	X				COPD	CHF,CAD,HTN, 心臓病
96-97			X		ICB	CHF,IDD,M,RNF
100-97		X			MI	GPA
102-97			X		MI	TIA's, 発作, 障害
109-97		X	X		ICB	?
110-97		X?			CHF	?
111-97		X		X	?	HTN,CAD
113-97		X			CVA	CPA
125-97		X			多発性 MI	CHF, 急性心臓病, 心臓病
132-97		X			心臓病, 心臓病	HTN,GI 出血, 両眼網膜剥離
117-97	X				GI 出血	COPD, 肺炎
136-97		X			GPA	?
145-97		X?			MI	IDD,M, 糖尿病
150-97		X?			心停止	?
152-97		X?			心臓病, 肺炎	前血腫, HTN, 肺, HTN, 肺動脈硬化
161-97		X?			肺線維症	CHF, 足の腫脹
154-97		X F			MI	?
160-97			X F/D		CHF,FM	HTN, 70-71F-1
162-97		X			ICB	CHF,COPD,MI
172-97	X				MI	AAA 修復
173-97			X		破裂 AAA	心臓病, 早老性虚衰
174-97	X		X		破裂 AAA	CAD, 末梢血管病変
181-97		X	X		前大動脈球状動脈瘤	FABM3,CVA,ARDS,HTN
182-97	X F				MI	HTN,CHF, 1型糖尿病
189-97	X?	X			CHF, 発作	CHF,CAD,HTN, 心臓病

ドナーの眼からなるヒト貯蔵所は、実施例1に記載されるパラメーターに従って収集された。医療および眼の病歴、家族質問表、ならびに血液および血清もまた

、AAAおよびAMDの存在を決定するために、大部分のドナーから得られた。全ての眼を網膜専門医による肉眼検査に供し、そして光学顕微鏡（4%パラホルムアルデヒド）および電子顕微鏡（2.0%ホルムアルデヒドおよび2.5%グルタルアルデヒド）、免疫組織化学、ならびに当該分野で公知の種々の生化学分析および分子生物学分析のために処理した。従って、DNA、RNA、固定された組織および凍結された組織が、貯蔵所中の全ての眼について利用可能であった。さらに、RPE細胞株を樹立し、そしてAMDを有するか有さない全ての年齢および人種の選択されたドナーから凍結した。眼を、AMDの存在について、直接的な検査（円板状瘢痕、黄斑下（submacular）血管新生膜、異常な色素沈着、および/または地図状萎縮）または臨床上記録された状態の病歴を得ることによって分析した。他の眼および全身の疾患（緑内障、糖尿病、ほかの網膜および黄斑変性、アルツハイマー病、パーキンソン病、および種々の発生異常を含む）はまた、貯蔵所中に示される。ドナーの眼貯蔵所は、AMDの原因に関与する特定の生物学的プロセス、遺伝子型-表現型相関、ならびにAMDおよび他の黄斑変性の原因に関連する「候補」分子および遺伝子の研究に有用である。

【0246】

（実施例4：AAAのサルモデル）

好ましい動物モデルは、サルのような斑を有する動物である、例えば、カニクイザルを、当該分野で周知の方法に従って麻酔した。脈絡膜循環をブロックし、そして360°角膜周囲切開を行い、眼をできるだけ回転させるために牽引縫合を使用し、後球（posterior globe）へのアクセスに達した。強膜の縁から脈絡膜を分離するために、平滑カニューレを使用し、そして60ユニットの、プロテアーゼを含まないコンドロイチナーゼABC（American Cyanamide）を含む100μlの滅菌バランス塩溶液（BSS）を、脈絡膜支質に注射した。強膜切開を、7-0ビクリル（vicryl）縫合糸で閉じた。間接型検眼鏡検査は、出血または色素脱失のない正常な脈絡膜および網膜を示した。結膜は、7-0ビクリル縫合糸および3mgのCelestoneを結膜下注射した。この動物を、新生血管形成を含む底の変化をモニターするために検眼鏡（ophthalmoscope）を使用して、7日間非侵襲性モニタ

一した。次いで、この動物を、過量のバルビツレート（「スリープアウェー（Sleep away）」）で安楽死させ、そして組織学的な観察のために、当該分野で公知の方法に従って眼を準備した。ブルーフ膜の明確な破壊が、実験の眼で観測され、酵素がブルーフ膜に達したことを示す。

【0247】

上記の実施例は、0.05から0.50mlのBSS中の1~100U/mlのエラスターゼを注射するために改変され得る。あるいは、上記の方法は、酵素の注射を、徐放性ペレットの形態での酵素の注入に置きかえるために改変され得、このような徐放性ペレット技術は、当該分野で周知である。あるいは、大動脈は、手術の必要なくエラスターゼまたはコンドロイチナーゼで灌流され得、そしてこの動物を上記のようにモニターする。

【0248】

（実施例5：AAAについてのラットモデル）

Anidjar/Dobrinラットを、腹大動脈への膵エラスターゼの注入によって作成する（Anidjar, S.ら、Circulation、82：973-981、1990、この技術は、本明細書中に参考として援用され、そして以下に簡単に記載される）。手短かに言うと、雄性Wistarラットの腹大動脈の1cmのセグメントを単離し、そして灌流する。この動物を、6%のナトリウムペントバルビタール（0.1ml/100g体重）で麻酔し、PE10ポリエチレンカテーテルを、大腿動脈に、その先端が腎臓下腹大動脈に達するまで外科手術用双眼顕微鏡の下で挿入する。大静脈を、側腹切開によって大動脈から切開し、側副動脈を結紮し、そしてカテーテル先端の位置を確認した。腹大動脈を、左腎静脈の位置でクランプし、そしてカテーテルの1cm下流の周りを結紮する。次いで、この単離した腹大動脈のセグメントを、2mlの適切な試験溶液（1ml/時の速度）で灌流する（例えば、2mlの標準生理食塩水中の15ユニットの膵エステラーゼ（I型；1ユニット = pH 8.8、37 で20分間加水分解された1mgのエラスチン、Sigma Chemical Co., St. Louis, MO）を、管腔から培地を通過して外膜へ）。コントロールラットを、2mlの生理食塩水単独で灌流する。灌流の終了の際に、大動脈のクラン

ブを外し、結紮系およびカテーテルを除去し、大腿動脈を結紮し、そして大動脈の透過性を確認する。この創傷を閉じ、ラットをそのケージに戻し、そしてAMD（例えば、結晶腔、円板状の癍痕または脈絡膜の新生血管形成）の存在およびAAAについてモニターする。

【0249】

あるいは、このラットを他のプロテアーゼ（例えば、コラーゲナーゼ、パパイシン、トリプシン、キモトリプシン、コンドロイチナーゼ、プラスミン、プラスミノゲンアクチベーターまたは「エラスターゼ活性」を有する（すなわち、成熟した架橋エラスチンを可溶化し得る）他の任意のプロテアーゼ、あるいはエラスチン性プロテアーゼ（*elastinolytic protease*）（例えば、マクロファージまたは好中球誘導プロテアーゼ））で灌流し得る。チオグリコレートまたは他の炎症性の刺激剤の灌流もまた、大動脈において炎症性応答を誘導し、これによってAAAまたはAMDの効果が悪化した。

【0250】

Anidjar/Dobrinラットに、代替的にエラスチン分解産物（EDP）（これは、大動脈を衰弱させ、樹状細胞およびマクロファージに対して走化性であることが示されてきた）を注入する。例えば、ペプチドVal-Gly-Val-Ala-Pro-Glyを大動脈に注入し得、この大動脈の拡張をモニターする（Senior, R.M.ら、*J. Cell Biol.*、99:870-874, 1984）。このラットを、例えば、CD18に指向される抗体、全ての白血球の抗原（*pan-leukocyte antigen*）（これらは、解剖に役立つマクロファージの移動をブロックする）のような免疫細胞の損傷大動脈への浸潤を阻害する薬剤（例えば、EDPによって生じる）の効果をモニターするために使用し得る（Ricci, M.A.ら、*J. Vasc. Surg.*、23:301-307, 1996）。

【0251】

（実施例6：アテローム硬化症、弾力線維症、アミロイドーシス、および膜性増殖性糸球体腎炎に付随する細胞外沈積物に共通の、タンパク質を含む加齢に伴う結晶腔および加齢性黄斑変性）

本発明者の研究室における最近の研究で、ビトロネクチンが結晶腔の主な成分であることが明らかとなった。ビトロネクチンがまた、種々の疾患に関連する異常沈積物の要素であるため、ヒト提供者の眼由来の結晶腔を、他の細胞外疾患沈積物との組成上の類似性について試験した。この研究に使用された63のヒト提供者の眼を、The University of Iowa Lions Eye Bank (Iowa City, IA) から、死後4時間以内、提供者の年齢が45から96歳の範囲で得た。結晶腔を、硬性または軟性として分類した。最低5人の提供者からの組織を、使用した各抗体でアッセイし、その少なくとも2つは臨床的に提供されたAMDを有し、そして各結晶腔の表現型を、少なくとも2人の提供者において試験した。ヒト提供者の組織を使用についての施設内審査委員会の承認を、The University of IowaでHuman Subjects Committeeから得た。29の異なるタンパク質またはタンパク質複合体に対する34の抗体を、硬性および軟性の結晶腔表現型を用いて免疫反応性について試験した。これらの分析は、結晶腔の分子組成物の部分的なプロフィールを提供する(以下の表Aを参照のこと)。血清アミロイドP成分、アポリポタンパク質E、イムノグロブリン軽鎖、第X因子、および補体タンパク質(C5およびC5b-9複合体)を、全ての結晶腔表現型において同定した。これらの分子の多くをコードする転写物もまた、網膜、網膜色素化上皮および/または脈絡膜によって合成されることを見出した(以下の表Bを参照のこと)。結晶腔と他の疾患沈積物との間の組成上の類似性は、AMDと動脈壁分裂疾患(アテローム硬化症を含む)との間の相関性の点では有意であり得る(以下の表Cを参照のこと)。これらのデータは、同様の経路が、AMDの病因および他の動脈壁分裂疾患に含まれ得ることを示唆する。

【0252】

【表9】

表 A: 結晶腔の免疫反応性

抗原	供給元	濃度	数	結晶腔
フィブリン	Accurate	1:50	5	-
アミロイド A	Dako	1:50	8	+/-; 胞
アミロイド B	Dako	1:10	7	-
アミロイド前駆タンパク質	Boehringer Mannheim	1:20	5	-
アミロイド P 成分	Dako	1:50	6	++
	Calbiochem	1:50	5	++
α1-アンチトリプシン	Dako	1:50	6	+/- (var.)
	Calbiochem	1:50	5	+/- (var.)
α1-アンチトリプシン	ICN	1:50	5	-; 稀に +/-
アポリポタンパク質 A1	Calbiochem	1:50	6	-
アポリポタンパク質 B	Chemicon	1:20	6	-
	Dako	1:50	5	-; 稀に +/-
アポリポタンパク質 E	Calbiochem	1:50	9	+
心臓性ナトリウム利尿因子	Chemicon	1:50	5	-
C-反応性タンパク質	Dako	1:50	5	-; 稀に +/- (var.)
カルシトニン	Dako	1:50	5	-
補体 C1q	Calbiochem	1:50	5	-
補体 C3	Dako	1:50	5	-; 稀に +/- (var.)
補体 C5	Dako	1:50	5	++
補体 C5b-9	Dako	1:50	5	++
シスタチン C	Accurate	1:50	5	-; (var.)
第 X 因子	Dako	1:50	9	+
フィブリンゲン	Dako	1:50	5	-; 稀に +/- (var.)
ゲルソリン	Chemicon	1:50	5	-
HLA-DR	Accurate	1:25	10	+
	Dako	1:200	10	+
免疫グロブリン K	Boehringer Mannheim	1:50	8	-; 稀に +/-
免疫グロブリン λ	Dako	1:50- 1:2000	9	+/-; 稀に +
β2 ミクログロブリン	Boehringer Mannheim	1:50	5	-; 稀に +/-
プロトロンビン	Dako	1:50	5	+(胞)
Tau	Dako	1:50	5	-
トランスサイレチン	Boehringer Mannheim	1:50	9	+/- (var.)
ユビキチン	Chemicon	1:50	5	-
	StressGen	1:100	5	-; 稀に +/-

略語: ++ = 非常に強い (不変性の標識); + = 大部分のドナーで強い標識; +/- = 弱い標識; - = 検出された標識なし; (var.) = ドナー間では結晶腔間で変動あり; 胞 = 結晶腔内の球状輪郭の標識

【0253】

【表10】

表 B: 網膜, RPE/脈絡膜 および肝臓 での RT-PCR 結果

遺伝子名	プライマー配列	Ret	R/Ch	RPE	Gen	肝臓
3'UTR	SN 5' GTCGAGATGCACACAAGAGTG 3' AS 5' TCCTTCAGTTTACTGGAGATCG 3'	+	+	+	-	+
3'UTR P	SN 5' GCCAGGAATATGAACAAGCCG 3' AS 5' CAAATCCCAATCTCTCCAC 3'	-	-	-	*	+
3'UTR B	SN 5' TGAACACCAACTTCTCCACG 3' AS 5' GGCGACCTCAGTAATTTTCTTG 3'	+	+	-	-	+
3'UTR E	SN 5' GGTCCGTTTTGGGATTACC 3' AS 5' CTCCAGTTCGATTTGTAGGC 3'	+	+	+	-	+
補体 3	SN 5' GTTCAAGTCAGAAAAGGGGC 3' AS 5' GTGTCTTGGTGAAGTGGATCTG 3'	+	+	+	-	+
補体 5	SN 5' ATGGTATGTGGACGATCAAGGC 3' AS 5' TATTGCTCGGTAACCTTCCCTG 3'	+	+	+	-	+
補体 9	SN 5' AATGAGCCCCTGGAGTGAATG 3' AS 5' ATGTCAGAGTGTTCCATCCCG 3'	+	+	-	-	+
第X因子	SN 5' GAGCGAGTTCTACATCCTAACG 3' AS 5' CACGAAGTAGGTGTCCTTGAAG 3'	+	+	-	-	+
7αグリーゲン	SN 5' AGACTGGAAC TACAAATGCC 3' AS 5' AGATTCAGAGTGCCATTGTCC 3'	-	+	-	-	+
Ig K	SN 5' ACGTTTGATITCCASYTTGGTCCC 3' AS 5' GAMATYSWGLATGACICAGTCTCC 3'	-	+	-	-	+
Ig λ	SN 5' ACCTARACGGTSASCTKGGTCCC 3' AS 5' TCYTMTGWGCTGACTCAGSMCC 3'	+	+	-	-	+
アトロンゲン	SN 5' GGGCTGGATGAGGACTCAG 3' AS 5' AAGGCAACAGGCTTCTTCAG 3'	-	-	-	-	+

Ret = 網膜, R/Ch = RPE/脈絡膜, Gen = プライマー対によるゲノムDNAの増幅
 プライマー対を用いて検出された高分子量ゲノムバンド

; * =

【 0 2 5 4 】

【表 1 1】

表 C: 細胞外疾患沈着物の組成比較

	VN	アミロイド P	アポ E	補体	入り組んだ エラスタン	PGs	脂質	カルシウム
結晶腔	+	+	+	+	?	-	+	+
弾力線維症	+	+	?	+	+	?	- *	? †
アミロイド-β	+	+	+	+	+	+	-	+
膜性腎症 慢性糸球体 腎炎	+	+	?	+	?	+	+	?
鋸状アーク	+	+	+	+(C5b-9)	+		+	+

* スタン親和性は、光線性弾力線維症とヒモに記載された。

† 弾力線維のカルシウム沈着は、弾力線維仮性黄色腫で生じる

(実施例7: 免疫仲介プロセスに關与する樹状細胞およびタンパク質は、結晶腔に關連し、そして結晶腔生物発生において中心的役割を果たす)

結晶腔は、加齢性黄斑変性 (AMD) の発達に關する有意な危険因子である。しかし、その起源については、相對的にほとんど知られていない。本發明者らは、最近、結晶腔内での異なる糖類で構成される集中したドメインの存在を記載した (J Histochem Cytochem 47; 1533-9, 1999)。電子顕微鏡分析により、脈絡膜細胞由来の細胞のプロセスが、ブルーフ膜を破り、そして結晶腔内の球状核で終わることを明らかにした。

【0255】

これらの中心終端が生じる脈絡膜細胞の免疫表現型、および結晶腔生物発生に対するその潜在的關係を評價するための研究を行った。この研究で使用したヒト提供者の眼を、The University of Iowa Lions Eye Bank (Iowa City, IA) から、死後4時間以内に得た。ヒト提供者の組織を使用についての施設内審査委員会の承認を、The University of IowaでHuman Subjects Committeeから得た。鋸状縁と斑との間にまたがる後極、または後極のウェッジを、30人の提供者からプロセスし、OCTで包埋し、液体窒素で凍結させ、そして-80で貯蔵した。組織を、低温槽上で6~8 μmの厚さに切り出した。共

焦点レーザー走査顕微鏡および免疫組織化学を使用して、ヒト提供者の眼における結晶腔関連核を試験した。切片の免疫標識を、内皮細胞、リンパ球、顆粒球、単球/マクロファージおよび樹状細胞を含む種々の細胞集合に対して指向された抗体のバッテリーを使用して行った。

【0256】

抗-CD45抗体は、より小さな結晶腔においてPNA-結合核と共存する。結晶腔核、およびそれらが誘導される細胞は、CD45、CD1a、CD83、CD86およびHLA-DR抗体に強く反応性である。定量的研究は、これらの結晶腔関連核が、結晶腔の約40%存在することを示す。結晶腔核は、より小さな結晶腔においてより蔓延することを示し、そしてまた、推定結晶腔前駆体（さらなる結晶腔の付着成長によって囲まれないブルーフ膜内の単独核）として検出される。

【0257】

免疫表現型のデータは、超微細構造的な分析と組み合わせる場合、結晶腔核が脈絡膜樹状細胞から誘導される強力な証拠を提供する。小さな結晶腔および推定結晶腔前駆体における樹状細胞由誘導核の同定は、すべての結晶腔の表現型において、HLA-DR、イムノグロブリン軽鎖、ビトロネクチン、および末端補体複合物の存在を実証する本発明者らの以前の研究を合わせる場合、結晶腔生物発生および初期AMDにおける樹状細胞および免疫媒介プロセスの役割を示唆する。

【0258】

（実施例8：「脈絡膜線維症」の形態学的特徴）

ヒト提供者の眼（臨床的に提供されるAMDおよび/または動脈壁分裂障害（AAA、TAA、大動脈狭窄、およびアテローム硬化症（atherosclerosis））を用いるものおよび用いないもの、そして異なる結晶腔形態学を用いて）を、同時伝達電子顕微鏡的および免疫組織化学的な観察のために使用した。この研究で使用される眼を、MidAmerica Transplant Services（St. Louis, MO）、Iowa Lions Eye Bank（Iowa City, IA）、Heartland Eye Bank（Columbia, MO）およびVirginia Eye Bank（

Norfolk、VA) から得られた、死後4時間以内に処理された2000対以上のヒト提供者の眼(0歳と102歳の間の年齢)の貯蔵所から選択した。全ての眼、ならびに対応する眼の病歴、底の写真および血管写の全体の病理学的特徴は、入手可能な場合、網膜外科医によって判断された。約18%の提供者は、いくつかの形態の臨床的に診断されるAMDを有し;これらは、斑の色素変化、黄斑結晶腔、地図状萎縮症、脈絡膜新生血管形成、および/または円板状の瘢痕を有する眼を含む。臨床的に提供されたAMDを有する眼および有さない眼を、この研究に使用した。

【0259】

151のこれらの提供者からのRPE-脈絡膜-強膜複合体を、伝達電子顕微鏡検査のためにプロセスした。組織を、死後4時間以内に、半分の強さのカルノフスキー固定液に最低24時間固定し、そして100mMのカルコジル酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)に移し、次いで脱水、包埋、切り出し、および顕微鏡写真を行った。

【0260】

電子顕微鏡のためにプロセスした同じ眼からの組織を、光組織学(Eastachrome stain; H&E)および免疫組織化学の研究のためにプロセスした。抗ビトロネクチン抗体を、Telios(San Diego, CA)から;コラーゲンI、III、V、およびVIをChemiconおよびSouthern Biotechから;エラスチンをElastin Productsから;フィブリリンをChemiconから;そしてフィブリン(fibulin)3および4をRupert Timplから得た。ヒト提供者のRPE-脈絡膜の選択した試験片を、0.1Mカルコジル酸ナトリウム緩衝液中の4%の(パラ)ホルムアルデヒド中に液浸することで固定し、そしてレーザー走査共焦点顕微鏡のためにプロセスした。イメージを捕獲し、そしてNikon逆転顕微鏡を備えたBioRad 1024レーザー走査共焦点顕微鏡を使用して表示した。

【0261】

これらの個体の30の脈絡膜漿液腫を、新しく合成したコラーゲン、エラスチ

ン、エラスチン関連細系、ならびに電子顕微鏡で表示されるような他の異なる構造的タンパク質および原線維で満たした。予備的な免疫組織化学分析に基づいて、この条件に関連したコラーゲンは、大部分がⅢⅢⅢ型およびⅤⅠ型を示し、そして代表的には「らせん状の」または「ほつれた」形態を示し、これはしばしば特定の遺伝性および後天性の疾患に関連する。この以前に記載されなかった現象（「脈絡膜線維症」といわれる）は、動脈壁分裂障害に共通する多くの病理学的特徴を共有する。

【0262】

【表12】

TEM 膜線維症予-タボ-ス表1

予-タボ-	性別	死七原因	病玉の病歴	死七の経緯	院外治療経過 少/年/月/日 (院外院中)	院中	院外治療経過 EM/Re	AMD, AAA
84-87	wM	球形体萎縮		AM AI-1 AI-2 BM BI-2 1c	1- 1c/e 1c/e 1c 1c 1c/e	EM		
124-88	wM	自殺, GSW+head	深煙者	AM AI-2 BM BI-2 1c	1c 1c/e 1c 1c 1c/e	EM		
140-88	CF	血刃/球形体	嗜煙者	AM AI-2 AI-2 AI-1 BI-1 ?	1c/e 1c 2c/e ? ? ?	EM		
163-88	wM	肺萎縮不全	嗜煙者	AM AI-2 AI-1 BI-1 ?	1c/e 1c ? ? ?	EM		
183-87	wF	自殺, GSW	嗜煙者	AM AI-2 AI-1 BI-1 ?	1c/e 1c ? ? ?	EM		
125-87	wM	心筋症	CHF, 糸球体腎炎	AM AI-1 BM AM BI-2 BI-2 ?	1c 1c ? ? ? ?	EM		
64-88	wM	腹部外傷	非喫煙者, 尿: 7H	AM BI-2 AM BI-2 BI-2 ?	1c 1c ? ? ? ?	EM		
152-88	wM	慢性腎臓病	非喫煙者	AM BI-2 BI-2 BI-2 ?	1c 1c ? ? ?	EM		
93-88	wM	MI	CAD, CAAG-89, EIC	AM AI-2 AI-2 BI-2 BI-2 ?	1c 1c ? ? ? ?	EM		
112-88	wM	MI, 心不全	腎不全 (透析中)	AM AI-2 AI-2 BI-2 BI-2 ?	1c 1c ? ? ? ?	EM		
147-88	wM	MI	腎不全 (透析中)	AM AI-2 AI-2 BI-2 BI-2 ?	1c 1c ? ? ? ?	EM		
185-88	wM	AVM	NIDDM, 腎臓病	AM AI-2 AI-2 BI-2 BI-2 ?	1c 1c ? ? ? ?	EM		
204-88	wM	肺, HTN	肺カノ, IDDM, PVD	AM AI-2 AI-2 BI-2 BI-2 ?	1c 1c ? ? ? ?	EM		
85-88	CF	子宮癌 (art.1)	嗜煙者	AM AI-2 AI-2 BI-2 BI-2 ?	1c 1c ? ? ? ?	EM		
94-88	wF	腎不全	ASHD, PVD, CVA, 腎不全	AM AI-2 AI-2 BI-2 BI-2 ?	1c 1c ? ? ? ?	EM		
39-88	CM	MI	CAD, PVD, 腎不全	AM AI-2 AI-2 BI-2 BI-2 ?	1c 1c ? ? ? ?	EM		
56-88	wM	肥満症	EIC, HTN	AM AI-2 AI-2 BI-2 BI-2 ?	1c 1c ? ? ? ?	EM		
71-88	wM	肥満症	肥満症, COPD, 腎不全	AM AI-2 AI-2 BI-2 BI-2 ?	1c 1c ? ? ? ?	EM		
73-88	wM	肥満症	肥満症, HTN, 腎不全	AM AI-2 AI-2 BI-2 BI-2 ?	1c 1c ? ? ? ?	EM		
42-88	wM	MI	腎不全, HTAM	AM AI-2 AI-2 BI-2 BI-2 ?	1c 1c ? ? ? ?	EM		
58-88	wM	肥満症	肥満症, 腎不全	AM AI-2 AI-2 BI-2 BI-2 ?	1c 1c ? ? ? ?	EM		

【0263】

【表13】

TEM 脈絡膜線維症データベース表1 (ワグマ)

55-98	WM	83 Y	腕が、眼痛、 分血性不全	糖尿病、 HTN	BT-2	3 c/e	EM	AMD
85-98	WM	86 Y		発作、HTN	AM	2 c/e	EM	AMD
80-97	WF	87 Y	TAA 破裂	血管性痴呆	AI-1	3 c/e	EM	AAA
					AI-2	3 c/e	R	
					BI-1	3 c/e	R	
117-97	WM	81 Y	CPA	AAA, 痴呆, CO AM	BI-2	3 c/e		
#9-98	WF	80 Y	軟縮症	HTN, 肺炎	BM	3 c/e	EM	AAA
					BI-2	2 c/e	EM	
14-98	WF	82 Y	MI	示味が、 非喫煙者	BI-2	3 c/e		
21-98	WM	87 Y	腔内出血		BI-2	3 c/e		
29-98	WM	81 Y	力感不全		BI-2	?	EM	
38-98	WM	82 Y	MI	緑内障、 HTN, 乳がん、 AAA	AI-2	?	EM	緑内障、 AAA, TAA
239-98	WF	83 Y	CHF	TAA, 喫煙者	BI-2	3 c/e	EM	
278-98	WF	80 Y	Disscd. AA	CVA, MI, 喫煙者	BI-2	3 c/e	EM	TAA
100-97	WM	82 Y	MI	示味が、AMD	BT-3	2 c/e	EM	AMD
46-98	WF	83 Y	軟縮症(30%)	CVA, CHF, IDDM,	AI	2 c/e	EM	AMD
				乳がん、AMD	BI-2	?	EM	
51-98	WF	83 Y	呼吸不全	HTN, HOH, CHZ	AM	3 c/e		
					BM	3 c/e		
58-98	WF	84 Y	結腸がん	HTN, AMD, POAG	AM	3 c/e	EM	AMD, POAG
68-98	WF	81 Y	CVA/CHF	非喫煙者 大動脈硬化症+弁 心疾患、HTN	BI-2	2 c/e	EM	
					BM	2 c/e	EM	AMD, 緑内障
100-98	WF	80 Y	頸部の出血	AMD, 緑内障	AT-3	?	EM	
107-97	WF	101 Y		非喫煙者 示味が、 示味が、 示味が、	BT-3	2 c/e	EM	
					AT-3	2+ c/e	EM	
					BI-1	?	EM	
					BI-2	3 c/e	EM	
161-98	WM	78 Y	狭心症, CHF	HTN, PVD, CHF, 不全, AMD-GA	AI-1	3 c/e	EM	AMD-GA
					BI-2	2+ c/e	EM	
27-98	WM	77 Y	呼吸不全、 肺炎	以前口喫煙者 肺がん、 肺がん、 HTN, CAD, 不活動 ΔHDL、以前口喫煙者	BM	3 c/e		肺がん、 肺がん
152-97	WM	57 Y		肺炎、 AMD	BI-2	3 c/e		
				肺高血圧症、 AMD	NIDDM/BM	2 c/e		AMD, 肺がん、 緑内障
236-98	WM	77 Y	CABG/CVA1枚	HTN, COPD, 肺炎、 示味が、 動脈硬化 以前口喫煙者	BI-2	3 c/e		AAA, 肺がん
					BM	?	EM	

【0265】

【表15】

TEM 脈絡膜線維症と心臓系表1 (続き)

27-98	77 WM	脈絡膜線維症、心臓系不全、心不全	大動脈硬化、HTNAI-2	27 c3 e	2 e	
38-97	84 WF	心不全、心臓系不全	TIA, CAD, 喫煙者 AMD, HTN, 鼻血	3 c/e	3 c2 e	AMD
24-98	81 WM	MUCHE	心不全	3 c2 e	2 c/e	
91-98	81 WM	肺炎、散血、肺動脈不全	非喫煙者 DVT, PVD, CoBT3	?	?	EM
94-98	65 WF	腎不全	HTN, 非喫煙者 AMD, ASHD, PUD, BM	?	?	EM
114-98	78 WF	CHF	変形性関節症 非喫煙者	2 c/b	2 c/a	EM
			変形性 cardomyo	?	?	EM
			CAD, smp MI, HTN, CHF			
			腎不全			
			非喫煙者			
159-98	71 WM	肺出血	AAA, AMD?, 動脈硬化	?	?	EM
			系交換			
			HTN, CABG			
			非喫煙者			
180-99	82 CM	肺炎	腎不全、多臓器不全	?	?	EM
			不全、心臓系不全			
			CHF, 急性腎不全			
			動脈硬化			
			下行胸大動脈			
			非喫煙者			
31-99	69 WF	不全 AAA	1. 動脈硬化、動脈硬化、BM 肺炎、心不全	?		EM
			動脈硬化、HTN、動脈硬化			
			動脈硬化、心不全、90、			
			肺動脈硬化、動脈硬化			
			喫煙者			

【0266】

【表16】

TEI限絡腺線維症データベース表2

Case #	年齢	性別	病状	過去の病歴	限の病状	限の病状	限の病状	EM/RF/AM/DAAA
1-92	71	WM	小脳血腫		BM		1	
10-92	53	M	MI		BM		1	
20-92	63	CM	急性腎不全		ATb		1	
28-92	61	CF	呼吸不全	肺がん、高血圧、脳梗塞	ATb		2	
44-92	79	WM	肺がん	脳梗塞、高血圧、脳出血	BTb		1	
45-92	48	bM	心臓-肺病変、70 MT		AM		1	
49-92	18	bM	高血圧、GSW		ATb		1	
56-92	17	WM	高血圧、MVA		AM		1	
81-92	50	bF	高血圧、脳梗塞	CPA、肺線維症	BM		?	
89-92	38	bF	高血圧、脳梗塞		AM		1	
91-92	54	WM	高血圧、脳梗塞		BM		2	
93-92	62	WF	心臓病、高血圧、脳梗塞		AM		1	
95-92	72	WF	大腸出血		BTb		2	
96-92	71	WM	心臓病、脳梗塞		AM		2	
97-92	59	WF	脳梗塞、CHF		AM		2	
98-92	22	WM	高血圧、脳梗塞		AM		1	
99-92	69	WF	呼吸不全	肺がん	ATb		1	
100-92	36	WF	高血圧、脳梗塞	高血圧、脳梗塞、高心臓二重線維症	BM		1	
101-92	58	WF	肺がん		AM		2	
102-92	85	WM	心臓病		BM		2	
104-92	53	WF	高血圧、脳梗塞		AM		1	
109-92	22	WM	高血圧		AM		1	
110-92	30	bM	GSW	肺がん、IB、高血圧、脳梗塞	AM		2	
111-92	62	WM	肺がん		ATb		1	
113-92	42	WF	脳梗塞		BM		2	
114-92	58	WM	高血圧、脳梗塞		AM		1	
115-92	13	WM	高血圧		AM		2	
116-92	76	WF	心臓病		AM		1	

【0267】

【表17】

TEM脈絡膜線維症予後予測表2 (続き)

患者ID	年齢	性別	病歴	検査結果	治療	経過	予後
156-92	36	WM	動脈硬化 + 糖尿病	AM			2
			外傷 / MVA				2
			尿路上出血				
158-92	68	WF	脈絡膜乳頭腫	HTN			1+
162-92	45	WM	頭部損傷	AM			2
163-92	52	WF	尿路上出血	HTN, 片頭痛, CHF, ATa			?
				心臓薬			
				腎臓薬			
166-92	98	WF	CHF	ATb			2
169-92	60	WM	空海士 / CP	AM			2
169-92	59	WF	CHF / 大動脈出血	AM			2
				HTN			1
171-92	28	WM	PE	AM			?
				ATC			
175-92	55	BM	脈絡膜乳頭腫	BM			1
176-92	66	WF	脈絡膜乳頭腫	AM			2
			内服薬				
178-92	37	WF	PE	AM			2
				EKG 心臓薬 / 利尿薬			
180-92	62	BM	呼吸器病	BM			?
			呼吸器病				
181-92	85	WF	?	BM			2
182-92	47	WM	脈絡膜乳頭腫	AM			1+
				ATb			
183-92	72	WM	MI	BM			1
185-92	86	WM	CHF / 糖尿病	BM			3
				BTa			
				BTc			2
				BTd			2
				BTe			2
				BTf			2
186-92	68	WF	CVA	AM			1+
				ATb			
187-92	79	WM	糖尿病 / 腎臓病	AM			1
				ATb			2
				ATb			1+
188-92	14	WM	糖尿病 / 腎臓病	AM			1+
189-92	64	WM	糖尿病 / 腎臓病	AM			1+
192-92	86	WF	心臓薬	BM			2
193-92	68	BF	糖尿病	AM			2
194-92	78	WM	心臓薬	ATb			2
				ATb			1
195-92	75	WM	心臓薬	ATb			1
				CV-AM			1

【0269】

【表19】

TEM脈絡膜線維症予-データベース表2 (続玉)

年齢	性別	病歴	検査項目	陽性	備考
198-92	82 WM	動脈硬化、糖尿病、CV 疾患	BM	2	
199-92	60 WM	心臓-肺病、痔	AM	1	
200-92	53 WM	腎臓不全、HTN、CHF、糖尿病	BM	1	

(実施例9：コントロール、AMD、および動脈壁破裂障害の脈絡膜中の線維症分子の遺伝子発現)

全RNAを成人ヒト肝臓から単離し、そしてRPE / 脈絡膜複合体を5人のコントロールヒトドナー(年齢18歳から58歳)、1人のAMD / AAAドナー、1人のAMD / 大動脈弁狭窄症ドナー、およびAMDの家族病歴がある1人の

AMDドナーから単離した。得られたペレットを - 80 で保存した。得られたRNAの質/完全性をアガロースゲルおよびノーザンブロットの両方で評価した。cDNAを逆転写酵素によってオリゴ(dT)16をプライマーとして用いて合成した。酵素はコントロール反応を省略した。

【0270】

この一連のコントロール(非疾患)および罹患(AMD/AAA、AMD、AMD/大動脈弁狭窄症)ドナー由来のRPE-脈絡膜複合体のRT-PCR分析は、2つのグループ間でアップレギュレーションおよびダウンレギュレーションされる遺伝子発現の識別的パターンを明らかにする(以下の表D参照)。これらは、「アップレギュレーション」のb1インテグリン、エラスチン、コラーゲンVIa2、コラーゲンa3、PI-1(アンチトリプシン)、PI-2、ヒトメタロクターゼ(およびおそらくフィブリリン-2)、ならびに「ダウンレギュレーション」のBigHを含む。コラーゲンIIIa1、コラーゲンIa2、コラーゲン6a1、フィブリリン(fibulin)-1、2、3、4、および5、HLA-DR、Ig、ラミニンレセプター、またはラミニンC2で検出可能な発現レベルの差異は観察されなかった。RT-PCRの限界のため、さらに実時間定量的RT-PCRによる研究を行い、2つのグループにおけるこれらの遺伝子の正確なレベルを評価しているところである。

【0271】

表D: AMDおよび動脈壁破裂障害における遺伝子発現

【0272】

【表20】

分子	線維症におけるコントロール対比での発現
BIG H3	減少
b1-インテグリン	増加
コラーゲン 3 a1	変化なし
コラーゲン 1a1	変化なし
コラーゲン 1a2	変化なし
コラーゲン 6 a1	変化なし
コラーゲン 6 a2	増加
コラーゲン 6 a3	増加
エラスチン	増加
エミリン (Emilin)	"
フィブリン-1	変化なし
フィブリン-2	変化なし
フィブリン-3	変化なし
フィブリン-4	変化なし
フィブリン-5	変化なし
FBN-1	?
FBN-2	?
フィコリン (Ficolin)	?
HLA-DR b	変化なし
HME	増加
IgK	変化なし
ラミンレセプター	変化なし
Lam C1	?
Lam C2	変化なし
Lam C3	?
LO2	変化なし
LO4	変化なし
LTBP-1	?
LTBP-3	?
LTBP-4	減少
MFAP-1	減少
MFAP-2	減少
MFAP-3	変化なし
MFAP-4	変化なし
MMP-2	変化なし
MMP-7	?
MMP-9	?
MMP-12	変化なし
PI-1	減少
PI-2	減少
PI-3	?
PLOD2	変化なし
PM5	変化なし
RPE-65	変化なし
TIMP-1	変化なし
TIMP-2	変化なし
TIMP-3	変化なし
ビトロネクチン (Vitronectin)	増加 ?

(実施例10: AMD / 動脈壁破裂疾患に関連する自己抗体:)

結晶腔発生を含むAMDおよび動脈壁破裂障害の病因における自己抗体の役割と取り組むために、本発明者らは、AMDおよびAAAを有するドナーの血清中

に存在し得る抗結晶腔 / ブルーフ膜 / R P E 自己抗体の同定のため、エンリッチされた結晶腔調製物を用いて一連の予備的実験を行った。

【0273】

#69 Beaver ブレードによるブルーフ膜の挫滅組織切除によって得られたエンリッチされた結晶腔調製物 (D R +) 由来のタンパク質抽出物およびコントロール (D R -) 調製物由来のタンパク質抽出物をプロテイナーゼインヒビターカクテルおよび穏和な界面活性剤を含む P B S を用いて調製した。タンパク質を 10 - 20 パーセントグラジエントのミニ S D S ゲル (A m r e s c o) を用いて分子量で分離し、そしてウェスタンブロット分析用の P V D F メンブレンに移した。50 の正常ヒト網膜由来のヒト網膜タンパク質を含む P V D F ストリップもまた、ドナー血清中の抗網膜自己抗体の検出のために用いた。

【0274】

上記と同じ8人のドナー由来の血清をスクリーニングした。1人のAMDドナー由来の血清 (# 9 0 - 9 8) は、R P E (D R + および D R - の両方) および R P E / 脈絡膜調製物において約 3 5 k D a の1つのバンドをポジティブに標識した。約 6 0 k D a の第2のバンドは D r + タンパク質抽出物においてのみ弱く標識された。A A A ドナー由来の血清 (# 1 8 9 - 9 7) は約 5 3 k D a のタンパク質と反応した。このバンドは3つのタンパク質抽出物の全てで標識された。この血清試料が D R + 試料においてのみ標識する約 6 4 k D a の1つのバンドがあった。

【0275】

A M D / A A A を有するドナーにおける血清抗結晶腔 / R P E 自己抗体の存在は、これらの障害における共通の免疫仲介プロセスに対する役割の可能性を示唆している。

【0276】

(実施例 1 1 : A M D および動脈壁破裂障害における差次的遺伝子発現分析 :)

選択された A M D および A A A 表現型と年齢の適合したコントロールとの4組のドナー由来の R P E / 脈絡膜複合体の差次的遺伝子発現を遺伝子アレイ分析を

用いて分析した。この研究で利用したアレイはI . M . A . G . A協会由来の18,380の非冗長cDNAを含んでいた。各cDNAクローンを自動装置で二連でナイロンメンブレン上に正確なパターンでスポットして、同定を容易にした。これらの分析は典型的には、プローブmRNAの逆転写の間に放射標識された第1鎖cDNAを用いて行われる。しかし、個別のヒトドナーの眼のRPE層から単離され得るmRNAは少量なので、本発明者らはこの標準的プロトコルを改変した。cDNAをランダムプライムされた反応で33-Pによって放射標識し、精製し、そして遺伝子アレイにハイブリダイズさせる。アレイをホスホイメージング(phosphoimaged)し、シグナルを正規化し、そしてデータをGenome Discovery Softwareパッケージ(Genome Systems)を用いて分析した。

【0277】

データの分析により、特定のAMDおよびAMD/AAA表現型の個人のRPE/脈絡膜において、コントロールと比べて有意にアップレギュレーションおよび/またはダウンレギュレーションされるクローンの識別的なパターンが明らかになった。この時点で、差次的に発現されるmRNAは3つの識別的な「経路」：細胞外マトリックス経路、膜輸送経路、および遺伝子調節関連経路にグループ分けされ得る。さらに、特定のAMDおよびAAA表現型のドナーのRPE-脈絡膜において、疾患を有さないドナー由来のRPEと比べて、有意な数の特徴付けされていない発現配列タグ(EST)が差次的に発現される。

【0278】

【表21】

遺伝子アレイ分析 テーマベース1
アイランドアレイ

ファイル	
1	Soares 胎児肝臓腫瘍 1NfLS(ESTs)
1	Soares 胎児心臓 NBHPs(ESTs)
1	Soares 胎児心臓 1NIB/チンパンジー活性化前駆体と類似(精嚙芽細胞増殖因子8)
1	Soares 胎児心臓 1NIB/チンパンジーCRADD mRNAを含むヒトドメイン
6	Soares 胎児肝臓腫瘍 1NfLS/胎児肝臓腫瘍1kdタンパク質-ヒトタンパク質mRNA高度に類似
4	Soares 胎児肝臓腫瘍 1NfLS/カルボキシルシグナルペプチド-ヒトタンパク質mRNA-ヒンチタンパク質
3	Stratagene 胎児心臓 #937225/転写因子GATA-2と類似(GATA結合タンパク質2)
4	Soares 網膜 2NBHb(ESTs)
6	Soares 胎児肝臓腫瘍 1NfLS/チンパンジー-1-リン酸カルシウムトランスフェラーゼと類似
2	Soares 胎児肝臓腫瘍 1NfLS/V-erbBリボウイルスCT10チンパンジーホモログ
2	Soares 老齢精嚙芽細胞NBHSF/Au成体エレメントと類似(KIA0032タンパク質に於けるホモサピエンズmRNA 部分cds)
2	Soares 網膜N2b5HR/チンパンジー-ヒトタンパク質1前駆体と類似(5-6-ヒトタンパク質mRNA-ヒンチタンパク質)
4	Soares 胎児心臓NBHH19W(ホモサピエンズ)と類似(5-6-ヒトタンパク質mRNA-ヒンチタンパク質)
6	Soares 胎児肝臓腫瘍 1NfLS(ESTs)
1	Soares 胎児肝臓腫瘍 1NfLS(ESTs)
1	Soares メンデルサイト 2NBHM(ホモサピエンズ)と類似(ホモサピエンズp21高活性キナーゼPAK1BmRNA、完全cds)
6	Soares 胎児肝臓腫瘍 1NfLS(ESTs)ATPLセクターと類似(ESTs)
1	Soares 胎児肝臓腫瘍 1NfLS/MER6反復エレメントに類似(ESTs)
5	Soares 胎児肝臓腫瘍 1NfLS/チンパンジー/ヒトオニオンプロテインキナーゼpakと類似(ホモサピエンズp21高活性キナーゼPAK1BmRNA)
6	Soares 網膜 B-9 2NBHP8to0W(ESTs)
2	Soares 網膜 N2b5HR
2	Soares メンデルサイト 2NBHM
1	Soares 胎児心臓 1NIB/チンパンジーと類似、非筋肉タイプB-ヒト
1	Stratagene 胎児心臓 #937225(ESTs)
1	Soares 胎児肝臓腫瘍 1NfLS(ESTs)
2	Soares 網膜 N2b5HR
6	Soares 胎児心臓 NBZHP(シグマ3Bタンパク質に対するホモサピエンズmRNA)
3	Soares 胎児心臓 1NIB(ESTs)4kdタンパク質mRNA、完全cds-PTB関連スプライシング因子)
5	Soares 胎児肝臓腫瘍 1NfLS
4	Stratagene 網膜 #937210(ESTs)
1	Soares 網膜 N2b4HR(ESTs)
1	Soares 網膜 N2b2HP
6	Soares 上皮小体腫瘍 NBHPA/チンパンジー-rRNAホルミルトランスフェラーゼと類似
4	Soares 胎児心臓 NBHH19W/チンパンジー/ヒトタンパク質C13-ヒトと類似(チンパンジー/ヒト部分C13前駆体)
1	Soares 胎児心臓 1NIB(ESTs)
6	Soares 胎児肝臓腫瘍 1NfLS/胎児心臓腫瘍1kdタンパク質-ヒトと類似
6	Soares 胎児心臓 NBHL19W(ESTs、CMP-N-アセチルチンパンジー-β-1,4-ガラクトシド-2,3-シリアルトランスフェラーゼと類似(ESTs)
1	Soares 胎児肝臓腫瘍 1NfLS/Au成体エレメント、MUR成体エレメントに類似(ESTs)
6	Soares 網膜 N2b4HR/DBP成体エレメントに類似
6	Soares 網膜 NBZHP/Au成体エレメントに類似(ESTs)
2	Soares 成人脳 N2b5HB55Y(GOS)チンパンジータンパク質 L41)
1	Soares 網膜 N2b5HR(CHK-ras)チンパンジータンパク質mRNA、完全cds-胎児肝臓腫瘍タンパク質P21/H-RAS-1)
6	Soares メンデルサイト2NBHM/スーパ-オキシジスムターゼ-ヒト(スーパ-オキシジスムターゼ1-Cu/Zn)に類似
1	Soares 網膜 N2b4HR/Au成体エレメントに類似(ESTs)
1	Soares メンデルサイト 2NBHM/Au成体エレメントに類似

【0280】

【表23】

データベース 1

5h08	7	1148.27	2754.46	3852.93	2.389	1606.18	562186	Cluster	AA211593	Hs. 82129	HT3659
1h24	8	787.53	2147.49	3708.42	2.727	1359.96	382457	Cluster	AA069746	Hs. 84244	HT393
6h15	2	374.91	1371.78	3660.87	3.669	997.87	130980	Cluster	R23027	Hs. 138216	
6h13	2	395.69	1416.11	3646.8	3.576	1019.42	133702	Cluster	R26577		
2h01	2	230.66	1035.87	3615.96	4.491	805.2	28229	Cluster	R13333	Hs. 21305	
6h22	6	536.46	1685.93	3577.31	3.111	1130.49	306412	Cluster	W20275		
6h10	2	1079.88	2551.97	3478.28	2.363	1471.99	132237	Cluster	R25219	Hs. 23817	HT1389
3h14	7	654.63	1643.77	3349.17	2.816	1189.14	85533	Cluster	I72189		
3h20	1	3273.06	5327.27	3343.46	1.628	2054.21	114073	Cluster	T78540	Hs. 111782	
2h13	2	599.82	1742.2	3318.07	2.805	1142.38	284866	Cluster	R13379	Hs. 84135	
1h24	3	136.08	741.53	3299.14	5.449	605.45	139990	Cluster	R64675	Hs. 24167	
5h23	6	331.56	1216.26	3258.05	3.674	886.7	297963	Cluster	N88325	Hs. 137909	
4h18	2	1264.85	2726.78	3195.13	2.172	1470.93	37482	Cluster	R33082		
1h23	4	188.47	875.74	3193.53	4.647	687.28	50141	Cluster	H17788	Hs. 31056	
4h23	2	371.59	1286.77	3181	3.468	917.18	37109	Cluster	R34443		
2h13	4	863.3	2132.38	3134.63	2.47	1269.07	174864	Cluster	H40849		
6h22	1	977.26	2299.66	3111.47	2.353	1322.3	128161	Cluster	R09793	Hs. 27931	
2h07	5	583.08	1667.72	3102.44	2.86	1084.86	230996	Cluster	R66161	Hs. 138512	
3h23	4	835.38	2074.03	3075.28	2.483	1238.66	179905	Cluster	H50920		
1h10	4	539.16	1583.6	3067.65	2.937	1044.43	52618	Cluster	H29394		
6h11	5	739.02	1916.38	3053.03	2.593	1177.36	264948	Cluster	N29101		
2h20	4	184.88	648.85	3049.52	4.592	684.08	172473	Cluster	H20257		
6h02	2	1234.95	2637.47	2995.38	2.136	1402.53	133902	Cluster	R24478		
1h05	1	762.32	1920.24	2981.04	2.552	1167.82	21917	Cluster	T66081		
2h12	3	419.6	1345.01	2966.42	3.203	925.42	142882	Cluster	R71643	Hs. 141984	
1h01	6	731.53	1882	2959.81	2.573	1150.47	271252	Cluster	N34571	Hs. 41663	
6h10	5	496.23	1483.88	2953.47	2.96	987.66	262754	Cluster	N28295	Hs. 141435	
2h01	1	117.94	651.36	2946.02	5.523	533.42	110759	Cluster	T83266	Hs. 100090	
4h20	7	94.4	574.28	2919.33	6.083	479.88	530260	Cluster	AA111987		
5h02	1	1426.28	2874.44	2918.56	2.016	1448.17		Cluster	#NAME?		
2h05	1	385.5	1230.09	2909.82	3.366	864.69	110893	Cluster	T82879	Hs. 13756	
1h05	8	151.81	744.28	2904.98	4.903	592.48	380914	Cluster	AA057495	Hs. 76224	HT3350
1h14	8	485.37	1417.51	2900.22	3.048	952.14	270035	Cluster	N40606	Hs. 141444	
6h05	1	487.94	1417.75	2877.74	3.03	949.81	126638	Cluster	R07461		
5h02	6	1029.9	2307.86	2863.74	2.241	1277.96	295400	Cluster	W04464	Hs. 138522	
6h10	4	482.43	1436.72	2837.01	2.976	953.29	209204	Cluster	H62020		
6h16	6	336.18	1159.02	2836.78	3.448	822.84	302070	Cluster	W17034	Hs. 363	
2h11	5	1752.63	3263.61	2813.62	1.882	1510.98	272409	Cluster	H86161	Hs. 141367	
6h03	7	2336.16	3883.14	2808.07	1.705	1846.97	626746	Cluster	AA216447	Hs. 89608	HT115
1h03	2	422.22	1316.61	2789.02	3.118	884.39	129413	Cluster	R11257		
2h09	2	1458.78	2807.65	2789.26	1.866	1408.78	24657	Cluster	R14286		
1h14	3	387.9	1244.45	2747.85	3.208	858.54	137744	Cluster	R88503	Hs. 138231	
6h21	3	549.28	1532.33	2742.42	2.78	983.05	47817	Cluster	H11685		
1h03	4	364.21	1192.63	2712.67	3.275	828.42	48961	Cluster	H29383		
4h23	3	242.87	934.18	2657.46	3.845	691.19	153354	Cluster	R47887	Hs. 71388	
4h17	1	398.91	1246.35	2647.64	3.124	847.43	119302	Cluster	T96238		
1h19	5	581.86	1532.3	2646.57	2.727	970.44	211202	Cluster	H67987	Hs. 38654	HT889
1h06	5	448.71	1335.34	2638.51	2.976	868.62	220470	Cluster	H87319	Hs. 1432	
6h19	5	1624.7	3030.57	2622.381	1.865	1405.87	269278	Cluster	N41802		

Cluster = 7759-

【0281】

【表 24】

遺伝子アレイ分析
データベース1

5	Stratagene	筋肉#837209(産後脱水腫腫加一ヒト)
1	Scores	松葉体N3HPG(ホモサビエンズカラムキチキチKKV2.1mRNA,完全ods)
6	Scores	胎盤Nb2HP(ESTs)
6	Scores	胎盤Nb2HP
2	Scores	胎盤Nb2HP
6	Scores	胎盤Nb2HP(ESTs)
6	Scores	胎盤Nb2HP(ESTs)
3	Stratagene	肝臓 #937224/肝臓カボネキエストラ一ヒト腫瘍
3	Scores	胎盤肝臓腫瘍1NFLS/Alu反復エレメントに類似(ESTs)と類似
1	Scores	胎盤肝臓腫瘍1NFLS/Alu反復エレメントに類似(ESTs)と類似
2	Scores	胎盤肝臓腫瘍1NFLS/Alu反復エレメントに類似(ESTs)
4	Scores	胎盤肝臓腫瘍1NFLS/Alu反復エレメントに類似(ESTs)
1	Scores	胎盤肝臓腫瘍1NFLS/Alu反復エレメントに類似(ESTs)
4	Scores	胎盤肝臓腫瘍1NFLS/Alu反復エレメントに類似(ESTs)
1	Scores	胎盤肝臓腫瘍1NFLS/Alu反復エレメントに類似(ESTs)
2	Scores	成人脳 N2b5HB55
0	Scores	胎盤肝臓腫瘍1NFLS(ESTs)
2	Scores	胎盤肝臓腫瘍1NFLS/Alu反復エレメントに類似(ESTs)
3	Scores	成人脳 N2b4HB55
1	Scores	胎盤肝臓腫瘍1NFLS
1	Scores	胎盤肝臓腫瘍1NFLS
2	Scores	マノサイト 2NBHM(ホモサビエンズTFE3遺伝子,エキソン1,2,3ニおほひ種高しods/原遺伝子E3一ヒト)
2	Scores	成人脳 N2b5HB55
6	Scores	胎盤 Nb2HP
1	Scores	胎盤 Nb2HP
2	Scores	胎盤 Nb2HP/Alu反復エレメントに類似(ESTs)
1	Scores	マノサイト 2NBHM/ヒト胎盤腫瘍Alu反復エレメントに類似(ESTs)
6	Scores	マノサイト 2NBHM/Alu反復エレメントに類似(ESTs)
2	Scores	胎盤肝臓腫瘍1NFLS(ヒト/カボネキエストラ)
4	Stratagene	網膜名細胞 #937212/60S腫瘍性ホルヌムタンパク質P1一ヒトと類似
5	Scores	胎盤肝臓腫瘍1NFLS(ESTs)
1	Scores	網膜 N2b4HR(ヒト胎盤外タンパク質[S1-5]mRNA,完全ods-ライプリン-1,イウ製V前駆体一ヒト)
1	Scores	マノサイト 2NBHM(ESTs)
6	Scores	胎盤肝臓腫瘍1NFLS/ベテロ種カボネキエストラタンパク質AT一ヒトと類似
3	Scores	胎盤肝臓腫瘍1NFLS/Alu反復エレメントに類似(ESTs)
6	Scores	胎盤肝臓腫瘍1NFLS/Alu反復エレメントに類似(ESTs)
6	Scores	胎盤肝臓腫瘍1NFLS/Alu反復エレメントに類似(ESTs)
2	Scores	網膜N2b5HR(ESTs)
6	Scores	網膜N2b5HR(ESTs)
1	Scores	胎盤肝臓腫瘍1NFLS
2	Scores	胎盤 Nb2HP/Alu反復エレメントに類似(ESTs)
1	Scores	胎盤 Nb2HP
1	Scores	胎盤 Nb2HP
4	Scores	網膜 2NBHMest/ウシカチアジジと類似(ホモサビエンズカチアジジ前駆体[CTez]mRNA,完全ods)
4	Scores	胎盤肝臓腫瘍1NFLS/Alu反復エレメントに類似(ESTs)と類似
1	Scores	網膜 N2b4HR/Alu反復エレメントに類似(クロロインキナーゼC遺伝子80K一ヒト)
1	Scores	胎盤8-9番2NBHP8to9W/ヒト胎盤腫瘍Alu反復エレメントに類似(ESTs)
6	Scores	胎盤8-9番2NBHP8to9W/ヒト胎盤腫瘍Alu反復エレメントに類似(ESTs)

【0282】

【表25】

ア-91-ス1

1	23	8	537.38	1484.57	2616.8	2.763	947.2	381024	Cluster AA054639	Hs. 36658
2	h04	4	1134.32	2370.98	2584.88	2.09	1236.65	177300	Cluster H40720	Hs. 31775
4	109	7	286.02	1013.81	2579.66	3.545	727.79	511972	Cluster AA102358	
1	812	4	778.27	1845.08	2529.15	2.371	1066.81	20075	Cluster H17348	Hs. 117688

Cluster=D779-

【0283】

【表26】

遺伝子アレイ分析
データベース1

1	Scores	網羅	N2B4HR/Alu反復エレメントE類(ESTs)
2	Scores	成人型	N2B5HB65Y/L1反復エレメントE類(ESTs)
4	Stratagems	大綱	#S97Z04
1	Scores	初見型	INB/Alu反復エレメントE類(ESTs, Aluサブファミリー-SB2-E1とE2に類似)

【0284】

【表27】

遺伝子アレイ分析データベース

2	b205	2089.01	861.17	2978.49	2.426	1227.84	232461	495908	なし	Scarsa熱帯魚 EST
5	a224	139.97	447.25	2955.97	3.119	947.72	199370	897323	85927	メダロプロテアーゼ3の組織インヒター
2	b087	2501.93	1157.32	2906.85	2.162	1344.62	324356	747664	80706	NAD(P)H:クマリンオキシドレダクターゼ
3	c071	1332.38	420.53	2888.68	3.168	911.82	112471	765895	1163	海胆卵凍結伝子A
5	b124	840.88	190.35	2873.71	4.417	650.53	200031	897154	なし	Scarsa熱帯魚 EST
1	b098	1219	365.31	2848.71	3.337	853.69	366603	AA026304	20943	Scarsa熱帯魚 EST
3	b236	745.1	154.8	2841.26	4.813	580.3	296664	W02194	なし	Scarsa熱帯魚 EST
3	b074	1148.1	335.2	2784.28	3.425	812.9	178922	H51007	89655	赤毛ウシエンテロシロシホスファターゼ(A-2/PTP)mRNA
2	b186	915.08	226.55	2780.91	4.039	688.51	275842	R93869	86378	Scarsa熱帯魚 EST
1	b201	1064.65	297.27	2748.33	3.581	797.38	24808	T00480	13512	ヒトタンパク質ZW10ホモログ(HZW10)mRNA
3	b126	4674.26	2850.22	2731.54	1.584	1724.05	286050	N64281	48742	Morton熱帯魚 EST
5	b162	983.41	264.12	2678.26	3.723	719.3	37720	R09435	なし	Scarsa熱帯魚 EST
3	b193	4801.61	2916.69	2658.27	1.578	1684.92	148425	H12367	119499	ヘモグロビン, beta
1	b087	764.02	171.17	2646.33	4.464	592.66	310622	W31182	109819	Scarsa熱帯魚 EST
3	b171	846.52	206.41	2625.1	4.101	840.1	114411	T78159	76536	トランスユベリンタンパク質に対するmiRNA:ガンマクロレオチン結合タンパク質16 類似
2	b146	1370.01	476.68	2551.2	2.826	891.35	278288	N64916	118779	90Sリボソームタンパク質L24
2	m184	824.37	201.38	2550.24	4.084	622.99	172893	H20448	31748	TRESに対するmiRNA
2	a212	9833.36	7814.74	2540.05	1.258	2018.62	382225	R13408	なし	Scarsa熱帯魚 EST
1	b037	869.37	222.08	2533.81	3.915	647.28	308013	W24484	19399	Scarsa熱帯魚 EST
6	b188	5378.44	3851.84	2500.54	1.448	1726.59	22478	T74342	なし	Scarsa熱帯魚 EST
2	b156	1349.09	476.61	2469.62	2.831	872.48	274375	H49808	35750	ヒト染色体16BACクローンGT19879K-A-962B4
1	b088	1230.4	419.22	2380.86	2.935	811.19	382889	AA084560	76152	デロン:青プロテオグリカン前駆体と類似
6	b056	559.62	106.82	2377.64	5.248	453	299666	W05763	77208	Scarsa熱帯魚 EST
3	b061	4618.76	3053.64	2367.33	1.513	1566.13	114928	T86234	なし	Scarsa熱帯魚 EST
3	b195	1148.21	390.65	2226.64	2.838	757.56	233826	H64619	138557	Scarsa熱帯魚 EST
3	b077	768.87	197.47	2224.76	3.894	671.4	324213	W47502	76847	RNA0098:遺伝子に対するヒトmRNA
4	k131	7404.01	5699.52	2214.23	1.299	1704.49	116431	T91423	16904	Scarsa熱帯魚 EST
5	b124	2689.03	1513.31	2089.15	1.777	1175.72	199641	R98571	33433	Scarsa熱帯魚 EST
3	b064	570.23	122.91	2075.13	4.638	447.31	180285	R85333	なし	ヒトロムチン遺伝子対照体と類似
3	b187	1400.26	568.43	2049.1	2.463	831.83	328847	W45482	30825	海馬HS_eDNAクローンEST
2	b076	1040.39	354.13	2016.18	2.938	686.27	274408	H49897	93814	Scarsa熱帯魚 EST
6	m243	9144.65	7517.08	1979.98	1.217	1627.58	47171	H19763	21448	ヒトタンパク質体リタンパク質(DOC-2)mRNA
5	k175	738.48	201.02	1974.49	3.674	537.48	251637	H98724	81988	Scarsa熱帯魚 EST
3	c096	1998.95	1008.36	1963.7	1.982	990.58	279481	N45602	なし	Scarsa多量性遺伝子 EST
5	b034	3385.63	2163.51	1937.07	1.572	1232.12	201639	R99977	108048	Scarsa熱帯魚 EST
2	b135	2000.18	1022.05	1914.2	1.957	978.12	223082	F896650	33687	Scarsa熱帯魚 EST
2	m232	2028.18	1044.89	1908.35	1.941	863.48	31546	R20842	23075	Scarsa熱帯魚 EST
1	b037	1521.81	676.29	1902.49	2.24	845.51	321259	W55813	76317	リボソームタンパク質L31
5	b237	366.83	59.86	1880.87	6.127	306.96	531514	AA074032	63848	トリホセホスフェート(uracilphosphate)イソマーゼ1
3	a216	623.41	155.24	1860.14	4.016	468.18	279374	N46540	136692	Scarsa多量性遺伝子 EST
6	b246	1661.35	779.4	1879.94	2.132	881.95	306904	W21392	なし	Scarsa熱帯魚 EST

(実施例12: 加齢による黄斑およびAMDにおけるエラスチン分布の分析:

)

本発明者らは、ウサギポリクローナル抗大動脈エラスチン抗体とブルー膜の弾性層との反応性を若年 (< 5歳)、中年 (20 - 40歳)、およびAMD (> 50歳)の少人数の一連のドナーで試験した。この研究に使用した63人のヒトドナーの眼は、The University of Iowa Lions Eye Bank (Iowa City, IA)から死後4時間以内に入手した。ヒトドナー組織の使用に対するInstitutional Review Board委員会の承認はThe University of IowaのHuman Subjects Committeeから得た。後極、または鋸状縁と黄斑との間をつなぐ後極のウェッジを100mMカコジル酸ナトリウム中の4% (パラ)ホルムアルデヒド (pH 7.4)で固定した。固定から2 - 4時間後、眼を100mMカコジル酸ナトリウムに移し、そしてアクリルアミド中ですすぎ (3 × 10分)、浸透させ、包埋した。これらの組織を次にOCT中に包埋し、液体窒素中で急激に冷凍し (snap frozen)、そして-80で保存した。固定しなかった後極、またはそのウェッジをアクリルアミド浸透または包埋せずに、OCT中に直接包埋した。固定および未固定の組織の両方をクリオスタット上で厚さ6 - 8 μmの薄片に切った。結晶腔の存在およびタイプを、ヘマトキシリン/エオシン、過ヨウ素酸、シッフ試薬、およびスダンブラックB (70%エタノール中1%)で染色した隣接の切片上で記録した。

【0287】

免疫標識を以前に記載されたようにして行った (32)。隣接した切片を二次抗体単独と共にインキュベートし、ネガティブコントロールとして役立てた。いくつかの免疫標識された試料を、以前に記載されたように共焦レーザーキャニング顕微鏡で観察した (42)。黄斑中の弾性層は3つのグループ全てにおいて黄斑外の領域の弾性層とは顕著に異なっていた。免疫反応性エラスチンはAMDドナーの黄斑中で、連続的かつ厚い周辺領域と比べて、薄く、そして高度に断片化していた。免疫反応性エラスチンは、試験された2人の若いドナーの黄斑には存在しなかった。本発明者らは、これらの観察が、黄斑がなぜ変性に対して特に感受性であり得るかに関する重要な手がかりを提供することを提案する。

【0288】

(実施例13：AMDにおける血清自己抗体の帰属)

この副次的目的を行う理論的根拠は、樹状細胞が局所組織創傷によって活性化され得るという仮説、およびこれが組織損傷または慢性炎症の間、被覆されていない網膜および/またはRPE抗原に対する自己免疫反応の開始をもたらす得るという仮説に基づく。この事象は異常な遅延型過敏症反応の結果として生じ得、AMD患者のうちの一部において以前に観察された血清自己抗体を説明している。それ自体、この目的はAMDおよび眼の結晶腔の患者が結晶腔なしのコントロールと比べたときに特異的自己抗体のレベルが増大しているかどうかを決定することに関する。AMD表現型と結晶腔の状態と疾患の「病期」との潜在的な関係に対して得に注意が払われる。慢性炎症の自己抗体またはメディエーターの同定はAMDの同定のための診断アッセイの開発のための手段として役立つ。

【0289】

研究の設計：視力測定、立体黄斑写真、および周辺写真を研究の開始時とその後6ヶ月おきに行う。血液および血清を被験者が実験に入るときと、その後6-12ヶ月ごとに採取する。DNAを各血液試料の一部から将来の遺伝学的研究のために調製する。血清自己抗体および免疫複合体の存在を標準的なプロトコルを用いて決定する。さらに、血清をAMD有りおよび無しのドナー由来の組織切片と反応させ、次いでヒトイムノグロブリンに対して吸着した二次抗体と反応させる。AMDおよび非AMDドナー由来の網膜/RPE/脈絡膜のウェスタンブロットもまた血清試料と共にインキュベートして、自己抗体が反応する特異的バンドを同定する。さらに、以下のタンパク質、自己抗体応答、慢性炎症および/または急性期応答のさらなるインジケーターのレベルを臨床的診断的実験室でアッセイする。これらは、ベンス-ジョーンズタンパク質、血清アミロイドA、M成分(component)、C反応性タンパク質、マンナン結合タンパク質、血清アミロイドA、C3a、C5a、他の補体タンパク質、凝集タンパク質、フィブリノーゲン、ヒトロネクチン、CD25、インターロイキン1、インターロイキン6、およびアポリポタンパク質Eを包含する。血清タンパク質電気泳動、リンパ球幼化、沈降速度、および自発的、全血、白血球数もまた測定される。

【0290】

以下のタンパク質（他の加齢関連状態および/またはMPGNで多く観察される）に対する抗体の存在もまた決定される：IV型コラーゲン、糸球体基底膜、好中球、細胞質（c-ANCA、p-ANCA）、C3コンバーターゼ（C3腎炎因子）、アルファ-1抗トリプシンレベル（MPGN中で減少）、4対立遺伝子、アポリポタンパク質E、GFAP、ANA、血清老化細胞抗原、S-100、2型プラスミノゲン活性化因子、-1-抗キモトリプシン、SP-40,40、内皮細胞、壁細胞、ミトコンドリア、Jo-1、島細胞、内耳抗原、表皮剥離Bullosa Acquista、筋内膜IgA、癌抗原15-3、リン脂質、ニューロン核、カルジオリピン、およびガングリオシド。

表6 免疫仲介プロセスについての血清学的試験

（自己免疫および慢性炎症）

（細胞）

全血細胞数、ヘモグラムおよび示差

CBC、ヘモグラム

（イムノグロブリン）

イムノグロブリンA、G、M、D、E定量

IgGサブクラス定量

/ 軽鎖 - 定量および比率

（種々のタンパク質）

血清タンパク質電気泳動

補体、全ての古典的および代替

成分：C3、C4、C5定量的

ベンス-ジョーンズタンパク質

M成分

C反応性タンパク質

血清アミロイドA

凝集タンパク質

フィブリノーゲン（および/またはESR）

エラスターゼインヒビター

エラスチンおよびコラーゲンペプチドフラグメント

血清 - 2 - ミログロブリン

血清カロチン (c a r o t i n e)

クレアチンキナーゼ

リウマチ因子

C反応性タンパク質

(免疫担当細胞)

リンパ球免疫表現型 (i m m u n o p h e n o t y p i n g) および絶対CD4細胞数。

抗OKT3、IgG抗体。

CD34幹細胞数。

CD3細胞数。

CD4細胞数。

リンパ球マイトジェンおよび抗原プロフィールスクリーニング (L P A)

リンパ球抗体スクリーニング???

NK細胞。

TおよびB細胞マーカー。(どちらをスクリーニングするか?)

CD4 / CD8 - 絶対数および比率

H L A 表現型、クラスIおよびIIの両方。H L A B - 27。

(サイトカイン)

インターロイキン

線維芽細胞増殖因子

血管作用性腸ペプチド (V I P)

(自己抗体)

抗核抗体 (A N A)

抗好中球細胞質抗体 (A N C A)

二本鎖DNA抗体

抗リボ核タンパク質抗体

S c l - 7 0 抗体

S M 抗体

S S - A 抗体 (抗 R O) および S S - B (抗 L A) 抗体

抗ニューロン核抗体

抗ニューロン核抗体 (プルキニエ細胞)

J o - 1 抗体

新生物随伴抗体 A

抗カルジオリピン抗体

抗糸球体基底膜抗体

ミトコンドリア抗体

抗ガングリオシドアッセイ

抗ストレプトリジン O スクリーニング

抗スルファチド抗体

抗チロ細胞性 (t y r o c e l l u l a r) 抗体

内耳抗原に対する抗体

水疱性 (b u l l o s) 類天疱瘡抗体

P M - 1 抗体

副腎皮質抗体

肝腎ミクロソーム抗体

ミトコンドリア抗体

上皮小体抗体

壁細胞抗体

天疱瘡抗体

平滑筋抗体および横紋筋抗体

島細胞抗体

狼蒼抗凝固薬

(抗ウイルスおよび抗細菌抗体)

C M V 抗体

グループ B 連鎖球菌抗原

B、E、C、A型肝炎抗体

ヘリコバクターピロリ抗体

CMV、EBウイルス、単純ヘルペス、麻疹、マイコプラズマ、風疹、水痘 - 帯
状疱疹に対する抗体

(その他)

癌抗原125

癌抗原15-3

癌胎児性(carcinoembryonic)抗原

小線維軸索プロフィール

CNS血清学バッテリー

感覚運動ニューロパシープロフィール

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 00/04592
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
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) MEDLINE, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VINGERLING, J.R. ET AL.: "Age-related macular degeneration and smoking. The Rotterdam study" ARCH OPHTHALMOL, vol. 114, no. 10, October 1996 (1996-10), pages 1193-1196, XP000861808 abstract	1-16,42
X	SACKS J G ET AL: "The pathogenesis of optic nerve drusen. A hypothesis." ARCHIVES OF OPHTHALMOLOGY, (1977 MAR) 95 (3) 425-8. XP000911974 abstract	1-16,42
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 August 2000		Date of mailing of the international search report 12/09/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hoekstra, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 00/04592

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CUNNINGHAM R D ET AL: "Aneurysm of the ophthalmic artery with drusen of the optic nerve head." AMERICAN JOURNAL OF OPHTHALMOLOGY, (1971 OCT) 72 (4) 743-5. , XP000911948 abstract ---	1-16,42
X	TARKKANEN, A. AND LAATIKAINEN, L. : "late ocular manifestations in neonatal herpes simplex infection" BR J OPHTHALOML, vol. 61, 1977, pages 608-616, XP000911789 abstract -----	1-16,42

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Claims 30,31 and 33-36 are directed to a method of treatment of the human/animal body, a search has not been carried out and based on the alleged effects of the "arterial wall disruptive disorder therapeutic" due to lack of technical features as a basis for a meaningful search over the whole of the claimed scope.

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 30, 31 and 33-36

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-16 and 42 in part, 17-41 and 43,44 in toto

Present claims 1-16 and 42 relate to an extremely large number of possible methods or animal models. In fact, the claims contain so many options, that a lack of clarity (and/or conciseness) within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear (and/or concise), namely the subject-matter of claims 1-16 and 42 insofar as characterised by technical features which would, insofar as rendered plausible by the description, contribute to a solution to the problem of providing a diagnostic method for predisposition of macular degeneration. There appears to be no support in the sense of Article 6 and Article 5 PCT for the notion that any of the proposed specified biochemical markers of e.g. claim 10 are indeed solutions to the posed problem.

Moreover, the claims cover all methods having the feature of a drusen associated marker which in itself is defined by the result to be achieved of being a drusen associated marker without leading the skilled man to a technically supported choice of efficacious markers amongst all conceivable biochemical and histological associations with drusen or macular phenomena. In fact the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT only for arterial disruptive disorders as a suitable marker. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT), because of the attempt to define the method by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

of the claimed scope impossible.

The subject-matter for which protection is sought in claims 17-29 and 37-41 and 43 and 44 would be characterized by the technical nature of the (genomic) nucleic acid. As this nucleic acid is not defined in terms of technical features like sequence ID's or other specific scientific designations a meaningful search for these claims cannot be carried out either in view of a lack of clarity (Article 6 and Rule 6.3(a) PCT) and a lack of support for the whole of the scope of the claims (Article 5 PCT and Article 6 third sentence).

The same holds true mutatis mutandis for claims 32 and claims 31, 31 and 33-36 which fail to identify the technical nature of the "arterial wall disruptive disorder therapeutic".

The search has in effect been limited to finding documents which would reveal a causal or coincidental relation between macular degeneration and arterial wall disruption disorders.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト(参考)	
A 6 1 P	29/00	C 1 2 Q	1/68	A
C 1 2 Q	1/68	G 0 1 N	33/50	P
G 0 1 N	33/50		33/53	D
	33/53			L
				N
				P
				R
				Z
			33/564	Z
// G 0 1 N	33/564	C 1 2 N	15/00	Z N A A
(31)優先権主張番号	6 0 / 1 2 3 , 0 5 2			
(32)優先日	平成11年3月5日(1999.3.5)			
(33)優先権主張国	米国(US)			
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW			
Fターム(参考)	2G045 DA13 FA16 FB02 FB03			
	4B024 AA01 AA11 CA01 CA11 CA20			
	DA02 GA11 HA11			
	4B063 QA13 QA17 QA19 QQ42 QQ52			
	QQ79 QR08 QR32 QR35 QR42			
	QR55 QR62 QR72 QR80 QS16			
	QS25 QS33 QS36 QX02 QX10			
	4C084 AA17 NA14 ZA331 ZA441			
	ZB112			

专利名称(译)	黄斑变性的诊断和治疗		
公开(公告)号	JP2003504088A	公开(公告)日	2003-02-04
申请号	JP2001510848	申请日	2000-02-22
[标]申请(专利权)人(译)	爱荷华州研究基金会的盐湖城大学		
申请(专利权)人(译)	爱荷华州研究基金会的盐湖城大学		
[标]发明人	ハーグマン グレゴリー エス		
发明人	ハーグマン, グレゴリー エス.		
IPC分类号	A01K67/027 A61K38/00 A61K45/00 A61P9/14 A61P27/00 A61P27/02 A61P29/00 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/564 G01N33/68		
CPC分类号	A61P27/00 A61P27/02 A61P29/00 C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N33/6893 G01N2333/78 G01N2800/164 G01N2800/329		
FI分类号	A01K67/027 A61K45/00 A61P9/14 A61P27/02 A61P29/00 C12Q1/68.A G01N33/50.P G01N33/53.D G01N33/53.L G01N33/53.N G01N33/53.P G01N33/53.R G01N33/53.Z G01N33/564.Z C12N15/00.ZNA.A		
F-TERM分类号	2G045/DA13 2G045/FA16 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024/HA11 4B063/QA13 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR80 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX02 4B063/QX10 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA331 4C084/ZA441 4C084/ZB112		
优先权	60/120822 1999-02-19 US 60/120668 1999-02-19 US 60/123052 1999-03-05 US		
其他公开文献	JP2003504088A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及黄斑变性和动物模型的诊断和治疗。特别地，它涉及如本文所述的黄斑变性与动脉壁破裂疾病之间的关联。在一个实施方案中，本发明提供了用于诊断黄斑变性的试剂盒和方法，其包括鉴定包括动脉瘤在内的动脉壁破裂疾病的标志物。在一个实施方案中，本发明提供了一种用于治疗黄斑变性的治疗方法，其包括向受试者递送可用于治疗包括动脉瘤在内的动脉壁破裂疾病的药剂。包括在内。

AAA 特徴	AMD	特異性
遺伝性	X	
加齢性	X	
炎症性破壊 & 他の ECM	X	University of Iowa 特異
コラーゲン及びマトリックスの新生	X	University of Iowa 特異
高血圧による増悪	?	
血管因子による増悪	X	
自己免疫関与	?	University of Iowa 特異
大動脈血管新生	X	
アロパチ性動脈硬化症の関連	X	
COPDの血管内閉塞	?	University of Iowa 特異
血管平滑筋細胞の増殖	?	University of Iowa 特異
樹状細胞の誘入	X	University of Iowa 特異
小量性炎症 (特異的)	?	University of Iowa 特異
以下を調節: MMP2 & MMP9, t-PA, uPA, PAI-1, C3, IgG, TNFα, IL1, IL6, IL8, TIMP, GAG,	?	
PGの下方調節		
α-1アンチトリプシン欠損 (特異的)	?	University of Iowa 特異