

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-505431
(P2010-505431A)

(43) 公表日 平成22年2月25日(2010.2.25)

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

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 71 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-531782(P2009-531782)
 (86) (22) 出願日 平成19年10月11日(2007.10.11)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年6月8日(2009.6.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2007/008872
 (87) 国際公開番号 W02008/043566
 (87) 国際公開日 平成20年4月17日(2008.4.17)
 (31) 優先権主張番号 60/850,659
 (32) 優先日 平成18年10月11日(2006.10.11)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 06023597.5
 (32) 優先日 平成18年11月14日(2006.11.14)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)

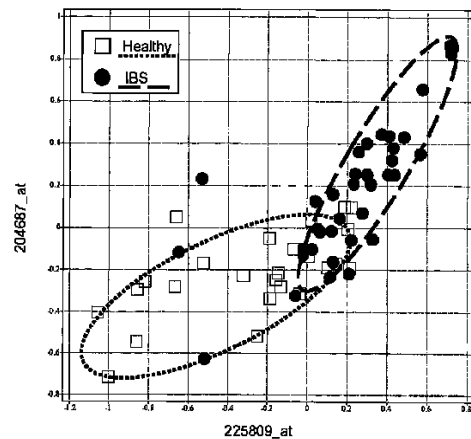
(71) 出願人 503459970
 ジャンセン ファーマシューティカ エヌ
 . ヴェー.
 ベルギー、ペー-2340 ベールス、ト
 ウールンオートゼヴェグ 30
 (71) 出願人 501083115
 メイヨ・ファウンデーション・フォー・メ
 ディカル・エデュケーション・アンド・リ
 サーチ
 アメリカ合衆国、ミネソタ州 55905
 、ロチェスター、ファースト・ストリート
 ・サウスウエスト 200
 (74) 代理人 100064746
 弁理士 深見 久郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 過敏性腸症候群の処置および予防のための組成物および方法

(57) 【要約】

本発明は、一般的に、慢性内臓過敏(CVH)、特に過敏性腸症候群(IBS)と関連する障害の治療および診断に関する。特に、本発明は、CVHと関連することが示されているポリペプチドならびにこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。このようなポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、CVHと関連する障害の診断、処置および/または予防、特にIBSと関連する障害の診断、処置および/または予防に有用である。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 被験体の生物学的試料において、IBS分子署名遺伝子 (IBS-MSG) の遺伝子転写レベルを測定すること、ここで、前記 IBS-MSG は、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、RFC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4 および MUC20 からなる群より選択される、

(b) 該遺伝子転写レベルを正常対照試料における遺伝子転写レベルと比較すること；ならびに

(c) 工程 (b) の結果に基づいて IBS の存在および / またはその状態を調べることを含む、被験体において IBS を検出および / またはモニタリングするためのインビトロ方法。

10

【請求項 2】

工程 (a) が、該 IBS-MSG の少なくとも 2 種類の測定を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 IBS-MSG が、VSI G2、VSI G4 および MUC20 からなる群より選択される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記工程 (a) が、

- IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3 および VSI G2；または
 - IBS1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1 および VSI G2；または
 - MUC20、VSI G2 および VSI G4
- の遺伝子転写レベルの測定を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

20

【請求項 5】

工程 (a) が、さらに、IBS マーカとして知られる遺伝子、特に、CASP1、FCGR2A および CKB からなる群より選択される遺伝子の少なくとも 1 つ、2 つ、3 つまたはそれ以上の遺伝子転写レベルの測定を含む、請求項 1 ~ 4 いずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 6】

被験体において IBS を測定するための方法であり、工程 (c) において、IBS1、VSI G2 および MUC20 からなる群より選択される遺伝子の遺伝子転写レベルの増大、または COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、RFC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL および VSI G4 からなる群より選択される遺伝子の遺伝子転写レベルの減少が、前記被験体における IBS の存在の表示である、請求項 1 ~ 5 いずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

IBS-MSG の遺伝子転写レベルが、タンパク質レベルで、または遺伝子転写レベルでのいずれかで測定される、請求項 1 ~ 6 いずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 8】

IBS-MSG の遺伝子転写レベルが、アレイ手法を用い、前記 IBS-MSG から転写されたオリゴヌクレオチドに特異的に結合するプローブを用いてオリゴヌクレオチドレベルで、IBS-MSG ポリペプチドに結合する特異的結合剤を用いてタンパク質レベルでのいずれかで測定される、請求項 1 ~ 7 いずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

生物学的試料が、血液、尿、唾液、糞便試料、糞便細胞、組織生検材料または剖検材料からなる群より選択される、請求項 1 ~ 8 いずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 10】

遺伝子の発現レベルが、表 1 または表 2 に列挙したプローブから選択されるプローブのアレイを用いて測定される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

被験体において I B S を同定および / またはモニタリングするための方法であり、遺伝子転写レベルがタンパク質レベルで測定される、請求項 1 ~ 9 いずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

タンパク質レベルが、I B S - M S G タンパク質に結合する抗体を用いて測定される、請求項 11 に記載の方法。

10

【請求項 13】

I B S 1 に特異的な抗体である I B S - M S G にコードされたポリペプチドに対する抗体の使用を含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

a) 少なくとも 1 種類の I B S - M S G を発現する細胞を試験対象の化合物と接触させること、ここで、I B S - M S G は、I B S 1、C O P 1、P S M E 2、F 1 3 A 1、N C F 4、C S F R 1、M 1 6 0、K C N S 3、L Y Z、M S 4 A 4 A、H E L L S、F R C 4、M C M 5、T A P 2、L R A P、D T L、V S I G 2、V S I G 4 および M U C 2 0 からなる群より選択される、

b) 前記 I B S - M S G の発現レベルを測定すること ; ならびに

20

c) 前記化合物の非存在下での前記 I B S - M S G の発現レベルと比較することを含み、

これにより、I B S において観察される前記 I B S - M S G の発現レベルの変化を妨害することができる化合物が、C V H の処置、特に I B S の処置のための候補化合物として同定される、C V H の処置、特に I B S の処置のための候補化合物を同定するためのインビトロ方法。

【請求項 15】

I B S - M S G が I B S 1 である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

発現レベルが、核酸レベルで、またはタンパク質レベルで検出される、請求項 14 または 15 に記載の方法。

30

【請求項 17】

遺伝子の発現レベルが、I B S - M S G に結合するオリゴヌクレオチドプローブのアレイを用いて測定される、請求項 14 ~ 16 いずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

前記 I B S - M S G の発現レベルが、I B S - M S G ポリペプチドのタンパク質レベルを測定することにより測定される、請求項 14 ~ 16 いずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

該タンパク質レベルが抗体を用いて測定される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

40

(a) I B S - M S G 産物を試験対象の化合物とともにインキュベートすること、ここで、I B S - M S G は、I B S 1、C O P 1、P S M E 2、F 1 3 A 1、N C F 4、C S F R 1、M 1 6 0、K C N S 3、L Y Z、M S 4 A 4 A、H E L L S、F R C 4、M C M 5、T A P 2、L R A P、D T L、V S I G 2、V S I G 4 および M U C 2 0 からなる群より選択される、ならびに

(b) 前記化合物が I B S - M S G 産物と結合できる能力を測定すること、ここで、I B S - M S G 産物に対して結合できる化合物は、I B S の処置のための候補化合物である、C V H の処置、特に I B S の処置のための候補化合物を同定および取得するためのスクリーニング方法。

【請求項 21】

50

I B S - M S G 産物は、前記遺伝子またはその断片にコードされたポリペプチドからなる、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

(a) I B S 1、C O P 1、P S M E 2、F 1 3 A 1、N C F 4、C S F R 1、M 1 6 0、K C N S 3、L Y Z、M S 4 A 4 A、H E L L S、F R C 4、M C M 5、T A P 2、L R A P、D T L、V S I G 2、V S I G 4 および M U C 2 0 からなる群より選択される I B S - M S G に特異的に結合する少なくとも 1 種類のプローブ；または

(b) I B S - M S G ポリペプチドまたはその断片に特異的に結合する少なくとも 1 種類の薬剤、ここで、I B S - M S G は、I B S 1、C O P 1、P S M E 2、F 1 3 A 1、N C F 4、C S F R 1、M 1 6 0、K C N S 3、L Y Z、M S 4 A 4 A、H E L L S、F R C 4、M C M 5、T A P 2、L R A P、D T L、V S I G 2、V S I G 4 および M U C 2 0 からなる群より選択される、を備える診断用キット。

10

【請求項 23】

各々が I B S - M S G に特異的に結合する少なくとも 2 種類のプローブ、または各々が I B S - M S G ポリペプチドに特異的に結合する少なくとも 2 種類の薬剤を含む、請求項 22 に記載の診断用キット。

【請求項 24】

I B S - M S G の遺伝子転写レベルを特異的に検出することができるプローブまたは薬剤からなり、前記 I B S - M S G が、

- I B S 1、C O P 1、P S M E 2、F 1 3 A 1、N C F 4、C S F 1 R、M 1 6 0、K C N S 3 および V S I G 2；または

20

- I B S 1、P S M E 2、F 1 3 A 1、N C F 4、C S F R 1 および V S I G 2；または

- M U C 2 0、V S I G 2 および V S I G 4

である、請求項 21 または 22 に記載の診断用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般的に、慢性内臓過敏 (C V H)、特に過敏性腸症候群 (I B S) と関連する障害の治療および診断に関する。特に、本発明は、C V H と関連することが示されているポリペプチドならびにこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。このようなポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、C V H と関連する障害の診断、処置および / または予防、特に、I B S と関連する障害の診断、処置および / または予防に有用である。

30

【背景技術】

【0002】

発明の背景

過敏性腸症候群 (I B S) および炎症性腸疾患 (I B D) は、腹痛、不快感 (切迫と鼓脹) および排便習慣の変化が慢性的に繰返される症状を特徴とする状態の代表的な 2 つである。しかしながら、これらの腸疾患は病態と生理病理学が有意に異なり、したがって、異なる診断方法および処置方法が関与する。I B D が小腸および / または大腸における炎症または潰瘍化を特徴とする場合、かかる明白な構造上の変化は I B S と関連していない。I B S は、病態が未知の機能性 (器質性と反対) の腸障害に分類される。機能性障害は、主な異常が、特定可能な構造的または生化学的原因ではなく、生理学的機能の変化である障害または疾患をいう。現在、I B S の診断は、検出可能な構造的異常の非存在下での特徴的な症状群に基づくもの (D r o s s m a n D A , C a m i l l e r i M , M a y e r E A , W h i t e h e a d W E . A G A t e c h n i c a l r e v i e w o n i r r i t a b l e b o w e l s y n d r o m e . G a s t r o e n t e r o l o g y . 2 0 0 2 ; 1 2 3 : 2 1 0 8 - 3 1)、例えば、検出可能な進行中の器質性疾患の非存在下で起こる断続的な腹痛および不快感ならびに排便習慣の変化、例えば、弛

40

50

緩性または高頻度の排便、下痢および/または便秘に基づくものである。腹痛または腹部の不快感の主症状の特異性が欠如しているため、IBSの現行の診断は、不均一な患者群にあてはまり、主な排便習慣（下痢が主、便秘が主、交代性の下痢と便秘、正常）に基づいて亜群を規定する試みの後になってあてはまる。

【0003】

IBSは、一般人口のほぼ10～20%が罹患している。これは、胃腸科専門医によって診断される最も一般的な疾患であり、プライマリ・ケアの医師によって確認される最も一般的な障害の1つである。

【0004】

IBSの病態生理学が説明される現行の理論としては、内臓知覚、胃腸管の運動性または腸上皮の機能および免疫機能の変化が挙げられる。公表された証拠により、IBSが慢性内臓過敏(CVH)状態と関連していることが示されており、内臓の知覚情報処理が変化しているが、IBSにおけるCVHの発生と維持の原因となる分子上の変化は不明であることが示されている。公表された証拠により、IBS症状の提示または悪化が誘発され得るそれぞれ中枢的および末梢的誘因としての、心理社会的および身体的（例えば、腸管感染症）ストレス要因の役割が裏づけられている。例えば、IBSの病因における低度の慢性炎症の推測的役割の証拠は増加している。そのため、IBSのための現行の医療処置は、潜在する原因ではなく、主に周辺症状を対象とするものであり、薬物処置による治療利得は、通常、適度であり、プラセボ応答は高い(Mertz H, Naliboff B, Munakata J, Niazi N, Mayer EA. Altered rectal perception is a biological marker of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 1995; 109: 40-52)。したがって、原因となる神経学的欠陥および分子上の欠陥を明らかにすることは、より好成績の治療戦略の設計に重要である。さらに、当該技術分野において、IBSおよび他のCVH関連障害をスクリーニング、診断および処置するための改善された方法の必要性が存在する。

10

20

30

40

【0005】

原因となる分子上の欠陥を特定しようとする(try and identify)ための第1の取り組みにおいて、Pasricha Pら(PCT公開公報WO2005/020902)は、CNI-1493で処置したときの、慢性内臓過敏のラットモデル由来の結腸組織RNAおよびS1脊髄神経節RNAのマイクロアレイ発現プロファイルの解析を報告している。

【0006】

本明細書では、IBS患者と健常被験体対照被験体由来のS状結腸粘膜生検材料のマイクロアレイ発現プロファイルの解析を報告する。この解析では、IBS患者において、宿主の防御システムと免疫応答の特定の成分の機能の変化を示すいくつかの差次的に発現される遺伝子が明らかになった。これは、IBSの病態の原因となる胃腸管の周辺変化に対する重要な役割を裏付ける。IBS患者の結腸粘膜生検材料において最も著しく増大した発現を伴う2つの遺伝子プローブセットは、未同定の遺伝子(DKFZP56400823)を表す。この遺伝子をIBS1に名称変更することを提案する。IBS患者と健常対照被験体との識別を可能にするマイクロアレイ上での特定の遺伝子プローブセットの同定、いわゆる分子署名を記載する。IBSにおける発現プロファイルは、結腸内の種々の位置において一貫しており、経時的に安定である。したがって、同定された分子署名は、IBS患者の(サブセットの)治療に対する応答の診断および評価に有用なバイオマーカーを開発するための機会を提供する。これは、もっぱら臨床症状の変化のみに依存する現行の標準ではなく、生物学的活性の特定の变化に基づく有意な前進である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

発明の概要

50

本発明は、IBS患者の結腸に構造的異常がないにもかかわらず、正常組織と比べて差次的に発現される遺伝子だけでなく、その差次的発現が、IBSと関連し、診断上、予測上のおよび/または治療上の価値を有する遺伝子を同定することも可能であるという驚くべき所見に基づく。

【0008】

したがって、本発明は、これまでIBSと関連しておらず、本明細書において以下IBS分子署名遺伝子 (IBS - MSG) といういくつかの遺伝子 (表1) の同定に関し、したがって、前記遺伝子に関連する核酸分子およびタンパク質、ならびにCVHの処置、特にIBSの処置に使用され得る化合物を同定するための方法におけるその使用、または被験体においてIBSを確認およびモニタリングするための診断方法におけるその使用を提供する。

10

【0009】

該核酸分子は、例えば、個々の遺伝子の発現レベルをモニタリングするために個々に使用され得るか、あるいはマイクロアレイ形式で、被験体においてIBSを確認および/またはモニタリングするために提供され得る。該核酸分子は、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび低分子干渉RNA (siRNA)、リボザイム、および遺伝子発現の変更、診断、スクリーニングおよび治療の目的に有用な他の分子を設計するために使用され得る。さらに、該核酸分子は、コードされたタンパク質を発現させるために使用され得る。また、当業者は、該核酸配列に基づいてペプチド抗原を設計することができよう。

20

【0010】

該タンパク質は、創薬のための標的として、例えば、その活性を作動または拮抗するリード化合物を化合物を同定するのに有用である (後述)。また、該タンパク質は、抗体または他の特異的結合剤を作製するために使用され得る。このような特異的結合剤は、被験体においてIBSを処置、診断またはモニタリングするための方法、またはCVHの処置、特にIBSの処置に使用され得る化合物をスクリーニング、すなわち同定するための方法に使用され得る。

【課題を解決するための手段】

【0011】

一態様において、本発明は、対照試料に対して被験体由来の生物学的試料におけるIBS - MSGの1つ以上の発現レベルをヌクレオチドまたはタンパク質レベルで比較することにより、CVH、特にIBSを診断およびモニタリングするための方法、より詳細にはインビトロ方法を提供する。

30

【0012】

一実施形態において、本発明は、(a)被験体の生物学的試料において、IBS - MSGの遺伝子転写レベルを測定する工程；(b)該遺伝子転写レベルを正常対照試料における遺伝子転写レベルと比較する工程；ならびに(c)工程(b)の結果に基づいて診断を得る工程を含む、被験体においてIBSを検出および/またはモニタリングするための方法を提供する。該IBS - MSGは、典型的には、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4およびMUC20からなる群より選択される (i s i s)。より詳しくは、該方法は、対照試料におけるこれらの遺伝子の発現と比べて、これらの遺伝子の発現に差があることを調べることを伴い、それにより、これらの遺伝子の1つ以上における発現の差は、IBS、IBSの状態および/または具体的な処置の型に対する感受性を示す。

40

【0013】

本発明の方法の特別な実施形態において、工程a)は、上記のIBS - MSGの2、3、4、5、6、7、8種またはそれ以上を調べることを含む。特に、工程(a)は、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4およびMUC20の発現レベルを測定することからなる。

50

より詳細には、工程(a)は、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3およびVSI G2の発現レベルを測定することからなる。あるいはまた、該工程は、IBS1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1およびVSI G2の発現レベルを測定することからなる。あるいはまた、該工程は、MUC20、VSI G2およびVSI G4の発現レベルを測定することからなる。

【0014】

本発明の方法の特別な実施形態において、工程a)は、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、VSI G2からなる群より選択されるIBS-MSGの2、3、4、5、6、7、8種またはそれ以上、あるいはまた、IBS1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1およびVSI G2からなる群からの2、3、4、5、6種、あるいはまた、MUC20、VSI G2およびVSI G4からなる群より選択される2種または3種を調べることを含む。

10

【0015】

本発明の方法の特別な実施形態において、工程a)は、さらに、少なくとも1、2、3種またはそれ以上の他の遺伝子、特に、CASP1、FCGR2AおよびCKBからなる群より選択される遺伝子の遺伝子転写レベルの測定を含む。

【0016】

本発明は、さらに、(a)被験体の生物学的試料において、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、RFC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4およびMUC20からなる群より選択されるIBS-MSGの遺伝子転写レベルを測定する工程；ならびに(b)該遺伝子転写レベルを正常対照試料における遺伝子転写レベルと比較し、該試料が、IBSを示すか、IBSの状態を示すか、および/または具体的な処置の型に対する感受性を示すか否かの判定を含み、ここで、IBS1、VSI G2およびMUC20からなる群より選択される遺伝子の遺伝子転写レベルの増大、またはCOP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、RFC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTLおよびVSI G4からなる群より選択される遺伝子の遺伝子転写レベルの減少は、前記被験体におけるIBSの存在の表示である、被験体においてIBSを確認または判定するための方法を提供する。したがって、遺伝子転写レベルの差、より詳細には、IBS1、VSI G2およびMUC20からなる群より選択される遺伝子の遺伝子転写レベルの増大、またはCOP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、RFC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTLおよびVSI G4からなる群より選択される遺伝子の遺伝子転写レベルの減少は、前記被験体におけるIBSの存在の表示である。

20

30

【0017】

本発明の方法は、特定の遺伝子の発現の増大および/または減少を調べることを伴う。特別な実施形態において、該方法は、対照と比べた該遺伝子の発現において、少なくとも1.15倍、より詳細には少なくとも1.2倍変化に相当する増大があるか否か、または少なくとも0.85倍変化、より詳細には少なくとも0.8倍変化に相当する減少があるか否かの判定を伴う。

40

【0018】

本発明の方法の工程(a)では、遺伝子転写レベルは、好ましくは、IBS-MSGポリペプチドに結合する抗体を用いてタンパク質レベルで、または好ましくは、前記IBS-MSGから転写されたオリゴヌクレオチドに特異的に結合するプローブを用いて遺伝子転写レベルで、好ましくは、cDNAもしくはmRNAレベルでのいずれかで測定される。遺伝子転写レベルは、任意選択で、アレイ手法を用い、本明細書に記載の特異的プローブを用いてオリゴヌクレオチドレベルで、または特異的結合剤、好ましくは本明細書に記載の抗体を用いてタンパク質レベルでのいずれかで測定される。

【0019】

50

本発明の方法の具体的なある実施形態において、遺伝子転写レベルは、IBS - MSG に結合するオリゴヌクレオチドプローブのアレイを用いて評価される。任意選択で、IBS - MSG に対するオリゴヌクレオチドプローブのアレイを、他の遺伝子、特に、CASP1、FCGR2A およびCKB からなる群より選択される遺伝子に特異的に結合するプローブと組み合わせる。

【0020】

さらなる具体的なある実施形態は、IBS 遺伝子の発現レベルが、表1に示したプローブのアレイを用いて、より詳細には表2に示したプローブのアレイを用いて測定される方法に関する。

【0021】

別の具体的なある実施形態によれば、遺伝子転写レベルは、逆転写定量的ポリメラーゼ連鎖反応(RTQ-PCR)を用いて評価される。

【0022】

IBS 遺伝子の発現レベルの検出を伴う方法の具体的なある実施形態において、本発明の方法に使用される生物学的試料は、血液(例えば、全血、血清、血漿、特に、白血球)、尿、唾液、糞便試料、糞便細胞、組織生検材料(特に、結腸生検材料)または剖検材料からなる群より選択される。

【0023】

本発明の方法のさらなる実施形態は、(a)被験体の生物学的試料において、少なくとも1種類のIBS - MSG タンパク質のタンパク質レベルを測定する工程；(b)該タンパク質レベルを正常対照試料におけるタンパク質レベルと比較する工程；および(c)試料がIBSを示すか否かを判定する、および/または工程(b)の結果に基づいて診断を得る工程を含む、被験体においてIBSを確認および/またはモニタリングするための方法を提供する。したがって、このような実施形態によれば、IBS - MSG の遺伝子転写レベルは、タンパク質レベルで測定される。典型的には、このような方法では、タンパク質レベルは、IBS - MSG タンパク質に結合する抗体を用いて測定される。具体的なある実施形態において、該抗体は、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4 およびMUC20 から選択されるIBS - MSG にコードされたポリペプチドまたはタンパク質に対する抗体である。最も特別な実施形態において、IBS1 タンパク質のタンパク質レベルは、IBS1 の遺伝子産物に特異的な抗体を用いて測定される。

【0024】

具体的なある実施形態では、該方法には、上記のタンパク質からのIBS - MSG タンパク質の少なくとも2種、任意選択で3、4、5、6種またはそれ以上のタンパク質レベルの測定が包含される。特に、該方法には、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3 およびVSI G2 からなる群のIBS - MSG、あるいはまた、IBS1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1 およびVSI G2 からなる群のIBS - MSG；あるいはまた、MUC20、VSI G2 およびVSI G4 からなる群のIBS - MSG にコードされたペプチドまたはタンパク質のタンパク質レベルの測定が包含される。

【0025】

特別な実施形態において、本発明は、(a)被験体の生物学的試料を、IBS - MSG ポリペプチドと特異的に結合する薬剤と接触させること；(b)該ポリペプチドに対する該薬剤の結合レベルを測定すること；および(c)前記生物学的試料中の該薬剤の結合レベルを、正常対照試料中の該薬剤の結合レベルと比較すること；および(d)工程(c)の結果に基づいて診断を得る(または試料がIBSを示すか否かを判定する)ことを含む、被験体においてIBSを検出および/またはモニタリングするための方法を提供する。工程(d)は、典型的には、工程(c)の結果に基づいて、試料がIBSまたはIBSの特定の状態を示すか否かの判定を含む。任意選択で、かかる方法では、結合レベルは、I

10

20

30

40

50

B S - M S G 特異的抗体のタンパク質アレイを用いて測定される。この場合も、具体的なある実施形態は、I B S - M S G 特異的抗体が、I B S 1、C O P 1、P S M E 2、F 1 3 A 1、N C F 4、C S F R 1、M 1 6 0、K C N S 3、L Y Z、M S 4 A 4 A、H E L L S、F R C 4、M C M 5、T A P 2、L R A P、D T L、V S I G 2、V S I G 4 および M U C 2 0 からなる群より選択される I B S - M S G と反応性である方法に関する。特別な実施形態では、該方法には、各々が、I B S 1、C O P 1、P S M E 2、F 1 3 A 1、N C F 4、C S F R 1、M 1 6 0、K C N S 3、L Y Z、M S 4 A 4 A、H E L L S、F R C 4、M C M 5、T A P 2、L R A P、D T L、V S I G 2、V S I G 4 および M U C 2 0 からなる群より選択される異なる I B S - M S G と反応性である少なくとも2種類の結合剤の使用が包含される。より詳細には、該方法には、この群から選択される2、3、4、5、6種またはそれ以上の結合剤の検出が包含される。このような方法の特別な実施形態において、検出される I B S - M S G は、I B S 1、C O P 1、P S M E 2、F 1 3 A 1、N C F 4、C S F 1 R、M 1 6 0、K C N S 3 および V S I G 2 からなる。より詳細には、検出される I B S - M S G は、I B S 1、P S M E 2、F 1 3 A 1、N C F 4、C S F R 1 および V S I G 2 からなる。さらにより詳細には、検出される I B S - M S G は、M U C 2 0、V S I G 2 および V S I G 4 からなる。代替的な特別な実施形態によれば、I B S - M S G の検出は、I B S 1 ポリペプチドと反応性である特異的抗体を用いた、I B S 1 にコードされたポリペプチドのタンパク質レベルの測定を含む。またさらなる特別な実施形態によれば、I B S - M S G の検出は、I B S 1 ポリペプチドと反応性である特異的抗体を用いた、I B S 1 にコードされたポリペプチドのタンパク質レベルの測定からなる。

【0026】

本発明の方法の具体的なある実施形態では、タンパク質アレイが利用され、任意選択で、I B S - M S G に対するタンパク質アレイを、他の既知の I B S マーカ、特に、C A S P 1、F C G R 2 A および C K B からなる群より選択されるマーカと組み合わせる。

【0027】

本発明の方法の具体的なある実施形態には、I B S 1、V S I G 2 および M U C 2 0 からなる群より選択される I B S - M S G 遺伝子に対する特異的結合剤の結合レベルの増大、または C O P 1、P S M E 2、F 1 3 A 1、N C F 4、C S F 1 R、M 1 6 0、K C N S 3、L Y Z、M S 4 A 4 A、H E L L S、R F C 4、M C M 5、T A P 2、L R A P、D T L および V S I G 4 からなる群より選択される I B S - M S G 遺伝子に対する特異的結合剤の結合レベルの減少が、前記被験体における I B S の存在の表示である方法が包含される。

【0028】

I B S - M S G ポリペプチドに対する薬剤の結合の検出を伴う方法の具体的なある実施形態において、生物学的試料は、血液（例えば、全血、血清、血漿、特に、白血球）、尿、唾液、糞便試料、糞便細胞、組織生検材料（特に、結腸生検材料）または剖検材料からなる群より選択される。

【0029】

本発明の別の態様は、I B S - M S G 産物との薬剤の相互作用、または前記 I B S - M S G / I B S - M S G 産物の活性もしくは発現に対する薬剤の効果に基づいて、抗 C V H 剤、特に、抗 I B S 剤をスクリーニングするための方法を提供する。

【0030】

したがって、本発明は、(a) 少なくとも1種類の I B S - M S G を発現する細胞を試験対象の化合物と接触させる工程；(b) 前記 I B S - M S G の発現レベルを測定する工程；および(c) 前記化合物の非存在下での前記 I B S - M S G の発現レベルと比較する工程を含み、これにより、I B S において観察される I B S - M S G の発現レベルの変化を妨害することができる化合物が、C V H の処置、特に I B S の処置のための候補化合物として同定される、C V H の処置、特に I B S の処置のための候補化合物を同定するための方法、特に、インビトロ方法を提供する。

【0031】

このような方法の具体的なある実施形態は、IBS - MSGが、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4およびMUC20からなる群より選択される方法を提供し、特に、本発明のスクリーニング方法において使用されるIBS - MSGは、IBS1からなる。

【0032】

このような方法のさらなる具体的なある実施形態(embodiment)には、少なくとも2種類のIBS - MSGを発現する細胞を接触させること、該少なくとも2種類のIBS - MSGの発現レベルを測定すること、および該化合物の非存在下での該少なくとも2種類のMSGの発現レベルと比較することが包含される。より詳細には、(at)2、3、4、5、6種またはそれ以上の遺伝子が測定される。特別な実施形態には、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3およびVSI G2からなる群に対応するIBS - MSGの発現、より詳細には、IBS1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1およびVSI G2からなる群に対応するIBS - MSGの発現、あるいはまた、MUC20、VSI G2およびVSI G4からなる群からなる群に対応するIBS - MSGの発現を調べることが包含される。

10

【0033】

本発明のこのような方法の具体的なある実施形態において、発現レベルは、核酸レベルで、またはタンパク質レベルで検出される。さらに特別な実施形態では、発現レベルは、IBS - MSG、特に、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4およびMUC20からなる群より選択されるIBS - MSGに結合するプローブを用いて測定され、最も詳細には、スクリーニング方法に使用されるIBS - MSGは、IBS1からなる。特別な実施形態では、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、VSI G2からなる群に対応するIBS - MSG、より詳細には、IBS1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1およびVSI G2からなる群に対応するIBS - MSG、あるいはまた、MUC20、VSI G2およびVSI G4からなる群に対応するIBS - MSGに対応するプローブが使用される。

20

30

【0034】

本発明のこのような方法の特別な実施形態において、遺伝子の発現レベルは、IBS - MSGに結合するオリゴヌクレオチドプローブのアレイを用いて、より詳細には、表1に示したプローブを用いて、または表2に示したプローブセットを用いて測定される。

【0035】

本発明は、さらに、(a)少なくとも1種類のIBS - MSGを発現する細胞を試験対象の化合物と接触させる工程；(b)前記IBS - MSGのタンパク質レベルを測定する工程；および(c)前記化合物の非存在下での前記IBS - MSGのタンパク質レベルと比較する工程を含み、これにより、IBSにおいて観察される前記IBS - MSGのタンパク質レベルの変化を妨害することができる化合物が、CVHの処置、特にIBSの処置のための候補化合物として同定される、CVHの処置、特にIBSの処置のための候補化合物を同定するための方法を提供する。したがって、この実施形態によれば、IBS - MSGの発現レベルは、IBS - MSGポリペプチドのタンパク質レベルを測定することにより測定される。

40

【0036】

本発明の方法の具体的なある実施形態において、タンパク質レベルは、抗体を用いて測定される。さらなる具体的なある実施形態において、該抗体は、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4およびMUC20からなる群より選択されるIBS - MSGにコードされたポ

50

リペプチドに結合する。最も詳細には、本発明のスクリーニング方法において使用される IBS - MSG は、IBS 1 からなる。

【0037】

特に、該方法は、該抗体の少なくとも2種類の使用を含む。より詳細には、該方法は、2、3、4、5、6種またはそれ以上 (of more) の抗体であって、各々が、IBS 1、COP 1、PSME 2、F13A 1、NCF 4、CSFR 1、M160、KCNS 3、LYZ、MS4A4A、HEL L S、FRC 4、MCM 5、TAP 2、LRAP、DTL、V S I G 2、V S I G 4 および MUC 2 0 からなる群より選択される IBS - MSG にコードされたポリペプチドに結合する抗体の使用を含む。最も詳細には、該方法は、IBS 1、COP 1、PSME 2、F13A 1、NCF 4、CSFR 1、M160、KCNS 3、V S I G 2 からなる群の IBS - MSG の遺伝子産物、より詳細には、IBS 1、PSME 2、F13A 1、NCF 4、CSFR 1 および V S I G 2 からなる群からなる群の IBS - MSG の遺伝子産物、あるいはまた、MUC 2 0、V S I G 2 および V S I G 4 からなる群の IBS - MSG の遺伝子産物のタンパク質レベルの検出を伴う。

10

【0038】

本発明は、さらに、(a) IBS - MSG 産物を試験対象の化合物とともにインキュベートする工程；および (b) 前記化合物が IBS - MSG 産物と結合できる能力を測定する工程を含み、ここで、IBS - MSG 産物に結合できる化合物は、IBS の処置のための候補化合物である、CVH の処置、特に IBS の処置のための候補化合物を同定および取得するためのスクリーニング方法を提供する。このような方法では、IBS - MSG 産物は、前記遺伝子またはその断片にコードされたポリペプチドからなる。別の特別な実施形態によれば、IBS - MSG 産物は、前記遺伝子またはその断片から転写されたポリヌクレオチドである。

20

【0039】

本発明のまた別の態様は、CVH、特に IBS を診断するためのキットを提供し、該キットは、以下：(1) IBS - MSG に特異的に結合するポリヌクレオチドプローブ、および (2) IBS - MSG 産物に特異的に結合できる薬剤の少なくとも1つを備える。

【0040】

したがって、本発明は、(a) IBS - MSG に特異的に結合する、特に、IBS 1、COP 1、PSME 2、F13A 1、NCF 4、CSFR 1、M160、KCNS 3、LYZ、MS4A4A、HEL L S、FRC 4、MCM 5、TAP 2、LRAP、DTL、V S I G 2、V S I G 4 および MUC 2 0 からなる群より選択される IBS - MSG に特異的に結合する少なくとも1種類のプローブ；または (b) IBS - MSG ポリペプチドまたはその断片に特異的に結合する少なくとも1種類の薬剤、特に、IBS 1、COP 1、PSME 2、F13A 1、NCF 4、CSFR 1、M160、KCNS 3、LYZ、MS4A4A、HEL L S、FRC 4、MCM 5、TAP 2、LRAP、DTL、V S I G 2、V S I G 4 および MUC 2 0 からなる群より選択される IBS - MSG のポリペプチドに特異的に結合する少なくとも1種類の薬剤、より詳細には、IBS 1、COP 1、PSME 2、F13A 1、NCF 4、CSFR 1、M160、KCNS 3 および V S I G 2 からなる群より選択される IBS - MSG のポリペプチドに特異的に結合する少なくとも1種類の薬剤、さらにより詳細には、IBS 1、PSME 2、F13A 1、NCF 4、CSFR 1 および V S I G 2 からなる群より選択される IBS - MSG のポリペプチドに特異的に結合する少なくとも1種類の薬剤、最も詳細には、MUC 2 0、V S I G 2 および V S I G 4 からなる群より選択される IBS - MSG のポリペプチドに特異的に結合する少なくとも1種類の薬剤を備える診断用キットを提供する。

30

40

【0041】

具体的なある実施形態において、本発明のキットは、各々がそれぞれ異なる IBS - MSG もしくは IBS - MSG ポリペプチドまたはその断片に特異的に結合する少なくとも2種類のプローブまたは薬剤を備え、該 IBS - MSG は、IBS 1、COP 1、PSME 2、F13A 1、NCF 4、CSFR 1、M160、KCNS 3、LYZ、MS4A4

50

A、HELLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4およびMUC20からなる群より選択される。より特別な実施形態は、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSF1R、M160、KCNS3およびVSI G2からなる群のIBS-MSGに対応する、さらにより詳細には、IBS1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1およびVSI G2からなる群に対応するIBS-MSG、あるいはまた、MUC20、VSI G2およびVSI G4からなる群に対応するIBS-MSGの異なるIBS-MSGまたはIBS-MSG産物に特異的に結合するプローブまたは薬剤からなるキットに関する。少なくとも2種類のプローブまたは薬剤を備えたキットとは、典型的には、各々が、それぞれIBS-MSGまたはIBS-MSGポリペプチドに特異的に結合する少なくとも2種類のプローブまたは少なくとも2種類の薬剤を含むことを意味するが、IBS-MSGに特異的に結合する少なくとも1種類のプローブおよびIBS-MSGポリペプチドに特異的に結合する少なくとも1種類の薬剤を備えたキットもまたこの用語の範囲内に想定される。

10

20

30

40

50

【0042】

また別の態様において、本発明は、CVH、特にIBSの処置のための医薬組成物を提供する。該医薬組成物は、薬学的に許容され得る担体と、以下：(1)IBS-MSG産物；(2)IBS-MSG産物と結合する薬剤および/またはその活性をモジュレートする薬剤；ならびに(3)IBS-MSGの発現をモジュレートする薬剤の少なくとも1種とを含む。したがって、本発明の目的は、患者(patient)に、上記の医薬組成物を投与する工程を含む、患者のCVH、特にIBSを処置するための方法を提供することである。特別な実施形態では、IBS-MSGがIBS1である。

【0043】

本発明の上記ならびに他の特性、特徴および利点は、以下の詳細説明を、本発明の原理を一例として図示した添付の図面と併せて考慮すると自明となろう。この説明は、本発明の範囲を限定することなく、単なる例示の目的で示す。以下に示す図面の記載事項は、添付の図面をさす。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1-1】図1は、10例の個体から採取されたS状結腸試料の発現プロフィールの一致相関解析の図である。試料の類似性の低度(一致相関係数、CCC)をカラーコードで示す。解析には、各被験体について3つの試料を含めた。試料AとBは、結腸内で互いにほぼ10cm離れた位置で同時に採取、試料Cは85日後に採取。青四角は、1例の個体由来の試料の一致相関解析を示す。濃い黒線は、IBS被験体と健常被験体の試料を区別している。解析は、(A)フルデータセットにおいて発現の最大変動を示した1,000遺伝子プローブの組、および(B)マイクロアレイの予測解析で同定された32遺伝子プローブの組において行なった。

【図1-2】図1は、10例の個体から採取されたS状結腸試料の発現プロフィールの一致相関解析の図である。試料の類似性の低度(一致相関係数、CCC)をカラーコードで示す。解析には、各被験体について3つの試料を含めた。試料AとBは、結腸内で互いにほぼ10cm離れた位置で同時に採取、試料Cは85日後に採取。青四角は、1例の個体由来の試料の一致相関解析を示す。濃い黒線は、IBS被験体と健常被験体の試料を区別している。解析は、(A)フルデータセットにおいて発現の最大変動を示した1,000遺伝子プローブの組、および(B)マイクロアレイの予測解析で同定された32遺伝子プローブの組において行なった。

【図2】図2は、IBS患者と健常被験体のS状結腸試料のマイクロアレイデータに関するスペクトルマップ解析の結果を示すプロットの図である。異なるグラフは、解析の6つの第1主成分(PC)の異なる組合せを示す。赤丸は、粘膜反復試料に対して志願した被験体由来の試料を示し、青丸は、他のすべての被験体(反復試料なし)を示す。反復試料を提供した被験体は、これらのグラフのいずれにおいてもクラスタリングしておらず、これらが、確かにコホート全体の代表であることを示す。

【図3】図3は、IBS患者の結腸粘膜において差次的に発現された遺伝子の概略全体像の図である。IBS患者対健常対照での結腸粘膜試料における発現が増大(下線)または減少した遺伝子。酸化的バースト(2O₂ 20-)の原因であるタンパク質複合体を、五角形形状として示す。「ROS」は、反応性酸素種(Reactive Oxygen Species)を表す。

【図4】図4は、IBS患者(緑色点)由来の結腸粘膜試料においてマイクロアレイ有意性解析(Significance of Microarray Analysis)(SAM)によって同定された有意な遺伝子の相対発現レベルを健常対照(赤点)と比べた図である。発現レベル(y軸)は、未処理データの処理後のアレイにおいて測定された蛍光シグナル強度として示す(方法の項目を参照)。個々の各点は、被験体1人あたりの2つの試料の発現の平均値を表す。

【図5-1】図5は、DKFZP56400823(IBS1)の遺伝子発現プロフィールと比較配列解析の図である。(A)IBS患者(緑色、図の右側)および健常被験体(赤、図の左側)由来の結腸粘膜生検材料における、DKFZP56400823(IBS1)を表すAffymetrixアレイ上の2つの異なるプローブセット(204678__atおよび225809__at)の遺伝子発現プロフィール。各丸は、一例の個体由来の2つの試料の平均を示す。発現レベルは、未処理データの処理後のアレイにおいて測定されたシグナル強度として示す(方法の項目を参照)。緑と赤の水平線は、それぞれ、健常被験体とIBS被験体における平均発現レベルを表す。(B)この図は、IBS1遺伝子を示す2つのプローブセット間の優れた相関を示す。健常対照とIBS患者を、それぞれ、白四角と黒丸で表示する(図7もまた参照のこと)。

【図5-2】図5は、DKFZP56400823(IBS1)の遺伝子発現プロフィールと比較配列解析の図である。(C)ヒト(Hs)DKFZP56400823(IBS1)(Hs__NP__056208)とそのマウス(Mm__NP__663537)およびラット(Rn__NP__775137)ホモログの比較タンパク質配列解析。黒または灰色背景で、異なる種間で同一のアミノ酸にハイライトする。タンパク質の種々のドメインを、そのアミノ酸配列の下部に表示する。

【図6】図6(A)は、結腸内皮一次細胞における、炎症サイトカインであるインターフェロン(IFN)、腫瘍壊死因子(TNF)およびインターロイキン4(IL4)によって誘導されたDKFZP56400823遺伝子発現の試験の図である。Gene Expression Omnibus, 受託番号GDS502(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/gds/profileGraph.cgi?&dataset=MzA&dataset=S4O&gmin=-0.090309&gmax=-0.032624&gds=502&idref=5543&annot=DKFZP56400823>)より。図6(B)は、誘導プロモーターからのサル免疫不全ウイルス(SIV)Nefの誘導後のジャーカットCD4+T細胞の解析の図である。Nefタンパク質は、HIVおよびSIV感染症の初期において発現され、疾患進行に重要な役割を果たす。その結果、T細胞遺伝子発現においてNef媒介性変化が確認されている。Gene Expression Omnibus, 受託番号GDS2164(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/gds/profileGraph.cgi?&dataset=ABPyqz&dataset=LL6gee&gmin=2.600000&gmax=56.900000&gds=2164&idref=225809__at&annot=DKFZP56400823)より。

【図7】図7は、DKFZP56400823遺伝子を表す2つのプローブセット204678__atおよび225809__atの発現レベルの相関の図である。健常対照とIBS患者を、それぞれ、白四角(点線の集団)と黒丸(破線)で表示する。

【図8】図8は、IBS疾患状態における最短収縮重心分類装置(nearest shrunken centroid classifier)から出力されたマイクロアレイ予測解析(PAM)のまとめの図である。(A)32個の遺伝子を使用した場合に最

10

20

30

40

50

も少ない誤分類エラーが得られることを示す、クロスバリデーション誤分類エラー曲線。対応するデルタ(2.0)を、さらなる解析のための閾値として選択した。(B)閾値(デルタ=2.0)で残存したこの32個の遺伝子の各クラスの収縮重心分類。さらなる詳細については、Tibshiraniら(2002)を参照のこと。

【図9-1】図9は、階層的クラスタリング解析のまとめの図である。(A)類似性の尺度として平均連鎖と相関を用いた、16種のプローブセットと試料の階層的クラスタリングによるヒートマップのクラスタリング表示。ヒートマップの色は、青(高発現)から黒(中発現)に黄色(低発現)までの範囲で、色の度合の勾配で相対発現レベルを示す。この色の度合は、全試料において個々の各プローブセットに対して最大化される(すなわち、最高発現レベルの試料は青であり、最低発現の試料は黄色である)。ヒートマップ上の白色水平線は、得られたIBSの分子署名によって予測される疾患状態を識別する。図の右パネルは、訓練組または試験組に割り当てられた被験体において臨床診断された疾患状態を示す。

10

【図9-2】図9は、階層的クラスタリング解析のまとめの図である。(B)ここでも図9Aの右パネルを示すが、この場合では、被験体の性別と併用薬物処置と関連させている(M:男性;F:女性;SSRI:選択的セロトニン再取り込み阻害薬;SNRI:セロトニン-ノルエピネフリン再取り込み阻害薬;SNDRI:セロトニン-ノルエピネフリン-ドパミン再取り込み阻害薬;TCA:三環系抗鬱薬)。

【図10】図10は、マイクロアレイおよびRTQ-PCRで測定したときの、IBS患者と健常被験体間でのmRNA発現レベルの変化倍数の比較の図である。RTQ-PCR解析で統計学的に有意($p < 0.05$)と確認されたマイクロアレイ研究での有意な遺伝子に下線を付す。

20

【発明を実施するための形態】

【0045】

詳細説明

本発明の好ましい実施形態を以下に記載する。特に記載のない限り、本明細書および特許請求の範囲における単語および語句は、これが適用される技術分野の当業者にとって、通常の慣用的な意味で示されているものとする。なんらかの他の意味が意図される場合、本明細書において、単語および語句に特別な意味が適用される旨を具体的に記載する。

30

【0046】

さらに、本発明は、好ましい実施形態に記載する具体的な構造、材料または作用のみに限定されず、さらに、特許請求の範囲に記載の発明の機能が発揮される任意のあらゆる構造、材料または作用、ならびに特許請求の範囲に記載の発明を実施するための任意のあらゆる後発同等構造体、材料または作用を包含するものとする。

【0047】

本開示全体において、さらなる実施例が存在し、本出願人は、本明細書には明白に特定していないが特許請求の範囲に記載の発明の機能が発揮され得る構造、材料、方法または作用の使用を本発明の範囲から排除することを意図しない。

【0048】

本明細書で用いる場合、用語「化合物」または「薬剤」は、生物学的化合物または化学化合物、例えば、単純または複雑な有機分子、ペプチド、タンパク質またはオリゴヌクレオチドなどを意味する。「試験化合物」は、本明細書で用いる場合、IBS-MSG産物に結合するか否か、および/またはその活性をモジュレートするか否かを評価するために本発明による方法で使用する「化合物」または「薬剤」をいう。

40

【0049】

用語「慢性内臓過敏-分子シグナル遺伝子」または「CVH-MSG」は、本明細書で用いる場合、その発現が慢性内臓過敏(CVH)の臨床診断と関連している遺伝子をいう。このようなものとしては、健常対照患者と比べ、CVHと診断された患者において特異的に上方調節または下方調節される遺伝子が挙げられる。

【0050】

50

用語「炎症性腸症候群分子署名遺伝子」または「IBS - MSG」は、本明細書で用いる場合、その発現が炎症性腸症候群 (IBS) の臨床診断と関連している遺伝子をいう。このようなものとしては、健常対照患者と比べ、IBSと診断された患者において特異的に上方調節または下方調節される遺伝子が挙げられる。

【0051】

用語「IBS - MSG産物」または「遺伝子産物」は、本明細書で用いる場合、IBS - MSGが転写および/または翻訳されたときに生成されるポリヌクレオチドまたはポリペプチドおよびそのバリエーションが包含される。

【0052】

本明細書で用いる場合、「ポリヌクレオチドのバリエーション」には、元のポリヌクレオチドにコードされたポリペプチドと比べ、コードされたポリペプチドの活性が実質的に変化しない (例えば、該活性は、50%未満、好ましくは20%未満低減または増強されていてもよい) ような1つ以上の置換、付加、欠失および/または挿入により、元のポリヌクレオチドと異なるポリヌクレオチドが包含される。

【0053】

また、ポリヌクレオチドのバリエーションには、低ストリンジェンシー条件、より好ましくはストリンジェント条件、最も好ましくは高ストリンジェント条件下で、元のポリヌクレオチド (相補配列) にハイブリダイズさせることができるポリヌクレオチドが包含される。

【0054】

当業者には、遺伝コードの縮重の結果、本明細書に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が多く存在することが認識されよう。これらのポリヌクレオチドの一部のものは、任意の天然遺伝子のヌクレオチド配列に対して有する相同性が最小限である。それでもなお、改変がサイレントな変化、すなわち、該ポリヌクレオチドにコードされたアミノ酸が改変されない変化に限定されたポリヌクレオチドが、特に本発明で想定される。

【0055】

ポリヌクレオチドバリエーションは、好ましくは、天然ポリヌクレオチドと、少なくとも約70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは、少なくとも (at least) 95%、特に少なくとも97%、最も好ましくは少なくとも99%の配列相同性を示すものである。さらなる実施形態において、ポリヌクレオチドバリエーションは、天然ポリヌクレオチドと、少なくとも約70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは、少なくとも95%、特に少なくとも97%、最も好ましくは少なくとも99%の配列同一性を示すものである。

【0056】

用語「ハイブリダイゼーション」は、本明細書で用いる場合、単鎖核酸分子がヌクレオチド塩基対合を介して相補鎖と接合されるプロセスをいう。

【0057】

用語「ストリンジェンシー」は、ハイブリダイゼーション条件をいう。高ストリンジェンシー条件は、非相同的な塩基対合に不都合である。低ストリンジェンシー条件は反対の効果をもつ。ストリンジェンシーは、例えば、温度と塩濃度によって変更され得る。「ストリンジェント条件」は、50%ホルムアミド、5xSSC (750mM NaCl、75mMクエン酸ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム (pH7.6)、5xデンハルト溶液、10%硫酸デキストラン、および20μg/ml変性切断サケ精子DNAを含む溶液中42°Cでの一夜インキュベーション後、0.1xSSC中約65°Cでのフィルターの洗浄をいう。さらなる適当なハイブリダイゼーション条件は、実施例に記載している。

【0058】

「低ストリンジェンシー条件」としては、6xSSPE (20xSSPE = 3M NaCl; 0.2M NaH₂PO₄; 0.02M EDTA、pH7.4)、0.5%SDS、30%ホルムアミド、100μg/mlサケ精子ブロックDNAを含む溶液中37°C

10

20

30

40

50

での一夜インキュベーション後、50 での1×SSPE、0.1%SDSによる洗浄が挙げられる。また、さらに低ストリンジェンシーを達成するためには、ストリンジェントハイブリダイゼーション後に行なう洗浄を、さらに高い塩濃度（例えば、5×SSC）で行なうとよい。上記の条件のバリエーションは、ハイブリダイゼーション実験におけるバックグラウンドを抑制するために使用される代替的なブロッキング試薬を含めること、および/または置換することによって達成され得ることに注意されたい。典型的なブロッキング試薬としては、デンハルト試薬、BLOTTO、ヘパリン、変性サケ精子DNA、および市販の専売製剤が挙げられる。特定のブロッキング試薬を含めるには、適合性に関する問題のため、上記のハイブリダイゼーション条件の修正が必要な場合がある。

【0059】

本明細書で用いる場合、「ポリペプチドのバリエーション」は、天然ポリペプチドの生体活性または免疫原性が実質的に減衰されないような1つ以上の置換、付加、欠失および/または挿入により、天然ポリペプチドと異なるポリペプチドである。換言すると、バリエーションポリペプチドの生体活性、またはバリエーションポリペプチドが抗原特異的抗血清と反応する能力は、天然ポリペプチドと比べて、50%未満、好ましくは20%未満増強または減衰されていてもよい。バリエーションポリペプチドとしては、N末端リーダー配列または膜貫通ドメインなどの1つ以上の部分が除去されたものが挙げられる。他の好ましいバリエーションとしては、成熟タンパク質のN末端および/またはC末端から小さい部分（例えば、1~30個のアミノ酸、好ましくは5~15個のアミノ酸）が除去されたバリエーションが挙げられる。

【0060】

さらなるバリエーションポリペプチドは、天然ポリペプチドとアミノ酸配列が1つ以上の同類置換により異なるものである。「同類置換」は、ある特定のアミノ酸の当該技術分野で認識された置換可能性に基づいて、親分子の生物学的活性に影響のない親タンパク質における1つ以上のアミノ酸残基の置換をいう（例えば、M. Dayhoff, In Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol. 5, Supp 3, pgs 345-352, 1978を参照）。

【0061】

バリエーションはまた、あるいは代替的に、非同類変化を含むものであってもよい。好ましい実施形態において、バリエーションポリペプチドは天然配列と、5個以下のアミノ酸の置換、欠失または付加により異なる。バリエーションはまた（あるいは代替的に）、例えば、該ポリペプチドの免疫原性、二次構造、三次構造およびハイドロパシー（hydrophobic）性質に対する影響が最小限であるアミノ酸の欠失または付加によって修飾されたものであり得る。

【0062】

ポリペプチドバリエーションは、好ましくは、元のポリペプチドと、少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約90%、さらにより好ましくは少なくとも約95%、最も好ましくは少なくとも約97%の配列相同性を示すものである。さらなる実施形態において、該ポリペプチドバリエーションは、元のポリペプチドと、少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約90%、さらにより好ましくは少なくとも約95%、最も好ましくは少なくとも約97%の配列同一性を示すものである。

【0063】

用語「相補的な」または「相補性」は、本明細書で用いる場合、プリンヌクレオチドおよびピリミジンヌクレオチドが水素結合によって会合し、二本鎖核酸分子を形成する能力をいう。以下の塩基対：グアニンとシトシン；アデニンとチミン；およびアデニンとウラシルは、相補性と関連する。本明細書で用いる場合、「相補的」は、前述の関係が、前記両分子の全長にわたって2つの単鎖核酸分子を含む実質的にすべての塩基対にあてはまることを意味する。「一部相補的」は、前述の関係において、2つの単鎖核酸分子の一方が他方よりも長さが短いため、両分子の一方の一部が単鎖のままであるものをいう。

【0064】

10

20

30

40

50

用語「被験体」は、本明細書で用いる場合、哺乳動物（例えば、齧歯類（マウスもしくはラットなど）、ブタ、霊長類、または愛玩動物（例えば、イヌもしくはネコ））をいう。特に、該用語は、ヒトをいう。

【0065】

用語「アレイ」および「マイクロアレイ」は、互換的に使用し、一般的に、種々の分子（本明細書では「プローブ」という）が、任意の順序で配列された（例えば、表面または基材上に）ものをいう。アレイの種々の各プローブは、アレイの状況の特定の分子（本明細書では、「標的」という）に対する特異的認識および/または結合能を有する。マイクロアレイを用いて検出され得る典型的な標的分子の例としては、mRNA転写物、cDNA分子、cRNA分子、およびタンパク質が挙げられる。

10

【0066】

マイクロアレイは、試料中（関連細胞、組織もしくは生物体から単離されたmRNA調製物、または対応するcDNAもしくはcRNA調製物など）の複数の異なる標的分子の存在、非存在および量を同時に検出するのに有用である。試料中のプローブの標的分子の存在および量または非存在は、表面または基材上の特定の位置において標的がプローブに結合したかどうか、（およびどれだけ多く結合したか）を解析することにより容易に測定され得る。

【0067】

好ましい実施形態において、本発明において使用されるアレイは、種々の各プローブが特定の「アドレス」と関連している「アドレス可能なアレイ」である。例えば、プローブが表面または基材上に固定化された好ましい実施形態では、アドレス可能なアレイの種々の各プローブは、該表面または基材上の特定の既知の位置に固定化される。したがって、試料中の該プローブの標的分子の存在または非存在は、標的が表面または基材上の該特定の位置に結合したかどうかを単純に検出することにより容易に測定され得る。

20

【0068】

本発明によるアレイは、好ましくは、表面または基材上に固定化された複数の核酸プローブを含む核酸アレイ（本明細書では、「転写物アレイ」または「ハイブリダイゼーションアレイ」ともいう）である。種々の核酸プローブが試料中の種々の標的核酸分子に相補的であり、したがって、これらにハイブリダイズし得る。したがって、かかるプローブは、試料中の複数の異なる核酸分子の存在および量を同時に検出するため、複数の異なる遺伝子の発現レベル、例えば、異なるmRNA分子または該分子に由来する核酸分子（例えば、cDNAもしくはcRNA）の存在および存在量を測定するために使用され得る。

30

【0069】

マイクロアレイ手法には、主に2つの型；スポット型cDNAアレイおよび製造型オリゴヌクレオチドアレイがある。以下の実施例のセクションでは、高密度オリゴヌクレオチドAffymetrix GeneChip（登録商標）アレイの使用を説明する。

【0070】

アレイは、好ましくは再生可能であり、多コピーの所与のアレイを作製し、各々の結果を互いに容易に比較することが可能である。好ましくは、マイクロアレイは小型であり、通常、5cmより小さく、結合（例えば、核酸ハイブリダイゼーション）条件下で安定な材料で作製されたものである。マイクロアレイ内の所与の結合部位または特殊な組の結合部位に標的（例えば、細胞内の単一の遺伝子のmRNA）が特異的に結合する。特定の1つの標的に対して1つより多くの物理的結合部位（本明細書において以下「部位」）が存在し得るが、明確にする目的で、以下の論考では、存在する部位は1つであると仮定している。細胞のRNAに相補的なcDNAを作製し、適当なハイブリダイゼーション条件下でマイクロアレイにハイブリダイズさせた場合、任意の特定の遺伝子に対応するアレイ内の部位へのハイブリダイゼーションのレベルまたは程度は、該遺伝子から転写されたmRNAの該細胞内における存在割合（prevalence）を反映することは認識されよう。例えば、全細胞mRNAに相補的な検出可能に標識された（例えば、フルオロフォアにより）cDNAをマイクロアレイにハイブリダイズさせる場合、その細胞内で転写されな

40

50

い遺伝子（すなわち、該遺伝子の核酸産物に特異的に結合することができる）に対応するアレイ上の任意の部位は、シグナルをほとんどまたは全く有さないが、そのコードmRNAが高度の割合で存在する遺伝子は、比較的強力なシグナルを有する。一例として、GeneChip（登録商標）発現解析（Affymetrix, Santa Clara, CA）では、遺伝子発現プロファイルの評価および他の生物学的アッセイのためのデータが得られる。

【0071】

オリゴヌクレオチド発現アレイでは、数千個のmRNA転写物（遺伝子またはEST）が同時かつ定量的に「インテロゲート（interrogate）」され、大きなゲノムの研究が簡単になる。各転写物は、多数のプローブ対によってプローブアレイ上に提示され、密接に関連する遺伝子ファミリーの構成員が識別され得る。各プローブセットは、数百万コピーの特異的オリゴヌクレオチドプローブを含み、低強度のmRNAハイブリダイゼーションパターンであっても、正確で感度のよい検出を可能にする。ハイブリダイゼーション後、強度データを、例えば光学検出システム（例えば、スキャナー）を用いて捕捉し、ソフトウェアを使用すると、各プローブセルの強度値が自動的に算出され得る。プローブセル強度は、mRNAの存在量と相関する各遺伝子の平均強度を算出するために使用され得る。発現データは、任意の解析パラメータに基づいて速やかに分類され、任意の選択した遺伝子サブセットについて、さまざまなグラフ形式で表示され得る。遺伝子発現検出手法としては、とりわけ、Hewlett-Packard、Perkin-ElmerおよびGene Logicによって製造販売されている研究用製品が挙げられる。

10

20

【0072】

用語「同類置換」または「同類アミノ酸置換」は、ある特定のアミノ酸の当該技術分野で認識された置換可能性に基づいて、親分子の生物学的活性に影響のない親タンパク質における1つ以上のアミノ酸残基の置換をいう（例えば、M. Dayhoff, In Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol. 5, Supp 3, pgs 345 - 352, 1978を参照）。

【0073】

「その断片」は、配列が本明細書に開示された核酸またはタンパク質分子の断片、小片または部分領域であって、親タンパク質または核酸分子内の連続する5個以上のアミノ酸、または10個以上のヌクレオチドを含むようなものをいう。

30

【0074】

「機能性断片」は、本明細書で用いる場合、本明細書に開示されたタンパク質またはアミノ酸配列の、例えば、機能的に明確な領域（受容体に対する活性部位など）を含む単離された部分領域または断片をいう。機能性断片は、クローニング手法によって、または選択的スプライシング機構の天然産物として得られ得る。

【0075】

用語「ホモログ」または「相同的」は、異なる核酸分子またはアミノ酸配列が、前記分子または配列内の1つ以上のブロックまたは領域において一部同一または類似していることによって関連している、前記配列間または分子間の関係を示す。「単離された核酸化合物」は、任意のRNAまたはDNA配列をいうが、その天然の位置とは位置が異なるものも想定または合成される。

40

【0076】

本明細書で用いる場合、「同一性または類似性」は、当該技術分野において知られているように、2つ以上のポリペプチド配列間または2つ以上のポリヌクレオチド配列間の関係であり、これは、配列を比較することにより測定される。当該技術分野では、同一性はまた、ポリペプチド間またはポリヌクレオチド配列間で配列が関連している程度を意味し、場合によっては、これは、かかる配列の全長（string）間のマッチングによって測定される。同一性および類似性はともに、容易に算出され得る（Computational Molecular Biology, Lesk, A.M. 編、Oxford University Press, New York, 1988; Biocomput

50

ing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W. 編、Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M. および Griffin, H. G. 編、Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; ならびに Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. および Devereux, J. 編、M Stockton Press, New York, 1991)。2つのポリヌクレオチド間または2つのポリペプチド配列間の同一性および類似性を測定するための方法がいくつか存在するが、どちらの用語も当業者には周知である (Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. および Devereux, J. 編、M Stockton Press, New York, 1991; ならびに Carillo, H. および Lipman, D. (1988) SIAM J. Applied Math., 48, 1073。配列間の同一性または類似性を測定するのに一般的に使用される方法としては、限定されないが、Carillo, H. および Lipman, D. (1988) SIAM J. Applied Math., 48, 1073 に記載されたものが挙げられる。

【0077】

2つ以上の配列間の同一性および類似性を比較するために使用される方法は、当該技術分野でよく知られている。したがって、例えば、Winconsin Sequence Analysis Package, バージョン 9.1 (Devereux J. ら、Nucleic Acid Res., 12, 387-395, 1984) において入手可能なプログラム、例えば、プログラム BESTFIT および GAP を用いて、2つのポリヌクレオチド間の同一性%、ならびに2つのペプチド間またはポリペプチド配列間の同一性%および類似性%が測定され得る。BESTFITでは、Smith および Waterman の「局所相同性」アルゴリズム (J. Mol. Biol., 147, 195-197, 1981) が使用され、2つの配列間に最良の単一の類似性領域が見出される。BESTFITは、長さが異なる2つのポリヌクレオチドまたは2つのペプチドもしくはポリペプチド配列を比較するのにより適しており、該プログラムでは、短い方の配列が長い方の一部であると仮定される。比較において、GAPでは、2つの配列をアラインメントし、Needleman および Wunsch のアルゴリズム (J. Mol. Biol., 48, 443-453, 1970) に従って「最大類似性」が見い出される。GAPは、ほぼ同じ長さの配列を比較するのにより適しており、アラインメントは全長にわたって予測される。好ましくは、各プログラムで使用されるパラメータ「ギャップウェイト」および「長さウェイト」は、それぞれ、ポリヌクレオチド配列で50と3、およびポリペプチド配列では12と4である。好ましくは、同一性および類似性の%は、比較される2つの配列を最適にアラインメントして測定する。また、配列間の同一性および/または類似性を測定するための他のプログラムも当該技術分野において知られている (例えば、BLAST ファミリのプログラム (Altschul S F ら、Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402, 1997))。

【0078】

「核酸プローブ」または「プローブ」は、本明細書で用いる場合、別の核酸化合物とハイブリダイズする核酸化合物、特に標識された核酸化合物である。「核酸プローブ」は、単鎖標的核酸配列とハイブリダイズする単鎖核酸配列を意味する。核酸プローブは、オリゴヌクレオチドまたはヌクレオチドポリマーであり得る。「プローブ」には、通常、検出可能な部分が含まれ、これは、そのプローブの末端 (一方または両方) に結合されていてもよく、そのプローブの配列内部に存在していてもよい。具体的なある実施形態では、「プローブ」はまた、本明細書において前述の「アレイ」および「マイクロアレイ」におけ

る使用のために固相支持体に結合させたオリゴヌクレオチド（例えば、約25ヌクレオチド長）をいうために用いられる。

【0079】

用語「プライマー」は、例えば核酸分子の酵素または合成による伸長のための開始基質としての機能を果たす核酸断片である。

【0080】

用語「ハイブリダイゼーション」は、本明細書で用いる場合、単鎖核酸分子がヌクレオチド塩基対合を介して相補鎖と接合されるプロセスをいう。

【0081】

本明細書で用いる場合、用語「モジュレーション」には、その種々の文法形態（例えば、「モジュレートされる」、「モジュレーション」、「モジュレートすること」など）、上方調節、誘導、刺激、相乗的増強および/または阻害の緩和、ならびに阻害および/または下方調節もしくは抑制が包含される。

10

【0082】

核酸配列は、該核酸配列が別の核酸配列と機能する関係で配置されている場合、前者は後者に「作動可能に連結」されている。例えば、プレ配列または分泌性のリーダーペプチドのDNAは、あるポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現されるならば、該ポリペプチドのDNAに作動可能に連結されている；プロモーターまたはエンハンサーは、コード配列の転写に影響するならば、該配列に作動可能に連結されている；またはリボソーム結合部位は、翻訳を助長するような位置に存在するならば、コード配列に作動可能に連結されている。一般的に、「作動可能に連結された」とは、連結されたDNA配列が隣接していること、および、分泌性リーダーの場合は、隣接し、かつリーディングフェーズ（reading phase）にあることを意味する。しかしながら、エンハンサーは、隣接していなくてもよい。連結は、簡便な制限部位でのライゲーションによって達成される。かかる部位が存在しない場合は、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが、慣用的実務に従って使用される。

20

【0083】

本発明は、CVHの臨床症状、より詳細にはIBSと関連するいくつかの遺伝子の同定に基づく。これらの遺伝子は、IBSと診断された患者と健常対照の差次的発現解析によって同定されている。より詳しくは、胃腸科専門医による患者のIBS診断を、腸疾患アンケート（Talleyら、1990）（Rome II基準（Thompsonら、1999）に対応する質問を含む）によって確認した。また、腸疾患アンケートには、非潰瘍性消化不良の特徴である身体化障害および症状を確認することを意図した心身症状のチェックリストも含まれ、疫学的研究に拡張して使用されている。

30

【0084】

本発明により、結腸粘膜におけるその発現が、健常対照と比べてCVH、より詳細にはIBSの患者において減少しているか増大しているかのいずれかである遺伝子が同定されている。これらの発現マーカの特別な利点は、特定の遺伝子の発現とIBSの発症との間に強力な相関があること、およびこれらの発現パターンが予測値を有することである。したがって、これらの発現マーカは、診断用ツールとして有用である。発現マーカは、必ずしも対応する遺伝子の多型の存在とは関連しておらず、さらに、たいていは関連しておらず、遺伝子マーカとは区別される。

40

【0085】

スクリーニング方法

本発明は、CVH、特にIBSの処置用の治療剤としての使用のための化合物を同定するためのスクリーニングアッセイに使用され得る核酸分子および遺伝子産物（タンパク質）を提供する。

【0086】

本明細書に記載の核酸分子にコードされたタンパク質は、CVH、特にIBSを処置するためのリード化合物をスクリーニングするための結合アッセイおよび機能性アッセイに

50

使用され得る。各遺伝子産物について記載のように、アンタゴニストまたはアゴニストのいずれかであることが確認できることにより、IBSのための新たな処置薬の開発が提供され得る。

【0087】

したがって、核酸分子は、単離して直接結合アッセイに使用するタンパク質を発現させるのに有用である。タンパク質の発現は、任意の宿主細胞系、例えば、植物、原核生物（例えば、大腸菌）、酵母、昆虫の細胞（例えば、Sf9細胞、バキュロウイルスベクターを使用）、または哺乳動物細胞（例えば、CHO、COSなど）において行われ得る。タンパク質産物の単離および精製のための手法は、当業者には周知である。

【0088】

タンパク質産物またはその断片（例えば、タンパク質分解断片もしくは合成断片）を用いて、例えば、免疫アッセイによってタンパク質発現を直接検出するための特異的抗体が作製され得る。

【0089】

遺伝子発現プロフィールは、差次的に発現される表1の遺伝子のmRNAまたはタンパク質発現をモジュレートする化合物のスクリーニングに使用され得る。かかる差次的に発現される遺伝子を「目的遺伝子」と称し、かかるモジュレート化合物をモジュレーターと称し、これは、mRNAの転写を上方調節もしくは下方調節するもの、またはタンパク質の活性を作動もしくは拮抗するものであり得る。かかる化合物は、例えば、IBSにおいて調節されることがわかっている遺伝子の発現を阻害または刺激するのに有用である。該遺伝子の1つ以上の発現プロフィールをモジュレートする化合物は、当該技術分野において知られた数多くのスクリーニング方法を用いて容易に同定され得る。本明細書で用いる場合、遺伝子の発現は、標準的な手法を用いてmRNAのレベル、タンパク質レベルまたはタンパク質の活性を測定することにより測定され得る。

【0090】

したがって、本発明の目的は、

a) 少なくとも1種類のIBS-MSGを発現する細胞を試験対象の化合物と接触させること；

b) 前記IBS-MSGの発現レベルを測定すること；ならびに

c) 前記化合物の非存在下での前記IBS-MSGの発現レベルと比較すること

を含み、
これにより、IBSにおいて観察されるIBS-MSGの発現レベルの変化を妨害することができる化合物が、CVHの処置、特にIBSの処置のための候補化合物として同定される、CVHの処置、特にIBSの処置のための候補化合物を同定するための方法を提供することである。

【0091】

本発明のスクリーニング方法に使用されるIBS-MSGは、典型的には、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4およびMUC20からなる群、特に、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、VSI G2からなる群、より詳細には、IBS1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1およびVSI G2からなる群、さらにより詳細には、MUC20、VSI G2およびVSI G4からなる群より選択され、最も詳細には、本発明のスクリーニング方法において使用されるIBS-MSGは、IBS1からなる。

【0092】

特定の一実施形態によれば、細胞は、結腸細胞、より詳細には結腸粘膜細胞である。

特定の一実施形態によれば、本発明の方法は、工程(b)において、少なくとも2つの異なる遺伝子の発現の測定であって、該遺伝子の1つが、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A

10

20

30

40

50

、HEL LLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4、MUC20からなる群より選択され、1つ以上の他の遺伝子が、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HEL LLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4、MUC20、CAS P1、FCGR2AおよびCKBからなる群より選択される測定を含み、特に、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HEL LLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4およびMUC20からなる群より選択される少なくとも2つの遺伝子、特に、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、VSI G2からなる群より選択される少なくとも2つの遺伝子、より詳細には、IBS1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1およびVSI G2からなる群の少なくとも2つの遺伝子、さらにより詳細には、MUC20、VSI G2およびVSI G4からなる群の少なくとも2つの遺伝子の発現の測定を含む。本発明のさらなる実施形態は、工程(b)において、少なくとも2つの遺伝子の発現の測定であって、該遺伝子の1つがIBS1であり、その他が、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HEL LLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4、MUC20、CAS P1、FCGR2AおよびCKBからなる群より選択される測定を含む。

10

【0093】

20

上記の各実施形態では、工程(c)は、前記化合物と接触させた後の前記細胞による前記少なくとも2つの遺伝子の発現レベルを、前記化合物の非存在下での前記細胞による前記遺伝子の発現と比較することからなる。

【0094】

本明細書で用いる場合、IBS-MSGの発現レベルは、核酸レベルまたはタンパク質レベルで検出され得る。核酸レベルでの発現レベルの測定は、遺伝子転写レベルが測定される任意の利用可能な手法を用いて達成され得る。例えば、該方法は、インサイチュハイブリダイゼーション、ノザンハイブリダイゼーションまたは核酸マイクロアレイ(オリゴヌクレオチドマイクロアレイもしくはcDNAマイクロアレイなど)に対するハイブリダイゼーションを使用するものであり得る。あるいはまた、該方法は、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)、例えば、蛍光色素系定量的リアルタイムPCR(TaqMan(登録商標)PCR)などを使用するものであり得る。以下に示す実施例のセクションでは、核酸発現レベルは、Affymetrix GeneChip(登録商標)オリゴヌクレオチドマイクロアレイに対する全細胞mRNA由来の標識cRNAのハイブリダイゼーションおよびRTQ-PCR(TaqMan(登録商標)PCR)の使用によって得た。タンパク質レベルでの発現レベルは、タンパク質レベルが測定される任意の利用可能な手法を用いて評価され得る。例えば、該方法は、タンパク質マイクロアレイ手法、ウエスタンブロッティング、免疫細胞学的検査、SDS-PAGE、質量分析を使用する相対的定量および必須アミノ酸の同位体異性形態での細胞の予備標識(Unwin R. D., Evans, C.A. および Whetton A.D. 2006 TRENDS in Biochemical Sciences Vol. 31(8); 473-484)を使用するものであり得る。

30

40

【0095】

好ましくは、発現レベルは核酸レベルで測定される。この場合、mRNAまたはcDNAは、検出に直接使用され得るか、または解析前にPCRもしくは他の増幅手法を用いて酵素的に増幅され得る。好ましくは、前記解析方法は、そのポリヌクレオチドの適当な領域に標的化される標識オリゴヌクレオチドプローブの使用を含む。したがって、特別な実施形態では、発現レベルは、IBS-MSGに結合するプローブを用いて、特に、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HEL LLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DT

50

L、V S I G 2、V S I G 4 および M U C 2 0 からなる群より選択される I B S - M S G、特に、I B S 1、C O P 1、P S M E 2、F 1 3 A 1、N C F 4、C S F 1 R、M 1 6 0、K C N S 3、V S I G 2 からなる群、より詳細には、I B S 1、P S M E 2、F 1 3 A 1、N C F 4、C S F R 1 および V S I G 2 からなる群、さらにより詳細には、M U C 2 0、V S I G 2 および V S I G 4 からなる群より選択される I B S - M S G に結合するプローブを用いて測定され、最も詳細には、該スクリーニング方法に使用される I B S - M S G は、I B S 1 からなる。なおさらなる実施形態では、該遺伝子の発現レベルは、I B S - M S G に結合するオリゴヌクレオチドプローブのアレイを用いて、より詳細には、表 1 に示したプローブを用いて、最も詳細には、以下の表 2 に示したプローブセットを用いて測定される。

【 0 0 9 6 】

【表 1】

表 2
プローブセットの説明

CASP1 特異的プローブ
 カスパーゼ1、アポトーシス関連システインペプチダーゼ (インターロイキン1、β、コンバーターゼ)
 Refseq ID (NCBI): NM_001223
 SwissProt: P29466
 Refseqタンパク質ID (NCBI): NP_001214.1

配列番号 1

206011_at CASP1

10

>HG-U133_PLUS_2:206011_AT
 aatgctctaaaaatccaacactgtgtgagcggcccatgatattcaaggaaatgtttatgaaacatttcaattanaggttttgattagggatgctaaa
 ccagtaagtatacagctgaattccaatatacaaaaaatctgaaattgaaatactctggtagcatgcaatttggataaggataatcaagccatatacag
 aaaaactgtaagtaatgcttctctggtcagtgacagcagcttctctctccaaagtcttcaattagaccctttgagattcatctgatattggccta
 gaagtggccgtaagactacaaccctcactttggatgtttctctctcctcagcagcagggtatatttaaacatagcatgtgtcttctcttttaaaatgtgt
 atgttcccattgggtataactttataacttgcattgctt

Genbank: A1719655 (nt 1539-1970)

配列番号 2

211367_s_at CASP1

20

>HG-U133_PLUS_2:211367_S_AT
 gagctgaggtgacatcacaggcatgacaatgctgctcaaaaatctgggtacagcgtagatgtaaaaaaatctcactgcttcggacatgactaca
 gagctggaggcattgacacccggcagagcacaagacctctgacagcagcgtcctggttcatgtctcatggtattcgggaaggcatttggggaa
 gaaacactctgagcaagctccagatatactactacaactcaatgcaatctttaacatgtaafaccaagaactgccaagtttgaaggacaaccggaaggt
 gatcatcatccaggcc

Genbank: U13699 (nt 275-561)

配列番号 3

211366_x_at CASP1

30

>HG-U133_PLUS_2:211366_X_AT
 gcacaagacctctgacagcacgttctctgtgtctcatggtattcgggaaggcatttggggaagaacactctgagcaagtccagatatact
 acaactcaatgcaatcmtaactgttgaatccaagaactgccaagttgaaaggacaaccggaaggtgatcatcatccaggcctgctgtgaca
 gccctgtgtgtgtgtgttaagattcagtaggtttctgaaacctatctttaccaactacagaagatttggagatgcttattaagaagcccac
 atagagaaggatttattcgttctctctccacaccagataatgctctggagacatccacaatgggctctgtttttatggaaagactcattgaacat
 gcaagaatatgcttctctgtgtgaggaatctccgcaaggttcgatttcaattgagcagccagatggtagagcgcagatgccaccactgaa
 agagtgactttgacaagatgtttctaccttctccaggacattaaa

Genbank: U13698 (nt 402-925)

配列番号 4

209970_x_at CASP1

40

>HG-U133_PLUS_2:209970_X_AT
 cgaaggtgatcatccaggcctgcccgtgtgtgacagcccctgtgtgtgtgtttaaagattcagtaggatttctggaacctatctttaccaactac
 agaagagtttgaggatgatgctattaagaagcccacatagagaaggattttatcgtttctgctctccacaccagataatgtttctggagacatccca
 caatgggctctgtttttatggaagactcattgaacatgatcaagaatatgctgttctctgtgtgtggaggaaatttccgcaaggttcgatttctgag
 cagccagatggtagagcagatgccaccactgaaagagtgactttgacaagatgtttctaccttctccaggacattaaa

Genbank: M87507 (nt 859-1133)

【 0 0 9 7 】

【表 2】

配列番号 5

211368_s_at CASP1

>HG-U133_PLUS_2:211368_S_AT

aatgtttcttggagacatcccacaatgggctctgttttattggaagactcattgaacatatcaagaafatgccctgtcctgtgatgaggaaatttcc
gcaaggcttcgatttcarrigagcagccagatggtagagcgcagatgccaccactgaaagagtgactttgacaagatgtttctaccttccaggaca
ttaaataat

Genbank: U13700 (nt73-258)

=====

COPI 特異的プローブ

カスパーゼー1ドミナントネガティブ阻害薬偽I C E

Refseq ID (NCBI): NM_001017534

SwissProt: Q5EG05

Refseqタンパク質ID (NCBI): NP_001017534.1

10

配列番号 6

1552703_s_at COPI

>HG-U133_PLUS_2:1552703_S_AT

ttccatgggtgaaggtacaataaatggcttactggatgaattattacagacaagggtgctgaaccaggaagagatggagaagtaaacgtgaaaatg
ctcagttatggataagaccgagcttggatgactccggtattccgaaaggggcacagggcatgccaatttgcatacatacattgtgaagaagacag
ttacctgg

Genbank: NM_052889 (nt 86-267)

20

配列番号 7

1552701_a_at COPI

>HG-U133_PLUS_2:1552701_A_AT

aggctccgatacctggaaattagcttagtacacaagactccaattactattttct

Genbank: NM_052889 (nt 314-344)

=====

PSME2 特異的プローブ

プロテアソーム (プロソーム、マクロパイン (macropain)) アクチベータ サブユニット2 (PA28β)

Refseq ID (NCBI): NM_002818

SwissProt: Q2TNB3

Refseqタンパク質ID (NCBI): NP_002809.2

30

配列番号 8

201762_s_at PSME2

>HG-U133_PLUS_2:201762_S_AT

caacacctgatcccaagattgaagatggaatgatitgggtagcaatccaggagaaggctggagagggtgaatgccgtcaagaccaagtg
gaagcttccagacaaccattccaagtactctcagaacgtgggatgctgtgccaaggcctccaaggagactcatgtaatggattaccggccttg
gtcatgagcagatgaggcagcctatggggagctcagggccatggctgctggacctgagggccttctatgctgagctttatcatatcatcagcagcaa
cc

Genbank: NM_002818 (nt 453-723)

40

【 0 0 9 8 】

【表 3】

=====

F13A1 特異的プローブ
 第 X I I 凝固因子、A 1 ポリペプチド
 Refseq ID (NCBI): NM_000129
 SwissProt: P00488
 Refseqタンパク質ID (NCBI): NP_000120.1

配列番号 9
 203305_at F13A1

>HG-U133_PLUS_2:203305_AT
 gccttcacarcaccatttgagacctcagctggcactcaggctgctgaagggtaatatggactcagccttgcaaatagccagtgctagtctgacccaa
 ccacagaggatgctgacatcattgtattatgtccaaggctactacagagaaggctgctgctatgtattgcaaggctgattatggicagaatttcct
 ctgatatgtctagggtgtgatttagctagactgtgattcttagcaaaaaatgaacagtgataagtatactggggcgaanaatcagaatggaatgctct
 ggtctatataaacacattctgagcctttgagactgctcctgagccttcagcactaacctatgaggggtgagctggtccctctatatacatcatactaac
 ttactaagtaatctcacagcattgccaagtctcccaatatccaatt

Genbank: NM_000129 (nt 3289-3718)

10

=====

NCF4 特異的プローブ
 好中球細胞質ソル因子 4、4 0 k D a
 Refseq ID (NCBI): NM_000631
 SwissProt: Q15080
 Refseqタンパク質ID (NCBI): NP_000622.2

20

配列番号 1 0
 205147_x_at NCF4

>HG-U133_PLUS_2:205147_X_AT
 agcagaggctctattgacttactggaacagcaaacctggagctgaattcaaagctggagatgtgatcttctcctcagctggatcaacaaagactg
 gctggaggcactgtccggggagccacgggcatcttccctctcctctcgtgaagatcctcaaagacttccctgaggaggacgacccaccaactgg
 ctgctgttactactacgaagacacatcagcaccatcaaggacatcgcggtggagggaagatcagcagcactccctattgaaagactgctgg
 agctcacaaggcggagttccagagagagacatagctctgaattaccgggacgctgaggggatctggttcggctgctgctgagatgaggacgtag
 cgctcatggtgcgagcgtctggtccctccctccagaagcgccttctccctggaagctgcacatcacgcagaaggacaactacagggcttaca
 acacgatgccat

Genbank: NM_000631 (nt 690-1162)

30

=====

M160: 特異的プローブ
 スカベンジャー受容体 シス테인高含有 1 型タンパク質 M 1 6 0、前駆体 (C D 1 6 3 分子様 1)
 Refseq ID (NCBI): NM_174941
 SwissProt: Q2M3B7
 Refseqタンパク質ID (NCBI): NP_777601.2

配列番号 1 1
 223655_at M160 (CD163L1)

>HG-U133_PLUS_2:223655_AT
 tctatgggactgtcagccaaccctggggacagagtactgtggacacaaggaagatgctggcgtgaggtgctctggacagtcgctgaaatcact
 gaatgcctctcaggtcgttagcacttarmatccagtaicctgggctccttctcccgggtctgtttatctattctcactggtgcccaggtcagaacaa
 aaacatctgcccctcagagttcaaccagaaggagggttctctcaggagaattatccatgagatggagacctgcctcaagagagagaccac

40

【 0 0 9 9 】

【表 5】

IBS1 特異的プローブ

DKFZP564O0823 protein

Refseq ID (NCBI): NM_015393

SwissProt: Q6UW12

Refseqタンパク質ID (NCBI): NP_056208.2

配列番号 1 5

204687_at DKFZP564O0823 (IBS1)

>HG-U133_PLUS_2:204687_AT

aatctctattatctggtgtttctgacaggatgctgcctgctgctcaagctggaaagcagcttctgctgcctaatgaaagatgaaaatagg
aagtgccttgaggaggccagcaggctcacggggcagaatctctcagggttctggtggatctcagtggtccctaccgttctccctccaggccacc
tgtctctgtaaaaggatgtctgctctgtcaaaaggcagctgggatccagcccacaagtgatcagcagagtgctattccaaaagaaaggctatgaga
tgagctgagttatagagagaaggaggagcagctgtacgggtgtgggaagtgggaaggagctggcggggagaaggaggctaacctgcactga
gtacttcattaggacaagtgagaatcagctattgataatggccagagatatccacagcttggaggagcccagagaccgnttgccttataccacacagc
aactgggtccactgcttactg

10

Genbank: NM_015393 (nt 1602-2089)

VSIG2 特異的プローブ

Vセットおよび免疫グロブリンドメイン含有 2

Refseq ID (NCBI): NM_014312

SwissProt: Q96IQ7

Refseqタンパク質ID (NCBI): NP_055127.2

20

配列番号 1 6

229369_at VSIG2

>HG-U133_PLUS_2:229369_AT

ggggtagcgcaaggaggaggaaagggtgagttaaaagcgggtgctgcaccctcaactccgacatcattcagtggttttaggggcaggag
gtgtgtttcagccgtggaaattgctggtgagcagctgtaacctgtgtattgagggtacagggcaancgggtacagggtggagtggtggtccacaagct
gtggcagggaagctggttcagaggactgccctgcc

Genbank: A1201858 (nt 940-1143)

【 0 1 0 1 】

30

あるいはまた、遺伝子転写レベルは、タンパク質レベルで測定され、本発明は、

a) 少なくとも 1 種類の IBS - MSG を発現する細胞を試験対象の化合物と接触させること；

b) 前記 IBS - MSG のタンパク質レベルを測定すること；ならびに

c) 前記化合物の非存在下での前記 IBS - MSG のタンパク質レベルと比較することを含み、

これにより、IBS において観察される IBS - MSG のタンパク質レベルの変化を妨害することができる化合物が、CVH の処置、特に IBS の処置のための候補化合物として同定される、CVH の処置、特に IBS の処置のための候補化合物を同定するための方法を提供する。

40

【 0 1 0 2 】

好ましくは、タンパク質レベルは、IBS - MSG 産物に結合する抗体を用いて測定される。特に、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSIG2、VSIG4 および MUC20 からなる群より選択される IBS - MSG にコードされたポリペプチドに結合する抗体が使用され、特に、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、VSIG2 からなる群、より詳細には、IBS1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1 および VSIG2 からなる群、さらにより詳細には、MUC20、VSIG2 および VSIG4 からなる群より選択される IBS - MSG にコードされたポリペプ

50

チドに結合する抗体が使用され、最も詳細には、本発明のスクリーニング方法において使用される I B S - M S G は、I B S 1 からなる。

【0103】

特定の一実施形態によれば、本発明の方法は、工程 (b) において、少なくとも2つの異なる遺伝子の遺伝子産物のタンパク質レベルの測定 (determining the determine) であって、該遺伝子の1つが、I B S 1、C O P 1、P S M E 2、F 1 3 A 1、N C F 4、C S F R 1、M 1 6 0、K C N S 3、L Y Z、M S 4 A 4 A、H E L L S、F R C 4、M C M 5、T A P 2、L R A P、D T L、V S I G 2、V S I G 4、M U C 2 0 からなる群より選択され、1つ以上の他の遺伝子が、I B S 1、C O P 1、P S M E 2、F 1 3 A 1、N C F 4、C S F R 1、M 1 6 0、K C N S 3、L Y Z、M S 4 A 4 A、H E L L S、F R C 4、M C M 5、T A P 2、L R A P、D T L、V S I G 2、V S I G 4、M U C 2 0 からなる群より選択される測定を含み、特に、I B S 1、C O P 1、P S M E 2、F 1 3 A 1、N C F 4、C S F R 1、M 1 6 0、K C N S 3、L Y Z、M S 4 A 4 A、H E L L S、F R C 4、M C M 5、T A P 2、L R A P、D T L、V S I G 2、V S I G 4 および M U C 2 0 からなる群より選択される少なくとも2つの遺伝子の遺伝子産物のタンパク質レベルの測定、特に I B S 1、C O P 1、P S M E 2、F 1 3 A 1、N C F 4、C S F 1 R、M 1 6 0、K C N S 3、V S I G 2 からなる群より選択される少なくとも2つの遺伝子、より詳細には、I B S 1、P S M E 2、F 1 3 A 1、N C F 4、C S F R 1 および V S I G 2 からなる群の少なくとも2つの遺伝子、さらにより詳細には、M U C 2 0、V S I G 2 および V S I G 4 からなる群の少なくとも2つの遺伝子の遺伝子産物のタンパク質レベルの測定を含む。本発明のさらなる実施形態は、工程 (b) において、少なくとも2種類の遺伝子産物の (o f o f) タンパク質レベルの測定であって、該遺伝子の1つが I B S 1 遺伝子産物であり、その他が、C O P 1、P S M E 2、F 1 3 A 1、N C F 4、C S F R 1、M 1 6 0、K C N S 3、L Y Z、M S 4 A 4 A、H E L L S、F R C 4、M C M 5、T A P 2、L R A P、D T L、V S I G 2、V S I G 4、M U C 2 0、C A S P 1、F C G R 2 A および C K B の遺伝子産物からなる群より選択される測定を含む。

10

20

30

40

50

【0104】

本発明のポリペプチドに対して生成される抗体は、該ポリペプチドもしくはエピトープ含有断片、類縁体またはこれらを発現する細胞を、動物、好ましくは非ヒト動物に、常套的なプロトコルを用いて投与することにより得られ得る。モノクローナル抗体の調製には、細胞株の連続培養によって産生される抗体が得られる任意の手法が使用され得る。例としては、ハイブリドーマ手法 (Kohler, G. および Milstein, C., Nature (1975) 256: 495 - 497)、トリオーマ手法、ヒトB細胞ハイブリドーマ手法 (Kozborら、Immunology Today (1983) 4: 72) および EBV - ハイブリドーマ手法 (Coleら、MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp. 77 - 96, Alan R. Liss, Inc., 1985) が挙げられる。

【0105】

単鎖抗体の作製のための手法 (例えば、米国特許第 4, 946, 778号に記載のものなど) もまた、本発明のポリペプチドに対する単鎖抗体の作製に適合させることができる。また、トランスジェニックマウスまたは他の生物体 (例えば、他の哺乳動物) を用いて、ヒト化抗体を発現させ得る。

【0106】

上記の抗体は、該ポリペプチドを発現するクローンを単離および同定するため、または親和性クロマトグラフィによって該ポリペプチドを精製するために使用され得る。

【0107】

本発明のポリペプチドに対する抗体はまた、C V Hを処置するため、特に I B S の処置のために使用され得る。

【0108】

タンパク質量を測定するため、本発明による抗体は、慣用的な免疫学的手法で使用される。好適な免疫学的手法は当業者には周知であり、例えば、E L I S A、ウエスタンブロット解析、競合的またはサンドイッチイムノアッセイなどが挙げられる。他の点も周知であるように、これらはすべて、抗原-抗体免疫複合体の形成に依存しており、アッセイの目的のため、抗体は、例えば、放射能、酵素もしくは蛍光標識で検出可能に標識され得るか、または不溶性担体上に固定化され得る。

【0109】

例えば、E L I S Aスクリーニング形式では、抗体は、担体(B S Aなど)にカップリングされたタンパク質またはそのペプチド断片のいずれかでコーティングされた固相(例えば、マイクロプレートの底面)に添加され、次いで、検出可能な標識(酵素、好ましくはホースラディッシュペルオキシダーゼ、または¹²⁵Iなどの放射性同位体など)にコンジュゲートされた抗免疫グロブリン抗体が添加される(例えば、免疫処置がマウスで行なわれる場合は、抗マウス免疫グロブリン抗体、例えばヒツジ抗マウス免疫グロブリン(I g)が使用される)。

10

【0110】

本発明の好ましい実施形態では、個々の核酸および/または遺伝子産物は、最初に、特定の遺伝子または遺伝子産物に特異的に結合する「候補化合物」を同定するためのスクリーニング方法において使用される。同定されたら、候補化合物は、さらに、細胞系または完全体の動物系アッセイで、特定の核酸の発現またはその遺伝子産物の発現もしくは活性(すなわち、機能)に対するその効果を、同じ核酸および/または遺伝子産物を発現する未処置対照の細胞または動物と比較して調べるために使用され得る。本発明では、発現はまた、I B Sを処置するために一般に使用される薬物、例えば、プロビオティクス(p r o b i o t i c)、例えば、ラクトパチルスおよびビフィドバクテリウム; 抗炎症剤、例えば、局所活性5 - A S A化合物またはコルチコステロイド類など(例えば、ブデノシドなど); 肥満細胞安定剤、P A R - 2アンタゴニスト、およびカスパーゼ活性を阻害するアプローチ、例えば、N¹ - 3 - メチルブチリル - N⁴ - 6 - アミノヘキサノイル - ピペラジン; C N I - 1 4 9 3またはプラルナカサンでさらに処理した細胞または未処理細胞においても検出され得る。結腸細胞(例えば、C a c o - 2またはH T - 2 9細胞)を用いた細胞培養アッセイを用いて、試験化合物が発現のモジュレーターとしての機能を果たすか否かが測定され得る。具体的なある実施形態では、細胞を試験化合物と接触させ、発現に対する該化合物の効果を、試験化合物と接触させていない対応する細胞と比較して評価する。本明細書で用いる場合、用語「対応する細胞」は、試験試料のものとは別の試料中の細胞であって、好ましくは、試験対象の細胞と同じ組織型由来の同じ細胞型をいう。

20

30

【0111】

したがって、本発明の目的は、

a) I B S - M S G産物を試験対象の化合物とともにインキュベートすること; および
b) 前記化合物がI B S - M S G産物と結合できる能力を測定すること、ここで、I B S - M S G産物に対して結合できる化合物は、I B Sの処置のための候補化合物である、を含む、C V Hの処置、特にI B Sの処置のための候補化合物を同定および取得するためのスクリーニング方法を提供することである。

40

【0112】

このような結合アッセイでは、I B S - M S G産物は、典型的には、前記遺伝子またはその断片にコードされたポリペプチドからなり、試験化合物が前記ポリペプチドに結合できる能力は、当該技術分野で知られた手順、例えば、A u s u b e l ら(C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , W i l e y I n t e r s c i e n c e , N e w Y o r k , 2 0 0 1)に記載のものなどを用いて測定される。代替的な実施形態において、I B S - M S G産物は、I B S - M S G遺伝子またはその断片から転写されたポリヌクレオチドである。

【0113】

特定の一実施例において、本発明のポリペプチドに結合する候補化合物は、クロマトグ

50

ラフィ系の手法を用いて同定され得る。例えば、本発明の組換えポリペプチドは、該ポリペプチド（例えば、上記のもの）を発現するように操作された細胞から、標準的な手法によって精製され得、カラム上に固定化され得る。次いで、候補化合物の溶液をカラムに通し、固定化された本発明のポリペプチドに特異的な化合物が、該ポリペプチドに結合する能力に基づいて同定され、カラム上に固定化される。該化合物を単離するため、カラムを洗浄して非特異的結合分子を除去し、次いで、目的の化合物をカラムから放出させ、収集する。同様の方法が、ポリペプチドマイクロアレイに結合した化合物の単離に使用され得る。この方法（または任意の他の適切な方法）によって単離された化合物は、所望によりさらに精製され得る（例えば、高速液体クロマトグラフィによって）。また、このような候補化合物は、本発明のポリペプチドの活性を改変する（例えば、増大または低下させる）能力について試験され得る。このアプローチによって単離された化合物はまた、例えば、ヒト被験体においてIBSを処置するための治療剤として使用され得る。本発明のポリペプチドに10 μM以下の親和性定数で結合すると確認された化合物は、本発明に特に有用であるとみなし、本明細書において以下、特異的結合剤とも称する。

10

20

30

40

50

【0114】

あるいはまた、該結合アッセイは、さらに、目的のIBS - MSGに対する特異的結合剤、すなわち、目的遺伝子と結合することがわかっている抗体または別の薬剤のいずれかの存在を含む。本発明のIBS - MSGについて、既知の市販の抗体および既知のアゴニストのリストを、以下にリストアップする。結合アッセイでは、試験化合物のIBS - MSGと結合できる能力を、IBS - MSGと前記特異的結合剤との相互作用に対する試験化合物の効果を測定することにより評価する。

【0115】

表1に示した遺伝子に対する市販の抗体（モノクローナルまたはポリクローナル）の例

：

抗ヒトCASP1抗体

(Abnova Corporation, Calbiochem, Novus Biologicals)

抗ヒトNCF4抗体

(Abnova Corporation, Abeam, GeneTex, Novus Biologicals)

抗ヒトリゾチーム抗体

(BIODESIGN International)

抗ヒトPSME2抗体

(Abnova Corporation, Novus Biologicals)

抗ヒトHELLS抗体

(Abnova Corporation, Bethyl Laboratories, GeneTex, Novus Biologicals)

抗ヒトCOP1抗体

(Abnova Corporation, IMGENEX, Novus Biologicals)

抗ヒトMCM5抗体

(Abeam, AbD Serotec, BD Biosciences Pharmingen, Bethyl Laboratories, BioLegend, GeneTex, Lab Vision, Novus Biologicals, Spring Bioscience)

抗ヒトTAP2抗体

(Abgent, BD Biosciences Pharmingen)

抗VSI G2抗体

(Abeam: マウスモノクローナル皮質胸腺細胞抗体, ab24235 - ヒト系と反応)

表 1 に示した遺伝子にコードされたタンパク質に対するアゴニストの例：

リゾチーム活性化（アゴニスト）：

- シクロスポリン A（リゾチーム放出の誘導）
- 1 - エチル - ベンズイミダゾリノン（1 - E B I O）
- カルバコール
- タブシガルジン
- フェニレフリン

N A D P H オキシダーゼ活性化：

- アンギオテンシン I I [A n g I I]
- P M A
- T N F -
- 増殖因子
- トロンピン
- 酢酸ミリスチン酸ホルボール（P M A）

P S M E 2 および T A P 2 活性化：

- インターフェロン -

前述のスクリーニングアッセイを用いた目的遺伝子への結合能を有する分子の検出では、目的遺伝子に特異的に結合する分子（例えば、抗体、アゴニストまたはポリヌクレオチドプローブ）は、原子（例えば、放射性核種）、分子（例えば、フルオレセイン）、または物理的もしくは化学的特性により該分子の存在を示す複合体を含有しているので、検出可能に標識され得る。また、分子は、検出可能な原子、分子または他の複合体をもたらす基体に対して作用する「レポーター」分子（例えば、酵素などの生体分子）に共有結合されている場合、あるいはこれと会合している場合、検出可能に標識され得る。本発明における使用に適した検出可能な標識としては、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的または化学的手段によって検出可能な任意の組成物が挙げられる。本発明に有用な標識としては、標識アビジンまたはストレプトアビジンコンジュゲートでの染色のためのビオチン、磁気ビーズ（例えば、Dyna beads）、蛍光色素（例えば、フルオレセイン、フルオレセイン - イソチオシアネート（FITC）、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質、増強緑色蛍光タンパク質、リサミン、フィコエリトリン、Cy 2、Cy 3、Cy 3. 5、Cy 5、Cy 5. 5、Cy 7、Fluor X [Amersham]、SyBR Green I および II [Molecular Probes] など）、放射性標識（例えば、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C もしくは ^{32}P ）、酵素（例えば、ヒドロラーゼ、特にホスファターゼ、例えばアルカリホスファターゼ、エステラーゼおよびグリコシダーゼ、またはオキシドレクターゼ、特にペルオキシダーゼ、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ、など）、基質、補因子、インヒビター、化学発光基、色素形成剤、ならびに比色的標識、例えば、金コロイドまたは着色ガラスまたはプラスチック（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど）ビーズが挙げられる。かかる標識の使用を教示する特許としては、米国特許第 3, 817, 837 号；同第 3, 850, 752 号；同第 3, 939, 350 号；同第 3, 996, 345 号；同第 4, 277, 437 号；同第 4, 275, 149 号；および同第 4, 366, 241 号が挙げられる。

【0116】

かかる標識を検出するための手段は当業者に周知である。したがって、例えば、化学発光標識および放射性標識は、写真フィルムまたはシンチレーションカウンタを用いて検出され得、蛍光マーカは、放射光を検出するための光検出器を用いて検出され得る（例えば、蛍光標示式細胞分取の場合と同様に）。酵素標識は、典型的には、該酵素に基質を提供し、基質に対する酵素の作用によって生成される着色反応生成物を検出することにより検出される。比色的標識は、着色された標識を単に可視化することにより検出される。したがって、例えば、標識が放射性標識である場合、検出手段としては、シンチレーションカウンタ、オートラジオグラフィの場合のような写真フィルム、または記憶蛍光体画像形成

10

20

30

40

50

が挙げられる。標識が蛍光標識である場合、これは、蛍光色素を適切な波長の光で励起し、生じた蛍光を検出することにより検出され得る。蛍光は、写真フィルムによって、電荷結合素子 (CCD) もしくは光電子増倍管などの電子検知器などの使用によって、可視的に検出され得る。同様に、酵素標識は、適切な基質を該酵素に提供し、得られた反応生成物を検出することにより検出され得る。また、単純な比色的標識は、該標識に伴う発色を観察することにより検出され得る。蛍光共鳴エネルギー転移は、非標識リガンドの結合に適合されており、アレイにおいて有用であり得る。

【0117】

さらに、結合相互作用の評価が *Biacore* 手法を用いて行われ得、この場合、*IBS-MSG* ポリペプチドまたはその結合パートナーをマイクロチップに、化学修飾によつて直接、または抗体-エピトープ会合 (例えば、*IBS-MSG* ポリペプチドに対する抗体)、エピトープタグ (例えば、*Hista* タグ) に指向される抗体もしくは融合タンパク質 (例えば、*GST*) による結合 (*tether*) のいずれかで結合させる。次いで、第2のタンパク質 (1つまたは複数) を、該「チップ」に流すことによって適用し、シグナルの変化を検出する。最後に、試験化合物を該「チップ」に流すことによって適用し、シグナルの変化を検出する。

【0118】

かかるスクリーニングアッセイによって同定され得る化合物の種類としては、限定されないが、小分子 (例えば、分子量が約 2 kd 未満、より好ましくは分子量が約 1 kd 未満の、および/または血液脳関門を通過することができるか、もしくは適切な細胞内に進入し、関連遺伝子の発現あるいは関連遺伝子産物の活性に影響する有機または無機分子) が挙げられる。また、このようなスクリーニングアッセイによって同定される化合物としては、ポリペプチド (可溶性ペプチド、融合ペプチドなど)、コンビナトリアルライブラリ (*Lam*ら、*Nature* 1991, 354: 82-84; および *Houghten*ら、*Nature* 1991, 354: 84-86 に記載のものなど) の構成員; コンビナトリアル化学によって誘導されたライブラリ (*D*-および/または *L*-配置アミノ酸の分子ライブラリ) の構成員; ホスホペプチド、例えば、ランダムまたは部分縮重指向型ホスホペプチドライブラリ (例えば、*Songyang*ら、*Cell* 1993, 72: 767-778 を参照) の構成員など; 「ファージ方法」 (*Scott* および *Smith*, *Science* 1990, 249: 386-390; *Cwirala*ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87: 6378-6382; *Devlin*ら、*Science* 1990, 49: 404-406) によるペプチドライブラリ; 他の化学物質ライブラリ (*Geysen*ら、*Molecular Immunology* 1986, 23: 709-715; *Geysen*ら、*J. Immunologic Methods* 1987, 102: 259-274; *Fodor*ら、*Science* 1991, 251: 767-773; *Furka*ら、14th International Congress of Biochemistry 1988, Volume & number; 5, Abstract FR: 013; *Furka*, *Int. J. Peptide Protein Res.* 1991, 37: 487-493; 米国特許第 4, 631, 211 号; 米国特許第 5, 010, 175 号; *Needels*ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90: 10700-4; *Ohlmeyer*ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90: 10922-10926; PCT 公開公報番号 WO 92/00252; および PCT 公開公報番号 WO 94/28028) 由来の化学物質; ならびにさまざまな供給元、例えば、*Maybridge Chemical Co.* (*Trevillet*, *Cornwall*, UK)、*Comgenex* (*Princeton*, NJ)、*Brandon Associates* (*Merrimack*, NH)、*Microsource* (*New Milford*, CT)、*Aldrich* (*Milwaukee*, WI)、*Pan Laboratories* (*Bothell*, WA)、および *Mycosearch* (NC) から入手可能な合成または天然化合物の大型ライブラリ (例えば、*Blondelle*ら、*TIBTech* 19

10

20

30

40

50

96, 14:60参照)が挙げられ得る。

【0119】

診断アッセイ

本発明は、さらに、診断用試薬としての本発明のポリヌクレオチドの使用に関する。IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4およびMUC20からなる群より選択されるIBS-MSGの変異型形態の検出、特に、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、VSI G2からなる群、より詳細には、IBS1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1およびVSI G2からなる群、さらにより詳細には、MUC20、VSI G2およびVSI G4からなる群、最も詳細には、IBS1からなる本発明の診断方法に使用されるIBS-MSGの変異型形態の検出により、該遺伝子の不十分な発現、過剰発現または空間的改変または一時的発現に起因する疾患の診断もしくは疾患に対する感受性に付加されるか、またはこれらが明示され得る診断ツールが提供される。該遺伝子に変異を有する個体は、さまざまな手法によってDNAレベルで検出され得る。

10

【0120】

したがって、本発明により、

(a) 本発明によるポリヌクレオチドにおける変異の存在または非存在を測定すること；および

20

(b) 前記変異の存在または非存在に基づいて、病的状態または病的状態に対する感受性診断すること

を含む、被験体におけるCVH、特にIBSと関連する病的状態または病的状態に対する感受性の診断方法が提供されることが認識されよう。

【0121】

該方法は、さらに、上記工程(a)に基づいて、試料が、IBSおよび/またはIBSの特定の段階を示すか否か、および/またはIBSの感受性を示すか否かを判定する方法を含む。

【0122】

診断用の核酸は、被験体の細胞、例えば、血液(例えば、全血、血清、血漿、特に、白血球)、尿、唾液、糞便試料、糞便細胞、組織生検材料(特に、結腸生検材料)または剖検材料などから採取されたものであり得る。ゲノムDNAを検出に直接使用してもよく、これを、解析前に、PCRまたは他の増幅手法を用いることにより酵素的に増幅してもよい。また、mRNAまたはcDNAも同様にして使用され得る。欠失および挿入は、正常な遺伝子型との比較における増幅産物の大きさの変化によって検出され得る。点変異は、増幅DNAを、標識哺乳動物プリンパーミアーズヌクレオチド配列にハイブリダイズさせることにより確認され得る。完全にマッチした配列はミスマッチ二本鎖と、RNアーゼ消化または融解温度の差によって識別され得る。また、DNA配列の差は、キャピラリー電気泳動カラムもしくはゲル内のDNA断片の電気泳動の移動度の変化によって(変性剤の有無)、または直接DNA配列決定(例えば、Myersら、Science(1985) 230:1242)によっても検出され得る。また、特定の位置における配列の変化は、特異的制限エンドヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ保護アッセイ(RNアーゼおよびS1保護など)または化学的切断方法(Cottonら、Proc Natl Acad Sci USA(1985) 85:4397-4401参照)によっても示され得る。別の実施形態では、IBS-MSGに特異的に結合するオリゴヌクレオチドプローブのアレイを構築して、例えば、遺伝子変異の効率的なスクリーニングが行なわれ得る。アレイ手法・方法は周知であり、一般適用性を有し、分子遺伝学、例えば、遺伝子発現、遺伝子連鎖および遺伝子変異性におけるさまざまな問題に取り組むために使用され得る(例えば、M. Cheeら、Science, Vol 274, pp 610~613(1996)を参照)。

30

40

【0123】

50

該診断アッセイは、記載の方法によってIBS - MSGにおける変異を検出することによるIBSに対する感受性の診断または判定プロセスを提供する。また、かかる疾患は、正常な構造と比較して被験体由来の試料からポリペプチドまたはmRNAの異常に減少または増大したレベルを測定すること、ならびに前記試料からタンパク質誘導体の存在を調べることを含む方法によって診断され得る。発現の減少または増大は、ポリヌクレオチドの定量のための当該技術分野で周知である任意の方法を用いて、例えば、核酸増幅（例えば、PCR、RT-PCRによる）；RNアーゼ保護；ノザンプロットングおよび他のハイブリダイゼーション方法などによって、RNAレベルで測定され得る。宿主由来の試料中の本発明のポリペプチドなどのタンパク質のレベルを測定するために使用され得るアッセイ手法は、当業者には周知である。かかるアッセイ方法としては、ラジオイムノアッセイ、競合的結合アッセイ、ウエスタンプロット解析およびELISAアッセイが挙げられる。タンパク質誘導体またはパリアントの存在を調べるために使用され得るアッセイ手法には、とりわけ、質量分析が含まれる。

10

【0124】

したがって、別の態様において、本発明は、

(a) 被験体の生物学的試料において、IBS - MSGの遺伝子転写レベルを測定すること；

(b) 該遺伝子転写レベルを正常対照試料における遺伝子転写レベルと比較すること；
ならびに

(c) 工程b)の結果に基づいて診断を得ること

20

を含む、被験体においてIBSを検出および/またはモニタリングするための方法を提供する。

【0125】

該方法は、さらに、試料がIBSおよび/またはIBSの特定の段階を示すか否か、および/または上記の工程(a)および(b)に基づいてIBSの感受性を示すか否かを判定する方法を含む。

【0126】

本発明の診断方法に使用されるIBS - MSGは、典型的には、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4およびMUC20からなる群より選択され、特に、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、VSI G2からなる群、より詳細には、IBS1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1およびVSI G2からなる群、さらにより詳細には、MUC20、VSI G2およびVSI G4からなる群より選択される。

30

【0127】

したがって、本発明の目的は、

(a) 被験体の生物学的試料において、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4およびMUC20からなる群、特に、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3およびVSI G2からなる群、より詳細には、IBS1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1およびVSI G2からなる群、さらにより詳細には、MUC20、VSI G2およびVSI G4からなる群より選択されるIBS - MSGの遺伝子転写レベルを測定すること、

40

(b) 該遺伝子転写レベルを正常対照試料における遺伝子転写レベルと比較すること；
ならびに

(c) 工程b)の結果に基づいて、診断を得ることおよび/または試料が(特定の型の)IBSを示すか否かを判定すること

を含む、被験体においてIBSを検出および/またはモニタリングするための方法を提供

50

することである。

【0128】

被験体においてIBSを検出および/またはモニタリングするための方法のさらなる実施形態において、工程a)は、上記のIBS - MSGの2、3、4、5、6、7、8種またはそれ以上を調べることを含む。

【0129】

特別な実施形態では、前記患者の生物学的試料は、結腸組織の試料、より詳細には結腸粘膜組織の試料である。

【0130】

特定の一実施形態によれば、本発明による被験体においてIBSを検出および/またはモニタリングするための方法は、工程(a)において、少なくとも2つの異なる遺伝子の発現の測定であって、該遺伝子の1つが、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4、MUC20からなる群より選択され、1つ以上の他の遺伝子が、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4、MUC20、CASP1、FCGR2AおよびCKBからなる群より選択される測定、特に、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4およびMUC20からなる群より選択される少なくとも2つの遺伝子の発現の測定、特にIBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、VSI G2からなる群より選択される少なくとも2つの遺伝子；より詳細には、IBS1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1およびVSI G2からなる群の少なくとも2つの遺伝子；さらにより詳細には、MUC20、VSI G2およびVSI G4からなる群の少なくとも2つの遺伝子の発現の測定を含み、本発明のさらなる実施形態は、工程(a)において、少なくとも2つの遺伝子の発現の測定であって、該遺伝子の1つがIBS1であり、その他が、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4、MUC20、CASP1、FCGR2AおよびCKBからなる群より選択される測定を含む。

10

20

30

【0131】

記載の各実施形態では、工程(b)は、前記少なくとも2つの遺伝子の発現レベルを、健常対照試料における前記遺伝子の転写レベルと比較することからなる。

【0132】

特に、これは、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4およびMUC20の発現レベル；より詳細には、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、VSI G2の発現レベル；さらにより詳細には、IBS1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1およびVSI G2の発現レベル；最も詳細には、MUC20、VSI G2およびVSI G4の発現レベルを測定することからなる。

40

【0133】

被験体においてIBSを検出および/またはモニタリングするための前述の任意の方法において、本出願書類に特定されたIBS - MSGの使用は、他の遺伝子、例えば、CASP1、FCGR2A、SLC6A4、SLC12A2、SCNN1A、OPR1M、AQP3、NKCC1、THP1、CCL2/MCP-1、CXCL8/IL-8、IL-10、GNB3、ADRA2A、TNFA、CCK1、IL-4、IL-4R、IL-6、IL-7、IL-1 およびCKBなどと組み合わせてもよい。

50

【0134】

したがって、本発明の目的は、被験体においてIBSを検出および/またはモニタリングするための方法であって、前述の任意の実施形態による工程a)が、さらに、IBSマーカーとして知られる遺伝子の少なくとも1つ、2つ、3つまたはそれ以上、特に、CASP1、FCGR2AおよびCKBからなる群より選択される遺伝子の遺伝子転写レベルを測定することを含む方法を提供することである。

【0135】

被験体においてIBSを検出するためには、前記被験体の試料におけるIBS-MSGの発現レベルを、正常対照試料と比較する必要がある。対照試料における前記遺伝子の発現レベルと比較したときの、前記被験体の試料におけるIBS-MSGの発現レベルの変化は、前記被験体におけるIBSの診断またはIBSに対する感受性を示す。例えば、以下：IBS1、VSI G2またはMUC20のIBS-MSGのいずれかのレベルが対照試料と比べて増大している場合（例えば、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%またはそれ以上）、これを前記被験体におけるIBSに対する陽性指標とみなす。別の例では、以下：COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、RFC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTLまたはVSI G4のIBS-MSGのいずれかのレベルが対照試料と比べて減少している場合（例えば、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上）、これを前記被験体におけるIBSに対する陽性指標とみなす。さらにはまた、発現における差は、対照試料で観察される発現レベルと比べた「変化倍数」で示され得る。かかる実施形態では、1.4倍変化は40%の増大に相当するなどである。一般に、発現の減少は、40%の減少に対して0.6倍変化と称する。***「確認されたい」***

したがって、本発明の目的は、

(a) 被験体の生物学的試料において、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、RFC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4およびMUC20からなる群、特に、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3およびVSI G2からなる群、より詳細には、IBS1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1およびVSI G2からなる群、さらにより詳細には、MUC20、VSI G2およびVSI G4からなる群より選択されるIBS-MSGの遺伝子転写レベルを測定すること、ならびに

(b) 該遺伝子転写レベルを正常対照試料における遺伝子転写レベルと比較することを含み、

ここで、IBS1、VSI G2およびMUC20からなる群より選択される遺伝子の遺伝子転写レベルの増大、またはCOP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、RFC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTLおよびVSI G4からなる群より選択される遺伝子の遺伝子転写レベルの減少は、前記被験体におけるIBSの存在の表示である、被験体においてIBSを確認するための方法を提供することである。

【0136】

本明細書において上記のように、遺伝子転写レベルは、好ましくは、IBS-MSGポリペプチドに結合する抗体を用いてタンパク質レベルで、または好ましくは、前記IBS-MSGから転写されたオリゴヌクレオチドに特異的に結合するプローブを用いて遺伝子転写レベルで、好ましくは、cDNAもしくはmRNAのレベルでのいずれかで測定される。特別な実施形態において、遺伝子転写レベルは、アレイ手法を用い、本明細書で前述の特異的プローブを用いてオリゴヌクレオチドレベルで、または特異的結合剤、好ましくは、本明細書で後述する抗体を用いてタンパク質レベルでのいずれかで測定される。

【0137】

10

20

30

40

50

したがって、本発明のさらなる実施形態では、前述の方法における遺伝子の発現レベルは、目的遺伝子のcDNAまたはmRNAに特異的に結合するプローブを用いて、特に、マイクロアレイ手法を用いて評価される。

【0138】

したがって、本発明の目的は、被験体においてIBSを測定およびモニタリングするための方法であって、遺伝子転写レベルが、IBS-MSGに結合するオリゴヌクレオチドプローブのアレイを用いて評価される方法を提供することである。一実施形態において、前記遺伝子は、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4およびMUC20からなる群より選択され、特に、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3およびVSI G2からなる群、より詳細には、IBS1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1およびVSI G2からなる群、さらにより詳細には、MUC20、VSI G2およびVSI G4からなる群より選択される。既に本明細書において前述のように、IBS-MSGに対するオリゴヌクレオチドプローブのアレイを、任意選択で、他の遺伝子、特に、CASP1、FCGR2AおよびCKBからなる群より選択される遺伝子に特異的に結合するプローブと組み合わせる。したがって、本発明のさらなる目的において、遺伝子の発現レベルは、表1に示したプローブのアレイを用いて、より詳細には、表2に示したプローブのアレイを用いて測定される。

10

【0139】

タンパク質アレイは、典型的には、表面（例えば、ガラス、膜、マイクロタイターウェル、質量分析計のプレートおよびビーズまたは他の粒子）上に固定化されたタンパク質を使用した固相リガンド結合アッセイシステムである。自動マルチウェル形式は、最良に開発されたものであり、自動96ウェルプレート系スクリーニングシステムは、最も広く使用されている。本発明の方法に使用され得るタンパク質アレイの説明については、米国特許第6,475,809号；同第6,406,921号および同第6,197,599号；ならびにPCT公開公報WO00/04389およびWO00/07024を参照のこと。

20

【0140】

アレイの構築では、タンパク質の供給源として、組換えタンパク質のための細胞系の発現系、天然供給源からの精製、無細胞翻訳系によるインビトロ作製、およびペプチドの合成方法が挙げられる。捕捉アレイおよびタンパク質の機能解析では、タンパク質が正しくフォールディングされており、機能性であることが重要である。これは、例えば、組換えタンパク質が細菌から変性条件下で抽出される場合は必ずしもそうではないが、他の方法（天然タンパク質の単離、無細胞合成）では、一般的に、機能性が保持される。しかしながら、変性タンパク質のアレイは、交差反応性に関する抗体のスクリーニング、自己抗体の特定およびリガンド結合タンパク質の選択に有用である。

30

【0141】

使用される固定化方法は、再生可能であり、種々の性質（大きさ、親水性、疎水性）のタンパク質に適用可能であり、ハイスループットおよび自動化しやすく、および十分に機能性のタンパク質活性の保持と適合性であるのがよい。共有結合性と非共有結合性の両方のタンパク質固定化方法が使用される。共有結合のための基材としては、アミノ-またはアルデヒド含有シラン試薬（Telechem）でコーティングされたガラススライドが挙げられる。Versalinx系（Prolinx）では、フェニルニボロン酸で誘導体化されたタンパク質と、支持体表面上に固定化されたサリチルヒドロキシサム酸との相互作用によって、可逆的共有結合が得られる。安定な結合をもたらす共有結合方法は、ある範囲のタンパク質に適用され得る。非修飾タンパク質の非共有結合は、3次元ポリアクリルアミドゲル系のHydroGel（PerkinElmer）などの多孔質構造において生じる。

40

【0142】

50

したがって、さらなる実施形態において、本発明は、

(a) 被験体の生物学的試料において、少なくとも1種類のIBS-MSGタンパク質のタンパク質レベルを測定すること；

(b) 該タンパク質レベルを正常対照試料におけるタンパク質レベルと比較すること；および

(c) 工程b)の結果に基づいて診断を得ること

を含む、被験体においてIBSを確認および/またはモニタリングするための方法を提供する。

【0143】

好ましくは、タンパク質レベルは、IBS-MSGタンパク質に結合する少なくとも1種類の抗体を用いて測定される。特に、1種類以上の抗体であって、各々が、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4およびMUC20から選択されるIBS-MSGにコードされたポリペプチドに結合する抗体が使用され、特に、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、VSI G2からなる群、より詳細には、IBS1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1およびVSI G2からなる群、さらにより詳細には、MUC20、VSI G2およびVSI G4からなる群より選択されるIBS-MSGにコードされたポリペプチドに結合する抗体が使用され、最も特別な実施形態では、タンパク質レベルは、IBS1に特異的な抗体を用いて測定される。

10

20

【0144】

代替的な実施形態において、該方法は、本発明による少なくとも1種類のタンパク質に限定されないが、IBSに関与すると確認されたタンパク質群、すなわち、表1に示したIBS-MSGにコードされたタンパク質群の発現レベルの同時評価が必要とされ、一実施形態において、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4およびMUC20からなる群；特に、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3およびVSI G2からなる群、より詳細には、IBS1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1およびVSI G2からなる群、さらにより詳細には、MUC20、VSI G2およびVSI G4からなる群のIBS-MSGにコードされたタンパク質群の発現レベルの同時評価が必要とされる。好ましい実施形態において、タンパク質群の発現レベルの同時評価は、アレイ手法を用いて、特に、免疫学的方法(ELISAおよびRIAなど)を用いて行われる。本明細書において前述のように、タンパク質アレイでは、一次薬剤、典型的には、IBSタンパク質を認識する抗体またはタンパク質を、固相支持体(例えば、膜またはマイクロタイタープレート)に結合させる。この固相支持体を使用し、IBSタンパク質が生物学的試料から抽出され得、検出可能な標識(酵素、好ましくは、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、または¹²⁵Iなどの反応性同位体など)とコンジュゲートさせた二次薬剤(例えば、IBSタンパク質の第2のエピトープを認識する二次抗体、または一次抗体を認識する抗体もしくはタンパク質)を用いて定量され得る。

30

40

【0145】

したがって、本発明の目的は、

a) 被験体の生物学的試料を、IBS-MSGポリペプチドと特異的に結合する少なくとも1種類の薬剤と接触させること；

b) 該ポリペプチドに対する該薬剤の結合レベルを測定すること；

c) 前記生物学的試料中の該薬剤の結合レベルを、正常対照試料中の該薬剤の結合レベルと比較すること；ならびに

d) 工程c)の結果に基づいて、診断を得ること、または試料がIBSおよび/または

50

IBSの特定の状態を示すか否かを判定すること

を含む、被験体においてIBSを検出および/またはモニタリングするための方法を提供することである。

【0146】

既に本明細書において前述のように、好ましい実施形態では、該アッセイは、IBS - MSGポリペプチド特異的抗体のタンパク質アレイを用いて行なわれる。一実施形態において、2つ以上の特異的抗体は各々、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、RFC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4およびMUC20からなる群より選択されるIBS - MSGのポリペプチドと反応性であり、特に、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3およびVSI G2からなる群より選択されるIBS - MSGのポリペプチドと反応性であり、より詳細には、IBS1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1およびVSI G2からなる群より選択されるIBS - MSGのポリペプチドと反応性であり、さらにより詳細には、MUC20、VSI G2およびVSI G4からなる群より選択されるIBS - MSGと反応性である。既に本明細書において前述のように、IBS - MSGのタンパク質アレイを、任意選択で、他の遺伝子、特に、CASP1、FCGR2AおよびCKBからなる群より選択される遺伝子に特異的に結合する薬剤と組み合わせる。

10

【0147】

被験体においてIBSを検出するためには、前記被験体の試料におけるIBS - MSGポリペプチドに対する薬剤の結合レベルを、正常対照試料における結合レベルと比較する必要があり得る。結合レベルの変化は、前記被験体におけるIBSの診断またはIBSに対する感受性を示す。例えば、以下：IBS1、VSI G2またはMUC20のIBS - MSGのポリペプチドのいずれかの結合レベルが対照試料と比べて増大している場合（例えば、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%またはそれ以上）、これを前記被験体におけるIBSに対する陽性指標とみなす。別の例では、以下：COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、RFC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTLまたはVSI G4のIBS - MSGのポリペプチドのいずれかの結合レベルが対照試料と比べて減少している場合（例えば、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上）、これを前記被験体におけるIBSに対する陽性指標とみなす。

20

30

【0148】

本明細書に記載の診断方法はまた、被験体においてIBSをモニタリングするため、または治療用化合物の投薬量を決定するために使用され得る。一例において、治療用化合物が投与され、IBS - MSGの発現レベルが、治療過程で測定される。

【0149】

本発明では、IBS - MSGの任意の1つ以上の発現をモジュレートする治療剤を特に有用であるとみなす。一例では、治療過程で以下：IBS1、VSI G2またはMUC20のIBS - MSGのいずれかの発現レベルを10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%またはそれ以上減少させる治療用薬剤を、有効な治療用薬剤または有効投薬量の治療用薬剤とみなす。別の例では、治療過程で、以下：COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、RFC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTLまたはVSI G4のIBS - MSGのいずれかの発現レベルを10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上増大させる治療用薬剤を、有効な治療用薬剤または有効投薬量の治療用薬剤とみなす。

40

【0150】

診断用キット

50

本発明はまた、生物学的試料中のIBS-MSG産物の存在を検出するためのキットを包含し、該キットは、上記の任意の診断アッセイ行なうのに必要とされる成分と、生物学的試料におけるIBS-MSGの発現の評価および被験体におけるIBSの診断に該成分を使用するための使用説明書とを備える。

【0151】

したがって、本発明の目的は、

(a) IBS-MSGに特異的に結合する少なくとも1種類のプローブ、特に、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4およびMUC20からなる群より選択されるIBS-MSG、より詳細には、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSF1R、M160、KCNS3およびVSI G2からなる群より選択されるIBS-MSG、さらにより詳細には、IBS1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1およびVSI G2からなる群より選択されるIBS-MSG、最も詳細には、MUC20、VSI G2およびVSI G4からなる群より選択されるIBS-MSGに特異的に結合する少なくとも1種類のプローブ；または

(b) IBS-MSGポリペプチドまたはその断片に特異的に結合する少なくとも1種類の薬剤；特に、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4およびMUC20からなる群より選択されるIBS-MSGのポリペプチド、より詳細には、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSF1R、M160、KCNS3およびVSI G2からなる群より選択されるIBS-MSGのポリペプチド、さらにより詳細には、IBS1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1およびVSI G2からなる群より選択されるIBS-MSGのポリペプチド、最も詳細には、MUC20、VSI G2およびVSI G4からなる群より選択されるIBS-MSGのポリペプチドまたはその断片に特異的に結合する少なくとも1種類の薬剤、

を備える診断用キットを提供することである。

【0152】

特定の一実施形態によれば、本発明のキットは、少なくとも2つの異なる遺伝子の発現を測定するための2種類以上のプローブおよび/または結合剤であって、該遺伝子の1つが、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4、MUC20からなる群より選択され、1つ以上の他の遺伝子が、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4、MUC20、CASP1、FCGR2AおよびCKBからなる群より選択される、少なくとも2つの異なる遺伝子の発現を測定するための2種類以上のプローブおよび/または結合剤を備え、特に、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4およびMUC20からなる群より選択される少なくとも2つの遺伝子の発現を測定するための2種類以上のプローブまたは結合剤、特に、IBS1、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSF1R、M160、KCNS3、VSI G2からなる群より選択される少なくとも2つの遺伝子の発現を測定するための2(two)種類以上のプローブ、より詳細には、IBS1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1およびVSI G2からなる群由来の2つ以上の遺伝子の発現を測定するための少なくとも2種類のプローブおよび/または結合剤、さらにより詳細には、MUC20、VSI G2およびVSI G4からなる群の少なくとも2つの遺伝子の発現を測定するための少なくとも2種類のプローブおよび/または結合剤を備える。本発明のキットのさら

なる実施形態は、少なくとも2つの遺伝子の発現を測定するための2種類以上のプローブおよび/または結合剤を備え、該遺伝子の1つはIBS1であり、その他が、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSFR1、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、FRC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTL、VSI G2、VSI G4、MUC20、CASP1、FCGR2AおよびCKBからなる群より選択される。

【0153】

任意のかかるキットにおいて、(a)または(b)には、本明細書において前述の任意の診断アッセイを行なうのに必要とされるさらなる成分が含まれていてもよいことは認識されよう。例えば、好ましい実施形態では、IBS-MSGポリペプチドに特異的に結合する薬剤は抗体であり得、キットは、さらに、該抗体とIBS-MSGポリペプチド間の結合を定量するのに必要とされる成分を含むものであり得る。本発明の一実施形態において、かかる免疫学的キットは、一次薬剤(例えば、抗原を認識する抗体またはタンパク質)でコーティングされた固相支持体(例えば、膜またはマイクロタイタープレート)、標準曲線を作成するための精製タンパク質の標準溶液、体液(例えば、血清または尿)、分析実験の品質試験用の対照、標識もしくは酵素(ホースラディッシュペルオキシダーゼなど)にコンジュゲートされた、または他の方法で標識された二次薬剤(例えば、検出対象の抗原の第2のエピトープと反応性である二次抗体、または一次抗体を認識する抗体もしくはタンパク質)、基質溶液、停止溶液、洗浄バッファーおよび取扱説明書を含むものである。膜は計深棒構造体上に支持され得る(この場合、試料は膜上に、計深棒構造体を試料内に配置することにより配置される)か、または膜は、側方流カセット内に支持され得る(この場合、試料は膜上に、カセット内の開口部を通して配置される)。キットはまた、アレイ形式であってもよく、バイオチップ上(例えば、GeneChipTMなど)に配列された本発明のポリペプチドまたは本発明のポリペプチドに特異的に結合する結合分子のアレイを含むものであり得る。

10

20

【0154】

また、診断用キットには、一般的に、キット成分の意図される用途、および標準曲線を作成するために使用される参照試料または精製タンパク質に関するラベルまたは使用説明書が含まれる。一例において、キットは、該キットをIBSの診断に使用するための使用説明書を含む。また別の例では、キットは、該キットをIBSの処置のための治療処置または投薬レジメンのモニタリングに使用するための使用説明書を含む。参照試料値は、キットの意図される用途に依存することは理解されよう。例えば、試料は、正常参照値と比較され得、この場合、1種類以上の本発明のポリペプチドのレベルまたは1種類以上の本発明のポリペプチドの測定使用レベルの変化は、IBSまたはIBSに対する素因を示す。別の例において、治療モニタリングに使用されるキットはIBSを示す参照値を有し得、この場合、参照試料と比べた1種類以上の本発明のポリペプチドのレベルまたは1種類以上の本発明のポリペプチドの測定使用レベルの変化は、治療用化合物の治療有効性または有効投薬量を示すために使用され得る。

30

【0155】

治療有用性

本発明は、被験体においてCVHを処置または予防するため、特にIBSを処置または予防するための方法および組成物を特徴とする。IBS1、VSI G2およびMUC20のレベルは、IBSを有する被験体において増大していることが見出された。したがって、本発明は、これらのポリペプチドまたは核酸分子の任意の1種以上の発現レベルまたは生物学的活性を減少させる方法および薬剤を包含する。かかる薬剤(より詳細に後述)としては、上記のポリペプチドの任意の1種以上の生物学的活性を下方調節または阻害する化合物;免疫学的/ワクチン製剤;上記のポリペプチドの任意の1種類に特異的に結合する精製抗体または抗原結合断片;アンチセンス核酸塩基オリゴマー;および上記のポリペプチドのいずれかを標的化するdsRNAが挙げられる。

40

【0156】

50

第1の態様において、IBSにおいて上方調節されるポリペプチドの生物学的活性の低下は、治療有効量のアンタゴニスト、例えばペプチドまたは小分子化合物を、薬学的に許容され得る担体または賦形剤との組合せで含む医薬組成物を用いて確立される。

【0157】

本発明のさらなる一態様は、免疫学的/ワクチン製剤(組成物)に関し、これは、哺乳動物宿主に導入されると、該哺乳動物において、本発明のポリペプチドに対する免疫学的応答を誘導し、該組成物は、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含むものである。該ワクチン製剤は、さらに、適当な担体を含んでいてもよい。ポリペプチドは胃で分解され得るため、好ましくは非経口投与される(例えば、皮下、筋肉内、静脈内または皮内注射)。非経口投与に適した製剤としては、水性および非水性の滅菌注射用液剤(これには、抗酸化剤、バッファー、静菌薬および製剤をレシピエントの血液と等張性にするための溶質が含有され得る);ならびに水性および非水性の滅菌懸濁剤(これには、懸濁剤または増粘剤が含有され得る)が挙げられる。該製剤は、単位投与容器または反復投与容器(例えば、密閉アンプルおよびバイアル)にて提示され得るか、使用直前に滅菌液状担体を添加するだけでよい凍結乾燥状態で保存され得る。また、ワクチン製剤には、製剤の免疫原性を増強するためのアジュバント系(水中油型系および当該技術分野において知られた他の系など)が含まれ得る。投薬量は、ワクチンの特異的な活性に依存し、常套的な実験手法によって容易に決定され得る。

10

【0158】

さらに別のアプローチでは、上方調節される遺伝子の発現は、発現ブロック手法を用いて阻害され得る。かかる既知の手法は、内部で生成させるか、外的に投与するかのいずれかで、アンチセンス配列の使用を伴う(例えば、O'Connor, J. Neurochem (1991) 56:560; Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)を参照)。あるいはまた、該遺伝子と三重らせん(「三重鎖」)を形成するオリゴヌクレオチドが供給され得る(例えば、Leeら、Nucleic Acids Res (1979) 6:3073; Cooneyら、Science (1988) 241:456; Dervanら、Science (1991) 251:1360を参照)。このようなオリゴマーは、それ自体を投与してもよく、関連オリゴマーをインピボで発現させてもよい。合成アンチセンスまたは三重鎖オリゴヌクレオチドは、修飾塩基または修飾主鎖を含むものであってもよい。後者の例としては、メチルホスホネート、ホスホロチオエートまたはペプチド核酸主鎖が挙げられる。かかる主鎖は、ヌクレアーゼによる分解からの保護をもたらすため、アンチセンスまたは三重鎖オリゴヌクレオチド内に組み込まれ、当該技術分野で周知である。これらおよび/または他の修飾主鎖とともに合成されるアンチセンスおよび三重鎖分子もまた、本発明の一部を構成する。

20

30

【0159】

細胞内の標的遺伝子の発現を阻害する別の方法では、一部または完全に二本鎖の性質を有するRNAを細胞内または細胞外環境に導入する。阻害は、標的遺伝子の一部分に由来するヌクレオチド配列が阻害性RNAの作製に選択されているという点で、特異的である。該RNAは、1つ以上の重合リボヌクレオチド鎖を含むものであってもよく、リン酸-糖主鎖またはヌクレオシドのいずれかに対して修飾を含むものであってもよい。二本鎖構造は、1本の自己相補性RNA鎖または2本の相補鎖によって形成され得る。阻害は、該RNAの二本鎖領域に対応するヌクレオチド配列が遺伝子阻害の標的となる点で、配列特異的である。標的配列の一部分と同一のヌクレオチド配列を含むRNAが好ましい。RNA阻害手法の例は、国際特許出願WO99/32619を見るとよい。

40

【0160】

また、上方調節されるIBS-MSGタンパク質の発現は、前記タンパク質をコードするmRNA配列に特異的なリボザイムを使用することにより抑制され得る。リボザイムは触媒的に活性なRNAであり、天然または合成のものであり得る(例えば、Usman,

50

Nら、Curr. Opin. Struct. Biol (1996) 6 (4), 527 - 33を参照)。合成リボザイムは、前述のmRNAを選択した位置で特異的に切断し、それにより前記mRNAの機能性ポリペプチドへの翻訳が抑制されるように設計され得る。リボザイムは、RNA分子に通常見られるような天然リボースのリン酸主鎖と天然塩基を用いて合成され得る。あるいはまた、リボザイムは、リボヌクレアーゼ分解からの保護をもたらす非天然主鎖（例えば、2'-O-メチルRNA）を用いて合成され得、修飾塩基を含んでいてもよい。

【0161】

別の代替例として、被験体においてIBSを予防または処置するために、上記の上方調節されるIBS-MSGに結合し、その活性を中和する抗体が使用され得る。本発明のポリペプチドに対して生成される抗体は、該ポリペプチドまたはエピトープ含有断片、類縁体またはこれらを発現する細胞を、動物、好ましくは非ヒト動物に、常套的なプロトコルを用いて投与することにより得られ得る。抗体は、ポリクローナルであってもモノクローナルであってもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。モノクローナル抗体の調製のため、細胞株の連続培養によって産生される抗体をもたらす任意の手法が用いられ得る。例としては、ハイブリドーマ手法（Kohler, G. およびMilstein, C., Nature (1975) 256: 495 - 497）、トリオーマ手法、ヒトB細胞ハイブリドーマ手法（Kozborら、Immunology Today (1983) 4: 72）およびEBV-ハイブリドーマ手法（Coleら、MONOCLONAL ANTI BODIES AND CANCER THERAPY, pp. 77 - 96, Alan R. Liss, Inc., 1985）が挙げられる。モノクローナル抗体、特に、齧歯類（例えば、マウス）に由来するものが、種々の疾患の処置に使用されている。しかしながら、その使用（例えば、ヒト抗マウス免疫グロブリン応答の誘導）には制限があり、急速なクリアランスおよび処置の有効性の低下が引き起こされる。例えば、齧歯類のモノクローナル抗体の臨床使用における大きな制限は、治療中での抗グロブリン応答である（Millerら、Blood, 62: 988 - 995 1983; Schroffら、Cancer Res., 45: 879 - 885, 1985）。

【0162】

当該技術分野では、動物の抗原結合可変ドメインがヒト定常ドメインに連結された「キメラ」抗体を構築することにより、この問題の解決が試みられている（米国特許第4, 816, 567号; Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851 - 6855, 1984; Boulianneら、Nature, 312: 643 - 646, 1984; Neubergerら、Nature, 314: 268 - 270, 1985）。キメラ抗体は、好ましくは、実質的または排他的にヒト抗体定常領域に由来する定常領域と、実質的または排他的にヒト以外の哺乳動物の可変領域の配列に由来する可変領域とを有するものである。かかるヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小限の配列を含むキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはその断片（Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂もしくは抗体の他の抗原結合部分配列など）である。非ヒト抗体のヒト化方法は、当該技術分野で周知である（概説については、VaswaniおよびHamilton, Ann Allergy Asthma Immunol., 81: 105 - 119, 1998ならびにCarter, Nature Reviews Cancer, 1: 118 - 129, 2001を参照）。一般的に、ヒト化抗体は、非ヒト供給源由来の1つ以上のアミノ酸残基が導入されている。このような非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、インポート（import）残基と称され、典型的にはインポート可変ドメインから採用される。ヒト化は、本質的に当該技術分野において知られ方法に従って（Jonesら、Nature, 321: 522 - 525, 1986; Riechmannら、Nature, 332: 323 - 329, 1988; およびVerhoevenら、Science, 239: 1534 - 1536 1988）、齧歯類のCDRまたは他のCDR配列を、ヒト抗体の対応する配列で置き換えることにより行なわれ得る。したがって、かかるヒト化抗体は、実質的にインタクトに満たないヒト可変ドメインが、

非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体である（例えば、米国特許第4,816,567号を参照）。実際、ヒト化抗体は、典型的には、一部のCDR残基と場合によっては一部のFR残基が、齧歯類の抗体内の類似部位に由来する残基で置換されたヒト抗体である（Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596, 1992）。

【0163】

本発明のモノクローナル抗体のカクテルは、妊娠関連高血圧性障害（子癇前症または子癇など）に対する有効な処置剤として使用され得る。該カクテルは、2、3もしくは4程度の少数の異なる抗体を含むもの、または6、8または10種もの多数の異なる抗体を含むものであり得る。また、本発明の抗体は、現在IBSの処置に使用されている薬物（例えば、CNI-1493）またはIBSもしくはIBSと関連する症状の処置に使用される任意の他の投与薬物と併用してもよい。

10

【0164】

本発明の方法に有用な抗体の非限定的な例は、以下のとおり：抗IBS1；抗VSI G2、例えば、市販の抗VSI G2抗体（Abcam製）[ab24235、マウスモノクローナル皮質胸腺細胞抗体]および抗MUC20である。

【0165】

また、COP1、PSME2、F13A1、NCF4、CSF1R、M160、KCNS3、LYZ、MS4A4A、HELLS、RFC4、MCM5、TAP2、LRAP、DTLおよびVSI G4のレベルは、IBSを有する被験体において減少していることがわかった。したがって、本発明はまた、これらのポリペプチドまたは核酸分子の任意の1種以上の発現レベルまたは生物学的活性を増大させる任意の方法および薬剤を包含する。かかる薬剤（より詳細に後述）としては、該ポリペプチドの任意の1種以上の生物学的活性を上方調節または増大させる化合物、例えば、このようなポリペプチドまたは該ポリペプチド自体の精製形態をコードするオリゴヌクレオチドが挙げられる。

20

【0166】

タンパク質の不十分な発現に関連する異常な状態を処置するため、いくつかのアプローチもまた利用可能である。アプローチの一例は、被験体に、本発明のポリペプチドを活性化する化合物（すなわち、上記のアゴニスト）の治療有効量を、薬学的に許容され得る担体との組み合わせで投与し、それにより異常な状態を緩和することを含むものである。本発明による方法に有用なIBS-MSGアゴニストの例は、リゾチーム（LYZ）アゴニスト、例えば、シクロスポリンA（リゾチーム放出の誘導）、1-エチル-ベンズイミダゾリノン（1-EBIO）、カルバコール、タブシガルジンおよびフェニレフリンなど；NADPHオキシダーゼの活性化因子、例えば、アンジオテンシンII [Ang II]、PMA、TNF-、増殖因子、トロンビンおよび酢酸ミリスチン酸ホルボール（PMA）など；ならびにインターフェロン-によるPSME2およびTAP2の誘導である。

30

【0167】

あるいはまた、被験体において関連細胞による哺乳動物系プリンパーミアーゼの内因的産生をもたらすため、遺伝子治療が使用され得る。例えば、本発明のポリヌクレオチドは、上記のように、複製欠陥レトロウイルスベクターでの発現のために操作され得る。次いで、レトロウイルス発現構築物は単離され、本発明のポリペプチドをコードするRNAを含有するレトロウイルスプラスミドベクターで形質導入されたパッケージング細胞内に、該パッケージング細胞が、目的遺伝子を含有する感染性ウイルス粒子を産生するように導入され得る。このようなプロデューサー細胞は、被験体に、細胞のインビボ操作および該ポリペプチドのインビボ発現のために投与され得る。遺伝子治療の概要については、Human Molecular Genetics, T StrachanおよびAP Read, BIOS Scientific Publishers Ltd (1996)の第20章、Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches（およびそこに挙げられた参考文献）を参照のこと。別のアプローチは、治療量の本発明のポリペ

40

50

プチドを、適当な医薬用担体との組み合わせで投与することである。

【0168】

上記に基づき、さらなる態様において、本発明は、治療有効量のポリペプチド、例えば、本発明のポリペプチドの可溶性形態、アゴニスト/アンタゴニストペプチドまたは小分子化合物を、薬学的に許容され得る担体または賦形剤との組み合わせで含む医薬組成物を提供する。かかる担体としては、限定されないが、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびその組合せが挙げられる。本発明は、さらに、本発明の前述の組成物の成分の1種類以上が充填された1つ以上の容器を含む医薬パックおよびキットに関する。本発明のポリペプチドおよび他の化合物は、単独または他の化合物（治療用化合物など）と組み合わせで使用され得る。

10

【0169】

該組成物は、投与経路（例えば、全身性または経口経路）に適合される。全身性投与の好ましい形態としては、注射、典型的には静脈内注射が挙げられる。他の注射経路（皮下、筋肉内または腹腔内など）が使用され得る。全身性投与のための代替的手段としては、胆汁塩またはフシジン酸または他のデタージェントなどの浸透剤を用いる経粘膜および経皮投与が挙げられる。また、本発明のポリペプチドまたは他の化合物が、腸溶性製剤またはカプセル封入製剤に製剤化され得る場合、経口投与も可能であり得る。また、このような化合物の投与は、貼付剤、軟膏、ペースト剤、ゲル剤などの形態で局所的および/または局部的であり得る。

20

【0170】

必要とされる投薬量の範囲は、選択された本発明のペプチドまたは他の化合物、投与経路、製剤の性質、被験体状態の性質、および主治医の判断に依存する。しかしながら、好適な投薬量は、被験体の $0.1 \sim 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ の範囲である。しかしながら、利用可能な化合物の多様性および種々の投与経路の効率性の差異を鑑みると、必要な投薬量には広範な変動が予測される。例えば、経口投与は、静脈内注射による投与よりも高い投薬量が必要であることが予測され得る。このような投薬量レベルの変動は、最適化のための標準的な常套的実験を用いて調整され得、これは当該技術分野において充分理解されている。

【0171】

処置に使用されるポリペプチドはまた、被験体において内因的に生成されたものであってもよく、処置モダリティにおいて、上記のように、しばしば「遺伝子療法」と称される。したがって、例えば、被験体由来の細胞は、ポリヌクレオチド（DNAまたはRNAなど）によりポリペプチドをコードするように、例えば、レトロウイルスプラスミドベクターの使用によってエキソピボで操作され得る。次いで、該細胞を被験体に導入する。

30

【実施例】

【0172】

本発明は、以下の詳細な実施例を参照することによって、より良好に理解されよう。しかしながら、当業者には、これらが、添付の特許請求の範囲により十分に記載した本発明の例示にすぎないことは容易に認識されよう。

【0173】

さらに、本出願書類全体を通して、種々の刊行物を引用している。これらの刊行物の開示は、本発明が属する技術分野の技術水準をより十分に示すために、引用により本明細書に組み込まれる。

40

【0174】

実験手順

本発明の目的は、IBSの病因の分子的機序をさらに理解することであり、常套的な臨床実務と同様にして採取した生検材料を使用し、S状結腸粘膜のマイクロアレイ発現プロファイリング研究を行なった。

【0175】

本明細書において以下により詳細に説明するように、本発明者らの研究には、36例の

50

IBS患者(21例のIBS-Dおよび15例のIBS-C)ならびに25例の健常対照被験体を含めた。患者はすべて、IBS診断(Thompsonら、1999)のRome II基準を満たしており、臨床検査を受けており、他の胃腸管の障害は除外した。患者は、標準的なアンケートによって研究時に確認された主な腸機能障害に基づいて選択した。S状結腸鏡検査時、各参加者から2つのS状結腸生検材料を採取した。健常およびIBSにおける分子署名の安定性を評価するため、10例の被験体(5例のIBS患者および5例の健常対照)から、2~3ヶ月後にさらなる第3の結腸生検材料を採取した。

【0176】

方法

被験体の募集および結腸生検試料の採取

IBS参加者は、Rochester(Minnesota, USA)から半径150マイル以内に居住している752例のIBS患者の管理データベースから選択し、郵送で募集した。IBS患者はすべて、胃腸科専門医スタッフにより、内視鏡検査、生検材料および直腸排出試験を含む臨床表示試験によって既に評価済みであった。患者は、標準的なアンケート(Talleyら、1990)によって研究時に確認された主な腸機能障害に基づいて選択した。健常志願者は、Rochester, MNで一般広告によって募集した。参加の案内状に応募した参加者はすべて、研究のインフォームドコンセント(Mayo Clinic Institutional Review Boardによって承認済)に署名した。各参加者は、有効腸疾患アンケート(Talleyら、1990)(Rome II基準(Thompsonら、1999)に対応する質問を含む)に記入した。また、腸疾患アンケートには、非潰瘍性消化不良の特徴である身体化障害および症状を確認することを意図した心身症状のチェックリストを含め、疫学的研究に拡張して使用した。

【0177】

参加者は、General Clinical Research Center(Charlton 7)に参加して、結腸生検材料採取のための軟性S状結腸鏡検査を受けた。生検手順による出血のリスクのため、アスピリンまたは抗凝血剤を服用している参加者は、この投薬が内視鏡検査の少なくとも1週間前までに中止不可能であった場合、除外した。2つのリン酸ナトリウム塩注腸剤(Fleet(登録商標)注腸剤、C.B Fleet, Lynchburg, VA)を、S状結腸鏡検査の1時間前に投与した。生検材料は、外観が正常粘膜からのみ採取した。すなわち、内視鏡圧による浮腫を伴う領域は回避した。S状結腸鏡検査は、Mayo Clinicにおける臨床基準の場合と同様、鎮静なしで行ない、被験体を、生検後60分間モニタリングし、任意の出血または他の合併症の徴候がなく安定であることを保証した。標準的な大型の生検用鉗子を使用し、15例のIBS-C、21例のIBS-D患者および25例の健常対照から、2つのS状結腸粘膜生検材料を採取した。これらの被験体のうち10例(5例の対照および5例のIBS患者)を無作為に選択し、データ再現性を評価するために、最初の採取から2~3ヶ月後に第2のIRB承認S状結腸鏡検査を受けさせた。

【0178】

アレイ処理およびデータ前処理

採取時、結腸生検試料は、直ちに5容量のRNA Later溶液(Ambion, Austin, TX)中に浸漬させ、さらなる解析まで-20で保存した。組織をミキサミル501(Qiagen, Venlo, The Netherlands)にて、RLT細胞溶解バッファー(Qiagen)中で均質化した後、RNeasyミニキット(Qiagen)を用いてカラム上でのDNアーゼ処理により、破碎細胞からRNA抽出を行った。1μgの全RNAをピオチン標識し、Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChipマイクロアレイ上で、供給元(Affymetrix, Santa Clara, CA)の使用説明書に従ってハイブリダイズさせた。試料数が大きいため(n=132)、実験室でのこの処理は、4つの異なるバッチで行ない、各々には、IBSと健常被験体の両方の試料を含めた。未処理のAffymetrix G

10

20

30

40

50

eneChipデータの遺伝子発現サマリー値を、gcRMAアルゴリズム(Wuら 2004)(これは、GC親和性を考慮して、バックグラウンド調整、分位標準化および要約を行なう)を用いてコンピュータ処理した。PANP(Warrenら、2006)を、遺伝子の非存在または存在の呼び出し検出に使用し、1つの処置群の試料の少なくとも50%において存在が呼び出された場合は、遺伝子をフィルター処理した(McClintickおよびEdenberg, 2006)。種々の試料処理バッチの効果は、標準化後の明白なままであった。この技術的変動源を、元のバッチの関数として(in function of)一元配置ANOVAにおいて、発現レベルをモデル設計することにより補正し、このモデルの残差を、その後のすべての解析に使用した。最後に、擬似複製(Hurlbert 1984)により誤った結果が得られるのを回避するため、SAMおよびPAM解析について、複製試料の発現値を患者ごとに平均した(下記参照)。

10

【0179】

反復測定の一貫性の評価

同じ患者での経時的および組織空間の試料の再現性を定量するため、1000個の最も可変的な遺伝子プローブ、ならびにPAM解析においてIBS疾患状態を予測することがわかった32遺伝子プローブの組について、一致係数(Lin 1989)を算出した。

【0180】

差次的に発現された遺伝子の試験

マイクロアレイの有意性解析(SAM)を、IBS患者対健常者において差次的に発現される遺伝子の特定に適用した(0.05のDを使用)(Tusherら、2001)。また、代替法として、混合型ANOVAの適用(バッチおよび疾患状態は固定、患者は変量効果、FDR補正あり(Storeyら、2003))によって、より厳密な統計学的モデルを、未処理データ(すなわち、バッチ補正前のすべての生検試料処理前データ)に適用した。

20

【0181】

分類

疾患状態の予測のため、マイクロアレイ予測解析(Predictive Analysis of Microarray)(PAM)を適用した。これは、収縮重心法(Tibshiraniら、2002)を用いた最短重心分類の向上型変法である。8例のIBS患者および8例の健常被験体由来の試料を、モデル構築工程とは独立して維持し、起こり得る過剰適合がチェックされるようにモデルの予測力を評価した。

30

【0182】

階層的クラスタリング

分子署名の基礎構造を特定するため、階層的クラスタリング(Spotfire Decision Site 8.2 ソフトウェア)を、PAMおよびSAM解析の両方で選択された16遺伝子プローブの組に適用した。

【0183】

URL

SAMソフトウェアは、<http://www-stat.stanford.edu/~tibbs/SAM/>で入手可能である。

40

【0184】

PANPソフトウェアは、<http://people.brandeis.edu/~dtaylor/PANP/>で入手可能である。

【0185】

結果および考察

試料解析

各結腸生検試料から調製したビオチン標識全RNAを、Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChip マイクロアレイ(Affymetrix)においてハイブリダイズさせた。得られた未処理データファイル(バックグラウンド調整、データの標準化および変換、ならびに技術的バッチ変動に対する補正を含む)の前処

50

理により、各試料の遺伝子発現サマリー値のプロフィールが示された。これを、すべてのさらなる解析に使用した。

【0186】

任意の有用なバイオマーカに対する必要条件は、個々の被験体における遺伝子発現プロフィールの再現性である。一致係数（これは、一組の点が、どれだけ良好に同一性（identity）直線と適合しているかの指標である（Lin 1989））を、マイクロアレイ上の1,000の最も可変的な遺伝子プローブを用いて、同じ患者の反復試料間で測定した。2つの同時に採取された試料間的一致（ 0.7 ± 0.03 ）および3ヶ月の間隔をあけて同じ人から採取された2つの試料間的一致（ 0.41 ± 0.03 ）はともに、全体一致（ 0.25 ± 0.12 ；Mann-Whitney U検定；それぞれ、 $W = 3510$ 、 $p < 0.0001$ および $W = 6744$ 、 $p < 0.0001$ ）よりも有意に高かった。IBS患者と健常対照との間に一致の値に有意差は観察されなかった（図1A）。S状結腸生検材料の全体の発現プロフィールは、2つの部位および2つの採取時点の試料で比較的安定であったため、各患者の2つの採取結腸試料の遺伝子プローブ発現レベルを、その後の解析（マイクロアレイの有意性解析（SAM）および分類など（下記参照））のために平均した。さらに、反復採取試料のサブグループに選択したものは、元の研究群の代表とした。これを、反復試料採取する10例の個体（5例の健常対照および5例のIBS患者）を、なんら選択基準を考慮することなく無作為に選択することにより評価した。帰納的に、スペクトルマップ解析を用いて、このサブグループの被験体がコホート全体を代表するか否か確認した。この解析のグラフ出力（6つの第1主成分の複合効果をまとめたもの）は、確かに、反復試料採取のために選択された被験体が、コホート全体を代表することを示す（図2）。

10

20

【0187】

次に、SAMアルゴリズム（Tusherら、2001）を用いて、IBS患者と健常対照間で差次的に発現された遺伝子に関する調査を行なった。5%偽発見率で、25の遺伝子プローブセットがIBSと健常者間で、q値0.1の有意性レベルで差次的に発現されることがわかった。これらの25の有意な（ $q < 0.1$ ）遺伝子プローブセットは、20個の異なる遺伝子を示し、健常対照と比べ、IBS患者において4個は上方調節および16個は下方調節されていた（表1）。また、代替的な統計学的アプローチも、標準化された未処理データに適用した。これは、混合型ANOVAモデルであり、バッチおよび疾患状態を固定し、患者は変量効果とし、偽発見率補正を有した（Storeyら、2003）。この解析により、SAM解析と同等のq値を有する非常に類似した遺伝子のリストが得られた（表1）。有意に差次的に発現された遺伝子は、発現レベルの微妙な変化を反映した。該有意な遺伝子のうち数個のみが、IBS患者と健常対照間で > 1.5 倍の発現レベルの変化を有した。

30

【0188】

【表 6】

表 1

プローブセット	遺伝子記号	q-値 SAM	q-値 ANOVA	変化倍数	遺伝子 アノテーション	
対照と比べて IBS 患者で高発現						
225809_at	<i>IBS1</i>	0.018	0.03	1.41	DKFZP564O0823 (IBS1)	
204687_at	<i>IBS1</i>	0.018	0.01	1.24	DKFZP564O0823 (IBS1)	
226622_at	<i>MUC20</i>	0.018	0.05	1.52	ムチン 20	10
229369_at	<i>VSIG2</i>	0.023	0.01	1.20	Vセットおよび免疫	
231941_s_at	<i>MUC20</i>	0.030	0.07	1.47	グロブリンドメイン含有 2 ムチン 20	
200884_at	<i>CKB</i>	0.039	0.05	1.29	クレアチンキナーゼ、脳	
対照と比べて IBS 患者で低発現						
223655_at	<i>M160</i>	0.018	0.05	0.69	スカベンジャー受容体 システイン高含有 1 型タンパク質 M160 (CD163 抗原様 1)	
204787_at	<i>VSIG4</i>	0.023	0.05	0.66	Vセットおよび免疫グロブリンドメイン含有 4	
211368_s_at	<i>CASP1</i>	0.030	0.05	0.75	カスパーゼ 1、アポトーシス関連システインペプチダーゼ (インターロイキン 1、β、コンバーターゼ)	20
205147_x_at	<i>NCF4</i>	0.030	0.05	0.70	好中球細胞質ソル因子 4、40 kDa	
1555745_a_at	<i>LYZ</i>	0.030	0.11	0.48	リゾチーム	
205968_at	<i>KCNS3</i>	0.039	0.10	0.66	カリウム電位型チャネル、遅延整流、	
211367_s_at	<i>CASP1</i>	0.039	0.06	0.75	サブファミリー 3 カスパーゼ 1、アポトーシス関連システインペプチダーゼ (インターロイキン 1、β、コンバーターゼ)	
201762_s_at	<i>PSME2</i>	0.045	0.01	0.84	プロテアソームアクチベータ サブユニット 2 (PA28β)	30
211366_x_at	<i>CASP1</i>	0.049	0.06	0.76	カスパーゼ 1、アポトーシス関連 システインペプチダーゼ	

【 0 1 8 9 】

【表 7】

プローブセット	Gene 遺伝子記号	q-値 SAM	q-値 ANOVA	変化倍数	遺伝子 アノテーション
219607_s_at	MS444A	0.056	0.13	0.74	(インターロイキン1、β、コンバージョン) 膜通過4-ドメイン、サブファミリーA、 構成員4
220085_at	HELLS	0.058	0.07	0.82	ヘリカーゼ、リンパ系特異的
1552703_s_at	COP1	0.080	0.06	0.81	カスパーゼ1ドミナント ネガティブ阻害薬偽1CE
203561_at	FCGR2A	0.080	0.08	0.77	IgGのFc断片、 低親和性IIa、受容体 (CD32)
204023_at	RFC4	0.084	0.06	0.83	複製因子C (アクチベータ1) 4、37kDa
206011_at	CASP1	0.084	0.11	0.77	カスパーゼ1、アポトーシス関連 システインペプチダーゼ (インターロイキン1、 β、コンバージョン)
216237_s_at	MCM5	0.084	0.08	0.76	MCM5ミニ染色体維持欠損5、 細胞分裂周期46 (S、セレピシエ)
225973_at	TAP2	0.084	0.16	0.71	輸送体2、ATP結合カセット、 サブファミリーB (MDR/TAP)
219759_at	LRAP	0.084	0.21	0.39	白血球由来アルギニンアミノペプチダーゼ
218585_s_at	DTL	0.084	0.11	0.79	Denticlelessホモログ (ショウジョウバエ)

10

20

【0190】

同定された20個の有意な遺伝子の大部分が、免疫応答または細菌侵入に対する宿主の防御システムにある役割を果たしていることは注目に値する。健常対照と比べたIBS患者の結腸粘膜において差次的に発現された遺伝子の概略全体像を図3に示す。IBS患者と健常者間で差次的発現を有する一部の有意な遺伝子の発現レベルのプロットを図4に示す。

30

【0191】

抗原プロセッシングに影響する遺伝子の改変

IBS患者の結腸粘膜において有意に低い発現レベルを有する少なくとも3つの遺伝子は、主要組織適合性I複合体：P S M E 2 (プロテアソームアクチベータサブユニット2、P A 2 8)、T A P 2 (輸送体2、ATP結合カセット、サブファミリーB)、およびL R A P (白血球由来アルギニンアミノペプチダーゼ)による抗原のプロセッシングおよび提示の経路に不可欠な役割を果たしている。P A 2 8は、クラスI主要組織適合性複合体 (MHC) ペプチド (P r e c k e l ら、1999)の抗原プロセッシングを担う細胞質ゾル免疫プロテアソーム複合体の合成に不可欠である。T A P 2は、T A P 1とともに、小胞体 (ER) 膜内でヘテロ二量体膜貫通ATP結合カセット (A B C) 輸送体を形成しており、これは、細胞質ゾルからERへの抗原性ペプチドの送達に不可欠であり、ERでは、このペプチドがMHCクラスI分子上に負荷される。T A P 2は、T A P 1とは異なり、単離において非常に不安定であり、機能性T A Pの生合成は、新たに合成されたT A P 2による既存のT A P 1の合成に依存するが、逆はそうではなく、これは、主に、T A P 2発現によって活性輸送体分子の数が調節されることを示す (K e u s e k o t t e n ら、2006)。ERでは、MHCクラスI分子は、前駆体を抗原性ペプチドにトリミングするアミノペプチダーゼに依存している。L R A P (ERアミノペプチダーゼ2 (E R A P 2)とも称される)は、タンパク質またはペプチド基質のN末端アミノ酸の加水分解

40

50

を担う重要な酵素の1つである (Saveanuら、2005)。総合すると、IBS患者の結腸粘膜におけるPSME2、TAP2およびLRAPの有意に低い発現レベルは、MHCクラスI抗原提示における機能的活性が、これらの患者においてモジュレートされていることを強く示す。

【0192】

免疫応答を制御する遺伝子の改変

また、本発明者らの研究において、他の6個の有意に改変された遺伝子：VSI G2、VSI G4、FCGR2A、MS4A4A、M160およびMUC20が免疫応答に関与している(それぞれのq値については表1を参照)。Vセットおよび免疫グロブリンDメイン含有タンパク質ファミリー(VSIG)の構成員であるVSI G4の発現は減少しているが、別の近縁ファミリー構成員であるVSI G2の発現は、これらの被験体の結腸粘膜において高くなっている。IBS患者におけるVSI G4およびVSI G2の遺伝子発現の同時に起こるが反対の改変の意義は、これらの遺伝子の機能に関する最近の知見を考慮すると非常に興味深い。VSI Gファミリーの構成員すべての機能的役割は、まだ充分研究されていないが、VSI G4は、食作用および/または抗原提示によって媒介される免疫応答の調節に重要と思われる(Kimら、2005)。別の有意な遺伝子改変は、IBS患者の結腸においてモジュレートされた免疫応答システムのさらなる証拠が、FCGR2A(CD32)であることを示し、これは、免疫グロブリンFc受容体をコードしている。この受容体は、循環系から抗原抗体複合体を除去することによる外来抗原に対する生物体の防御に不可欠である。Fc受容体は、単球、マクロファージ、好中球、ナチュラルキラー(NK)細胞、ならびにTおよびBリンパ球上に存在しており、免疫複合体の食作用およびB細胞による抗体産生のモジュレーションに関与している(Unkles J C, 1989)。また、MS4A4AおよびCD163分子様1(M160)の発現もIBS患者において低い。MS4A4Aは、別の免疫グロブリン受容体のサブユニットホモログであり、CD163分子様1(M160)は、スカベンジャー受容体システム高含有スーパーファミリーの膜アンカー型構成員であり、主に、免疫系と関連する細胞において発現される。

10

20

【0193】

局部防御機構に関与している遺伝子の改変

他方において、細胞表面結合ムチン20タンパク質(MUC20にコードされている)の発現は、IBS患者において上昇している。この遺伝子は、主に腎臓で発現されることが知られており、発現の上昇は、IgA腎症患者ならびに数例の腎臓障害モデルの近位尿細管由来の上皮細胞において報告されている(Higuchiら、2004)。さらに、炎症誘発性物質、例えば、リポ多糖(LPS)、13-酢酸12-ミリスチン酸ホルポール(PMA)または腫瘍壊死因子などで尿細管上皮細胞株を刺激すると、MUC20 mRNA発現が有意に増大する。IBS患者の結腸粘膜に見られるMUC20発現の上昇は、局所の損傷または炎症に対する応答を反映しているかもしれない。

30

【0194】

病原体に対する宿主の防御応答に関与している遺伝子の改変

少なくとも4個の差次的に発現された遺伝子(LYZ、CASP1、COP1、NCF4)(表1)は、結腸において病原体に対する宿主の防御応答に関与している。抗菌因子リゾチーム(LYZ)(その天然基質は、細菌細胞壁のペプチドグリカンである)の発現レベルはIBS患者において有意に低く、これは、IBS患者の結腸における先天性免疫の障害の生物学的根拠が存在し得ることを示す。この機能は、さらなる研究を必要とする。パネート細胞は、小腸粘膜の分泌性上皮細胞であり、リゾチームを含む抗菌性のペプチドの主な供給源である。また、この抗菌性防御物質は、ほとんどの場合は粘膜の先天性免疫応答機構として、パネート細胞の化生によって結腸内の炎症部位に漸増され得る(Wehkampら、2006)。結腸の粘膜の先天性免疫システムがIBS患者において冒されているか否かには、さらなる研究が必要とされる。炎症誘発性サイトカイン、例えば、インターロイキン-1(IL-1)およびインターフェロン(IFN-)などは

40

50

、抗菌的防御システムの重要な成分である。IL-18は、IFN- 刺激因子であり、さまざまなグラム陽性およびグラム陰性菌病原体に対する防御に重要な役割を果たしている。IL-1 およびIL-18の合成は、システインプロテアーゼカスパーゼ1 (CASP1) (インターロイキン-1 (IL-1) 変換酵素としても知られる) によるその前駆体タンパク質 (プロ-IL-1 およびプロ-IL-18) のタンパク質分解的切断に依存する。実際、カスパーゼ-1欠損マウスは、IL-18およびIL-1 のインビボ産生に大きな欠陥を有し、これは、致死用量の内毒素/LPSに対する抵抗性によって行なわれる (Lira, 1995)。このマウスはまた、先天性の宿主防御機構の機能不全のため、野生型マウスよりも致死的大腸菌感染に対する感受性が2~3倍高い (Joshiら, 2002)。カスパーゼ-1ドミナントネガティブ阻害薬 (COP1) (偽ICEとしても知られる) は、カスパーゼ-1と物理的に相互作用してその活性化をブロックし、したがってIL-1 およびIL-18の分泌をブロックする。

【0195】

CASP1およびCOP1の発現はともに、IBS患者の結腸粘膜において減少している。CASP1とCOP1の遺伝子は、染色体IIq上で隣接しており、両遺伝子は、その同一の組織分布に基づき、類似した転写調節下にあることが示唆されている (Drullheら, 2001)。しかしながら、CASP1およびCOP1のmRNA発現の改変の、そのタンパク質の発現レベルならびにその後のIL-1 およびIL-18の産生に対する効果は不明である。本発明者らの研究集団の試料では、IL-1 は差次的に発現されなかったが、直腸粘膜でのIL-1 のmRNA発現の増大が、後天性感染後IBS患者において、最近報告されている (Gweeら, 2003)。

【0196】

NADPHオキシダーゼ複合体は、最初に、食細胞において同定および特徴付けされ、該細胞で、酸素とNADPHからのスーパーオキシドの酸化的バーストの生成を触媒することにより、微生物生物体に対する非特異的宿主防御に不可欠な役割を果たしている。NADPHオキシダーゼの構造は、2つの膜結合要素 (gp91^{phox} およびp22^{phox}、それぞれ、CYBBおよびCYBAにコードされている)、3つの細胞質ゾル成分 (p67^{phox}、p47^{phox} およびp40^{phox}、それぞれ、NCF2、NCF1およびNCF4にコードされている)、ならびに低分子量Gタンパク質 (rac1またはrac2のいずれか、RAC1およびRAC2にコードされている) からなる。該酵素複合体の活性化は、細胞膜への細胞質ゾル成分の移動と関連しており、そのため、完全なオキシダーゼが合成され得る (DecourseyおよびLigeti, 2005)。したがって、IBS患者の結腸粘膜におけるNCF1とNCF4の低発現により、NADPHオキシダーゼ酵素複合体の膜結合要素に輸送される細胞質ゾル成分の不足が引き起こされ得、食細胞発現型NADPHオキシダーゼの活性の減衰がもたらされ得る。該オキシダーゼの不可欠な触媒性コアであるgp91^{phox} (最近では、Nox2とも称される) は、いくつかの非常に類似したオキシダーゼからなるファミリーに属する。NADPHオキシダーゼ複合体のホモログは、数多くの非食細胞の細胞型で同定されており、例えば、結腸の表面粘膜上皮細胞で主に発現されるNox1酵素複合体が挙げられる (Kikuchiら, 2000)。種々の酵素複合体ホモログは、そのサブユニットの組成に基づいて、分子レベルで識別され得る。食細胞において発現されるNox2複合体と比較すると、Nox1複合体はp22^{phox} (CYBA) サブユニットを共有しているが、gp91^{phox} (CYBB)、p47^{phox} (NCF1) およびp40^{phox} (NCF4) サブユニットは、それぞれ、NOX1、NOXO1およびNOXA1に置き換えられている。興味深いことに、IBS患者の少なくともサブセットの結腸粘膜におけるNOX1発現の上昇のボーダーラインは、マイクロアレイ上のいくつかのNOX1プローブセットで見られた (206418__at; 207217__s__at; 210808__s__at)。ヒト結腸上皮細胞は、IFN- (Kawanoraら, 2006) およびサルモネラ・エンテリティディス由来のフラゲリン (Kawaharaら, 2004) に応答してNox1発現を誘導し、スーパーオキシド産生を上方調節することが示された。ヘリコバクターピロ

10

20

30

40

50

リのリポ多糖は、ヒトの胃粘膜において持続性の炎症および T_H1 免疫応答の増強を引き起こすことが知られており、これはまた、モルモットの胃粘膜細胞においてNOX1とNOX2のmRNA発現を刺激した後、スーパーオキシドの生成を上方調節する(Kusumotoら、2005)。NOX/DUOXオキシダーゼ遺伝子ファミリーの別の構成員は、デュアルオキシダーゼ(dual oxidase)2(DUOX2)であり、これは、消化管全体において発現され、最大レベルは、盲腸とS状結腸の粘膜表面上皮細胞において見られる(El Hassaniら、2005)。また、DUOX2のmRNA発現レベルは、IBS患者のS状結腸粘膜生検材料において高度に増大していることがわかった(DUOX1はそうではなかった)(219727__at, q = 0.15, 3.8倍増大、これは、すべての遺伝子で最も大きな変化倍数である)。DUOX2は(DUOX1とは対照的に)、構成的ではなく誘導的に発現されるデュアルオキシダーゼと考えられているため、およびDUOX2は、感染または炎症時に、ロバストな自己限定的な応答をもたらすため(Harperら、2005)、この所見は、いくぶん驚くべきことかもしれない。デュアルオキシダーゼは、NADPHオキシダーゼドメイン(H_2O_2 生成を担う)とヘムペルオキシダーゼドメイン(これは、ミエロペルオキシダーゼおよびラクトペルオキシダーゼなどのいくつかのペルオキシダーゼと近縁種である)の両方を含む。これらのオキシダーゼは、宿主の防御機構に不可欠な役割を有するスーパーオキシドおよび H_2O_2 などの反応性酸素種(ROS)の上皮での供給源を提供する(Geiszlerら、2003; El Hassaniら、2005)。IFN- γ などの炎症誘発性刺激はDUOX2の発現を誘導し、 H_2O_2 生成の上昇をもたらす(Harperら、2005)。腸免疫性におけるデュアルオキシダーゼの直接的な役割は、ショウジョウバエにおいて示された。デュアルオキシダーゼ発現がサイレント化された成虫のハエは、微生物汚染食物の摂取による軽微な感染後であっても、死亡率の著しい増大を示した。この効果はデュアルオキシダーゼの再導入によって逆転され得、これは、該酵素によって、腸内での微生物の増殖を制限する上皮での特殊な酸化バーストが生じることを示す(Haraら、2005)。DUOX2発現の上昇は、IBS患者の結腸における軽度だが慢性的な炎症状態の存在を示すと考えられる。総合すると、IBS患者の結腸における多サブユニットNADPHオキシダーゼ/デュアルオキシダーゼ酵素複合体のいくつかの構成員の発現の改変は、結腸内への細菌および他の侵入物質に対する宿主の防御応答がIBS患者において攪乱されているという仮説のさらなる裏づけを示す。

10

20

30

40

50

【0197】

過敏性腸症候群における新規遺伝子の上方調節

最後に、IBS患者の結腸粘膜生検材料において、最も有意に上方調節されたプローブセットの2つ(図5A)は、公の配列データベースにDKFZP56400823(NCBI GeneID: 25849)とアノテーションされたものと同じ遺伝子を示す。この遺伝子は、本明細書ではIBS1(過敏性腸症候群1)と名称変更している。インシリコ解析では、IBS1の5kbのcDNA配列が、930bpのオープンリーディングフレームを含むことが示されており、これは、シグナルペプチド(20AA)、細胞外領域(238AA)、膜貫通領域(21AA)、および細胞内領域(31AA)を含む310アミノ酸(AA)の予測原形質膜タンパク質をコードしている。

【0198】

IBS1遺伝子のマウスホモログは、RIKEN cDNA 9130213B05として知られており、細胞表面の糖タンパク質前駆体としてさらにアノテーションされている。ラットでは、IBS1ホモログは、去勢すると前立腺腹部で上方調節され、アポトーシスと関連する遺伝子と確認され、したがって、Cipar-1(去勢誘導型前立腺アポトーシス関連タンパク質1)またはPARM-1(前立腺アンドロゲン抑制メッセージ1)とアノテーションされた(Bruyninxら、Endocrinology, 1999, 140: 4789-4799; Cornetら、Prostate, 2003, 56: 220-230)。

【0199】

ヒトDKFZP56400823遺伝子に関する文献は、PubMedにおいてまだ入手可能ではないが、Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)には、炎症および免疫応答における役割を指摘するヒトDKFZP56400823遺伝子の発現の有意な変化に関するマイクロアレイ実験データが含まれている。第1の研究では、種々の組織に由来する一次ヒト内皮細胞が、炎症性および免疫サイトカインでチャレンジされた。DKFZP56400823の発現は、TNFに曝露すると、IFNまたはIL-4への曝露と比べて一次結腸内皮細胞において増大した(図6A)。後者の2つは、主にTヘルパー細胞サブセットと関連しているが、TNFは、炎症性応答と免疫学的応答の両方において重要な機能を有する多面発現性のサイトカインである。結腸内皮細胞に関するこれらのデータは、大規模な研究の一部を構成しているにすぎないため、このような実験に関する刊行物には、DKFZP56400823に関する結果が含まれておらず、むしろ、周知の遺伝子に重点が置かれている(Sanara, Cytokine 2005; 29: 256-269)。

10

20

30

40

50

【0200】

第2の研究では、遺伝子発現が、サル免疫不全ウイルス(SIV)由来のNefタンパク質の誘導後のジャーカットCD4+T細胞において評価された(Ndoloら, Virology 2006; 353: 374-387)。Nefタンパク質は、SIV(およびHIV)感染症の初期に発現され、細胞表面の主要組織適合性複合体クラスI(MHC-I)分子を下方調節し、それにより、免疫回避(immune evasion)が助長される。マイクロアレイ実験は、充分特徴付けされた多くの遺伝子の中で、特にDKFZP56400823遺伝子の発現は、SIV-Nefによって上方調節されることを示す(図6B)。

【0201】

文献のこれらの2つの後者の研究は、対照と比べたIBS患者の結腸における免疫応答の変化を示す本発明者らの結果と、概念的には一致している。免疫応答に対する効果によるDKFZP56400823遺伝子とIBSとの生物学的関連の仮説には、さらなる機能的特性評価が必要とされる。

【0202】

該遺伝子は、主に結腸と胎盤で発現されるが、多くの他の組織でも見られる。ヒト、マウスおよびラットホモログのアミノ酸配列アラインメントにより、膜貫通領域と細胞内領域において、高度に保存された配列が示されている(これらの領域での3種間のアミノ酸配列同一性は、それぞれ95%および94%)が、細胞外領域における相同性は低い(51% AA配列同一性)(図5C)。

【0203】

IBS1の機能的役割に関して現在わかっている情報がないため、IBS患者の結腸における発現レベルの増大の結果は不明である。しかしながら、マイクロアレイ上に2つの独立した遺伝子プローブセットにより、この遺伝子が、2つの独立した解析(SAMおよび混合型ANOVA)の中で最も有意であると確認されたこと、およびこれらの2つのプローブセット単独に基づいて、IBSと健常の比較的良好な識別が可能であること(図7、図5B)は注目に値する。

【0204】

差次的に発現される遺伝子がIBSの原因か否か、そうではなくIBSの結果であるか否かは不明である。IBSは、おそらく複雑な多因子性障害であるため、多くの遺伝子が関与している可能性があるが、各々の表現型全体に対する寄与は比較的少ない。主に、IBS患者の結腸粘膜における多くの遺伝子の発現の微妙な変化を示す本発明者らの結果は、この概念を裏付けている。特定の遺伝子の発現の改変は、場合によっては、IBS患者のサブセットのみで観察される。これは、表現型は共通するが原因となる分子的機序が不均一であることを反映している可能性がある。発現に有意な変化を有する遺伝子のほとんどは、管腔内抗原もしくは細菌の侵入またはその炎症誘発性効果に対する宿主の応答に関

与する類似した機能的細胞プロセスに関与している。同定された遺伝子におけるこの機構特異性の程度を考慮すると、この2つの適用した統計学的方法論を用いて偶然取り出したとき、これらが偽陽性関係を示すことは、起こりにくいと考えられる。

【0205】

粘膜遺伝子発現プロファイリングに基づいたIBSの分子診断の可能性

その臨床的関連性のため、続いて、S状結腸発現プロファイルに基づいたIBSの分子診断の予測力を評価した。したがって、61例の被験体を訓練組と試験組に無作為に分けた。訓練組(n=45)は、17例の健常被験体と28例のIBS患者(16例のIBS-D、12例のIBS-C)で構成し、試験組(n=16)は、残りの8例の健常対照と8例のIBS患者(5例のIBS-D、3例のIBS-C)で構成した。続いて、過剰適合に対してかなりロバストであるため、多くの測定値および比較的少数の試料でのデータセットにおいて良好に実施されることが示された2つの異なる独立した分類解析方法を適用した。まず、有効組に対してマイクロアレイの予測解析(Prediction Analysis for Microarrays)(PAM)(Tibshiraniら、2002)を使用し、32遺伝子プローブセット署名を得(図8)、平均クロスバリテーション誤分類率は22%であった(健常およびIBS被験体について、それぞれ、13/17例および22/28例が正しく分類された)。この分子署名を試験組の独立した試料に対して使用すると、PAMにより参加者の75%の疾患状態が正しく予測され、患者と健常者と等しく正確に予測された。誤分類率が訓練組(22%)と試験組(25%)で同様であったため、過剰適合は問題ではないようであった。

10

20

【0206】

32遺伝子プローブセットの分子署名をさらに有効にするため、再現性を測定した。すると、分子署名は、同じ患者の同時に採取された試料の反復試料間(一致 0.76 ± 0.05)、および2~3ヶ月の間隔をあけて採取された2つの試料間(一致 0.67 ± 0.04)で、高度に再生可能であった。患者では、一致は、参加者間の全体の一致よりも有意に高かった(一致 -0.02 ± 0.02 ; 不等分散でのMann-Whitney U検定; それぞれ、 $W = 3938$ 、 $p < 0.0001$ および $W = 7683$ 、 $p < 0.0001$)(図1B)。

【0207】

最後に、PAMおよび訓練組のみの試料に対して行なったSAM解析で共通して同定された遺伝子プローブの選択により、分子署名のプローブ数をさらに少なくすることを試みた。得られた16プローブの組は11個の異なる遺伝子を表しており、次いで、これを、研究の61例すべての被験体(すなわち、訓練組と試験組の両方)を含めた教師なし分類法、すなわち階層的クラスタリングに使用した。このクラスタリング方法により、一方では、一緒になった種々の被験体から類似した遺伝子発現プロファイルを有する遺伝子プローブが分類され、他方ではまた、類似性の尺度として平均連鎖と相関性を使用し、クラスタ階層に一緒になった16遺伝子プローブから類似した発現プロファイルを有する結腸試料が分類される(図9A)。遺伝子プローブ(X軸)の階層の第1レベルでは、IBS患者と健常対照との比較において、上方調節または下方調節された遺伝子プローブセット間で明白な識別が行なわれた。被験体(Y軸)の階層の第1レベルでは、IBS患者のサブセットが、他のすべての被験体と分離され、これは、F13A1、NCF4、M160、CSF1Rおよび/またはFCGR2Aの低発現レベルによって強く決定されるようである。第2の階層的クラスタリングレベルでは、主に、IBS患者群と健常個体群に対応するさらに2つの群が分離される。分類のための遺伝子プローブセットを選択するのに使用した訓練組の試料について予測され得るように、良好な分離が観察された(健常被験体およびIBS患者で、それぞれ、14/17例および25/28例が正しく分類された)。全体的に、試験組被験体では、16例のうち11例が正しく分類され(69%)、上記のPAM解析の結果と一致する。陽性予測値(すなわち、分子署名を有する人が実際にIBS患者である確率: 6/8)は75%であり、一方、陰性予測値(すなわち、分子署名を持たない人がIBS患者でない確率: 5/8)は63%であった。さらなる研究により、

30

40

50

予測値、感度および特異性をより正確に測定することが可能であるが、結腸粘膜におけるこれらの分子署名が、IBS患者の大部分に対して特定力を有することは、既に明白である。この知見は、共通の分子署名に基づいてIBS患者の特定のサブグループが規定され、したがってより個別化された医療への道が開かれる可能性を示す。結腸粘膜生検材料における分子署名の評価により、医師が、IBSの診断、および個々の患者に対する最も有益な治療戦略を決定するのを補助するための新たな補足的ツールが提供される。

【0208】

結果に対する性別または薬物処置の影響の可能性は、考慮されるべきである。コホートにおける性別と薬物処置の分布のグラフ表示が図9Bに挙げられており、これは、このような潜在的交絡因子による分類解析に対する潜在的影響は、あったとしてもわずかであったであろうことを示す。これは、署名遺伝子の組を用いたさらなる混合型ANOVA解析によって確認された。以下のことがわかった。

10

【0209】

a. 投与薬物は、これらの遺伝子の発現レベルに影響しなかった（投与薬物の影響の試験では、すべて $q > 0.7$ ）

b. 投与薬物と疾患との間に相互作用はなく、これは、該遺伝子発現が疾患状態に応じた投与薬物（すなわち、健常とIBS）に影響されなかったことを示す（投与薬物と疾患状態との間の相互作用の試験では、すべて $q > 0.1$ ）

c. 性別は、これらの署名遺伝子の発現レベル（投与薬物の影響の試験では、すべて $q > 0.9$ ）または健常者とIBS患者間の差（性別と疾患状態との間の相互作用の試験では、すべて $q > 0.9$ ）に影響しなかった

20

独立した手法、逆転写定量的ポリメラーゼ連鎖反応（RTQ-PCR）によるマイクロアレイ解析で見られた遺伝子発現の変化の確認データ

マイクロアレイデータ解析で同定された12個の遺伝子を、有効蛍光発生TaqMan遺伝子発現アッセイ-オン-デマンド（Applied Biosystems）による確認解析のために選択した。TaqManアッセイの結果の標準化を対照SART1遺伝子に対して行なった。それは、この遺伝子が、早くに安定であることがわかっていたため、また結腸試料において適度に発現される（Camilleri Mら、Gastroenterology 2007）ためである。全体的に、IBS患者と健常被験体間で発現レベルの変化倍数を比較すると、データは、AffymetrixマイクロアレイとTaqMan間でデータの実質的な一致を示す（図10）。FCGR2A遺伝子を除く、解析した12個の遺伝子のうち11個が、健常被験体と比べて、IBSにおいて発現の上方調節または下方調節という同じ傾向を示した。IBSと健常被験体間の有意差（ $p < 0.05$ ）は、12個の遺伝子のうち6個において確認され、これらは、変化倍数の値が最も大きい遺伝子であった。この有意性レベルは、変化倍数の差がより微妙な遺伝子では得られなかった。これは、TaqMan法では、遺伝子発現データを単一の参照遺伝子（本発明者らのアッセイではSART1）に対してのみ標準化しているが、マイクロアレイ法では、マイクロアレイ上の他のすべての遺伝子に対して個々の各遺伝子の発現レベルを標準化することが可能であることによって、一部説明され得る。これは、SART1遺伝子の遺伝子発現変動が比較的少ない場合であっても、RTQ-PCR手法を使用すると、目的遺伝子の標準化された発現レベルにノイズ（および変動）が導入されることを意味する。したがって、TaqMan手法は、マイクロアレイと比べて感度に関していくつかの利点を有する（すなわち、マイクロアレイ手法では解析が不可能であり得る低発現の遺伝子が、RTQ-PCRを用いて解析され得る）が、TaqManアッセイではマイクロアレイ解析と比べて、比較的大きな群内変動がしばしば見られることは明白である。

30

40

【0210】

まとめると、TaqManアッセイで得られたデータにより、個々の遺伝子の変化倍数レベルに関するマイクロアレイデータの大部分が確認される。

【0211】

結論として、いくつかの差次的に発現される遺伝子が、IBS患者の結腸粘膜に見られ

50

る。これらの遺伝子の多くは、宿主の防御機構の変化に関する。宿主の防御機構に関与しているタンパク質、または差次的に発現される遺伝子にコードされたタンパク質は、IBSのための新規薬物の開発のための潜在標的となり得る。IBS患者において発現が上昇している最も有意な遺伝子は、機能が不明である十分に特徴付けされていない膜タンパク質(DKFZP564O0823)をコードするものであり、これに対して、名称IBS1を提案する。限定的な遺伝子の組に基づいた結腸における遺伝子発現の分子署名により、IBS疾患状態が予測され得る。このような遺伝子発現プロフィールは数ヶ月にわたって安定であり、これは、分子署名によってIBSの診断が改善され、治療有効性がモニタリングされる可能性を示す。少なくとも、IBS患者におけるこのような生物学的な差は、結腸に客観的な差があること、および該疾患が、中枢神経系の知覚の障害のみを示すのではないことを示す。

【 図 2 】

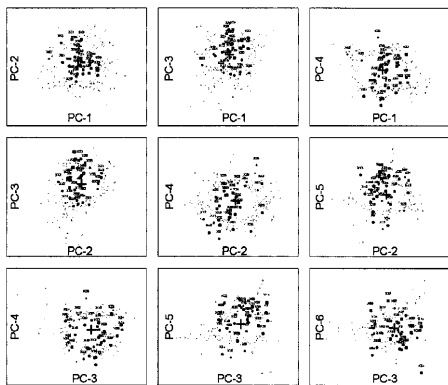


Figure 2

【 図 4 】

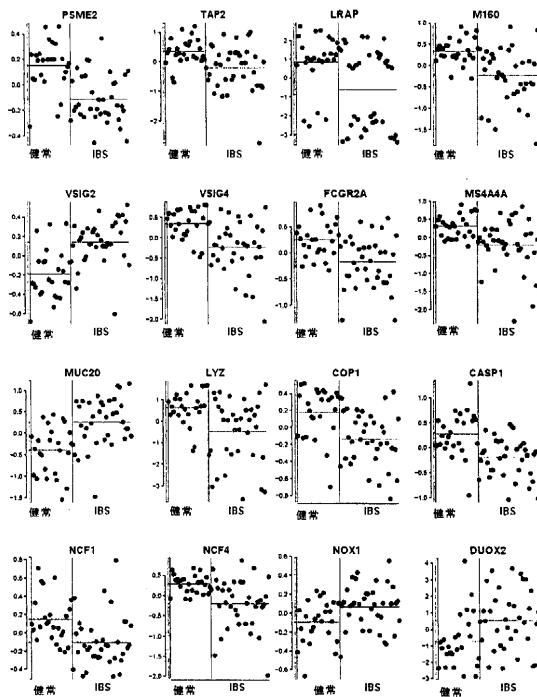


Figure 4

【 図 5 - 1 】

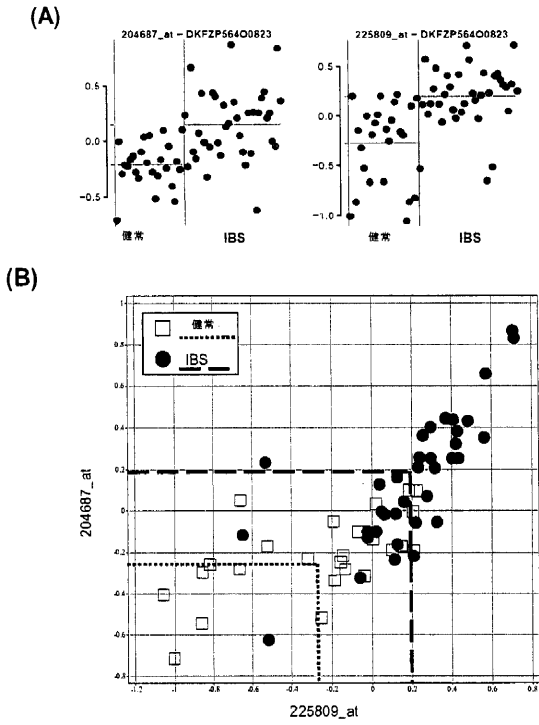


Figure 5

【 図 7 】

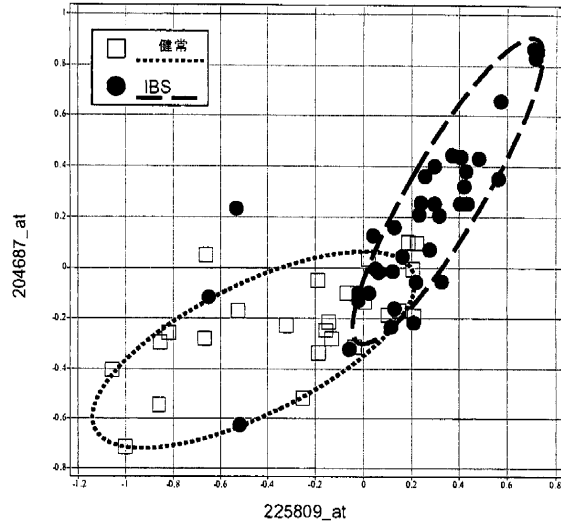


Figure 7

【 図 8 】

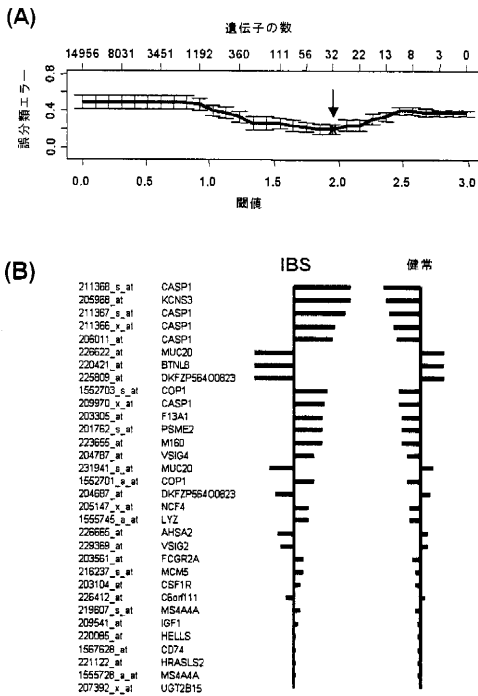


Figure 8

【 図 10 】

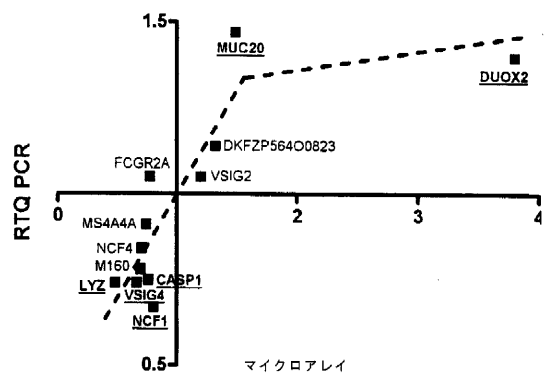


Figure 10

【 図 1 - 1 】

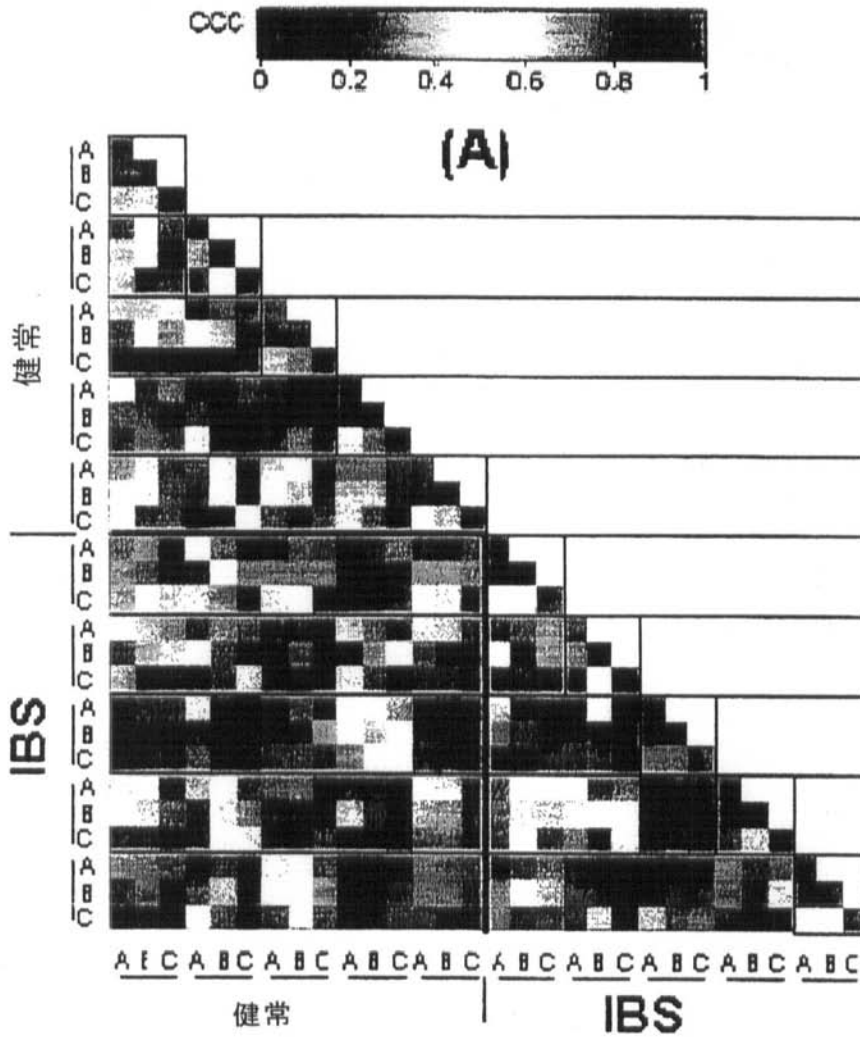


Figure 1

【 図 1 - 2 】

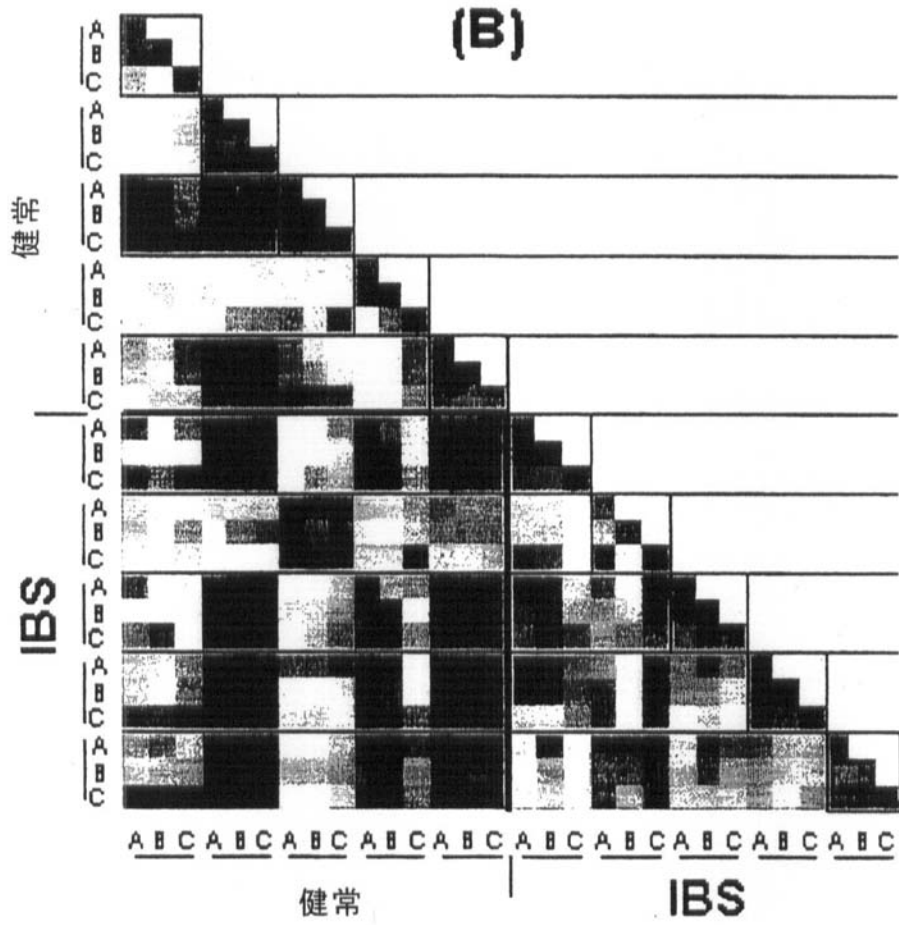


Figure 1 (continued)

【 図 3 】

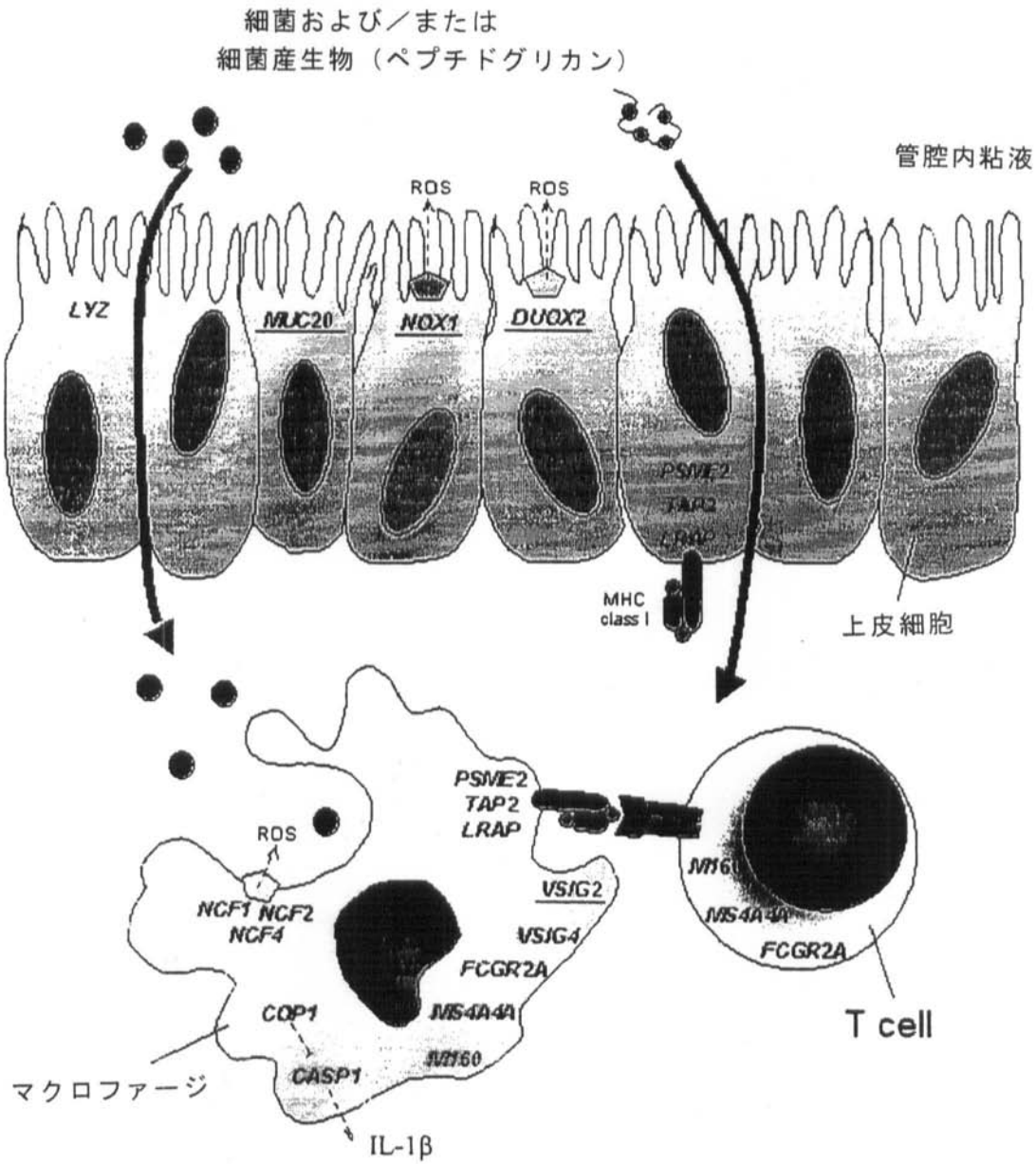


Figure 3

【 図 5 - 2 】

(C)

Hs_NP_056208 : MVYKTLFALCILTAGWRVQSLPTSAPLSVSLPTNIVPPTTIWTSSPQNTD : 50
 Mm_NP_663537 : MVCKVLIALCIFTAGLRVOGSP-TVFLPVSLMTKSSAPVATWTTSAPIHA : 49
 Rn_NP_775137 : MVCKALITLCIFAAGLMVOGSPPTLLVSLITTKSTAPMATWTTSAQHTA : 50

シグナルペプチド

Hs_NP_056208 : ADTASPSNGITHNNSVLPVTASAPTSLLPKNISIESREEEITSPGNSWEGT : 100
 Mm_NP_663537 : RATTPVASATHNASVLRRTTAASLTSQLPT---D-HREEAVTSPPLKRDMV : 95
 Rn_NP_775137 : MATTPVASATHNASVLRRTTAASLTSQLPTHP---REEAVTSPPLKREVN : 96

Hs_NP_056208 : NTDSPSPGFSSTSGGVHLTTLEHNSGTPEAGVAATLSQSAAPPTLIS : 150
 Mm_NP_663537 : STDSSPAGFPSTSSDGHLEFTPEEHSLSGSPATVVPATGSQ---PMLLS : 141
 Rn_NP_775137 : STDSSPTGFPSSNSSGIHLARTPEEHSLSGSPETSVVPATGSQ---PTLIF : 142

Extracellular region

Hs_NP_056208 : PQAPASSPSSLSSTSPPEVFSASVTTNHSSTVTSTOPTGAPTAPESPTEES : 200
 Mm_NP_663537 : SQAPTSATSPATSLSLSSLSASVTSSINSTVANIQPTAPMAPASPTEEH : 191
 Rn_NP_775137 : SQGPTSASTSPATSPPEPLSASVTSNHSTVNNIQPTGAPMAPASPTEEH : 192

Hs_NP_056208 : SSDHTPTSHAFAEPVPOEKTPTTVSGKVMCELIDMETTTFPRVIMQEV : 250
 Mm_NP_663537 : SSSHTPTSHVTAEPVPKEKSPQDTEPGKVICES-----ETTPFLIMQEV : 236
 Rn_NP_775137 : SSSHTPTSHMTLEPVPKEKSPQDTEPGKVICES-----ETTPFLIMQEV : 236

Hs_NP_056208 : EHALSSGSIAAITVTVIAVLLVFGVAAYLKIRHSSYGRLDDHDYG--S : 298
 Mm_NP_663537 : ENALSSGSIAAITVTVIAVLLVFGGAAYLKIRHSSYGRLDDHDYG--S : 284
 Rn_NP_775137 : ENALSSGSIAAITVTVIAVLLVFGAAAYLKIRHSSYGRLDDHDYGSGS : 286

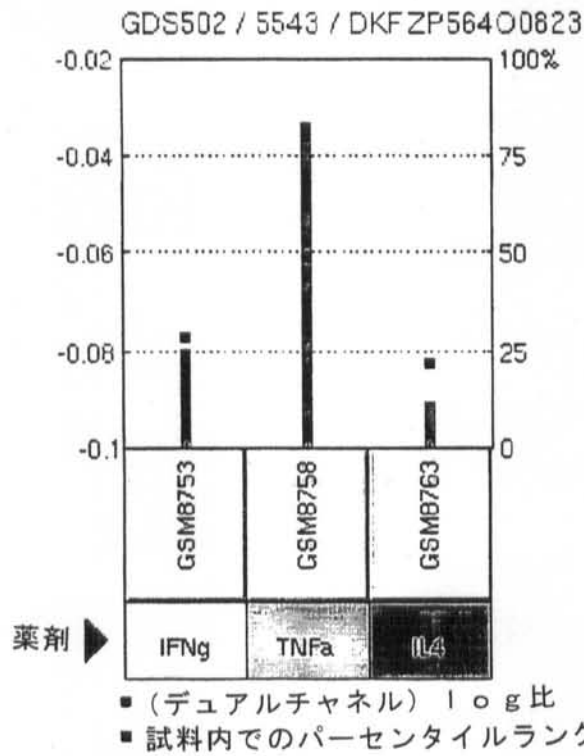
細胞質領域

Hs_NP_056208 : WGNYNPLYDDS : 310
 Mm_NP_663537 : WGNYNPLYDDS : 296
 Rn_NP_775137 : WGNYNPLYDDS : 298

Figure 5 (continued)

【図6】

(A)



(B)

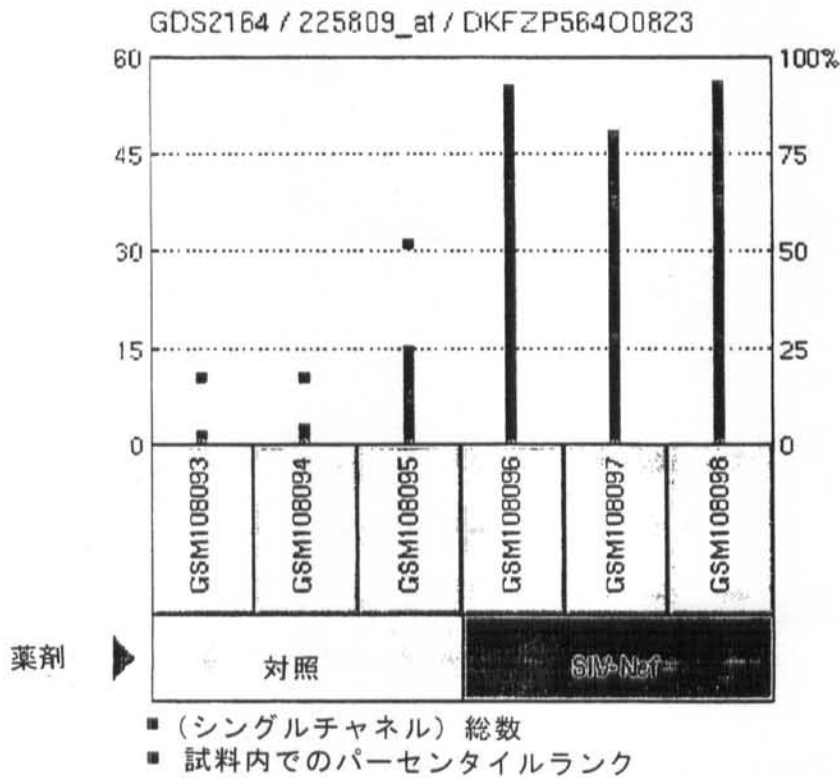


Figure 6

【 図 9 - 1 】

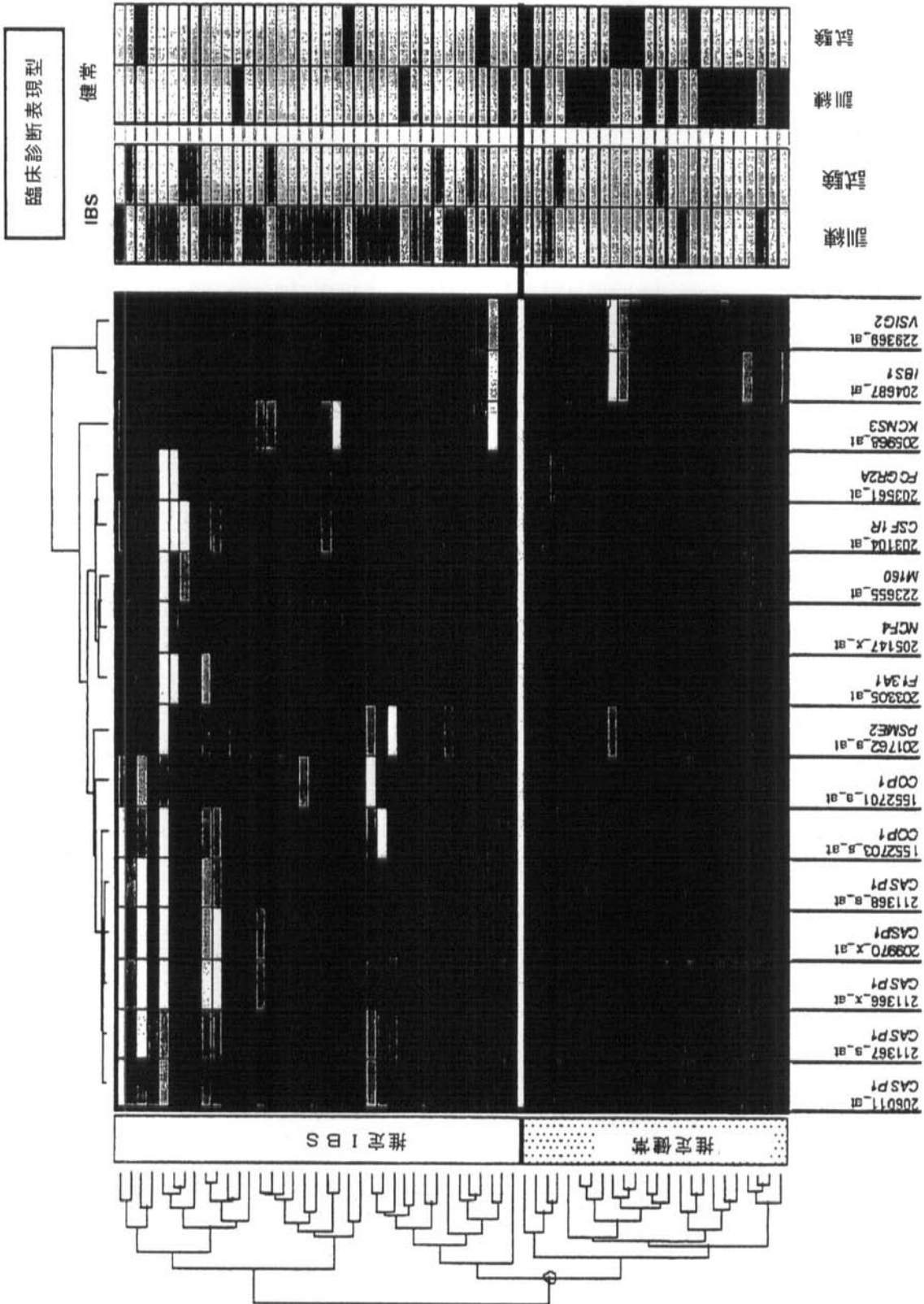


Figure 9 (A)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/EP2007/008872
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68 G01N33/53		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q 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) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PARK M-I ET AL: "Genetics and genotypes in irritable bowel syndrome: Implications for diagnosis and treatment" GASTROENTEROLOGY CLINICS OF NORTH AMERICA 2005 UNITED STATES, vol. 34, no. 2 SPEC. ISS., 2005, pages 305-317, XP008078496 ISSN: 0889-8553 the whole document	1-24
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. '&' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
28 March 2008		04/04/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Reuter, Uwe

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/EP2007/008872

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	COATES MATTHEW D ET AL: "Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome" GASTROENTEROLOGY, vol. 126, no. 7, June 2004 (2004-06), pages 1657-1664, XP002432328 ISSN: 0016-5085 the whole document	1-24
Y	OLSEN JORGEN ET AL: "Comparisons of gene expression in non-inflamed colonic mucosa reveal over-representation of genes from IBD susceptibility regions in IBD patients compared with control subjects" GASTROENTEROLOGY, vol. 126, no. 4, Suppl. 2, April 2004 (2004-04), page A355, XP008078502 & DIGESTIVE DISEASE WEEK/105TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-GASTROENTEROLOGICAL-ASSOCIATION; NEW ORLEANS, LA, USA; MAY 16 20, 2004 ISSN: 0016-5085 the whole document	1-24
Y	DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; April 2006 (2006-04), AERSSENS JEROEN ET AL: "Altered expression of TRP, Ca2+ and K+ channels in vagal visceral afferents in a post-infectious model of irritable bowel syndrome (IBS)" XP002433340 Database accession no. PREV200600504217 abstract & GASTROENTEROLOGY, vol. 130, no. 4, Suppl. 2, April 2006 (2006-04), page A441, DIGESTIVE DISEASE WEEK MEETING/107TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-GASTROENTEROLOGICAL-ASSOCIATION; LOS ANGELES, CA, USA; MAY 19 24, 2006 ISSN: 0016-5085	1-24
A	WO 2005/020902 A (CYTOKINE PHARMASCIENCES INC [US]) 10 March 2005 (2005-03-10) cited in the application the whole document	
A	WO 02/12434 A (GLAXO GROUP LTD [GB]; ALLAN CLAIRE JUDITH [GB]; POLLETT DIRK ERIK [GB]) 14 February 2002 (2002-02-14)	

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/008872

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SPILLER ROBIN C: "Irritable bowel syndrome" BRITISH MEDICAL BULLETIN, vol. 72, no. 1, 2005, pages 15-29, XP002432329 ISSN: 0007-1420</p>	
A	<p>NIELSEN O H ET AL: "Intestinal interleukin-8 concentration and gene expression in inflammatory bowel disease" SCANDINAVIAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY, vol. 32, no. 10, 1997, pages 1028-1034, XP008078412 ISSN: 0036-5521</p>	
A	<p>GWEE K -A ET AL: "Increased rectal mucosal expression of interleukin 1beta in recently acquired post-infectious irritable bowel syndrome." GUT, vol. 52, no. 4, April 2003 (2003-04), pages 523-526, XP008078461 ISSN: 0017-5749</p>	
A	<p>DROSSMAN D A ET AL: "AGA technical review on irritable bowel syndrome." GASTROENTEROLOGY, vol. 123, no. 6, December 2002 (2002-12), pages 2108-2131, XP002432330 ISSN: 0016-5085</p>	
A	<p>DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; April 2006 (2006-04), ANDREWS CHRISTOPHER ET AL: "Serotonin-transporter (SERT) polymorphism genotype and SERT expression in mucosal biopsies of patients with irritable bowel syndrome" XP002433341 Database accession no. PREV200600502261 abstract & GASTROENTEROLOGY, vol. 130, no. 4, Suppl. 2, April 2006 (2006-04), page A24, DIGESTIVE DISEASE WEEK MEETING/107TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-GASTROENTEROLOGICAL-ASSOCIATION; LOS ANGELES, CA, USA; MAY 19 24, 2006 ISSN: 0016-5085</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2007/008872

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005020902 A	10-03-2005	NONE	
WO 0212434 A	14-02-2002	AU 7859901 A EP 1356412 A2	18-02-2002 29-10-2003

フロントページの続き

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

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

(74)代理人 100085132

弁理士 森田 俊雄

(74)代理人 100083703

弁理士 仲村 義平

(74)代理人 100096781

弁理士 堀井 豊

(74)代理人 100109162

弁理士 酒井 將行

(74)代理人 100111246

弁理士 荒川 伸夫

(74)代理人 100124523

弁理士 佐々木 真人

(72)発明者 シールマンズ, テーオドーア・ビクトール・コンスタント

ベルギー、ベー - 2 3 4 0 ベールス、レニア・スニダーストラート、2 2

(72)発明者 アーセズ, ユルーン・マルセル・マリア・ロゲール

ベルギー、ベー - 3 2 2 1 ニューロード、クライカント、2 2 / セー

(72)発明者 タロエン, ビレム・ジャン・ポール・エドモンド

ベルギー、ベー - 2 6 0 0 アントワープ、アウワーストラート、5 8

(72)発明者 シールマンズ, レーン・アルベール・レオナーダ

ベルギー、ベー - 2 3 5 0 ボッセラール、デ・ポピュリエケンス、1 1

(72)発明者 カミレーリ, マイケル・エル

アメリカ合衆国、5 5 9 0 2 ミネソタ州、ロチェスター、フォース・ストリート・エス・ダブリュ、9 3 2

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA09 CA11 HA14

4B063 QA01 QA19 QQ52 QR55 QR82 QS34

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2010505431A5	公开(公告)日	2010-11-04
申请号	JP2009531782	申请日	2007-10-11
[标]申请(专利权)人(译)	詹森药业有限公司 梅约医学教育与研究基金会		
申请(专利权)人(译)	扬森制药, 锡卡NV.Weserblick. 梅奥基金会的医学教育和研究		
[标]发明人	シールマンズテオドーアビクトールコンスタント アーセンズユルーンマルセルマリアロゲール タロエンビレムジャンポールエドモンド シールマンズレーンアルペールレオナーダ カミレーリマイケルエル		
发明人	シールマンズ,テオドーア・ビクトール・コンスタント アーセンズ,ユルーン・マルセル・マリア・ロゲール タロエン,ビレム・ジャン・ポール・エドモンド シールマンズ,レーン・アルペール・レオナーダ カミレーリ,マイケル・エル		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/136 C12Q2600/158 G01N33/5008 G01N33/6893 G01N2800/065		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.F G01N33/53.M G01N33/53.D G01N37/00.102		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ52 4B063/QR55 4B063/QR82 4B063/QS34		
代理人(译)	森田俊夫 堀井裕 酒井 将行 荒川信夫		
优先权	60/850659 2006-10-11 US 2006023597 2006-11-14 EP		
其他公开文献	JP2010505431A		

摘要(译)

本发明一般涉及与慢性内脏高敏感 (CVH) , 特别是肠易激综合征 (IBS) 相关的疾病的治疗和诊断。特别地, 本发明涉及已显示与CVH相关的多肽, 以及编码这些多肽的多核苷酸。此类多肽和多核苷酸可用于诊断, 治疗和/或预防与CVH相关的病症, 特别是用于诊断, 治疗和/或预防与IBS相关的病症。