(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2012-139228
(P2012-139228A)
(43)公開日　平成24年7月26日(2012.7.26)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	ZNAA	4B024
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	D	4B063
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	

審査請求 有　請求項の数 22　ＯＬ　外国語出願　（全 140 頁）

(21)出願番号　特願2012-49810 (P2012-49810)
(22)出願日　平成24年3月6日 (2012.3.6)
(62)分割の表示　特願2007-555366 (P2007-555366)の分割
原出願日　平成18年2月14日 (2006.2.14)
(31)優先権主張番号　60/653,078
(32)優先日　平成17年2月14日 (2005.2.14)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/715,503
(32)優先日　平成17年9月9日 (2005.9.9)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/717,861
(32)優先日　平成17年9月16日 (2005.9.16)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　511293663
ユニバーシティー　オブ　アイオワ　リサーチ　ファウンデーション
アメリカ合衆国　アイオワ　５２２４２，アイオワ　シティ，２００　サウス　キャピトル　ストリート，　ユニバーシティー　キャピトル　センター　２６６０，
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】加齢性黄斑変性を処置および診断するための方法および試薬

(57)【要約】　（修正有）
【課題】被験体における加齢性黄斑変性（ＡＭＤ）の発症に対する感受性の指標として、該被験体のゲノムが、ＡＭＤの発症に対する感受性の減少と関連した補体Ｈ因子（ＣＦＨ）遺伝子におけるハプロタイプをコードするか否かを使用する方法を提供すること。
【解決手段】ＣＦＨタンパク質の６２位にイソロイシンをコードする配列が、該被験体のゲノムの多型部位ｒｓ８００２９２に存在するか否かを決定する工程を包含し、ここで、該ハプロタイプの存在は、該被験体が、ＡＭＤの発症に対して減少した感受性を有することを示す。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
被験体における加齢性黄斑変性（ＡＭＤ）の発症に対する感受性の指標として、該被験体のゲノムが、ＡＭＤの発症に対する感受性の減少と関連した補体Ｈ因子（ＣＦＨ）遺伝子におけるハプロタイプをコードするか否かを使用する方法であって、該方法は、
ＣＦＨタンパク質の６２位にイソロイシンをコードする配列が、該被験体のゲノムの多型部位ｒｓ８００２９２（配列番号１２）に存在するか否かを決定する工程を包含し、ここで、
該ハプロタイプの存在は、該被験体が、ＡＭＤの発症に対して減少した感受性を有することを示す、方法。
【請求項２】
前記被験体由来の生物学的サンプルにおいて、ＣＦＲタンパク質またはＣＦＲタンパク質の６２位にイソロイシンを含むＣＦＲタンパク質をコードするＤＮＡにおいて配列番号１２の２１位にアデニンが存在することを検出する工程を包含する、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記生物学的サンプルが血清サンプルである、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記被験体の前記ゲノムにおいてＨ因子遺伝子内の２つの多型部位における前記配列を決定する工程を包含する、請求項１に記載の方法であって、ここで、第１の多型部位はｒｓ８００２９２であり、そして第２の多型部位はｒｓ１０６１１７０（配列番号１６）である、方法。
【請求項５】
（ｉ）前記被験体由来の核酸サンプルと、配列番号１２またはその相補鎖に選択的にハイブリダイズ可能である第１のポリヌクレオチドプローブおよび配列番号１６またはその相補鎖に選択的にハイブリダイズ可能である第２のポリヌクレオチドプローブとを合わせる工程、ならびに（ｉｉ）各々のプローブについて、ハイブリダイゼーションの存在または不在を検出する工程を包含する、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記プローブが、増幅反応においてポリヌクレオチド合成を開始可能である、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
（ａ）ＡＭＤを発症するリスクを評価するために、前記被験体から家族歴が以前に取得されたか、または（ｂ）ＡＭＤを発症するリスクを評価するために、該被験体に対して眼科的検査が以前に実行された、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
前記方法が、ＡＭＤの特定のサブタイプのさらなる指標を使用する、請求項１に記載の方法。
【請求項９】
前記サブタイプが、初期ＡＭＤ、地図状萎縮症または滲出性ＡＭＤ（ＣＮＶ）である、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
前記生物学的サンプルが細胞を含む、請求項２に記載の方法。
【請求項１１】
配列番号１２を含むＣＦＨ遺伝子のセグメントを増幅する工程を包含する、請求項２に記載の方法。
【請求項１２】
前記第１のポリヌクレオチドプローブが、ＣＦＨタンパク質の６２位にイソロイシンをコードする配列番号１２に選択的にハイブリダイズする、請求項５に記載の方法。
【請求項１３】

前記ＣＦＨタンパク質が免疫学的アッセイを使用して検出される、請求項２に記載の方法。
【請求項１４】
前記生物学的サンプルが細胞を含む、請求項１１に記載の方法。
【請求項１５】
被験体における加齢性黄斑変性（ＡＭＤ）の発症に対する感受性の指標として、ＣＦＨタンパク質の６２位にイソロイシンをコードする配列が、該被験体のゲノムの多型部位ｒｓ８００２９２（配列番号１２）に存在するか否かを使用する方法であって、該方法は、
ＣＦＨタンパク質の６２位にイソロイシンをコードする該配列が、該被験体のゲノムの多型部位ｒｓ８００２９２（配列番号１２）に存在するか否かを決定する工程を包含し、ここで、
６２位にイソロイシンをコードする配列の存在は、該被験体が、ＡＭＤの発症に対して減少した感受性を有することを示す、
方法。
【請求項１６】
（ａ）ＡＭＤを発症するリスクを評価するために、前記被験体から家族歴が以前に取得されたか、または（ｂ）ＡＭＤを発症するリスクを評価するために、該被験体に対して眼科的検査が以前に実行された、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記被験体のゲノムの少なくとも一部を配列決定する工程を包含する、請求項１５に記載の方法。
【請求項１８】
前記被験体由来の生物学的サンプルにおいて、ＣＦＨタンパク質をコードするＤＮＡまたはＲＮＡにおいて６２位にイソロイシンをコードする配列の存在を検出する工程、あるいはＣＦＲタンパク質の６２位にイソロイシンを含むＣＦＲタンパク質を検出する工程を包含する、請求項１５に記載の方法。
【請求項１９】
前記被験体由来の核酸サンプルと、ＣＦＨタンパク質の６２位にイソロイシンをコードする配列番号１２またはその相補鎖に選択的にハイブリダイズ可能であるポリヌクレオチドプローブとを合わせる工程、およびハイブリダイゼーションの存在または不在を検出する工程を包含する、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記プローブが、増幅反応においてポリヌクレオチド合成を開始可能である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
第１の被験体が、第２の被験体よりもＡＭＤを発症するリスクが低いことの指標としての、配列番号２にしたがってナンバリングされたＣＦＨタンパク質の６２位にイソロイシンをコードする配列を含む、補体Ｈ因子（ＣＦＨ）遺伝子の存在を使用するための方法であって、該方法は：
該第１の被験体において、配列番号２にしたがってナンバリングされたＣＦＨタンパク質の６２位にイソロイシンをコードする該配列を含む、補体Ｈ因子（ＣＦＨ）遺伝子の存在を検出する工程であって、ここで、６２位にイソロイシンをコードする配列の存在は、該被験体が、ＡＭＤの発症に対して減少した感受性を有することを示す、工程；ならびに
該第２の被験体において、ＣＦＨ遺伝子に、ＣＦＨタンパク質の６２位にイソロイシンをコードする該配列を含む配列が存在しないことを検出する工程、
を包含する、方法。
【請求項２２】
前記第２の被験体において、ＣＦＨ遺伝子において、ＣＦＨタンパク質の４０２位にヒスチジンをコードする配列の存在を検出する工程を包含する、請求項２１に記載の方法。
【発明の詳細な説明】

【技術分野】
【０００１】
（関連出願への相互参照）
本願は、米国仮出願第６０／６５０，０７８号（２００５年２月１４日出願）、同第６０／７１７，８６１号（２００５年９月１６日出願）、同第６０／７１５，５０３号（２００５年９月９日出願）、および同第６０／７３５，６９７号（２００５年１１月９日出願）の利益を主張し、これら全体の内容は、参考として本明細書に援用される。
【０００２】
（連邦政府によって資金提供された研究開発の下でなされた発明についての権利に関する申し立て）
本願に記載される研究は、ＮＩＨ眼研究所（Ｅｙｅ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）補助金ＥＹ１１５１５によって部分的に援助された。米国政府は本発明において特定の権利を有し得る。
【背景技術】
【０００３】
（発明の背景）
加齢性黄斑変性（ＡＭＤ）は、６０歳を超えた個人のほぼ１５％に罹患する、先進国における不可逆的な失明の主要な原因である（概説としては、非特許文献１、非特許文献２；非特許文献３；非特許文献４；非特許文献５；非特許文献６を参照のこと）。この年齢層には６億人の個人が見積もられている。ＡＭＤの有病率は年齢とともに増加し；軽度のまたは初期の型は、７５歳以上の人口のほぼ３０％、進行型は約７％に発生する（Ｋｌｅｉｎら、１９９２；Ｖｉｎｇｅｒｌｉｎｇら、１９９５ａ，１９９５ｂ）。臨床的には、ＡＭＤは、神経網膜の特殊な領域である網膜黄斑およびその下にある組織で発生する変性的変化に起因する中心視の進行性の喪失によって特徴付けられる。この疾患の最も重篤なまたは滲出性の型において、脈絡膜血管に由来する新生血管葉状体（ｆｒｏｎｄ）が、ブルーフ膜および網膜色素上皮（ＲＰＥ）を突き破り、典型的には、網膜の剥離および引き続く変性に至る。
【０００４】
遅発性複合障害であるＡＭＤは、遺伝因子および環境因子の組み合わせによって発生および／または調節されるようである（ＳｅｄｄｏｎおよびＣｈｅｎ、２００４；Ｔｕｏら、２００４；ＫｌｅｉｎおよびＦｒａｎｃｉｓ、２００３）。家族集積性研究は、遺伝要素がこの障害の２５％もに主として関与すると見積もった（Ｋｌａｖｅｒら、１９９８ａ）。広く行き渡っている仮説に従うと、ＡＭＤの症例の大部分は、複数の単一遺伝子障害の蓄積ではなく、定量的表現型、複数の感受性遺伝子座の相互作用の発現を表す。関与する遺伝子座の数、付与される起因し得るリスク、および種々の遺伝子座間の相互作用は不明瞭なままである。
【０００５】
連鎖および候補遺伝子スクリーニング分析は、ＡＭＤの遺伝学に限られた洞察を提供してきた。ＡＭＤについてのリスクの増加を伴う１つの遺伝子、ＡＢＣＡ４（Ａｌｌｉｋｍｅｔｓら、１９９７）およびリスクの減少を伴う１つの遺伝子、ＡｐｏＥ４（Ｋｌａｖｅｒら、１９９８ｂ、Ｓｏｕｉｅｄら、１９９８）の信頼できる関連性が報告されてきた。加えて、いくつかのグループが、ゲノム規模での連鎖分析の結果を報告している（Ｔｕｏら、２００４；Ｗｅｅｋｓら、２００４において概説されている）。特定の染色体領域、１ｑ２５－ｑ３１（ＡＲＭＤ１）に対するＡＭＤ表現型を有する１つの家族の連鎖が実証されている（Ｋｌｅｉｎら、１９９８）。ＨＥＭＩＣＥＮＴＩＮ－１は原因遺伝子であることが示唆されてきたが（Ｓｃｈｕｌｔｚら、２００３）、その役割は確実には確認されていない。いくつかの研究における染色体１ｑ上の重複する遺伝子座の同定（Ｗｅｅｋｓら、２００１；Ｉｙｅｎｇａｒら、２００３；Ｗｅｅｋｓら、２００４）は、この遺伝子座がＡＭＤ関連遺伝子を保有し得ることを示唆する。
【０００６】

ＡＭＤの発症と関連する特徴的な眼の病変であるドルーゼンの最近の研究は、ＡＭＤの初期型および後期型の機序において、炎症および他の免疫媒介性プロセス、特に補体活性化についての役割を関連付けてきた（Ｈａｇｅｍａｎら、１９９９，２００１；Ｍｕｌｌｉｎｓら、２０００，２００１；Ｒｕｓｓｅｌｌら、２０００；Ａｎｄｅｒｓｏｎら、２００２，２００４；Ｊｏｈｎｓｏｎら、２０００，２００１；Ｃｒａｂｂら、２００２；非特許文献４；Ｐｅｎｆｏｌｄら、２００１；Ｅｓｐｉｎｏｓａ－Ｈｅｉｄｍａｎら、２００３）。これらの研究は、終末経路の補体成分（Ｃ５、Ｃ６、Ｃ７、Ｃ８およびＣ９）および終末経路の活性化特異的補体タンパク質フラグメント（Ｃ３ｂ、ｉＣ３ｂ、Ｃ３ｄｇおよびＣ５ｂ－９）ならびに種々の補体経路調節因子および阻害因子（Ｈ因子、Ｉ因子、Ｄ因子、ＣＤ５５およびＣＤ５９を含む）が、ドルーゼンの中、ブルーフ膜（ＲＰＥおよび脈絡膜を隔てる、エラスチンおよびコラーゲンから構成される細胞外層）に沿って、およびドルーゼンを重層するＲＰＥ細胞の中にあることを明らかにしている（Ｊｏｈｎｓｏｎら、２０００，２００１；Ｍｕｌｌｉｎｓら、２０００，２００１；Ｃｒａｂｂら、２００２）。これらのドルーゼン関連分子の多くは、以前には肝臓によって主として合成されていると考えられていた、循環血漿タンパク質である。興味深いことに、多くはまた、ＲＰＥおよび／または脈絡膜細胞によって局所的に合成されるように見える。

【０００７】

補体系の活性化は、通常の宿主の防御および損傷に対する応答において主要な役割を果たす（Ｋｉｎｏｓｈｉｔａ、１９９１）。しばしば、特異的補体関連遺伝子における変異によって引き起こされるこの系の不適切な活性化および／または制御は、アテローム性動脈硬化症（Ｔｏｒｚｅｗｓｋｉら、１９９７；Ｎｉｃｕｌｅｓｃｕら、１９９９）、アルツハイマー病（Ａｋｉｙａｍａら、２０００）および糸球体腎炎（Ｓｃｈｗｅｒｔｚら、２００１）において示されたのと同様に、自己免疫続発症および局所的組織破壊に寄与し得る（Ｈｏｌｅｒｓ、２００３；ＬｉｓｚｅｗｓｋｉおよびＡｔｋｉｎｓｏｎ、１９９１；ＭｏｒｇａｎおよびＷａｌｐｏｒｔ、１９９１；ＳｈｅｎおよびＭｅｒｉ、２００３）。

【０００８】

ＩＩ型膜性増殖性糸球体腎炎（ＭＰＧＮ　ＩＩ）は、補体カスケードの代替経路の制御されない全身的な活性化と関連するまれな疾患である。この疾患は、腎糸球体基底膜中の補体の代替経路に関与するタンパク質であるＣ３およびＣ３ｃを含む異常に電子密度の高い物質の沈着によって特徴付けられ、これは最終的には腎不全を引き起こす。興味深いことに、ＭＰＧＮＩＩを有する多くの患者は、黄斑ドルーゼン、ＲＰＥ剥離および脈絡膜新生血管膜を発症し、これらは、臨床的および組成的にＡＭＤにおいて形成するものと区別できないが、これらはしばしば、１０歳代に検出される（Ｍｕｌｌｉｎｓら、２００１；Ｏ’Ｂｒｉｅｎら、１９９３；Ｈｕａｎｇら、２００３；Ｃｏｌｖｉｌｌｅら、２００３；Ｄｕｖａｌｌ－Ｙｏｕｎｇら、１９８９ａ，１９８９ｂ；Ｒａｉｎｅｓら、１９８９；Ｌｅｙｓら、１９９０；ＭｃＡｖｏｙおよびＳｉｌｖｅｓｔｒｉ、２００４；Ｂｅｎｎｅｔｔら、１９８９；ＯｒｔｈおよびＲｉｔｚ、１９９８；Ｈａｂｉｂら、１９７５）。

【０００９】

ＭＰＧＮＩＩを有する大部分の患者において、補体カスケードを調節することができないことは、Ｃ３ｂＢｂに対して指向された自己抗体によって媒介される。しかし、他のＭＰＧＮ　ＩＩ患者は、代替補体経路の主要な阻害因子であるＨ因子（非特許文献７；非特許文献８）における変異を保有する。Ｈ因子における点変異（Ｉ１１６６Ｒ）は、ヨークシャーピッグにおいてＭＰＧＮＩＩを引き起こし（非特許文献９）、Ｈ因子欠損マウスは重篤な糸球体腎炎を発症する（非特許文献１０）。さらに、関連する障害であるＭＰＧＮＩＩＩを有するいくつかの大家族の中での罹患した個体は、ＡＭＤについてのゲノム規模の連鎖研究において同定された遺伝子座に重なる領域である染色体１ｑ３１－３２（非特許文献１１）への連鎖を示す（上記を参照のこと）。この特定の遺伝子座は、多数の補体経路関連遺伝子を含む。補体活性化の調節因子（ＲＣＡ）遺伝子クラスターと呼ばれるこれらの遺伝子の１つのグループは、Ｈ因子、５つのＨ因子関連遺伝子（ＣＦＨＲ１、ＣＦ

ＨＲ２、ＣＦＨＲ３、ＣＦＨＲ４およびＣＦＨＲ５）、および第ＸＩＩＩ凝固因子のβサブユニットをコードする遺伝子を含む。Ｃ４ＢＰＡ、Ｃ４ＢＰＢ、Ｃ４ＢＰＡＬ２、ＤＡＦ（ＣＤ５５）ＣＲ１、ＣＲ２、ＣＲ１ＬおよびＭＣＰ（ＣＤ４６）を含む、補体経路関連遺伝子の第２のクラスターは、１ｑ２５－３１遺伝子座に直接隣接して存在する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【００１０】

【非特許文献１】Ｚａｒｂｉｎ、Ｅｕｒ Ｊ Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ（１９９８）８：１９９～２０６

【非特許文献２】Ｚａｒｂｉｎ、Ａｒｃｈ Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ（２００４）１２２（４）：５９８～６１４

【非特許文献３】Ｋｌｅｉｎら、Ａｍ Ｊ Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ（２００４）１３７（３）：５０４～５１０

【非特許文献４】Ａｍｂａｔｉら、Ｓｕｒｖ Ｊ Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ（２００３）４８（３）：２５７～２９３

【非特許文献５】ｄｅ Ｊｏｎｇ、Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌｏｇｉａ（２００４）２１８補遺１：５～１６

【非特許文献６】ｖａｎ Ｌｅｅｕｗｅｎら、Ｅｕｒ Ｊ Ｅｐｉｄｅｍｉｏｌ（２００３）１８（９）：８４５～８５４

【非特許文献７】Ａｕｌｔら、Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ（１９９７）２７２：２５１６８～２５１７５

【非特許文献８】Ｄｒａｇｏｎ－Ｄｕｒｅｙら、Ｊ Ａｍ Ｓｏｃ Ｎｅｐｈｒｏｌ（２００４）１５：７８７～７９５

【非特許文献９】Ｊａｎｓｅｎら、Ｋｉｄｎｅｙ Ｉｎｔ（１９９８）５３（２）３３１～３４９

【非特許文献１０】Ｐｉｃｋｅｒｉｎｇら、Ｎａｔ Ｇｅｎｅｔ（２００２）３１；４２４～４２８

【非特許文献１１】Ｎｅａｒｙら、Ｊ Ａｍ Ｓｏｃ Ｎｅｐｈｒｏｌ（２００２）１３：２０５２～２０５７

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１１】

（発明の要旨）

本発明は、加齢性黄斑変性（ＡＭＤ）およびＩＩ型膜性増殖性糸球体腎炎（ＭＰＧＮＩＩ）の発症と関連する補体Ｈ因子における多型およびハプロタイプに関する。本発明はまた、ＡＭＤおよびＭＰＧＮＩＩの発症と関連する補体Ｈ遺伝子関連５（ＣＦＨＲ５）遺伝子における多型およびハプロタイプに関する。本発明は、これらおよび他の疾患を診断、モニター、および治療する方法を提供する。

【００１２】

１つの局面において、本発明は、Ｈ因子遺伝子の１つまたは複数の多型部位における１つまたは複数の変異の存在または非存在を検出する工程を包含する、加齢性黄斑変性（ＡＭＤ）を発症する被験体の性向を決定するための診断方法を提供する。１つの実施形態において、本発明は、個体のＨ因子遺伝子における多型の存在または非存在を検出する工程を包含する、ＡＭＤを発症する感受性の増加を診断する方法を提供する。これらの方法は、個体からＤＮＡを入手する工程、およびＤＮＡがＨ因子遺伝子中に多型を含むか否かを決定するために個体からのＤＮＡを分析する工程を包含してもよい。特定の多型は、個体が、対照集団と比較して、ＡＭＤを発症する感受性の増加を有することを示す。特定の多型は、個体がＡＭＤを発症する可能性の減少を有することを示す。特定の多型は、個体がＡＭＤを発症する可能性の増加または減少のいずれも有しないことを示す。

【００１３】

１つの実施形態において、被験体における加齢性黄斑変性（ＡＭＤ）を発症する性向を診断する方法は、被験体からＤＮＡのサンプルを入手する工程、ならびに、ＡＭＤの発症と関連する多型の存在または非存在、被験体がＡＭＤを発症する性向の増加を有することの指標である多型の存在、および被験体がＡＭＤを発症する性向の減少を有することの指標である多型の非存在を患者のＤＮＡ中で検出する工程を包含する。

【００１４】

関連する局面において、本発明は、個体のＨ因子ハプロタイプを決定する工程を包含する、ＡＭＤを発症する感受性を診断する方法を提供する。これらの方法は、個体からＤＮＡを入手する工程、およびそれらのＨ因子ハプロタイプを決定するために個体のＤＮＡを分析する工程を包含する。特定のハプロタイプ（リスクハプロタイプ）は、個体がＡＭＤを発症する感受性の増加を有することを示す。特定のハプロタイプ（防御的ハプロタイプ）は、個体がＡＭＤを発症する感受性の減少を有することを示す。特定のハプロタイプ（中性ハプロタイプ）は、個体がＡＭＤを発症する可能性の増加または減少のいずれも有しないことを示す。

【００１５】

関連する実施形態において、Ｈ因子遺伝子の多型部位における変異の存在または非存在は、この遺伝子によってコードされるＲＮＡまたはＨ因子タンパク質（例えば、タンパク質アイソフォーム）などの遺伝子産物の分析によって決定される。変異体タンパク質の発現はＨ因子遺伝子の変異の指標であり、ＡＭＤを発症する性向の増加または減少を示すことができる。タンパク質は、イムノアッセイおよび他の方法を使用して検出することができる。

【００１６】

別の関連する局面において、本発明は、個体の生物学的サンプル中の変異体Ｈ因子ポリペプチドを検出することによって、ＡＭＤまたは他の疾患を発症する感受性を診断する方法を提供する。１つの実施形態において、抗体に基づくアッセイは、個体の生物学的サンプル、例えば、血清サンプルを抗体と接触させること、および変異体Ｈ因子ポリペプチドの存在または非存在を検出することによって、個体におけるＡＭＤまたは他の疾患を診断するために使用される。１つの実施形態において、抗体が、変異体Ｈ因子ポリペプチドに特異的な（すなわち、野生型Ｈ因子ポリペプチドにおいては見られない）エピトープと特異的に相互作用する。１つの実施形態において、分離に基づくアッセイ（例えば、ＰＡＧＥ）が、個体の生物学的サンプル、例えば、血清サンプル中の変異体Ｈ因子ポリペプチドの存在または非存在を検出することによって、個体中のＡＭＤまたは他の疾患を診断するために使用される。

【００１７】

１つの局面において、本発明は、全身レベルおよび／または眼レベルのＨ因子の型および／または量を調節することによって、ＡＭＤを有する個体（例えば、症候性ＡＭＤを発症するリスクの上昇を示す多型またはハプロタイプが検出される個体）または変異体Ｈ因子遺伝子を伴う他の疾患を有する個体を治療する方法を提供する。Ｈ因子ポリペプチドは、野生型Ｈ因子ポリペプチドまたは変異体Ｈ因子ポリペプチドであってもよい。Ｈ因子ポリペプチドは、リスクハプロタイプと関連するアレルよりもむしろ、中性または防御的アレルによってコードされる配列を有するＨ因子ポリペプチドであってもよい。１つの実施形態において、この方法は、疾患の徴候を減少させるための有効量でＨ因子ポリペプチドを個体に投与する工程を包含する。１つの実施形態において、この方法は、疾患の徴候を発症する性向を減少させ、かつ疾患の発症または進行を遅延させるための有効量で、Ｈ因子ポリペプチドを個体に投与する工程を包含する。１つの実施形態において、この方法は、Ｈ因子を含む血液を投与する工程を包含する。１つの実施形態において、この方法は、Ｈ因子ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸（例えば、導入遺伝子）を投与する工程を包含する。１つの実施形態において、この方法は、Ｈ因子ポリペプチドを発現する細胞を投与する工程を包含する。

【００１８】

１つの局面において、本発明は、ＡＭＤを有する個体（例えば、症候性ＡＭＤを発症するリスクの上昇を示す多型またはハプロタイプが検出される個体）または変異体Ｈ因子遺伝子を伴う他の疾患を有する個体を治療する方法を提供する。１つの実施形態において、この方法は、患者における疾患の徴候を減少するための有効量で、変異体Ｈ因子またはＨ因子をコードしている遺伝子の発現の量を減少させる薬剤を患者に投与する工程を包含する。関連する実施形態において、個体における変異体Ｈ因子ポリペプチドの阻害因子（すなわち、不活性化因子）の治療量が投与される。

【００１９】

１つの実施形態において、個体における阻害核酸（例えば、変異体Ｈ因子ポリペプチドのヌクレオチド配列の少なくとも一部に相補的であるＲＮＡ）が投与される。１つの実施形態において、変異体Ｈ因子ポリペプチドをコードするＲＮＡに相補的である精製されたアンチセンスＲＮＡが投与される。

【００２０】

別の実施形態において、個体において変異体Ｈ因子ポリペプチドを部分的に不活性化するために十分である抗ＣＦＨ抗体の治療量が投与される。

【００２１】

別の実施形態において、個体は、血液から有害型Ｈ因子を除去するために処理される（例えば、血漿分離交換法（ｐｌａｓｍａｐｈｏｒｅｓｉｓ）、抗体指向性血漿分離交換法、またはＨ因子結合部分、例えば、ヘパリンとの複合体化による）。

【００２２】

１つの局面において、本発明は、変異体Ｈ因子ポリペプチドをコードする精製されたＤＮＡ、変異体Ｈ因子ポリペプチドをコードする精製されたＲＮＡ、変異体Ｈ因子ポリペプチドをコードするＲＮＡに相補的な精製されたアンチセンスＲＮＡ、および精製された変異体Ｈ因子ポリペプチドを提供する。関連する局面において、本発明は、野生型または変異体Ｈ因子ポリペプチド、またはＨ因子の生物学的に活性なフラグメントを発現するための核酸を提供する。

【００２３】

１つの局面において、本発明は、Ｈ因子ポリペプチドをコードする核酸を含む遺伝子治療ベクターを提供する。このベクターは、複数の細胞型において、Ｈ因子遺伝子の発現を駆動するプロモーターを含んでもよい。もしくは、このベクターは、特定の細胞型においてのみ、例えば、網膜の細胞においてまたは腎臓の細胞においてのみ、Ｈ因子遺伝子の発現を駆動するプロモーターを含んでもよい。１つの局面において、Ｈ因子タンパク質をコードする遺伝子治療ベクターおよび薬学的に受容可能な賦形剤を含む薬学的組成物が提供され、ここで、この組成物は病原体を含まず、かつヒト患者への投与のために適切である。１つの実施形態において、コードされるＨ因子ポリペプチドは防御的変異体である。

【００２４】

１つの局面において、本発明は、組換えまたは精製されたＨ因子ポリペプチドを含む組成物を提供し、ここで、このポリペプチドは防御的変異体である。

【００２５】

関連する局面において、本発明は、組換えまたは精製Ｈ因子ポリペプチドおよび薬学的に受容可能な賦形剤を含む薬学的組成物を提供し、ここで、この組成物は病原体を含まず、かつヒト患者への投与のために適切である。１つの実施形態において、コードされるＨ因子ポリペプチドは野生型配列を有する。１つの実施形態において、コードされるＨ因子ポリペプチドは防御的変異体である。

【００２６】

１つの局面において、本発明は、変異体Ｈ因子ポリペプチドと特異的に相互作用するが野生型Ｈ因子ポリペプチドとは相互作用しない抗体を提供する。これらの抗体はポリクローナルまたはモノクローナルであってもよく、減法的技術（ｓｕｂｔｒａｃｔｉｖｅ ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ）によって得られてもよい。これらの抗体は、変異体Ｈ因子ポリペプチドを不活性化するために十分であり得る。関連する局面において、本発明は、抗Ｈ因子

抗体および薬学的に受容可能な賦形剤を含む薬学的組成物を提供し、ここで、この組成物は病原体を含まず、かつヒト患者への投与のために適切である。

【００２７】

１つの局面において、本発明は、ＡＭＤを発症するリスクの増加または減少と関連する変異体Ｈ因子タンパク質を同定するための方法を提供する。１つの実施形態において、本発明は、（ａ）防御的ハプロタイプを有するとして個体を同定する工程、および（ｂ）個体のゲノム中にコードされているＨ因子のアミノ酸配列を決定する工程によって、防御的Ｈ因子タンパク質を同定する方法を提供し、ここで、防御的Ｈ因子タンパク質は、防御的ハプロタイプを有するアレルによってコードされる。１つの実施形態において、本発明は、（ａ）中性ハプロタイプを有するとして個体を同定する工程、および（ｂ）個体のゲノム中にコードされているＨ因子のアミノ酸配列を決定する工程によって、中性Ｈ因子タンパク質を同定する方法を提供し、ここで、中性Ｈ因子タンパク質は、中性ハプロタイプを有するアレルによってコードされる。関連する実施形態において、本発明は、ＡＭＤを発症するリスクの減少に関連するＨ因子の変異体形態を同定する方法を提供し、この方法は（ａ）ＡＭＤを発症するリスクの減少と関連するハプロタイプまたはディプロタイプを有するとして個体を同定する工程；（ｂ）個体からゲノムＤＮＡまたはＲＮＡを入手する工程；および（ｃ）個体のゲノム中にコードされるＨ因子のアミノ酸配列を決定する工程を包含し、ここで、防御的Ｈ因子タンパク質は、ＡＭＤを発症するリスクの減少と関連するハプロタイプを有するアレルによってコードされる。１つの実施形態において、防御的または中性Ｈ因子タンパク質は、野生型Ｈ因子ポリペプチドのアミノ酸配列を有しない。

【００２８】

関連する方法において、ＡＭＤを発症するリスクの増加と関連するＨ因子の型は、（ａ）リスクハプロタイプを有するとして個体を同定する工程、および（ｂ）個体のゲノム中にコードされるＨ因子のアミノ酸配列を決定する工程によって同定され、ここで、リスクＨ因子タンパク質は、リスクハプロタイプを有するアレルによってコードされる。関連する実施形態において、本発明は、ＡＭＤを発症するリスクの増加と関連するＨ因子の変異体形態を同定する方法を提供し、この方法は（ａ）ＡＭＤを発症するリスクの増加と関連するハプロタイプまたはディプロタイプを有するとして個体を同定する工程；（ｂ）個体からゲノムＤＮＡまたはＲＮＡを入手する工程；および（ｃ）個体のゲノム中にコードされるＨ因子のアミノ酸配列を決定する工程を包含し、ここで、リスクＨ因子タンパク質は、ＡＭＤを発症するリスクの増加と関連するハプロタイプを有するアレルによってコードされる。１つの実施形態において、リスクＨ因子タンパク質は、野生型Ｈ因子ポリペプチドのアミノ酸配列を有しない。

【００２９】

１つの局面において、本発明は、患者の生物学的サンプル中の短縮型Ｈ因子に対する全長Ｈ因子の比率を検出することによって、ＡＭＤまたは他の疾患に対する性向または感受性を診断する方法を提供する。１つの実施形態において、被験体においてＡＭＤを発症する性向または感受性を診断する方法は、被験体からＲＮＡのサンプルを入手する工程、およびエキソン１０Ａ（すなわち、短縮型Ｈ因子）に対するエキソン１０（すなわち、全長Ｈ因子）の発現の比率を患者のＲＮＡ中で検出する工程を包含し、この比率の増加は、被験体がＡＭＤを発症する性向または感受性の増加を有することの指標であり、この比率の減少は、被験体がＡＭＤを発症する性向または感受性の減少を有することの指標である。１つの実施形態において、被験体においてＡＭＤを発症する性向または感受性を診断する方法は、被験体からタンパク質のサンプルを入手する工程、および短縮型Ｈ因子に対する全長Ｈ因子の発現の比率を患者のタンパク質中で検出する工程を包含し、この比率の増加は、被験体がＡＭＤを発症する性向または感受性の増加を有することの指標であり、この比率の減少は、被験体がＡＭＤを発症する性向または感受性の減少を有することの指標である。

【００３０】

１つの局面において、本発明は、Ｈ因子タンパク質またはそのフラグメントをコードす

る組換えまたは精製核酸、例えば、Ｈ因子遺伝子から誘導される核酸を含む細胞を提供する。この細胞は、細菌または酵母、または研究および薬物開発のために有用である任意の他の細胞であってもよい。従って、本発明は、組換え変異体ヒトＨ因子を発現する単離された宿主細胞および細胞株を提供する。１つの実施形態において、変異体はリスク変異体であり、４０２位のアミノ酸にヒスチジンを有する。１つの実施形態において、変異体は防御的変異体であり、６２位のアミノ酸にイソロイシンを有する。１つの実施形態において、変異体は中性変異体である。１つの実施形態において、リスク変異体、防御的変異体、または中性変異体のＨ因子タンパク質は、野生型Ｈ因子ポリペプチドのアミノ酸配列を有しない。

【００３１】

１つの局面において、本発明は、その体細胞および生殖細胞がヒト変異体Ｈ因子ポリペプチドをコードしている導入遺伝子を含む、トランスジェニック非ヒト動物を提供する。本発明のトランスジェニック動物は、ＡＭＤについてのモデルとして、およびＡＭＤを治療する際に有用である薬剤をスクリーニングするために使用される。この動物は、マウス、蠕虫、または研究および薬物開発（Ｈ因子の組換え産生など）のために有用な任意の他の動物であってもよい。１つの実施形態において、Ｈ因子は変異体ヒトＨ因子であり、ここで上記変異体はアミノ酸６２にイソロイシンを有し、または、アミノ酸４０２にヒスチジンを有する。

【００３２】

１つの局面において、本発明は、表１Ａ、１Ｂおよび１Ｃに記載されるＨ因子遺伝子における多型部位に連鎖した多型部位をスクリーニングする方法を提供する。これらの方法は、Ｈ因子遺伝子における多型部位に連鎖している遺伝子中の多型部位を同定し、ここで、Ｈ因子遺伝子中の多型部位の多型型は関連するＡＭＤである工程、および連鎖した多型部位が、ＡＭＤ表現型と関連するＨ因子遺伝子の多型型と平衡不平衡にあるか否かを示すために、個体の集団中のハプロタイプを決定する工程を包含する。

【００３３】

１つの局面において、本発明は、ＡＭＤについて上記のように実行される、ＭＰＧＮＩＩについての診断方法、治療方法、およびスクリーニング方法を提供する。

【００３４】

１つの局面において、本発明は、ＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩを発症する被験体の性向を決定するための診断方法を提供し、この方法は、ＣＦＨＲ５遺伝子の１つまたは複数の多型部位における１つまたは複数の変異の存在または非存在を検出する工程を包含する。１つの実施形態において、本発明は、個体のＣＦＨＲ５遺伝子中の多型の存在または非存在を検出する工程を含む、ＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩを発症する感受性の増加を診断する方法を提供する。これらの方法は、個体からＤＮＡを入手する工程、およびＤＮＡがＣＦＨＲ５遺伝子中に多型を含むか否かを決定するために個体からのＤＮＡを分析する工程を包含してもよい。特定の多型は、個体がＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩを発症する感受性の増加を有することを示す。特定の多型は、個体がＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩを発症する可能性の減少を有することを示す。特定の多型は、個体がＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩを発症する可能性の増加または減少のいずれも有しないことを示す。

【００３５】

１つの実施形態において、被験体におけるＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩを発症する性向を診断する方法は、被験体からのＤＮＡのサンプルを入手する工程、およびＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩの発症と関連する多型の存在または非存在を患者のＤＮＡ中で検出する工程を包含し、多型の存在は、被験体がＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩを発症する性向の増加を有することの指標であり、多型の非存在は、被験体がＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩを発症する性向の減少を有することの指標である。

【００３６】

関連する実施形態において、ＣＦＨＲ５遺伝子の多型部位における変異の存在および非存在は、遺伝子産物、例えば、ＲＮＡ、または遺伝子によってコードされるＣＦＨＲ５タ

ンパク質（例えば、タンパク質アイソフォーム）などの分析によって決定される。変異体タンパク質の発現はＣＦＨＲ５遺伝子中の変異の指標であり、ＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩを発症する性向の増加または減少を示すことができる。タンパク質は、イムノアッセイおよび他の方法を使用して検出することができる。

【００３７】

関連する局面において、本発明は、個体のＣＦＨＲ５ハプロタイプを決定する工程を包含する、ＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩを発症する感受性を診断する方法を提供する。これらの方法は、個体からＤＮＡを入手する工程、およびそれらのＣＦＨＲ５ハプロタイプを決定するために個体のＤＮＡを分析する工程を包含する。特定のハプロタイプ（リスクハプロタイプ）は、対照集団と比較して、個体がＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩを発症する感受性の増加を有することを示す。特定のハプロタイプ（防御的ハプロタイプ）は、個体がＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩを発症する感受性の減少を有することを示す。特定のハプロタイプ（中性ハプロタイプ）は、個体がＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩを発症する可能性の増加または減少のいずれも有しないことを示す。

【００３８】

別の関連する局面において、本発明は、個体の生物学的サンプル中の変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドを検出することによって、ＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩまたは他の疾患を発症する感受性を診断する方法を提供する。１つの実施形態において、抗体に基づくアッセイが、個体の生物学的サンプル、例えば、血清サンプルを抗体に接触させ、変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドの存在または非存在を検出することによって、個体におけるＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩまたは他の疾患を診断するために使用される。１つの実施形態において、抗体は変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドに特異的な（すなわち、野生型ＣＦＨＲ５ポリペプチドにおいては見られない）エピトープと特異的に相互作用する。１つの実施形態において、分離に基づくアッセイ（例えば、ＰＡＧＥ）が、個体の生物学的サンプル、例えば、血清サンプル中の変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドの存在または非存在を検出することによって、個体中のＭＰＧＮＩＩまたは他の疾患を診断するために使用される。種々の型のイムノアッセイ形式を、サンプル中のＣＦＨまたはＣＦＨＲ５ポリペプチドまたはタンパク質をアッセイするために使用することができる。これらには、サンドイッチＥＬＩＳＡ、ラジオイムノアッセイ、フルオロイムノアッセイ、免疫組織化学アッセイ、ドットブロット、ディップスティック、およびウェスタンブロットが含まれる。

【００３９】

１つの局面において、本発明は、全身レベルおよび／または腎臓レベルのＣＦＨＲ５の型および／または量を調節することによって、ＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩを有するかまたはそのリスクがある個体（例えば、症候性ＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩを発症するリスクの上昇を示す多型またはハプロタイプが検出される個体）または変異体ＣＦＨＲ５遺伝子を伴う他の疾患を有する個体を治療する方法を提供する。ＣＦＨＲ５ポリペプチドは、リスクハプロタイプと関連するアレルよりもむしろ、中性または防御的アレルによってコードされるＣＦＨＲ５ポリペプチドであってもよい。１つの実施形態において、この方法は、疾患の兆候を減少させるための有効量で、ＣＦＨＲ５ポリペプチドを個体に投与する工程を包含する。１つの実施形態において、この方法は、疾患の徴候を発症する性向を減少させ、かつ疾患の発症または進行を遅延させるための有効量で、ＣＦＨＲ５ポリペプチドを個体に投与する工程を包含する。１つの実施形態において、この方法は、ＣＦＨＲ５を含む血液を投与する工程を包含する。１つの実施形態において、この方法は、ＣＦＨＲ５ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸（例えば、導入遺伝子）を投与する工程を包含する。

【００４０】

１つの局面において、本発明は、ＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩを有する個体（例えば、症候性ＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩを発症するリスクの上昇を示す多型またはハプロタイプが検出される個体）または変異体ＣＦＨＲ５遺伝子を伴う他の疾患を有する個体を治療する方法を提供する。１つの実施形態において、この方法は、患者における疾患の徴候を減少

するための有効量で、変異体ＣＦＨＲ５またはＣＦＨＲ５をコードしている遺伝子の発現の量を減少させる薬剤を患者に投与する工程を包含する。ＣＦＨＲ５ポリペプチドは、野生型ＣＦＨＲ５ポリペプチドまたは変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドであってもよい。

【００４１】

１つの実施形態において、個体における阻害核酸（例えば、変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドのヌクレオチド配列の少なくとも一部に相補的なＲＮＡ）が投与される。１つの実施形態において、変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドをコードするＲＮＡに相補的な精製されたアンチセンスＲＮＡが投与される。

【００４２】

別の実施形態において、個体における変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドを部分的に不活性化するために十分である抗ＣＦＨＲ５抗体の治療量が投与される。

【００４３】

関連する実施形態において、個体における変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドの阻害因子（例えば、インアクチベーター）の治療量が投与される。

【００４４】

別の実施形態において、個体は、血液から有害型ＣＦＨＲ５を除去するために処理される（例えば、血漿分離交換法、抗体指向性血漿分離交換法、またはＣＦＨＲ５結合部分、例えば、ヘパリンとの複合体化による）。

【００４５】

１つの局面において、本発明は、変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドをコードする精製されたＤＮＡ、変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドをコードする精製されたＲＮＡ、変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドをコードするＲＮＡに相補的な精製されたアンチセンスＲＮＡ、および精製された変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドを提供する。関連する局面において、本発明は、野生型または変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチド、またはＣＦＨＲ５の生物学的に活性なフラグメントを発現するための核酸を提供する。

【００４６】

１つの局面において、本発明は、ＣＦＨＲ５ポリペプチドをコードする核酸を含む遺伝子治療ベクターを提供する。このベクターは、複数の細胞型において、ＣＦＨＲ５遺伝子の発現を駆動するプロモーターを含んでもよい。もしくは、このベクターは、特定の細胞型においてのみ、例えば、網膜の細胞においてまたは腎臓の細胞（例えば、内皮細胞、メサンギウム細胞、有足細胞）においてのみ、ＣＦＨＲ５遺伝子の発現を駆動するプロモーターを含んでもよい。１つの局面において、ＣＦＨＲ５タンパク質をコードする遺伝子治療ベクターおよび薬学的に受容可能な賦形剤を含む薬学的組成物が提供され、ここで、この組成物は病原体を含まず、かつヒト患者への投与のために適切である。１つの実施形態において、コードされるＣＦＨＲ５ポリペプチドは防御的変異体である。

【００４７】

１つの局面において、本発明は、組換えまたは精製されたＣＦＨＲ５ポリペプチドを含む組成物を提供し、ここで、このポリペプチドは防御的変異体である。

【００４８】

関連する局面において、本発明は、組換えまたは精製ＣＦＨＲ５ポリペプチドおよび薬学的に受容可能な賦形剤を含む薬学的組成物を提供し、ここで、この組成物は病原体を含まず、かつヒト患者への投与のために適切である。１つの実施形態において、コードされるＣＦＨＲ５ポリペプチドは野生型配列を有する。１つの実施形態において、コードされるＣＦＨＲ５ポリペプチドは防御的変異体である。

【００４９】

１つの局面において、本発明は、変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドと特異的に相互作用するが野生型ＣＦＨＲ５ポリペプチドとは相互作用しない抗体を提供する。これらの抗体はポリクローナルまたはモノクローナルであってもよく、減法的技術（ｓｕｂｔｒａｃｔｉｖｅ　ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ）によって得られてもよい。これらの抗体は、変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドを不活性するために十分であり得る。関連する局面において、本発明は

、抗ＣＦＨＲ５抗体および薬学的に受容可能な賦形剤を含む薬学的組成物を提供し、ここで、この組成物は病原体を含まず、かつヒト患者への投与のために適切である。

【００５０】

１つの局面において、本発明は、ＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩを発症するリスクの増加または減少と関連する変異体ＣＦＨＲ５タンパク質を同定するための方法を提供する。１つの実施形態において、本発明は、（ａ）防御的ハプロタイプを有するとして個体を同定する工程、および（ｂ）個体のゲノム中にコードされているＣＦＨＲ５のアミノ酸配列を決定する工程によって、防御的ＣＦＨＲ５タンパク質を同定する方法を提供し、ここで、防御的ＣＦＨＲ５タンパク質は、防御的ハプロタイプを有するアレルによってコードされる。１つの実施形態において、本発明は、（ａ）中性ハプロタイプを有するとして個体を同定する工程、および（ｂ）個体のゲノム中にコードされているＣＦＨＲ５のアミノ酸配列を決定する工程によって、中性ＣＦＨＲ５タンパク質を同定する方法を提供し、ここで、中性ＣＦＨＲ５タンパク質は、中性ハプロタイプを有するアレルによってコードされる。関連する実施形態において、本発明は、ＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩを発症するリスクの減少に関連するＣＦＨＲ５の変異体形態を同定する方法を提供し、この方法は（ａ）ＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩを発症するリスクの減少と関連するハプロタイプまたはディプロタイプを有するとして個体を同定する工程；（ｂ）個体からゲノムＤＮＡまたはＲＮＡを入手する工程；および（ｃ）個体のゲノム中にコードされるＣＦＨＲ５のアミノ酸配列を決定する工程を包含し、ここで、防御的ＣＦＨＲ５タンパク質は、ＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩを発症するリスクの減少と関連するハプロタイプを有するアレルによってコードされる。１つの実施形態において、防御的または中性ＣＦＨＲ５タンパク質は、野生型ＣＦＨＲ５ポリペプチドのアミノ酸配列を有しない。

【００５１】

関連する方法において、ＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩを発症するリスクの増加と関連するＣＦＨＲ５の型は、（ａ）リスクハプロタイプを有するとして個体を同定する工程、および（ｂ）個体のゲノム中にコードされるＣＦＨＲ５のアミノ酸配列を決定する工程によって同定され、ここで、リスクＣＦＨＲ５タンパク質は、リスクハプロタイプを有するアレルによってコードされる。関連する実施形態において、本発明は、ＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩを発症するリスクの増加と関連するＣＦＨＲ５の変異体形態を同定する方法を提供し、この方法は（ａ）ＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩを発症するリスクの増加と関連するハプロタイプまたはディプロタイプを有するとして個体を同定する工程；（ｂ）個体からゲノムＤＮＡまたはＲＮＡを入手する工程；および（ｃ）個体のゲノム中にコードされるＣＦＨＲ５のアミノ酸配列を決定する工程を包含し、ここで、リスクＣＦＨＲ５タンパク質は、ＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩを発症するリスクの増加と関連するハプロタイプを有するアレルによってコードされる。１つの実施形態において、リスクＣＦＨＲ５タンパク質は、野生型ＣＦＨＲ５ポリペプチドのアミノ酸配列を有しない。

【００５２】

１つの局面において、本発明は、ＣＦＨＲ５タンパク質に由来する組換えまたは精製核酸を含む細胞を提供する。この細胞は、細菌または酵母、または研究および薬物開発のために有用である任意の他の細胞であってもよい。従って、本発明は、組換え変異体ヒトＣＦＨＲ５を発現する単離された宿主細胞および細胞株を提供する。１つの実施形態において、ＣＦＨＲ５変異体はリスク変異体であり、４６位のアミノ酸にセリンを有する。１つの実施形態において、ＣＦＨＲ５変異体は中性変異体である。１つの実施形態において、リスク変異体、防御的変異体、または中性変異体のＣＦＨＲ５タンパク質は、野生型ＣＦＨＲ５ポリペプチドのアミノ酸配列を有しない。

【００５３】

１つの局面において、本発明は、その体細胞および生殖細胞がヒト変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドをコードしている導入遺伝子を含む、トランスジェニック非ヒト動物を提供する。本発明のトランスジェニック動物は、ＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩについてのモデルとして、およびＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩを治療する際に有用である薬剤をスクリーニング

するために使用される。この動物は、マウス、蠕虫、または研究および薬物開発（ＣＦＨＲ５の組換え産生など）のために有用な任意の他の動物であってもよい。１つの実施形態において、ＣＦＨＲ５は変異体ヒトＣＦＨＲ５であり、ここで上記ＣＦＨＲ５変異体はアミノ酸４６にセリンを有する。

【００５４】

１つの局面において、本発明は、表１４または表１５に記載されるＣＦＨＲ５遺伝子における多型部位に連鎖した多型部位をスクリーニングする方法を提供する。これらの方法は、ＣＦＨＲ５遺伝子における多型部位に連鎖している遺伝子中の多型部位を同定し、ここで、ＣＦＨＲ５遺伝子中の多型部位の多型型は関連するＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩである工程、および連鎖した多型部位が、ＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩ表現型と関連するＣＦＨＲ５遺伝子の多型型と平衡不平衡にある多型型を有するか否かを示すために、個体の集団中のハプロタイプを決定する工程を包含する。

【００５５】

１つの局面において、本発明は、Ｈ因子ハプロタイプの分析のためのキットを提供する。これらのキットは、患者におけるＡＭＤの診断のために使用され得る。これらのキットは、１つ以上のＨ因子、Ｈ因子アレル特異的オリゴヌクレオチド（例えば、アレル特異的プライマーまたはプローブ）、またはＨ因子ポリペプチドを特異的に認識する抗体を含んでもよい。Ｈ因子アレル特異的オリゴヌクレオチドは、Ｈ因子遺伝子のコード（エキソン）または非コード（プロモーター、５’非翻訳、イントロンまたは３’非翻訳）領域に由来する配列を含んでもよい。Ｈ因子特異的抗体は、正常もしくは野生型Ｈポリペプチド、または、非同義語一ヌクレオチド変異多型（ＳＮＰ）がＨ因子コード領域に存在する、変異体Ｈ因子ポリペプチドを認識してもよい。これらのキットは、ＡＭＤ、ならびに、Ｈ因子遺伝子中のＳＮＰと関連する他の疾患、例えば、ＭＰＧＮＩＩを診断するために使用されてもよい。これらのキットは、代わりにまたは加えて、１つ以上のＨ因子関連５（ＣＦＨＲ５）アレル特異的オリゴヌクレオチド（例えば、プライマーおよびプローブ）、またはＣＦＨＲ５ポリペプチドを特異的に認識する抗体を含んでもよい。ＣＦＨＲ５アレル特異的プライマーおよびＨ因子関連５アレル特異的オリゴヌクレオチドは、Ｈ因子関連５遺伝子のコード（エキソン）または非コード（プロモーター、５’非翻訳、イントロンまたは３’非翻訳）領域に由来する配列を含んでもよい。Ｈ因子関連５特異的抗体は、正常もしくは野生型Ｈポリペプチド、または、非同義語一ヌクレオチド変異多型（ＳＮＰ）がＨ因子関連５コード領域に存在する、変異体Ｈ因子関連５ポリペプチドを認識してもよい。

【００５６】

１つの実施形態において、このキットは、表１Ａ、表１Ｂ、および／または表１Ｃに列挙される多型部位におけるアレルを区別するプローブまたはプライマーを含む。１つの実施形態において、プローブは、表１Ａ、表１Ｂ、および／または表１ＣにＨ因子多型部位に及ぶ領域の核酸増幅のためのプライマーである。１つの実施形態において、このキットは、表１Ａ、表１Ｂ、および／または表１Ｃに列挙される２つ以上の多型部位においてアレルを区別するプローブまたはプライマーを有する。１つの実施形態において、このキットは、２つ以上の多型部位においてアレルを区別するプローブまたはプライマーを有し、ここで、この多型部位は以下を含む：（ａ）ｒｓ５２９８２５；（ｂ）ｒｓ８００２９２；（ｃ）ｒｓ３７６６４０４；（ｄ）ｒｓ１０６１１４７；（ｅ）ｒｓ１０６１１７０；（ｆ）ｒｓ２０３６７４；（ｇ）ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２の少なくとも１つ；（ｈ）ｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の少なくとも１つ；（ｉ）ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２の少なくとも１つ；ならびにｒｓ３７６６４０４；ならびにｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の少なくとも１つ；または（ｊ）少なくともｒｓ５２９８２５、ｒｓ８００２９２、ｒｓ３７６６４０４、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４。

【００５７】

関連する実施形態において、このキットは、２つ以上の多型部位においてアレルを区別するプローブまたはプライマーを有し、ここで、この多型部位は以下を含む：（ａ）ｒｓ

５２９８２５；（ｂ）ｒｓ８００２９２；（ｃ）イントロン２（ＩＶＳ２またはｉｎｓＴＴ）（ｄ）ｒｓ３７６６４０４；（ｅ）ｒｓ１０６１１４７；（ｆ）ｒｓ１０６１１７０；（ｇ）エキソン１０Ａ；（ｈ）ｒｓ２０３６７４；（ｉ）ｒｓ３７５０４６；（ｊ）ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２；（ｋ）ｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の少なくとも２つもしくは３つ；（ｌ）ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２の少なくとも１つ；ならびにイントロン２；ならびにｒｓ３７６６４０４；ならびにｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の少なくとも１つ；ならびにエキソン１０Ａ；ならびにｒｓ３７５０４６；（ｍ）少なくともｒｓ５２９８２５；ｒｓ８００２９２；イントロン２；ｒｓ３７６６４０４；ｒｓ１０６１１７０；エキソン１０Ａ；ｒｓ２０３６７４；およびｒｓ３７５０４６；（ｎ）ｒｓ５２９８２５、ｒｓ８００２９２、イントロン２；ｒｓ３７６６４０４、ｒｓ１０６１１７０、エキソン１０Ａ、ｒｓ２０３６７４、およびｒｓ３７５０４６の少なくとも２つ、もしくは少なくとも３つ、もしくは少なくとも４つ；（ｏ）エキソン２２（１２１０）；または（ｐ）任意の上述の変異もしくは変異のセット（ａ－ｏ）と組み合わせたエキソン２２（１２１０）。１つの実施形態において、このキットは、ｒｓ４６０８９７およびｒｓ４６０１８４の一方または両方においてアレルを区別するプローブまたはプライマーを有する。１つの実施形態において、このキットは、２つ以上の多型部位においてアレルを区別するプローブまたはプライマーを有し、ここで、多型部位は以下から選択される：（ａ）ｒｓ３７５３３９４；（ｂ）ｒｓ５２９８２５；（ｃ）ｒｓ８００２９２；（ｄ）イントロン２（ＩＶＳ２またはｉｎｓＴＴ）；（ｅ）ｒｓ３７６６４０４；（ｆ）ｒｓ１０６１１４７；（ｇ）ｒｓ１０６１１７０；（ｈ）ｒｓ２２７４７００；（ｉ）ｒｓ２０３６７４；（ｊ）ｒｓ３７５３３９６；および（ｋ）ｒｓ１０６５４８９。

【００５８】

１つの実施形態において、このキットは、上記のプローブの代わりに、またはそれに加えて、ＣＦＨＲ５遺伝子における多型部位を区別するプローブ、プライマー、抗体などを含む。１つの局面において、本発明は、ＣＦＨＲ５遺伝子における変異に基づいて患者におけるＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩを診断するためのキットを提供する。これらのキットは、１つ以上のＣＦＨＲ５特異的プローブもしくはＣＦＨＲ５アレル特異的オリゴヌクレオチド、またはＣＦＨＲ５ポリペプチドを特異的に認識する抗体を含んでもよい。ＣＦＨＲ５特異的プライマーおよびＣＦＨＲ５アレル特異的オリゴヌクレオチドは、ＣＦＨＲ５遺伝子のコード（エキソン）または非コード（プロモーター、５’非翻訳、イントロンまたは３’非翻訳）領域に由来する配列を含んでもよい。ＣＦＨＲ５特異的抗体は、正常もしくは野生型ＣＦＨＲ５ポリペプチド、または、１つ以上の非同義語一ヌクレオチド変異多型（ＳＮＰ）がＣＦＨＲ５コード領域に存在する、変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドを認識してもよい。これらのキットは、ＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩ、ならびにＣＦＨＲ５遺伝子中のＳＮＰと関連する他の疾患を診断するために使用されてもよい。

【００５９】

１つの実施形態において、このキットは、表１４または表１５に列挙される多型部位におけるアレルを区別するプローブまたはプライマーを含む。１つの実施形態において、プローブは、表１４または表１５に列挙されるＣＦＨＲ５遺伝子の多型部位に及ぶ領域の核酸増幅のためのプライマーである。１つの実施形態において、このキットは、表１４または表１５に列挙される２つ以上の多型部位におけるアレルを区別するプローブまたはプライマーを有する。１つの実施形態において、このキットは、以下の多型部位：ｒｓ９４２７６６１（－２４９Ｔ＞Ｃ）；ｒｓ９４２７６６２（－２０Ｔ＞Ｃ）；およびｒｓ１２０９７５５０（Ｐ４６Ｓ）の１つ、２つ、またはすべてのアレルを区別するプローブまたはプライマーを含む。

【００６０】

１つの実施形態において、このキットは、ＣＦＨ遺伝子における多型部位、およびＣＦＨＲ５などのＣＦＨＲ遺伝子中の多型部位におけるアレルを区別するプローブまたはプライマーを含む。

【００６１】
１つの局面において、本発明は、被験体のハプロタイプを決定するためのデバイスを提供する。これらのデバイスは、例えば、患者におけるＡＭＤまたは他の疾患の診断のために有用である。１つの実施形態において、このデバイスは、表１Ａ、１Ｂおよび／または１Ｃに列挙される多型部位におけるアレルを区別するプローブまたはプライマーを含む。１つの実施形態において、これらのプローブは、表１Ａ、１Ｂおよび／または１Ｃに列挙されるＨ因子遺伝子多型部位に及ぶ領域の核酸増幅のためのプライマーである。１つの実施形態において、このデバイスは、表１Ａ、１Ｂおよび／または１Ｃに列挙される２つ以上の多型部位におけるアレルを区別するプローブまたはプライマーを有する。１つの実施形態において、このデバイスは、２つ以上の多型部位におけるアレルを区別するプローブまたはプライマーを有し、ここで、この多型部位は以下を含む：（ａ）ｒｓ５２９８２５；（ｂ）ｒｓ８００２９２；（ｃ）ｒｓ３７６６４０４；（ｄ）ｒｓ１０６１１４７；（ｅ）ｒｓ１０６１１７０；（ｆ）ｒｓ２０３６７４；（ｇ）ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２の少なくとも１つ；（ｈ）ｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の少なくとも１つ；（ｉ）ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２の少なくとも１つ；ならびにｒｓ３７６６４０４；ならびにｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の少なくとも１つ；または（ｊ）少なくともｒｓ５２９８２５、ｒｓ８００２９２、ｒｓ３７６６４０４、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４。

【００６２】
上記のキットおよびそれらの内容物はまた、ＭＰＧＮＩＩを発症する性向を同定するため、または任意の目的のためにＨ因子ハプロタイプを決定するために使用されてもよい。

【００６３】
関連する実施形態において、このデバイスは、２つ以上の多型部位においてアレルを区別するプローブまたはプライマーを有し、ここで、この多型部位は以下を含む：（ａ）ｒｓ５２９８２５；（ｂ）ｒｓ８００２９２；（ｃ）イントロン２（ＩＶＳ２またはｉｎｓＴＴ）（ｄ）ｒｓ３７６６４０４；（ｅ）ｒｓ１０６１１４７；（ｆ）ｒｓ１０６１１７０；（ｇ）エキソン１０Ａ；（ｈ）ｒｓ２０３６７４；（ｉ）ｒｓ３７５０４６；（ｊ）ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２；（ｋ）ｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の少なくとも２つもしくは３つ；（ｌ）ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２の少なくとも１つ；ならびにイントロン２；ならびにｒｓ３７６６４０４；ならびにｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の少なくとも１つ；ならびにエキソン１０Ａ；ならびにｒｓ３７５０４６；（ｍ）少なくともｒｓ５２９８２５；ｒｓ８００２９２；イントロン２；ｒｓ３７６６４０４；ｒｓ１０６１１７０；エキソン１０Ａ；ｒｓ２０３６７４；およびｒｓ３７５０４６；（ｎ）ｒｓ５２９８２５；ｒｓ８００２９２；イントロン２；ｒｓ３７６６４０４；ｒｓ１０６１１７０；エキソン１０Ａ；ｒｓ２０３６７４；およびｒｓ３７５０４６の少なくとも２つ、もしくは少なくとも３つ、もしくは少なくとも４つ；（ｏ）エキソン２２（１２１０）；または（ｐ）任意の上述の変異もしくは変異のセット（ａ－ｏ）と組み合わせたエキソン２２（１２１０）。１つの実施形態において、このデバイスは、ｒｓ４６０８９７およびｒｓ４６０１８４の一方または両方においてアレルを区別するプローブまたはプライマーを有する。１つの実施形態において、このデバイスは、２つ以上の多型部位においてアレルを区別するプローブまたはプライマーを有し、ここで、この多型部位は以下から選択される：（ａ）ｒｓ３７５３３９４；（ｂ）ｒｓ５２９８２５；（ｃ）ｒｓ８００２９２；（ｄ）イントロン２（ＩＶＳ２またはｉｎｓＴＴ）；（ｅ）ｒｓ３７６６４０４；（ｆ）ｒｓ１０６１１４７；（ｇ）ｒｓ１０６１１７０；（ｈ）ｒｓ２２７４７００；（ｉ）ｒｓ２０３６７４；（ｊ）ｒｓ３７５３３９６；および（ｋ）ｒｓ１０６５４８９。１つの実施形態において、このデバイスは、２つ以上の多型部位においてアレルを区別するプローブまたはプライマーを有し、ここで、この多型部位は以下から選択される：（ａ）ｒｓ３７５３３９４；（ｂ）ｒｓ５２９８２５；（ｃ）ｒｓ８００２９２；（ｄ）イントロン２

（ＩＶＳ２またはｉｎｓＴＴ）；（ｅ）ｒｓ３７６６４０４；（ｆ）ｒｓ１０６１１４７；（ｇ）ｒｓ１０６１１７０；（ｈ）ｒｓ２２７４７００；（ｉ）ｒｓ２０３６７４；（ｊ）ｒｓ３７５３３９６；および（ｋ）ｒｓ１０６５４８９。

【００６４】

１つの局面において、本発明は、患者におけるＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩの診断のためのデバイスを提供する。１つの実施形態において、このデバイスは、表１４または表１５に列挙される多型部位においてアレルを区別するプローブまたはプライマーを含む。１つの実施形態において、これらのプローブは、表１４または表１５に列挙されるＣＦＨＲ５遺伝子多型部位に及ぶ領域の核酸増幅のためのプライマーである。１つの実施形態において、このデバイスは、表１４または表１５に列挙される２つ以上の多型部位におけるアレルを区別するプローブまたはプライマーを有する。本発明のデバイスは、上記および本開示の他のあらゆる箇所に記載される部位の任意の組み合わせを含む、Ｈ因子とＣＦＨＲ５変異体の両方の間を区別するプローブまたはプライマーを含んでもよい。

【００６５】

上記のデバイスおよびそれらの内容物はまた、ＭＰＧＮＩＩを発症する性向を同定するため、または任意の目的のためにＨ因子ハプロタイプを決定するために使用されてもよい。

【００６６】

１つの実施形態において、このデバイスは、上記のプローブまたはプライマーの代わりに、またはそれに加えて、ＣＦＨＲ５遺伝子における多型部位を区別するプローブ、プライマー、抗体などを含む。１つの局面において、本発明は、ＣＦＨＲ５遺伝子における変異に基づいて患者におけるＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩを診断するためのデバイスを提供する。これらのデバイスは、１つ以上のＣＦＨＲ５特異的プローブもしくはＣＦＨＲ５アレル特異的オリゴヌクレオチド、またはＣＦＨＲ５ポリペプチドを特異的に認識する抗体を含んでもよい。ＣＦＨＲ５特異的プライマーおよびＣＦＨＲ５アレル特異的オリゴヌクレオチドは、ＣＦＨＲ５遺伝子のコード（エキソン）または非コード（プロモーター、５’非翻訳、イントロンまたは３’非翻訳）領域に由来する配列を含んでもよい。ＣＦＨＲ５特異的抗体は、正常もしくは野生型ＣＦＨＲ５ポリペプチド、または、１つ以上の非同義語一ヌクレオチド変異多型（ＳＮＰ）がＣＦＨＲ５コード領域に存在する、変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドを認識してもよい。これらのデバイスは、ＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩ、ならびにＣＦＨＲ５遺伝子中のＳＮＰと関連する他の疾患を診断するために使用されてもよい。

【００６７】

１つの実施形態において、このデバイスは、表１４または表１５に列挙される多型部位におけるアレルを区別するプローブまたはプライマーを含む。１つの実施形態において、プローブは、表１４または表１５に列挙されるＣＦＨＲ５遺伝子の多型部位に及ぶ領域の核酸増幅のためのプライマーである。１つの実施形態において、このデバイスは、表１４または表１５に列挙される２つ以上の多型部位におけるアレルを区別するプローブまたはプライマーを有する。１つの実施形態において、このキットは、以下の多型部位：ｒｓ９４２７６６１（－２４９Ｔ＞Ｃ）；ｒｓ９４２７６６２（－２０Ｔ＞Ｃ）；およびｒｓ１２０９７５５０（Ｐ４６Ｓ）の１つ、２つ、またはすべてのアレルを区別するプローブまたはプライマーを含む。

【００６８】

１つの実施形態において、このデバイスは、ＣＦＨ遺伝子における多型部位、およびＣＦＨＲ５などのＣＦＨＲ遺伝子中の多型部位におけるアレルを区別するプローブまたはプライマーを含む。

【００６９】

本発明のさらなる局面は、開示の全体を読むことで明らかになる。

例えば、本発明は、以下の項目を提供する：

（項目１）

補体調節因子（ＲＣＡ）をコードする遺伝子の多型部位における変異の存在または非存在を検出する工程を包含する、加齢性黄斑変性（ＡＭＤ）を発症する被験体の性向を決定するための診断方法。
（項目２）
上記遺伝子がＨ因子またはＣＦＨＲ５である、項目１に記載の方法。
（項目３）
上記多型部位が、上記Ｈ因子遺伝子における両アレル一ヌクレオチド変異多型である、項目２に記載の方法。
（項目４）
患者から核酸のサンプルを入手する工程、およびＨ因子遺伝子における多型部位の変異の存在または非存在を該患者のＤＮＡ中で検出する工程を包含する、項目３に記載の方法。
（項目５）
上記変異の存在が、上記患者がＡＭＤを発症する性向の増加を有することの指標である、項目４に記載の方法。
（項目６）
上記変異の存在が、上記患者がＡＭＤを発症する性向の減少を有することの指標である、項目４に記載の方法。
（項目７）
上記多型部位が、表１Ａ～１Ｃに列挙したＨ因子遺伝子における一ヌクレオチド変異多型である、項目２に記載の方法。
（項目８）
上記多型がｒｓ８００２９２（Ｉ６２Ｖ）である、項目７に記載の方法。
（項目９）
上記多型がｒｓ１０６１１７０（Ｙ４０２Ｈ）である、項目７に記載の方法。
（項目１０）
上記多型がエキソン２２（Ｒ１２１０Ｃ）である、項目７に記載の方法。
（項目１１）
上記検出する工程が、（ｉ）反応中にＨ因子遺伝子アレルに選択的にハイブリダイズ可能である１種以上のポリヌクレオチドプローブと、被験体からの核酸サンプルを合わせる工程、および（ｉｉ）該反応をモニターして、該サンプル中の該Ｈ因子遺伝子アレルの存在を決定する工程を包含する、項目４に記載の方法。
（項目１２）
上記プローブが、ポリメラーゼ連鎖反応においてポリヌクレオチド合成を開始可能なオリゴヌクレオチドである、項目１１に記載の方法。
（項目１３）
変異体Ｈ因子タンパク質が検出される、項目２に記載の方法。
（項目１４）
上記変異体がアミノ酸６２にイソロイシンを有する、項目１３に記載の方法。
（項目１５）
上記変異体がアミノ酸４０２にヒスチジンを有する、項目１３に記載の方法。
（項目１６）
上記変異体がアミノ酸１２１０にシステインを有する、項目１３に記載の方法。
（項目１７）
上記検出する工程が、（ｉ）変異体タンパク質アレルに特異的な抗体試薬と、被験体からの血液または血清サンプルを免疫学的アッセイにおいて混合する工程、および（ｉｉ）該抗体試薬とタンパク質サンプルとの間の特異的結合を決定するためのアッセイをモニターする工程を包含する、項目１３に記載の方法。
（項目１８）
上記多型部位が、ｒｓ９４２７６６１（－２４９Ｔ＞Ｃ）、ｒｓ９４２７６６２（－２０Ｔ＞Ｃ）およびｒｓ１２０９７７５５０（Ｐ６４Ｓ）からなる群より選択されるＣＦＨＲ

５遺伝子における一ヌクレオチド変異多型である、項目２に記載の方法。
（項目１９）
上記多型がｒｓ１２０９７７５５０（Ｐ６４Ｓ）である、項目１８に記載の方法。
（項目２０）
変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドが検出される、項目２に記載の方法。
（項目２１）
上記変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドが、アミノ酸４６におけるプロリンの代わりにセリンを有する、項目２０に記載の方法。
（項目２２）
ハプロタイプについてスクリーニングする工程を包含する、被験体における加齢性黄斑変性（ＡＭＤ）に対する感受性を診断する方法であって、該ハプロタイプが：
ａ）健常個体と比較して、ＡＭＤと診断された個体においてより頻繁に存在する、Ｈ因子もしくはＣＦＨＲ５遺伝子におけるリスクハプロタイプ、または
ｂ）ＡＭＤと診断された個体と比較して、健常個体においてより頻繁に存在する、Ｈ因子もしくはＣＦＨＲ５遺伝子における防御的ハプロタイプ、または
ｃ）Ｈ因子もしくはＣＦＨＲ５遺伝子における中性ハプロタイプ
である、方法。
（項目２３）
上記ハプロタイプがＨ因子遺伝子の中にある、項目２２に記載の方法。
（項目２４）
上記ハプロタイプがｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の少なくとも１つの変異体配列を含む、項目２３に記載の方法。
（項目２５）
上記ハプロタイプが、ｒｓ５２９８２５、ｒｓ８００２９２、およびｒｓ３７６６４０４の少なくとも１つの変異体配列を含む防御的ハプロタイプである、項目２３に記載の方法。
（項目２６）
項目２３に記載の方法であって、上記スクリーニングが、以下における変異：
ａ）ｒｓ５２９８２５；ｒｓ８００２９２；ｒｓ３７６６４０４；ｒｓ１０６１１４７；ｒｓ１０６１１７０；およびｒｓ２０３６７４のいずれか１つ以上；
ｂ）イントロン２（ＩＶＳ２もしくはｉｎｓＴＴ）；ｒｓ２２７４７００；エキソン１０Ａ；およびｒｓ３７５０４６のいずれか１つ以上；
ｃ）ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２の一方もしくは両方；
ｄ）ｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の１つ以上；
ｅ）ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２の少なくとも１つ；ならびにｒｓ３７６６４０４；ならびにｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の少なくとも１つ；
ｆ）少なくともｒｓ５２９８２５、ｒｓ８００２９２、ｒｓ３７６６４０４、ｒｓ１０６１１７０、およびｒｓ２０３６７４；
ｇ）エキソン２２（Ｒ１２１０Ｃ）；または
ｈ）エキソン２２（Ｒ１２１０Ｃ）および（ａ）～（ｇ）のいずれか
を決定する工程を包含する、方法。
（項目２７）
上記ハプロタイプがＣＦＨＲ５遺伝子の中にある、項目２２に記載の方法。
（項目２８）
上記ハプロタイプが、ｒｓ９４２７６６１、ｒｓ９４２７６６２およびｒｓ１２０９７５５０の少なくとも１つの変異体配列を含むＣＦＨＲ５遺伝子の中のリスクハプロタイプである、項目２７に記載の方法。
（項目２９）
Ｈ因子ポリペプチドを患者に投与する工程を包含する、加齢性黄斑変性（ＡＭＤ）を有す

ると診断されたか、またはそれを発症するリスクがあると診断された患者を治療する方法。

（項目３０）

上記患者が、ＡＭＤのリスクと関連するH因子ハプロタイプを有する、項目２９に記載の方法。

（項目３１）

上記H因子ポリペプチドがH因子防御的ハプロタイプによってコードされている、項目２９に記載の方法。

（項目３２）

上記投与が、H因子ポリペプチドをコードする配列を含むポリヌクレオチドを投与する工程であって、該配列はプロモーターに作動可能に連結されている、工程、またはH因子ポリペプチドを発現する細胞を投与する工程を包含する、項目２９に記載の方法。

（項目３３）

上記プロモーターがＲＰＥに特異的である、項目３２に記載の方法。

（項目３４）

上記H因子ポリペプチドが眼に投与される、項目２９に記載の方法。

（項目３５）

上記H因子ポリペプチドが眼内注射によって投与される、項目３４に記載の方法。

（項目３６）

ＡＭＤのリスクと関連するH因子ハプロタイプを有する患者を治療する方法であって、変異体H因子ポリペプチドをコードするH因子遺伝子からコードされた遺伝子産物の発現を減少するための薬剤を投与する工程を含む、方法。

（項目３７）

上記薬剤が、上記変異体H因子ポリペプチドのヌクレオチド配列の少なくとも一部に相補的なＲＮＡである、項目３６に記載の方法。

（項目３８）

上記ＲＮＡがアンチセンスＲＮＡである、項目３７に記載の方法。

（項目３９）

上記ＲＮＡがリボザイムである、項目３７に記載の方法。

（項目４０）

上記ＲＮＡが低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）である、項目３７に記載の方法。

（項目４１）

H因子ポリペプチドをコードする遺伝子治療ベクターおよび薬学的に受容可能な賦形剤を含む薬学的組成物。

（項目４２）

組換えH因子ポリペプチドが防御的ハプロタイプによってコードされ、かつ６２位にイソロイシンを有する、組換えH因子ポリペプチドを含む組成物。

（項目４３）

組換えH因子ポリペプチドおよび薬学的に受容可能な賦形剤を含み、病原体を含まず、かつヒト患者への投与のために適切である、薬学的組成物。

（項目４４）

上記組換えH因子ポリペプチドが防御的ハプロタイプによってコードされている、項目４３に記載の薬学的組成物。

（項目４５）

変異体H因子タンパク質に結合するが、配列番号２または配列番号３３７の配列を有するH因子タンパク質には結合しない抗体を含む、薬学的組成物。

（項目４６）

変異体ヒトH因子をコードする導入遺伝子を発現するトランスジェニック非ヒト動物であって、該変異体はアミノ酸６２におけるイソロイシンの代わりにバリンを有し（Ｉ６２Ｖ）、該変異体はアミノ酸４０２におけるチロシンの代わりにヒスチジンを有し（Ｙ４０２

Ｈ）、または該変異体はアミノ酸１２１０におけるアルギニンの代わりにシステインを有する（Ｒ１２０Ｃ）、トランスジェニック非ヒト動物。

（項目４７）

組換え変異体ヒトＨ因子を発現する単離された宿主細胞であって、該変異体はアミノ酸４０２におけるチロシンの代わりにヒスチジンを有し（Ｙ４０２Ｈ）、または該変異体はアミノ酸１２１０におけるアルギニンの代わりにシステインを有する（Ｒ１２０Ｃ）、宿主細胞。

（項目４８）

組換え変異体ヒトＨ因子を発現する単離された宿主細胞であって、該変異体が防御的ハプロタイプによってコードされている、宿主細胞。

（項目４９）

ＡＭＤを治療可能である薬剤についてスクリーニングする方法であって：該薬剤と項目４７に記載の宿主細胞を接触させる工程；およびＹ４０２ＨまたはＲ１２１０Ｃ変異体の発現またはプロセシングをモニターする工程を包含する、方法。

（項目５０）

防御的Ｈ因子タンパク質を同定する方法であって：

ａ）防御的ハプロタイプを有するとして個体を同定する工程；および

ｂ）該個体のゲノム中にコードされるＨ因子の配列を決定する工程

を包含する、方法。

（項目５１）

ＡＭＤを発症するリスクの減少と関連するＨ因子の変異体形態を同定する方法であって：

ｉ）ＡＭＤを発症するリスクの減少と関連するハプロタイプまたはディプロタイプを有するとして個体を同定する工程；

ｉｉ）該個体からゲノムＤＮＡまたはＲＮＡを入手する工程；および

ｉｉｉ）該個体のゲノム中にコードされるＨ因子のアミノ酸配列を決定する工程

を包含する、方法。

（項目５２）

表１Ａ～１Ｃに列挙されるＨ因子遺伝子中の少なくとも１つの多型部位においてアレルを区別するオリゴヌクレオチドを含む、被験体におけるＡＭＤに対する感受性を診断するためのデバイスまたはキット。

（項目５３）

上記オリゴヌクレオチドが、表１Ａ～１Ｃに列挙されるＨ因子遺伝子多型部位に及ぶ領域の核酸増幅のためのプライマーである、項目５２に記載のデバイスまたはキット。

（項目５４）

上記オリゴヌクレオチドが、表１Ａ～１Ｃに列挙されるＨ因子遺伝子多型部位に及ぶ領域の核酸ハイブリダイゼーションのためのプローブである、項目５２に記載のデバイスまたはキット。

（項目５５）

表１Ａ～１Ｃに列挙される２つ以上の多型部位のアレルを区別するオリゴヌクレオチドを有する、項目５２に記載のデバイスまたはキット。

（項目５６）

項目５５に記載のデバイスまたはキットであって、上記多型部位が：

ａ）ｒｓ５２９８２５；ｒｓ８００２９２；ｒｓ３７６６４０４；ｒｓ１０６１１４７；ｒｓ１０６１１７０；およびｒｓ２０３６７４のいずれか１つ以上；

ｂ）イントロン２（ＩＶＳ２もしくはｉｎｓＴＴ）；ｒｓ２２７４７００；エキソン１０Ａ；およびｒｓ３７５０４６のいずれか１つ以上；

ｃ）ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２の一方もしくは両方；

ｄ）ｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の１つ以上；

ｅ）ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２の少なくとも１つ；ならびにｒｓ３７６６４０４；ならびにｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の

少なくとも１つ；
ｆ）少なくともｒｓ５２９８２５、ｒｓ８００２９２、ｒｓ３７６６４０４、ｒｓ１０６１１７０、およびｒｓ２０３６７４；
ｇ）エキソン２２（Ｒ１２１０Ｃ）；または
ｈ）エキソン２２（Ｒ１２１０Ｃ）および（ａ）～（ｇ）のいずれか
を含む、デバイスまたはキット。
（項目５７）
項目５５に記載のデバイスまたはキットであって、上記多型部位が：
ａ）ｒｓ５２９８２５；ｒｓ８００２９２；ｒｓ３７６６４０４；ｒｓ１０６１１４７；ｒｓ１０６１１７０；ｒｓ２０３６７４；イントロン２（ＩＶＳ２もしくはｉｎｓＴＴ）；ｒｓ２２７４７００；エキソン１０Ａ；ｒｓ３７５０４６；およびエキソン２２（Ｒ１２１０Ｃ）ならびに
ｂ）ｒｓ９４２７６６１、ｒｓ９４２７６６２およびｒｓ１２０９７５５０のいずれか１つ以上
を含む、デバイスまたはキット。
（項目５８）
表１４に列挙されたＣＦＨＲ５遺伝子中の少なくとも１つの多型部位におけるアレルを区別するオリゴヌクレオチドを含む、被験体におけるＡＭＤに対する感受性を診断するためのデバイスまたはキット。
（項目５９）
ＩＩ型膜性増殖性糸球体腎炎（高密度沈着疾患）（ＭＰＧＮＩＩ）を発症する被験体の性向を決定するための診断方法であって、Ｈ因子遺伝子および／または補体Ｈ因子関連５（ＣＦＨＲ５）遺伝子の多型部位における変異の存在または非存在を検出する工程を含む、方法。
（項目６０）
上記変異の存在は、患者がＭＰＧＮＩＩを発症する性向の増加を有することの指標である、項目５９に記載の方法。
【図面の簡単な説明】
【００７０】
【図１】図１Ａ～１Ｌは、ヒト網膜色素上皮におけるＨ因子（図１Ａ～１Ｈ）および終末補体複合体（Ｃ５ｂ－９）（図１Ｉ～１Ｌ）の免疫学的局在決定を示す。略号：（ＲＰＥ）－脈絡膜（Ｃｈｏｒ）複合体；ブルーフ膜（ＢＭ）；網膜（Ｒｅｔ）；ドルーゼン（Ｄｒ）。
【図２】図２は、ヒト眼から抽出したＲＮＡを使用する、Ｈ因子遺伝子発現（ＣＦＨおよび短縮型ＨＦＬ１）のＲＴ－ＰＣＲ分析を示す。
【図３】図３は、分析に使用した１２個のＳＮＰ、Ｈ因子遺伝子の２２個のエキソン、２０個の短いコンセンサスリピート（ＳＣＲ）、病原体および他の基質の結合部位、ならびに連鎖不平衡（ＬＤ）ブロックのおよその位置を示すヒトＨ因子遺伝子のダイアグラムである。ＣＦＨのすべての２２個のエキソンを示す（しかしイントロンは示さない）このダイアグラムは、原寸に比例して描かれてはいない。
【図４】図４は、円のサイズおよび位置によって示されるような、リスクハプロタイプ（黒丸）、防御的ハプロタイプ（線付き丸）、中性ハプロタイプ（白丸）および先祖ハプロタイプ（表示付き）の間の関連性、ならびにハプロタイプの相対的頻度を示す、ヒトＨ因子遺伝子ＳＮＰのハプロタイプネットワークダイアグラムである。
【図５】図５は、ヒトＨ因子遺伝子のハプロタイプおよびディプロタイプの連関分析を示す。情報を与える８個のＳＮＰを、ＡＭＤの症例および対照において対の連鎖不均衡について分析した。示される多型部位におけるコード鎖上のヌクレオチドを、ＩＶＳ１以外について示し、ＩＶＳ１では、非コード鎖上のヌクレオチドを示す。
【図６－１】図６は、ヒトＨ因子ｃＤＮＡの参照型の３９２６塩基ヌクレオチド配列（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｙ００７１６［配列番号１］）を示す。ＡＴＧ開始コド

ンは７４位のヌクレオチドで開始し、ＴＡＧ終止コドンは３７６９位のヌクレオチドで終わる。

【図６－２】図６は、ヒトＨ因子ｃＤＮＡの参照型の３９２６塩基ヌクレオチド配列（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｙ００７１６［配列番号１］）を示す。ＡＴＧ開始コドンは７４位のヌクレオチドで開始し、ＴＡＧ終止コドンは３７６９位のヌクレオチドで終わる。

【図７】図７は、配列番号１によってコードされるポリペプチド配列（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｙ００７１６［配列番号２］）を示す。１２３１アミノ酸のＨ因子ポリペプチドは、１８アミノ酸Ｎ末端シグナルペプチドを含む。

【図８】図８は、ヒトＨ因子の短縮型であるＨＦＬ１の参照型の１６５８塩基ヌクレオチド配列（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｘ０７５２３［配列番号３］）を示す。ＡＴＧ開始コドンは７４位のヌクレオチドで開始し、ＴＧＡ終止コドンは１４２３位のヌクレオチドで終わる。

【図９】図９は、配列番号３によってコードされるＨＦＬ１の参照型のポリペプチド配列（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｘ０７５２３［配列番号４］）を示す。４４９アミノ酸のＨＦＬ１ポリペプチドは、１８アミノ酸Ｎ末端シグナルペプチドを含む。

【図１０】図１０は、ヒトＨ因子の例示的な防御的変異体のポリペプチド配列［配列番号５］を示す。この防御的変異体Ｈ因子ポリペプチドは、６２位のアミノ酸にイソロイシン、および４０２位のアミノ酸にチロシンを有する（太字で示す）。

【図１１】図１１は、短縮型のヒトＨ因子であるＨＦＬ１の例示的な防御的変異体のポリペプチド配列（配列番号６）を示す。この防御的変異体短縮型Ｈ因子ポリペプチドは、６２位のアミノ酸にイソロイシン、および４０２位のアミノ酸にチロシンを有する（太字で示す）。

【図１２】図１２は、（Ａ）光学顕微鏡および（Ｂ）電子顕微鏡によって見られるような、ＭＰＧＮＩＩを有する患者における毛細血管壁肥厚を引き起こす、高密度の膜内沈着物を有する顕著な糸球体細胞過多を示す。沈着物は、糸球体基底膜（ＧＢＭ）の緻密層におけるセグメント性、不連続、または拡散パターンを形成し得る。光学顕微鏡によると、これらは、好酸性かつ屈折性であり、過ヨウ素酸－シッフで明るく染まり、そして高度に浸透性であり、これはそれらの高電子密度の外見を説明する（Ａ）。電子顕微鏡によっても、沈着物は下位構造を欠き、非常に暗い均質な染みとして見える（Ｂ）。高密度沈着物の正確な組成は未知のままである（バーは５μｍである）。

【図１３】図１３は、ＡＭＤおよびＭＰＧＮＩＩを有する患者において高レベルで全身的に活性化される、補体カスケードの代替経路の活性化および調節を示すダイアグラムである。補体カスケードの代替経路は、ＭＰＧＮ　ＩＩ／ＤＤＤを有する患者において高レベルで全身的に活性化される。通常、Ｃ３の連続的な低レベルの活性化は、チックオーバーとして知られる自発的加水分解のプロセスによって起こる。Ｃ３加水分解は、ダイアグラムの上端に示すタンパク質の大きなコンホメーションの変化を伴う。コンホメーションの変化は、Ｃ３（Ｈ２０）を、Ｃ３切断生成物であるＣ３ｂと類似させる。最初のコンバターゼ、Ｃ３（Ｈ２Ｏ）Ｂｂは、Ｃ３を活性化してＣ３ｂを形成する。Ｃ３ｂは短い半減期を有するが、これがＩｇＧ、細胞または基底膜に結合する場合、これは即時的な不活性から保護される。（Ｃ３ｂ）２－ＩｇＧ複合体が流体相中で形成し、プロペルジン（Ｐ）を結合し、これはＢ因子結合およびＣ３ｂＢｂの生成を促進する、ここではＢｂ（Ｃ３ｂ）２－ＩｇＧ－プロペルジン複合体として示される、代替経路のコンバターゼである。増幅ループは矢印によって示す。Ｃ３ＮｅＦは、Ｃ３コンバターゼの半減期を延長し、挿入図の中に示される。Ｃ３コンバターゼを分解する１つのメカニズムは、ｆＨとして下の右に示される補体Ｈ因子（ＣＦＨ）とのその相互作用を通してである。Ｈ因子における欠失および変異は、ＭＰＧＮ　ＩＩ／ＤＤＤと関連する。

【図１４】図１４は、染色体１ｑ３２上の補体活性化の調節因子（ＲＣＡ）遺伝子クラスターの組織化、ならびに補体Ｈ因子（ＣＦＨ）、Ｈ因子様１（ＣＦＨＬ１）ならびにＨ因子関連１、２、３、４および５（ＣＦＨＲ１、ＣＦＨＲ２、ＣＦＨＲ３、ＣＦＨＲ４およ

びＣＦＨＲ５）における短いコンセンサスリピート（ＳＣＲ）として知られるおよそ６０アミノ酸ドメインの配置を示すダイアグラムである。ＣＦＨは２０個のＳＣＲを有する。これらのＳＣＲのいくつかと相互作用するパートナーは決定されており、上端の右に示す（ＣＲＰ、Ｃ反応性タンパク質；Ｈｅｐ、ヘパリン）。補体Ｈ因子様１（ＣＦＨＬ１）は、ＣＦＨのスプライシングアイソフォームであるのに対して、補体Ｈ因子関連タンパク質１～５（ＣＦＨＲ１～５）は各々特有の遺伝子（ＣＦＨＲ１～５）によってコードされる。ＣＦＨＲ１～５のＳＣＲは、卵形の中の数字によって示されるように、ＣＦＨ中のＳＣＲのいくつかに類似している。例えば、ＣＦＨＲ５は９個のＳＣＲを有し、最初の２つはＨ因子のＳＣＲ６および７に類似しており、それゆえに、ＣＲＰおよびヘパリン結合特性を有する。ＣＦＨＲ５のＳＣＲ５～７は、対応する卵形の中に１２～１４の数字を有する。なぜなら、これらのＳＣＲはＨ因子のＳＣＲ１２～１４に類似しており、Ｃ３ｂおよびヘパリン結合特性を有するからである。

【図１５】図１５は、Ａ３０７ＡおよびＹ４０２ＨがＨ因子中で連鎖不均衡にあり、かつ－２４９Ｔ＞Ｃおよび－２０Ｔ＞ＣがＣＦＨＲ５中で連鎖不均衡にあることを示す、連鎖不均衡プロットを示す。

【図１６】図１６は、ヒトＣＦＨＲ５の参照型の２８２１塩基ヌクレオチド配列（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＦ２９５３２７［配列番号７］）を示す。ＡＴＧ開始コドンは９４位のヌクレオチドで開始し、ＴＧＡ終止コドンは１８０３位のヌクレオチドで終わる。

【図１７】図１７は、配列番号７によってコードされるポリペプチド配列（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＡＫ１５６１９［配列番号８］）を示す。５６９アミノ酸のＣＦＨＲ５ポリペプチドは、１８アミノ酸Ｎ末端シグナルペプチドを含む。

【図１８】図１８は、ＣＦＨおよびＨ因子関連タンパク質についての遺伝子のゲノム重複を示す。エキソンを垂直線で示す。同じ文字で標識した領域（例えば、Ａ、Ａ’、およびＡ’’）は実質的に同一の配列を有する。

【発明を実施するための形態】

【００７１】

（発明の詳細な説明）

Ｉ．序論

本発明は、Ｈ因子遺伝子、およびＨ因子関連５遺伝子などのＨ因子関連遺伝子における複数の変異から構成される多型およびハプロタイプのコレクションを提供する。これらの多型およびハプロタイプは、加齢性黄斑変性（ＡＭＤ）および他のＨ因子関連病気と関連する。特定のこれらの多型およびハプロタイプは、変異体Ｈ因子ポリペプチドを生じる。これらおよび他の多型および多型のセット（例えば、ハプロタイプ）の検出は、ＡＭＤについての診断アッセイを設計および実施する際に有用である。多型および多型のセットは、核酸の分析によって、Ｈ因子コード配列によってコードされるポリペプチド（スプライシング変異体によってコードされるポリペプチドを含む）の分析によって、または当該分野において公知である他の手段によって検出することができる。このような多型およびハプロタイプの分析はまた、ＡＭＤについての予防的および治療的レジメンを設計する際に有用である。

【００７２】

Ｈ因子は、補体系の主要な調節因子として機能する多機能タンパク質である。Ｚｉｐｆｅｌ，２００１，「Ｆａｃｔｏｒ Ｈ ａｎｄ ｄｉｓｅａｓｅ：ａ ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ ｒｅｇｕｌａｔｏｒ ａｆｆｅｃｔｓ ｖｉｔａｌ ｂｏｄｙ ｆｕｎｃｔｉｏｎｓ」Ｓｅｍｉｎ Ｔｈｒｏｍｂ Ｈｅｍｏｓｔ．２７：１９１－９を参照のこと。Ｈ因子タンパク質活性には以下が含まれる：（１）Ｃ反応性タンパク質（ＣＲＰ）への結合、（２）Ｃ３ｂへの結合、（３）ヘパリンへの結合、（４）シアル酸への結合、（５）内皮細胞表面への結合、（６）細胞インテグリン受容体への結合、（７）微生物を含む病原体への結合（図３を参照のこと）、および（８）Ｃ３ｂコファクター活性。ＨＦ１、ＣＦＨおよびＨＦとして知られるＨ因子遺伝子は、ヒト染色体１上の１ｑ３２位に局在している。

１ｑ３２の特定の遺伝子座は、多数の補体経路関連遺伝子を含む。補体活性化遺伝子クラスターの調節因子（ＲＣＡ）といわれるこれらの遺伝子の１つの群は、Ｈ因子をコードする遺伝子、５つのＨ因子関連遺伝子（それぞれ、ＦＨＲ－１、ＦＨＲ－２、ＦＨＲ－３、ＦＨＲ－４およびＦＨＲ－５、またはＣＦＨＲ１、ＣＦＨＲ２、ＣＦＨＲ３、ＣＦＨＲ４およびＣＦＨＲ５）、および凝固因子ＸＩＩＩのβサブユニットをコードする遺伝子を含む。Ｈ因子およびＨ因子関連遺伝子は、短いコンセンサスリピート（ＳＣＲ）からほぼ完全に構成される。Ｈ因子およびＦＨＬ１は、ＳＣＲ１～２０および１～７からそれぞれ構成される。ＦＨＲ－１、ＦＨＲ－２、ＦＨＲ－３、ＦＨＲ－４およびＦＨＲ－５は、５、４、５、５および８ＳＣＲからそれぞれ構成される（図１４を参照のこと）。セントロメアからテロメアまでの遺伝子の順番は、ＦＨ／ＦＨＬ１、ＦＨＲ－３、ＦＨＲ－１、ＦＨＲ－４、ＦＨＲ－２およびＦＨＲ－５である。

【００７３】

Ｈ因子遺伝子

参照型のヒトＨ因子ｃＤＮＡ（配列番号１）（Ｒｉｐｏｃｈｅら、１９８８，Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｊ ２４９：５９３－６０２を参照のこと）およびゲノム配列が決定された。Ｈ因子ｃＤＮＡは、１５５ｋＤａの見かけの分子量を有する１２３１アミノ酸長のポリペプチド（配列番号２）をコードする。ＦＨＬ－１として知られる（およびまた、ＨＦＬ１またはＣＦＨＴとも呼ばれてきた）Ｈ因子の選択的スプライシング型が存在する。ＦＨＬ－１（配列番号３）は、Ｈ因子のエキソン１から９までに本質的に対応する（Ｒｉｐｏｃｈｅら、１９８８，Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｊ ２４９：５９３－６０２を参照のこと）。ＦＨＬ１ ｃＤＮＡは、４５～５０ｋＤＡの見かけの分子量を有する４４９アミノ酸長のポリペプチド（配列番号４）をコードする。ＦＨ１およびＦＨＬ１の最初の４４５アミノ酸は同一であり、ＦＨＬ１はＣ末端４アミノ酸を有する（エキソン１０Ａ）。代替的なエキソン１０Ａは、エキソン９とエキソン１０との間のイントロンに局在化する。ヒトＨ因子およびＦＨＬ１についてのｃＤＮＡおよびアミノ酸配列データは、ＥＭＢＬ／ＧｅｎＢａｎｋデータライブラリーにおいて、それぞれ、アクセッション番号Ｙ００７１６およびＸ０７５２３の下で見出される。参照型のヒトＨ因子ｃＤＮＡの３９２６塩基ヌクレオチド配列（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｙ００７１６［配列番号１］）は図６に示され、配列番号１によってコードされるポリペプチド配列（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｙ００７１６［配列番号２］）は図７に示される。ヒトＨ因子の短縮型である、参照型のＨＦＬ１の１６５８塩基ヌクレオチド配列（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｘ０７５２３［配列番号３］）は図８に示され、配列番号３によってコードされるポリペプチド配列（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｘ０７５２３［配列番号４］）は図９に示される。Ｈ因子遺伝子配列（１５０６２６塩基長）は、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＬ０４９７４４の下で見出される。Ｈ因子プロモーターは、Ｈ因子遺伝子のコード領域に対して５’に局在化する。

【００７４】

ＦＨＲ－１遺伝子

ＦＨＲ－１遺伝子はまた、ＣＨＦＲ１、ＣＦＨＬ１、ＣＦＨＬ、ＦＨＲ１およびＨＦＬ１としても知られる。ヒトＨＦＲ－１の参照型のｃＤＮＡ配列（Ｅｓｔａｌｌｅｒら、１９９１，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４６：３１９０－３１９６を参照のこと）およびゲノム配列が決定された。ＦＨＲ－１ ｃＤＮＡは、３９ｋＤａの予測分子量を有する３３０アミノ酸長のポリペプチドをコードする。ヒトＦＨＲ－１についてのｃＤＮＡおよびアミノ酸配列データは、ＥＭＢＬ／ＧｅｎＢａｎｋデータライブラリーにおいてアクセッション番号Ｍ６５２９２の下で見出される。ＦＨＲ－１遺伝子配列は、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＬ０４９７４１において見出される。

【００７５】

ＦＨＲ－２遺伝子

ＦＨＲ－２遺伝子はまた、ＣＨＦＲ２、ＣＦＨＬ２、ＦＨＲ２およびＨＦＬ３としても知られる。ヒトＨＦＲ－２の参照型のｃＤＮＡ配列（Ｓｔｒａｕｓｂｅｒｇら、Ｐｒｏｃ

．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ ９９：１６８９９－１６９０３を参照のこと）およびゲノム配列が決定された。ＦＨＲ－２ ｃＤＮＡは、３１ｋＤａの予測分子量を有する２７０アミノ酸長のポリペプチドをコードする。ヒトＦＨＲ－２についてのｃＤＮＡおよびアミノ酸配列データは、ＥＭＢＬ／ＧｅｎＢａｎｋデータライブラリーにおいてアクセッション番号ＢＣ０２２２８３の下で見出される。ＦＨＲ－２遺伝子配列は、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＬ１３９４１８において見出される。

【００７６】

ＦＨＲ－３遺伝子

ＦＨＲ－３遺伝子はまた、ＣＦＨＲ３、ＣＦＨＬ３、ＦＨＲ３およびＨＬＦ４としても知られる。ヒトＨＦＲ－３の参照型のｃＤＮＡ配列（Ｓｔｒａｕｓｂｅｒｇら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ ９９：１６８９９－１６９０３を参照のこと）およびゲノム配列が決定された。ＦＨＲ－３ ｃＤＮＡは、３８ｋＤａの予測分子量を有する３３０アミノ酸長のポリペプチドをコードする。ヒトＦＨＲ－３についてのｃＤＮＡおよびアミノ酸配列データは、ＥＭＢＬ／ＧｅｎＢａｎｋデータライブラリーにおいてアクセッション番号ＢＣ０５８００９の下で見出される。ＦＨＲ－３遺伝子配列は、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＬ０４９７４１において見出される。

【００７７】

ＦＨＲ－４遺伝子

ＦＨＲ－４遺伝子はまた、ＣＦＨＲ４、ＣＦＨＬ４およびＦＨＲ４としても知られる。ヒトＨＦＲ－４の参照型のｃＤＮＡ配列（Ｓｋｅｒｋａら、１９９１，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７２：５６２７－５６３４を参照のこと）およびゲノム配列が決定された。ＦＨＲ－４ ｃＤＮＡは、３８ｋＤａの予測分子量を有する３３１アミノ酸長のポリペプチドをコードする。ヒトＦＨＲ－４についてのｃＤＮＡおよびアミノ酸配列データは、ＥＭＢＬ／ＧｅｎＢａｎｋデータライブラリーにおいてアクセッション番号Ｘ９８３３７の下で見出される。ＦＨＲ－４遺伝子配列は、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＦ１９０８１６（５’末端）、ＡＬ１３９４１８（３’末端）およびＢＸ２４８４１５において見出される。

【００７８】

ＦＨＲ－５遺伝子

ＦＨＲ－５遺伝子はまた、ＣＦＨＲ５、ＣＦＨＬ５およびＦＨＲ５としても知られる。ヒトＣＦＨＲ５の参照型のｃＤＮＡ配列（配列番号８３）（ＭｃＲａｅら、２００１，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７６：６７４７－６７５４を参照のこと）およびゲノム配列が決定された。ＣＦＨＲ５ ｃＤＮＡは、６５ｋＤａの見かけの分子量を有する５６９アミノ酸長のポリペプチド（配列番号８）をコードする。ヒトＣＦＨＲ５についてのｃＤＮＡおよびアミノ酸配列データは、ＥＭＢＬ／ＧｅｎＢａｎｋデータライブラリーにおいてアクセッション番号ＡＦ２９５３２７の下で見出される。ヒトＣＦＨＲ５の参照型の２８２１塩基ヌクレオチド配列（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＦ２９５３２７［配列番号７］）は図１６に示され、配列番号７によってコードされるポリペプチド配列（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＡＫ１５６１９［配列番号８］）は図１７に示される。ＣＦＨＲ５遺伝子配列は、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＬ１３９４１８（５’末端）およびＡＬ３５３８０９（３’末端）において見出される。ＦＨＲ－５プロモーターはＣＦＨＲ５遺伝子のコード領域に対して５’に局在化する。

【００７９】

ＩＩ．定義

以下の定義は、本発明の理解を補助するために提供される。他に定義されない限り、本明細書で使用される、すべての技術用語、表記法および他の科学的または医学的な用語または用語法は、医学および分子生物学の分野における当業者によって共通して理解される意味を有することが意図される。ある場合において、共通して理解される意味を有する用語は、明確さ、および／または即時的な参照のために本明細書で定義され、そして本明細書にこのような定義を含めることは、当該分野において一般的に理解されることを超えた

実質的な違いを表すものと仮定されるべきではない。

【００８０】

「核酸」、「ポリヌクレオチド」または「オリゴヌクレオチド」は、任意の長さのポリマー型のヌクレオチドであり、ＤＮＡまたはＲＮＡであってもよく、そして一本鎖または二本鎖であってもよい。核酸は、プロモーターまたは他の調節配列を含んでもよい。オリゴヌクレオチドは、通常、合成手段によって調製される。核酸には、表１Ａ、表１Ｂおよび／もしくは表１Ｃに示され、あるいはＨ因子遺伝子中にあることが知られている多型部位の任意の１つに及び、またはそれに隣接するＤＮＡのセグメントまたはそれらの補体が含まれる。これらのセグメントは、通常、５個から１００個の間の連続する塩基であり、５、１０、１２、１５、２０、または２５ヌクレオチドの下限から、１０、１５、２０、２５、３０、５０または１００ヌクレオチドの上限までの範囲であることが多い（ここで、上限は下限よりも大きい）。５～１０、５～２０、１０～２０、１２～３０、１５～３０、１０～５０、２０～５０または２０～１００塩基が一般的である。多型部位はセグメントの任意の位置に存在することができる。二本鎖核酸の一方の鎖の配列の言及は、相補鎖の配列を規定し、文脈から他のことが明白である場合を除いて、核酸の一方の鎖への言及はまた、その補体への言及である。特定の応用のために、核酸（例えば、ＲＮＡ）分子は、細胞内安定性および半減期を増加させるために修飾されてもよい。可能な修飾には、分子のバックボーン中のホスホジエステラーゼ結合よりもむしろホスホロチオエートまたは２’－Ｏ－メチルの使用が含まれるがこれに限定されない。修飾核酸には、ペプチド核酸（ＰＮＡ）および、イノシン、キューオシン、およびワイブトシンなどの特殊な塩基を有する核酸、ならびにアセチル－、メチル－、チオ－および同様に修飾された型のアデニン、シチジン、グアニン、チミン、およびウリジンを有する核酸が含まれ、これらは、内因性エンドヌクレアーゼによって容易には認識されない。

【００８１】

「ハイブリダイゼーションプローブ」は、核酸の相補鎖に対して塩基特異的な様式で結合が可能である核酸である。このようなプローブは核酸およびペプチド核酸を含む（Ｎｉｅｌｓｅｎら、１９９１）。ハイブリダイゼーションは、当該分野で公知であるストリンジェントな条件下で実施されてもよい。例えば、以下を参照のこと：ＢｅｒｇｅｒおよびＫｉｍｍｅｌ（１９８７）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１５２：Ｇｕｉｄｅ Ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ：Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．；Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８９）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ Ｅｄ．，Ｖｏｌｓ．１－３，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ；Ｓａｍｂｏｏｋ（２００１）３ｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ；Ｒｙｃｈｌｉｋ，Ｗ．およびＲｈｏａｄｓ，Ｒ．Ｅ．，１９８９，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１７，８５４３；Ｍｕｅｌｌｅｒ，Ｐ．Ｒ．ら（１９９３）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ １５．５所収、Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，Ｉｎｃ．およびＪｏｈｎ Ｗｉｌｅｙおよびｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；ならびにＡｎｄｅｒｓｏｎおよびＹｏｕｎｇ，Ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ Ｆｉｌｔｅｒ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ ｉｎ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ（１９８５））。本明細書で使用される場合、「プローブ」という用語はプライマーを含む。プローブおよびプライマーは、「オリゴヌクレオチド」と呼ばれることもある。

【００８２】

「プライマー」という用語は、適切な条件下で、適切な緩衝液中および適切な温度において、鋳型指向性のＤＮＡ合成の開始点として作用することが可能である一本鎖オリゴヌクレオチドをいう。プライマーの適切な長さは、意図されるプライマーの用途に依存するが、典型的には１５から３０ヌクレオチドまでの範囲である。プライマー配列は鋳型に対して正確に相補的である必要はないが、鋳型にハイブリダイズするために十分に相補的でなければならない。「プライマー部位」という用語は、プライマーがハイブリダイズする

標的ＤＮＡの領域をいう。「プライマー対」という用語は、増幅されるＤＮＡ配列の５’末端にハイブリダイズする５’上流プライマー、および増幅されるＤＮＡ配列の３’末端にハイブリダイズする３’下流プライマーを含む、プライマーのセットを意味する。

【００８３】

短いプローブおよびプライマーのための例示的なハイブリダイゼーション条件は、計算されたＴｍよりも約５～１２℃下である。Ｔｍを計算するための式は公知であり、かつ以下を含む：＜１４塩基のオリゴについて、かつ５０ｍＭの一価カチオンの存在下で反応が実行されることを仮定して、Ｔｍ＝４℃×（プライマー中のＧおよびＣの数）＋２℃×（プライマー中のＡおよびＴの数）。より長いオリゴについては、以下の式を使用することができる：Ｔｍ＝６４．９℃＋４１℃×（プライマー中のＧおよびＣの数－１６．４）／Ｎ、ここで、Ｎはプライマーの長さである。別の一般的に使用される式は、反応の塩濃度を考慮に入れている（Ｒｙｃｈｌｉｋ、前出、Ｓａｍｂｒｏｏｋ、前出、Ｍｕｅｌｌｅｒ、前出）：Ｔｍ＝８１．５℃＋１６．６℃×（ｌｏｇ１０［Ｎａ＋］＋［Ｋ＋］）＋０．４１℃×（ＧＣ％）－６７５／Ｎ、ここで、Ｎはオリゴ中のヌクレオチドの数である。上述の式は特定の適用のための出発点を提供する；しかし、特定のプローブおよびプライマーの設計は、さらなる因子および異なる因子を考慮に入れてもよい。本発明の方法における使用のためのプローブおよびプライマーの設計のための方法は、当該分野で周知である。

【００８４】

「リスク」「防御的」および「中性」という用語は、このような変異のパターンによって特徴付けられる遺伝子によってコードされる集団中の変異、ＳＮＰＳ、ハプロタイプ、ディプロタイプ、およびタンパク質を説明するために使用される。リスクハプロタイプは、１つの遺伝子、本明細書ではＨ因子またはＨ因子関連遺伝子のアレル型であり、ＡＭＤを発症するリスクの増加に関連する少なくとも１つの変異体多型、好ましくは、変異体多型のセットを含む。「変異体」という用語は、Ｈ因子またはＨ因子関連遺伝子に関連して使用される場合、配列が、集団、本明細書では、欧州－米国血統のヒトにおいて最も優勢である配列とは異なるヌクレオチド配列をいう。変異体多型は、遺伝子のコード部分または非コード部分においてであり得る。リスクＨ因子ハプロタイプの例は、アミノ酸４０２にヒスチジンを、および／またはアミノ酸１２１０にシステインをコードするＨ因子遺伝子のアレルである。リスクハプロタイプは、天然に存在することが可能であり、または組換え技術によって合成することが可能である。防御的ハプロタイプは、遺伝子、本明細書ではＨ因子またはＨ因子関連遺伝子のアレル型であり、ＡＭＤを発症するリスクの減少に関連する少なくとも１つの変異体多型、好ましくは、変異体多型のセットを含む。例えば、１つの防御的Ｈ因子ハプロタイプは、アミノ酸６２においてイソロイシンをコードするＨ因子遺伝子のアレルを有する。防御的ハプロタイプは、天然に存在することが可能であり、または組換え技術によって合成することが可能である。中性ハプロタイプは、遺伝子、本明細書ではＨ因子またはＨ因子関連遺伝子のアレル型であり、ＡＭＤを発症するリスクの増加または減少のいずれかを有する集団または民族的群に関連する変異体多型を含まない。以下の議論から、「中性」ハプロタイプにコードされるタンパク質は、ＡＭＤまたは他の病気のための治療または予防の必要がある患者に投与されるときに防御的であり得る。すなわち、ＣＦＨまたはＣＦＨＲ５の「中性」と「防御的」の両方の型は、例えば、ＡＭＤを有するかまたはＡＭＤを発症するリスクがある被験体に投与されるときに、治療的な利点を提供することができ、従って、疾患から被験体を「防御する」ことができる。

【００８５】

「野生型」という用語は、配列が、集団、本明細書では、欧州－米国血統のヒトにおいて最も優勢である型である核酸またはポリペプチドをいう（およそ４０％優勢、図５を参照のこと）。本開示において、「野生型」Ｈ因子タンパク質は、４０２位のアミノ酸がチロシンであること（Ｙ；［配列番号３３７］）以外は、配列番号２（図７）の配列を有する。本開示において、野生型Ｈ因子タンパク質をコードするＨ因子遺伝子は、４０２位のアミノ酸に対応する１２７７塩基で始まるコドンがチロシンをコードすること（ＴＡＴ；

［配列番号３３６］）以外は、配列番号１（図６）の配列を有する。

【００８６】

「変異体」という用語は、Ｈ因子またはＨ因子関連ポリペプチドに関連して使用される場合、配列が、コードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変化させる位置において正常型または野生型の配列とは異なるポリペプチドをいう。例えば、Ｈ因子遺伝子のヌクレオチド配列におけるある変異または置換は、異なるアミノ酸がコードされるようにコドンを変化させ（例えば、および非限定的に、Ｉ６２Ｖ、Ｙ４０２Ｈ、Ｄ９３６Ｅの１つ以上における代替的なアレルを有する）、変異体ポリペプチドを生じることがある。変異体ポリペプチドはリスクと関連し得（例えば、４０２位にヒスチジンを有する）、防御と関連し得（例えば、６２位にイソロイシンを有する）、または中性ハプロタイプによってコードされ得る（例えば、９３６位にアスパラギン酸を有する）。変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドはリスクと関連し得（例えば、４６位にセリンを有する）、防御と関連し得、または中性であり得る。

【００８７】

「参照」という用語は、Ｈ因子ポリペプチドに言及する場合、全長（ＦＨ１、配列番号２）または短縮型（ＦＨＬ１、配列番号４）ヒトＨ因子について、アミノ酸配列が、Ｒｉｐｏｃｈｅら、１９８８，Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｊ．２４９：５９３－６０２によって記載される配列に対して同一であるポリペプチドを意味する。「参照」という用語は、ＣＦＨＲ５ポリペプチドに言及する場合、全長ヒトＣＦＨＲ５（配列番号８）について、アミノ酸配列が、ＭｃＲａｅら、２００１，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７６：６７４７－６７５４によって記載される配列と同一であるポリペプチドを意味する。第１の同定されたアレル型は、参照型またはアレルと任意に指定され；他のアレル型は、代替アレルまたは変異体アレルとして指定される。野生型および変異体形態は、参照型と実質的な配列同一性を有し得る（例えば、野生型または変異体形態は、野生型または変異体のアミノ酸位置の少なくとも９０％、時折、位置の少なくとも９５％、および時折、位置の少なくとも９８％または９９％において、参照型と同一であり得る）。変異体は、フレームシフト突然変異またはスプライシング変異に起因するタンパク質の特定の領域において参照型とは異なり得る。

【００８８】

「多型」という用語は、集団中の２つ以上の遺伝的に決定された代替的配列またはアレルの存在をいう。「多型部位」は、配列の相違が存在する遺伝子座である。多型部位は少なくとも２つのアレルを有する。ダイアレル多型は２つのアレルを有する。トリアレル多型は３つのアレルを有する。二倍体生物は、アレル型について、ホモ接合性またはヘテロ接合性であり得る。多型部位は、１塩基対までの小ささであり得る。多型部位の例には以下が含まれる：制限フラグメント長多型（ＲＥＬＰ）；変数のタンデムリピート（ＶＮＴＲ）；超可変領域；ミニサテライト；ジヌクレオチドリピート；トリヌクレオチドリピート；テトラヌクレオチドリピート；および単純配列リピート。本明細書で使用される場合、「多型」への言及は、多型のセット（すなわち、ハプロタイプ）を包含することができる。

【００８９】

「一ヌクレオチド変異多型（ＳＮＰ）」は、アレル配列間の変異の部位である、単一のヌクレオチドによって占められる多型部位に存在する。この部位は、通常、アレルの高度に保存性の配列に先行され、およびこの配列に続く。ＳＮＰは、通常、多型部位において、１つのヌクレオチドの別のヌクレオチドへの置換に起因して生じる。１つのプリンの別のプリンによる置換、または１つのピリミジンの別のピリミジンによる置換はトランジションと呼ばれる。ピリミジンによるプリンの置換、またはその逆はトランスバージョンと呼ばれる。同義語ＳＮＰとは、コードされたポリペプチドのアミノ酸配列を変化させない、コード領域における１つのヌクレオチドの別のヌクレオチドへの置換をいう。非同義語ＳＮＰとは、コードされたポリペプチドのアミノ酸配列を変化させる、コード領域における１つのヌクレオチドの別のヌクレオチドへの置換をいう。ＳＮＰはまた、参照アレルに

対して、単数または複数のヌクレオチドの欠失または挿入から生じる可能性がある。

【００９０】

多型の「セット」とは、表１Ａ、表１Ｂおよび／または表１Ｃに示され、あるいはＨ因子遺伝子もしくは他の遺伝子の中で知られている、２つ以上の多型、例えば、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、または６個より多くの多型を意味する。

【００９１】

「ハプロタイプ」という用語は、個体の遺伝子の中の多型部位の、多型またはアレルのセットの指定をいう。例えば、「１１２」Ｈ因子ハプロタイプとは、最初の２つの多型部位の各々におけるアレル１および第３の多型部位における多型２を含む、Ｈ因子遺伝子をいう。「ディプロタイプ」はハプロタイプ対である。

【００９２】

「単離された」核酸とは、組成物中に存在する優勢な種である、核酸種を意味する。単離されたとは、核酸が、それが天然に付随する少なくとも１つの化合物から分離されていることを意味する。精製された核酸は、（分子量ベースで）存在するすべての高分子種の少なくとも約５０、８０または９０パーセントを含む。

【００９３】

２つのアミノ酸配列は、それらが少なくとも約８０％同一、好ましくは少なくとも約９０％同一、より好ましくは少なくとも約９５％同一、少なくとも約９８％同一、または少なくとも約９９％同一である場合に、「実質的な同一性」を有すると見なされる。配列同一性パーセンテージは、典型的には、２つの配列間の最適なアラインメントを決定すること、および２つの配列を比較することによって計算される。配列の最適なアラインメントは、検査によって、またはＳｍｉｔｈおよびＷａｔｅｒｍａｎ、１９８１，Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．２：４８２の局所的相同性アルゴリズムを使用することによって、ＮｅｅｄｌｅｍａｎおよびＷｕｎｓｃｈ、１９７０，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４３の相同性アラインメントアルゴリズムを使用することによって、ＰｅａｒｓｏｎおよびＬｉｐｍａｎ、１９８８，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ Ｕ．Ｓ．Ａ．８５：２４４４の類似性のための検索方法を使用することによって、アミノ酸比較のためのデフォルトパラメーター（例えば、ギャップスコアリングなどのための）を使用するこれらのアルゴリズムのコンピュータ化手段によって（例えば、ｔｈｅ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，５７５ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｒ．，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓ．において）実施されてもよい。特定の長さまたは領域に関して、２つの配列間で配列同一性を説明することが望ましいことがある（例えば、２つの配列は、少なくとも５００塩基対の長さにわたって少なくとも９５％の同一性を有すると説明されてもよい）。通常、その長さは、少なくとも約５０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００または１０００アミノ酸、または参照タンパク質の全長である。２つのアミノ酸配列はまた、それらが１、２、もしくは３残基、または２～２０残基、２～１０残基、３～２０残基、もしくは３～１０残基異なる場合に、実質的な同一性を有すると見なすことができる。

【００９４】

「連鎖」は、同じ染色体上のそれらの位置の結果として、一緒に遺伝される遺伝子、アレル、遺伝子座、または遺伝子マーカーの傾向を説明する。連鎖は、２つの遺伝子、アレル、遺伝子座または遺伝子マーカー間の組換えのパーセントによって測定することができる。典型的には、互いに５０センチモルガン（ｃＭ）の距離内に存在する遺伝子座は連鎖する。連鎖マーカーは、同じ遺伝子または遺伝子クラスターの中に存在する可能性がある。「連鎖不均衡」または「アレル連関」は、集団中の任意の特定のアレル頻度について偶然に予測されるよりもより高い頻度である、近傍の染色体の位置における特異的アレルまたは遺伝子マーカーとの特定のアレルまたは遺伝子マーカーの優先的な連関を意味する。連鎖不均衡にあるマーカーは、たとえそのマーカーそれ自体が疾患を引き起こさない場合

であっても、疾患に対する感受性を検出する際に特に有用であり得る。

【００９５】

「診断する」および「診断」という用語は、個体が疾患（徴候または症状を伴うものまたは伴わないものを含む）を発症する性向を有するか否かを決定する能力をいう。疾患を発症する性向の診断はまた「スクリーニング」と呼ぶことができ、本明細書で使用される場合、診断およびスクリーニングという用語は交換可能に使用される。病気を発症する性向の増加または減少を有するとは、病気を伴わない集団中の個体に対する、病気を発症する可能性をいうことが理解されよう。

【００９６】

ＩＩＩ．表

本明細書で言及される特定の表は、下記の実施例に従って提供される。以下の説明が読者を補助するために提供される。

【００９７】

表１Ａ～１Ｃは、ヒトＨ因子遺伝子多型および加齢性黄斑変性とのそれらの関連を示す。（１Ａ）ｄｂＳＮＰ番号、位置、多型に及ぶコード鎖（上、５’から３’方向）および非コード鎖（下）の配列、アミノ酸の変化、対照およびＡＭＤ症例についてのアレル頻度、ヒトＨ因子遺伝子における１ＳＮＰについてのχ^2およびＰ－値を示す。（１Ｂ）ｄｂＳＮＰ番号、質問配列、チンパンジーＨ因子遺伝子における対応するヌクレオチド、位置、アミノ酸の変化、ならびにヒトＨ因子遺伝子における１１個のＳＮＰについてのプライマーおよびプローブのセットを示す。（１Ｃ）存在する場合、ｄｂＳＮＰデータベース中には見出されないヒトＨ因子遺伝子中の１４個のＳＮＰについての、位置、多型に及ぶ配列、アミノ酸の位置およびアミノ酸の変化を示す。

【００９８】

表２は、ＡＭＤ症例および対照のコホートにおけるヒトＨ因子遺伝子における８個のＳＮＰのハプロタイプ分析を示す。

【００９９】

表３は、ヒトＨ因子遺伝子およびそれらのＡＭＤとの関連における６個のＳＮＰのハプロタイプ分析を示す。

【０１００】

表４は、加齢性黄斑変性と、１１個のヒトＨ因子遺伝子ＳＮＰとの関連性を示す。

【０１０１】

表５は、ヒトＨ因子についてのＳＳＣＰ、ＤＨＰＬＣおよびＤＮＡ配列決定分析のために使用されるプライマーを示す。

【０１０２】

表６は、ＡＭＤ患者および対照の遺伝子型決定データを示す。

【０１０３】

表７は、種々の民族群におけるアットリスクハプロタイプの頻度を示す。

【０１０４】

表８は、いくつかのＨ因子ディプロタイプを示す。一般的なリスクディプロタイプおよび防御的ディプロタイプを示す。

【０１０５】

表９は、Ｈ因子コード配列を増幅するために使用されるプライマーの配列を示す。

【０１０６】

表１０は、ＣＦＨＲ５コード配列を増幅するために使用されるプライマーの配列を示す。

【０１０７】

表１１は、２２例のＭＰＧＮＩＩ患者におけるＨ因子ＳＮＰの分析を示す。

【０１０８】

表１２は、２２例のＭＰＧＮＩＩ患者およびＡＭＤ陰性である民族的に一致する対照におけるＨ因子ＳＮＰ頻度の比較を示す。

【０１０９】
表１３は、ＭＰＧＮＩＩおよびそれらの関連するＳＣＲと関連するＨ因子ＳＮＰを列挙する。
【０１１０】
表１４は、２２例のＭＰＧＮＩＩ患者におけるＣＦＨＲ５　ＳＮＰの分析を示す。
【０１１１】
表１５は、２２例のＭＰＧＮＩＩ患者およびＡＭＤ陰性である民族的に一致する対照におけるＣＦＨＲ５　ＳＮＰ頻度の比較を示す。
【０１１２】
表１６は、Ｈ因子遺伝子における多型を検出するために有用である例示的なアレル特異的プローブ（１６Ａ）およびプライマー（１６Ｂ）を示す。
【０１１３】
ＩＶ．補体Ｈ因子多型
１つの局面において、本発明は、補体因子Ｈ（ＨＦ１）遺伝子における多型部位がＡＭＤに対する感受性およびその発症と関連するという発見に関係する、新規な診断的な治療および薬物スクリーニングの方法を提供する。
【０１１４】
ＡＭＤと関連するＨ因子多型は、実施例１に記載されるように、標準的なプロトコールに従って、ＳＳＣＰ分析、ＤＨＰＬＣ分析、および直接的配列決定を使用して、変異体についてＨ因子（Ｈ因子アイソフォームＦＨＬ１に転写されるエキソン１０Ａを含む）のコード領域および隣接するイントロン領域を調べることによって同定した。残りの多型は５’ヌクレアーゼ（Ｔａｑｍａｎ，ＡＢＩ）方法論によって決定した。Ｔａｑｍａｎ遺伝子型決定および関連する分析は、記載されたように（Ｇｏｌｄら、２００４）実施した。ＳＳＣＰおよびＤＮＡ配列決定分析のためのプライマーは、ＭａｃＶｅｃｔｏｒソフトウェアを使用して、各エキソンおよびその隣接するイントロン性領域を増幅するように設計した。ＰＣＲ由来のアンプリコンは、標準的なプロトコールに従って、ＳＳＣＰおよびＤＨＰＬＣによって配列の変異についてスクリーニングした。ＳＳＣＰおよびＤＨＰＬＣによって検出されるすべての変化は、標準的なプロトコールに従う二方向性配列決定によって確認した。統計学的分析は、カイ二乗（χ^2）およびフィッシャーの直接確率検定（Ｐ値）を使用して実施した。
【０１１５】
２つの独立したＡＭＤ症例の群および年齢を適合させた対照を使用した。すべての参加した個体は、６０歳を超えたヨーロッパアメリカ人血統であり、インフォームドコンセントに従ってＩＲＢ－認可プロトコールの下で登録された。これらの群は、アイオワ大学からの臨床的に記録されたＡＭＤを有する３５２例の血縁関係のない患者（平均年齢７９．５±７．８歳）および１１３例の血縁関係のない対照患者（平均年齢７８．４±７．４歳；年齢および民族によって適合させた）、ならびにコロンビア大学からの臨床的に記録されたＡＭＤを有する５５０例の血縁関係のない患者（平均年齢７１．３２±８．９歳）および２７５例の血縁関係のない、年齢および民族によって適合させた対照患者（平均年齢６８．８４±８．６歳）から構成された。患者は、網膜フェローシップ訓練された眼科医による間接検眼鏡検査および細隙灯顕微鏡検査によって調べた。
【０１１６】
基底部（ｆｕｎｄａｓ）の写真は、標準化された、国際分類系に従って等級付けした（Ｂｉｒｄら、１９９５）。対照患者は、彼らが黄斑疾患のいかなる際立った徴候も示さず、またはＡＭＤの既知の家族歴を有しなかった場合に、選択されかつ含められた。ＡＭＤ患者は、彼らが研究に参加した時点での彼らの最も重篤な眼の分類に基づいて、以下の表現型のカテゴリーに下位分類された：初期ＡＭＤ（ＡＲＭ）、地図状萎縮症（ｇｅｏｇｒａｐｈｉｃ　ａｔｒｏｐｈｙ）（ＧＡ）、および滲出性（ＣＮＶ）ＡＭＤ。アイオワ大学のＡＲＭおよびＧＡの症例は、さらに、別個の表現型（ＲＰＥ変化単独、＞１０黄斑硬性ドルーゼン、黄斑軟性ドルーゼン、ＢＢ（表皮）ドルーゼン、ＰＥＤ、「チェロキー」萎

縮症、半島地図状萎縮症、およびパターン地図状萎縮症）に下位分類された。すべての症例についての最初期の記録可能な表現型もまた、分析において記録および利用した。

【０１１７】

表１Ａに示されるように、Ｈ因子遺伝子における多型部位の、ＡＭＤとの高度に有意な関連性は、およそ９００例のＡＭＤの症例および４００例適合させた対照を一緒に含んだ２つの独立したコホートの試験において見出された。Ｈ因子遺伝子中の１６個の多型を表１Ａ～１Ｂに示す。このうちの１２個は、ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ（ＮＣＢＩ）において見出され得る、ＳＮＰデータベース（ｄｂＳＮＰ）において見出される。ｄｂＳＮＰは、ヒトＨ因子遺伝子におけるＳＮＰのコレクションであり、これは、Ｈ因子遺伝子の２２個のコーディングエキソンの間に、ならびにＨ因子遺伝子のプロモーター、５’非翻訳領域、イントロン、および３’非翻訳領域の間に分散している。以下に列挙するのは、ｄｂＳＮＰデータベースにおいて見出されるヒトＨ因子遺伝子における３７９個のＳＮＰについてのアクセッション番号である。これらのＳＮＰは本発明の方法を実行する際に使用することができる。

【０１１８】

【化１】

表 A

rs17575212	rs11582939	rs7551203	rs5014736	rs2019724	rs534479	rs395963
rs17573867	rs11580821	rs7546015	rs5014735	rs1984894	rs534399	rs395544
rs16840522	rs11579439	rs7540032	rs5014734	rs1928433	rs529825	rs395129
rs16840465	rs11539862	rs7539005	rs5014733	rs1928432	rs528298	rs393955
rs16840462	rs11398897	rs7537967	rs5003626	rs1887973	rs521605	rs386258
rs16840422	rs11390840	rs7535653	rs5003625	rs1831282	rs520992	rs385892
rs16840419	rs11340441	rs7535263	rs5003624	rs1831281	rs519839	rs385543
rs16840410	rs11339120	rs7529589	rs5002880	rs1831280r	rs518957	rs383191
rs16840401	rs11318544	rs7526622	rs5002876	rs1410997	rs551397	rs405306
rs16840397	rs11285593	rs7524776	rs5002875	rs1410996	rs544889	rs403846
rs16840394	rs10922109	rs7522681	rs5002874	rs1329429	rs543879	rs402991
rs16840381	rs10922108	rs7519439	rs4658046	rs1329428	rs536564	rs402056
rs16840379	rs10922107	rs7514261	rs4657826	rs1329427	rs536539	rs399469
rs12756364	rs10922106	rs7513157	rs4350148	rs1329424	rs515299	rs398248
rs12746361	rs10922105	rs7415913	rs4044888	rs1329423	rs514756	rs381974
rs12740961	rs10922104	rs7413999	rs4044884	rs1329422	rs514591	rs380390
rs12726401	rs10922103	rs7413137	rs4044882	rs1329421	rs513699	rs380060
rs12566629	rs10922102	rs6695321	rs3834020	rs1299282	rs512900	rs379489
rs12565418	rs10922101	rs6691749	rs3766405	rs1292487	rs508505	rs375046
rs12406047	rs10922100	rs6690982	rs3766404	rs1292477	rs499807	rs374896
rs12405238	rs10922099	rs6689826	rs3766403	rs1292476	rs495968	rs374231
rs12402808	rs10922098	rs6689009	rs3753397	rs1292475	rs495222	rs371647
rs12238983	rs10922097	rs6688272	rs3753396	rs1292474	rs493367	rs368465
rs12144939	rs10922096	rs6685249	rs3753395	rs1292473	rs491480	rs364947
rs12136675	rs10922095	rs6682138	rs3753394	rs1292472	rs490864	rs203688
rs12134975	rs10922094	rs6680396	rs3043115	rs1292471	rs488738	rs203687
rs12134598	rs10922093	rs6677604	rs3043113	rs1292466	rs487114	rs203686
rs12127759	rs10922092	rs6677460	rs3043112	rs1156679	rs482934	rs203685
rs12124794	rs10801561	rs6677089	rs3043111	rs1156678	rs480266	rs203684
rs12116702	rs10801560	rs6675088	rs2878649	rs1089031	rs466287	rs203683r
rs12096637	rs10801559	rs6674960	rs2878648	rs1065489	rs464798	s203682
rs12085209	rs10801558	rs6673106	rs2878647	rs1061171	rs463726	rs203681
rs12081550	rs10801557	rs6664877	rs2860102	rs1061170	rs460897	rs203680
rs12069060	rs10801556	rs6664705	rs2746965	rs1061147	rs460787	rs203679
rs12047565	rs10801555	rs6660100	rs2336225	rs1061111	rs460184	rs203678
rs12047106	rs10801554	rs6428357	rs2336224	rs1060821	rs459598	rs203677
rs12047103	rs10801553	rs6428356	rs2336223	rs1048663	rs454652	rs203676
rs12045503	rs10754200	rs5779848	rs2336222	rs1040597	rs436337	rs203675
rs12042805	rs10754199	rs5779847	rs2336221	rs800295	rs435628	rs203674
rs12041668	rs10737680	rs5779846	rs2300430	rs800293	rs434536	rs203673
rs12040718	rs10737679	rs5779845	rs2300429	rs800292	rs430173	rs203672
rs12039905	rs10733086	rs5779844	rs2284664	rs800291	rs428060	rs203671
rs12038674	rs10688557	rs5022901	rs2284663	rs800290	rs424535	rs203670
rs12038333	rs10685027	rs5022900	rs2274700	rs800280	rs422851	rs203669
rs12033127	rs10664537	rs5022899	rs2268343	rs800271	rs422404	rs70621
rs12032372	rs10616982	rs5022898	rs2173383	rs800269	rs420922	rs70620
rs12030500	rs10545544	rs5022897	rs2143912	rs766001	rs420921	rs15809
rs12029785	rs10540668	rs5016801	rs2104714	rs765774	rs419137	rs14473
rs12025861	rs10536523	rs5014740	rs2064456	rs742855	rs414539	rs3645
rs11809183	rs10489456	rs5014739	rs2020130	rs731557	rs412852	
rs11801630	rs10465603	rs5014738	rs2019727	rs572515	rs410232	
rs11799956	rs10465586	rs5014737	rs1803696	rs570618	rs409953	
rs11799595	rs9970784	rs5002879	rs1587325	rs569219	rs409319	
rs11799380	rs9970075	rs5002878	rs1576340	rs564657	rs409308	
rs11584505	rs9427909	rs5002877	rs1474792	rs559350	rs407361	

２つの高頻度の非同義語変異体、エキソン２におけるＩ６２Ｖおよびエキソン９におけ

るＹ４２９Ｈ、ならびにより頻度の低い変異体、エキソン２２におけるＲ１２１０Ｃは、ＡＭＤとの最も有意な関連性を示した。

【０１１９】

表１Ａ～１Ｂにおける３つのさらなる多型はＳＮＰデータベースには見出されない：プロモーターにおける多型（表１Ａにおけるプロモーター１）；２つのＴヌクレオチドが挿入されているイントロン２における多型；およびエキソン１０Ａにおける多型である。

【０１２０】

表１Ａにおける第１のカラムは、Ｈ因子遺伝子における多型についてのｄｂＳＮＰ番号を列挙する。例えば、ｒｓ８００２９２は、Ｈ因子遺伝子における多型についてのｄｂＳＮＰ指定である。この多型の説明、ならびにｄｂＳＮＰにおける他のＨ因子遺伝子多型は、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｅｎｔｒｅｚ／ｑｕｅｒｙ．ｆｃｇｉ？ｄｂ＝ｓｎｐ＆ｃｍｄ＝ｓｅａｒｃｈ＆ｔｅｒｍ＝）において利用可能である。第２のカラムは、多型の位置を列挙する。例えば、ｒｓ８００２９２多型は、Ｈ因子遺伝子のエキソン２に位置する。データベース番号によって同定されていない多型は、位置によって言及することができる（例えば、「イントロン２」）。第３のカラムは、多型に及ぶＤＮＡのコード鎖（上、５’から３’方向）および非コード鎖（下）の核酸配列を列挙する。例えば、ｒｓ８００２９２多型では、コード鎖についての括弧中に示されるＧまたはＡは、多型の５’または３’に示される２０ヌクレオチドによって隣接される。エキソン１０Ａ多型にわたる配列中の「Ｎ」は、変異体アレルにおけるＡ、Ｃ、ＧまたはＴのいずれかである単一のヌクレオチドの挿入を示す。第４のカラムは、配列についての配列番号を列挙する。第５のカラムは、存在する場合、多型と関連するアミノ酸の変化を列挙する。例えば、ｒｓ８００２９２多型は、Ｈ因子ポリペプチドの６２位におけるバリン（Ｖ）からイソロイシン（Ｉ）へのアミノ酸配列の変化を生じる。第６のカラムは、対照集団における多型のアレル頻度を列挙する。数字１および２は、それぞれ、第３のカラムの多型部位における第１のヌクレオチドおよび第２のヌクレオチドに対応するアレルをいう。例えば、ｒｓ８００２９２多型については、Ｇが、対照集団から配列決定されたアレルの７８％、Ａがその２２％で存在する。第７のカラムは、ＡＭＤ集団における多型のアレル頻度を列挙する。例えば、ｒｓ８００２９２多型については、Ｇが、ＡＭＤ集団から配列決定されたアレルの９１％、Ａがその９％で存在する。第８のカラムは、対照集団およびＡＭＤ集団中の多型のアレル頻度間の比較のための、カイ二乗検定およびフィッシャーの直接確率検定（それぞれ、χ^2値およびＰ値）を列挙する。例えば、ｒｓ８００２９２多型については、χ^2値は１６．１９でありかつＰ値は５．７４×１０$^{-5}$であり、ＧアレルがＡＭＤと関連することを示す。

【０１２１】

表１Ｂの部分（１）、（２）および（３）における第１のカラムは、Ｈ因子遺伝子における多型についてのｄｂＳＮＰ番号を列挙する。部分（１）については、第２のカラムは、多型にわたる核酸配列を列挙する（質問配列）。ｒｓ５２９８２５多型（イントロン１）、ｒｓ８００２９２多型（エキソン２）、およびｒｓ２０３６７４多型（イントロン１０）については、ヒトＨ因子遺伝子の非コード鎖の配列を示す。第３のカラムは、配列についての配列番号を列挙する。第４のカラムは、チンパンジーＨ因子遺伝子に存在するアレルを列挙する。第５のカラムは、ＳＮＰの位置を列挙する。第６のカラムは、存在する場合、多型と関連するアミノ酸変化を列挙する。部分（２）については、第２のカラムおよび第４のカラムは、多型を増幅するためのフォワードプライマーおよびリバースプライマー、またはＡＯＤ番号を列挙する。第３および第５のカラムは、プライマーについての配列番号を列挙する。部分（３）については、第２および第４のカラムは、多型を検出するために使用されるプローブを列挙する。第３および第５のカラムは、プローブについての配列番号を列挙する。

【０１２２】

表１Ａ～１Ｂに列挙されていないＨ因子遺伝子におけるさらなる多型部位がＡＭＤと関

連する可能性があることが理解されるべきである。例えば、H因子遺伝子における例示的な多型部位が上記に列挙され、これには限定されない。表１CはH因子遺伝子におけるさらなる１４個の多型部位を列挙し、これは、ｄｂＳＮＰデータベースには見出されず、ＡＭＤまたは他の疾患と関連する可能性がある。第１のカラムはＳＮＰの位置を列挙する。第２のカラムは多型にわたる核酸配列を列挙する。エキソン５多型にわたる配列中の「ｎｏｔＧ」は、変異体アレル中のＡ、ＣまたはＴヌクレオチドの存在を示す。エキソン６多型にわたる配列中の「ｎｏｔＣ」は、変異体アレル中のＡ、ＧまたはＴヌクレオチドの存在を示す。エキソン２１多型にわたる配列中の「Ｎ」は、変異体アレル中のＡ、Ｃ、ＧまたはＴのいずれかである単一のヌクレオチドの挿入を示す。第３のカラムは、存在する場合、多型と関連するアミノ酸変化を列挙する。第４のカラムは、配列についての配列番号を列挙する。これらのＳＮＰはまた、本発明の方法を実行する際に使用することができる。さらに、これらのＣＦＨ多型は、連鎖および関連性研究、臨床集団の遺伝子型決定、表現型情報に対する遺伝子型情報の相関、ヘテロ接合性の喪失の分析、および細胞サンプルの供給源の同定のために有用であることが認識される。

【０１２３】

表２は、ＡＭＤ症例および対照のヒトH因子遺伝子における８個のＳＮＰのハプロタイプ分析を示す。アットリスクハプロタイプは点描したボックスに示し、ＳＮＰを決定するハプロタイプ（Ｙ４０２HおよびＩＶＳ１０）はより高密度の点描に示す。防御的ハプロタイプは斜線を付けたボックスに示し、ＳＮＰを決定するハプロタイプ（ＩＶＳ１、Ｉ６２ＶおよびＩＶＳ６）はより高密度の斜線に示す。第１のカラムは、プロモーター中の多型のアレルを列挙する（プロモーター）。第２のカラムは、イントロン１中の多型の非コード鎖のアレルを列挙する（ＩＶＳ１）。第３のカラムは、エキソン２中の多型の非コード鎖のアレルを列挙する（Ｉ６２Ｖ）。第４のカラムは、イントロン６中の多型のアレルを列挙する（ＩＶＳ６）。第５のカラムは、エキソン９中の多型のアレルを列挙する（Ｙ４０２H）。第６のカラムは、イントロン１０中の多型の非コード鎖のアレルを列挙する（ＩＶＳ１０）。第７のカラムは、エキソン１３中の多型のアレルを列挙する（Ｑ６７２Ｑ）。第８のカラムは、エキソン１８中の多型のアレルを列挙する（Ｄ９３６Ｅ）。これらの８個のＳＮＰについてのｄｂＳＮＰ割り当ては表１Ａ～１Ｂに列挙する。第９のカラムは、ハプロタイプについてのオッズ比（ＯＲ）を列挙する。第１０のカラムは、アットリスクハプロタイプおよび２つの防御的ハプロタイプについてのＰ値を列挙する。第１１のカラムおよび第１２のカラムは、ＡＭＤ症例および対照におけるハプロタイプの頻度を列挙する。

【０１２４】

表３は、ＡＭＤを有する６個のH因子多型のハプロタイプ分析を示す。第１のカラムは、プロモーター中の多型の特定のアレルを列挙する（ｒｓ３７５３３９４）。第２のカラムは、イントロン１中の多型のアレルを列挙する（ｒｓ５２９８２５）。第３のカラムは、イントロン６中の多型のアレルを列挙する（ｒｓ３７６６４０４）。第４のカラムは、イントロン１０中の多型を列挙する（ｒｓ２０３６７４）。第５のカラムは、エキソン１３中の多型のアレルを列挙する（ｒｓ３７５３３９６）。第６のカラムは、エキソン１８中の多型のアレルを列挙する（ｒｓ１０６５４８９）。カラム１～６における数字１および２は、それぞれ、各々の多型部位における第１のヌクレオチドおよび第２のヌクレオチドに対応するアレルをいう（表１Ａを参照のこと）。従って、カラム１～６は、H因子遺伝子における５’から３’への多型のアレルを列挙する。第７のカラムは、カラム１～６に列挙された多型に基づいてH因子ハプロタイプを列挙する。第８のカラムは、対照集団における示されたH因子ハプロタイプの頻度を列挙する。第９のカラムは、ＡＭＤ集団における示されたH因子ハプロタイプの頻度を列挙する。表３に示されるように、ハプロタイプ分析は、複数の変異体が関連に寄与し、ＡＭＤのリスクの増加または減少のいずれかを付与し得ることを示唆する。

【０１２５】

表８は、７個のH因子多型のディプロタイプ分析を示す。第１のカラムは、ディプロタ

イプが、ＡＭＤの発症のリスクの増加（リスクディプロタイプ）または減少（防御的ディプロタイプ）と関連するか否かを示す。一般的なリスクディプロタイプおよび防御的ディプロタイプを示す。第２のカラムは、エキソン２における多型のアレルを列挙する（Ｉ６２Ｖ）。第３のカラムは、イントロン２における多型のアレルを列挙する（ＩＶＳ２－１８）。第４のカラムは、エキソン９における多型のアレルを列挙する（Ｙ４０２Ｈ）。第５のカラムは、エキソン１８における多型のアレルを列挙する（Ｄ９３６Ｅ）。第６のカラムは、イントロン２０における多型のアレルを列挙する（ＩＶＳ２０）。

【０１２６】

リスク関連（「リスク」）多型およびハプロタイプ

ＡＭＤについてのリスクの増加と関連する多型を含む部位を表１Ａおよび表２に示す。リスクの増加と特に関連する多型には、ｒｓ１０６１１７０（４０２Ｈ；エキソン９）；ｒｓ２０３６７４（イントロン１０）および残基１２１０における多型（Ｒ１２１０Ｃ；エキソン２２）における変異体アレルが含まれる。

【０１２７】

ＡＭＤについてのリスクの増加と関連する特定のハプロタイプは、表２および６ならびに図５に示される。表２および図５に示されるように、１つの一般的なアットリスクハプロタイプはＨ１ハプロタイプであり、これは、４０２位における変異体アレル（ヒスチジンをコードする）およびＩＶＳ１０における変異体アレル（イントロン１０、ｒｓ２０３６７４）を含み、ＡＭＤの症例の４９％に見出されるが、対照の２６％においてのみ見出される。リスクディプロタイプについてのホモ接合性（Ｈ１／Ｈ１）は有意にリスクがある。他のリスクがあるハプロタイプおよびディプロタイプは表２および８に示される。同様のデータは表３に提示され、これは、ＡＭＤ症例の４８％において見出されるが、対照の２８％においてのみ見出されるアットリスクハプロタイプ（１１１２１１）を示す。

【０１２８】

顕著には、ＭＰＧＮ　ＩＩ（ＩＩ型膜性増殖性糸球体腎炎）患者の７０％は、このアットリスクハプロタイプを有し（表７を参照のこと）、これは、ＭＰＧＮＩＩを発症する性向は、ＡＭＤについて本明細書に記載されるように、検出および治療することができることを示す。

【０１２９】

これらの多型部位の有意な関連性はまた、実施例１において開示されるように、種々のＡＭＤサブタイプとともに見出された。

【０１３０】

Ｈ因子遺伝子のエキソン２２における１２１０位のアミノ酸における非同義語多型は、ＡＭＤと強力に相関している（表１Ａを参照のこと）。アルギニンの代わりにシステインをコードする変異体アレルは、ＡＭＤの症例の５％においてヘテロ接合性状態で見出され、アイオワ大学において確認された９１９例の個体から構成されるコホート中の対照には見出されなかった。１２１０Ｃホモ接合性は今日までに同定されている。それゆえに、Ｈ因子のアミノ酸１２１０位におけるシステインの存在は、個体がＡＭＤを有するか、またはＡＭＤを発症する可能性があることの強力な徴候を提供する。顕著には、１２１０Ｃは、たとえ他の点では防御的であるアレル（例えば、Ｙ４０２）上で検出されるとしても、ＡＭＤまたは他の補体媒介の病気を発症する性向を示す。ＣＦＨ１２１０位における変異（Ｒ１２１０Ｃ）は、腎臓徴候を伴う補体関連疾患である非定型的溶血性尿毒症性症候群（ａＨＵＳ）を引き起こすことが知られている。拡大解釈すると、ａＨＵＳを引き起こすことが知られている他のＣＦＨの変異または突然変異は、ＡＭＤを発症するリスクの増加と関連する可能性がある。最も一般的に確立されたａＨＵＳを引き起こす変異には、Ｔ９５６Ｍ、Ｑ１０７６Ｅ、Ｄ１１１９Ｇ、Ｗ１１８３Ｌ、Ｔ１１８４Ｒ、Ｌ１１８９Ｒ、Ｌ１１８９Ｆ、Ｓ１１９１Ｗ、Ｓ１１９ＩＬ、Ｖ１１９７Ａ、およびＲ１２１５Ｇが含まれるがこれらに限定されず（Ｅｓｐａｒｚａ－Ｇｏｒｄｉｌｌｏら、２００５；Ｐｅｒｅｚ－Ｃａｂａｌｌｅｒｏら、２００１；Ｒｉｃｈａｒｄｓら、２００１；Ｓａｎｃｈｅｚ－Ｃｏｒｒａｌら、２００２）；さらなるａＨＵＳを引き起こす突然変異は、Ｓａｕｎｄｅ

ｒｓ（Ｓａｕｎｄｅｒｓら、２００６）によって記載されている。本発明の１つの局面において、被験体からの生物学的サンプル（例えば、タンパク質または核酸）は、１つ以上のａＨＵＳ関連変異または突然変異の存在についてアッセイされ、その存在は、ＡＭＤを発症する性向を示す。

【０１３１】

表１Ａ～１Ｃに列挙されない、Ｈ因子遺伝子におけるさらなる多型部位は、このハプロタイプ分析をさらに洗練し得ることが認められる。Ｈ因子遺伝子における非同義語多型を使用するハプロタイプ分析は、変異体Ｈ因子ポリペプチドを同定するために有用である。リスクと関連する他のハプロタイプは、中性または防御的ハプロタイプによってコードされるタンパク質と同じ配列を有するタンパク質をコードし得るが、例えば、Ｈ因子発現のレベルまたは部位を変化させる、プロモーターまたはイントロンにおけるアレルを含む可能性がある。Ｈ因子遺伝子またはＨ因子関連遺伝子における多型は、隣接する遺伝子における変異と連鎖される可能性があることもまた認められる。隣接する遺伝子におけるこの変異は、コードされるタンパク質の発現または型の変化を生じる可能性があり、キャリア中での有害な効果または防御的な効果を有する可能性がある。

【０１３２】

防御的多型およびハプロタイプ

予想外に、防御的多型またはハプロタイプもまた発見された。例えば、表２および図５に示すように、ＩＶＳ６中の変異体アレル（イントロン６、ｒｓ３７６６４０４）を含む防御的Ｈ２ハプロタイプは、対照の１２％に存在するが、ＡＭＤ症例の６％にしか存在しない。防御的Ｈ４ハプロタイプは、ＩＶＳ１中の変異体アレル（イントロン１、ｒｓ５２９８２５）および変異体アレル（Ｉ６２）（エキソン２、ｒｓ８００２９２）を含み、対照の１８％に存在するが、ＡＭＤ症例の１２％にしか存在しない。同様のデータは表３に提示されており、ここでは、ハプロタイプ１２１１１１は対照の２１％に存在するが、ＡＭＤ症例の１３％にしか存在せず、ハプロタイプ１１２１１１は対照の１３％に存在するが、ＡＭＤ症例の６％にしか存在しない。図５に示されるように、防御的ハプロタイプを有するホモ接合性は有意に防御されている。

【０１３３】

ある場合において、防御的ハプロタイプによって特徴付けられる遺伝子によってコードされるタンパク質は、リスクハプロタイプタンパク質とは異なる配列を有する（例えば、非同義語ＳＮＰの存在に起因する）。例えば、防御型のＨ因子タンパク質は、一般的には、４０２位にヒスチジンを有しない。ある実施形態において、防御型は、６２位にイソロイシンを有する。さらなる防御型は、（１）防御的ハプロタイプを有する単数または複数の個体を同定すること、および（２）個体からのＨ因子のｃＤＮＡまたはタンパク質の配列を決定することによって同定することができる。他の防御型は、ＶＩＩＩ節において以下に説明されるように同定される。

【０１３４】

中性多型およびハプロタイプ

特定のハプロタイプは、ＡＭＤを発症するリスクの増加または減少のいずれも有しない集団において関連付けられ、これは「中性」と呼ばれる。コーカサス人集団において同定された中性ハプロタイプの例は図５（Ｈ３およびＨ５）に示す。さらなるまたは異なる中性ハプロタイプが、人種的／民族的に異なる集団において同定される可能性がある。中性ハプロタイプによって特徴付けられる遺伝子によってコードされるタンパク質は「中性」Ｈ因子タンパク質である。上記に説明したように、「中性」Ｈ因子タンパク質は、リスクハプロタイプを有するか、またはＡＭＤを有すると診断された患者に投与されるときに、治療的利点を提供し得る。例えば、中性ハプロタイプによって特徴付けられた遺伝子によってコードされる例示的なタンパク質には、４０２位にヒスチジンを有しないタンパク質、および／または６２位にイソロイシンを有しないタンパク質が含まれる。４０２位にヒスチジンを有しないタンパク質は、その位置にチロシンを有する可能性があり、またはヒスチジンもしくはチロシン以外のアミノ酸を有する可能性がある。６２位にイソロイシン

を有しないタンパク質は、その位置にバリンを有する可能性があり、またはバリンもしくはイソロイシン以外のアミノ酸を有する可能性がある。中性型のＨ因子タンパク質は、一般的に、１２１０位にシステインを有しない。

【０１３５】

Ｖ．Ｈ因子関連５（ＣＦＨＲ５）遺伝子多型

１つの局面において、本発明は、Ｈ因子遺伝子およびＣＦＨＲ５遺伝子における多型部位がＭＰＧＮＩＩの発症に対する感受性と関連するという発見に関連する、新規な診断、治療、および薬物スクリーニングの方法を提供する。

【０１３６】

ＭＰＧＮＩＩと関連するＨ因子多型およびＣＦＨＲ５多型は、実施例２に記載されるように、ＰＣＲ増幅を使用して変異体についてのＨ因子またはＣＦＨＲ５のコード領域および隣接するイントロン領域を調べることによって、続いて標準的なプロトコールに従って、アガロースゲル電気泳動および二方向性配列決定を行ってＰＣＲ産物を確認することによって同定した。新規なＳＮＰおよび報告されていたＳＮＰを、変性高速液体クロマトグラフィー（ＤＨＰＬＣ）によって対照集団中でタイプ付けした。Ｈ因子およびＣＦＨＲ５のコード配列を増幅するために使用したプライマーは、表９および１０にそれぞれ示す。

【０１３７】

生検で判明したＭＰＧＮＩＩを有する患者からなる試験群は、腎臓病学部門において確認され、ＩＲＢ認可ガイドラインの下で本研究に加入させた。対照群は、眼科的試験によってＡＭＤがその中で除外された、民族的に適合させられたが、年齢が一致しない、血縁関係のないヒトからなった。

【０１３８】

表１１および１２に示されるように、Ｈ因子遺伝子における多型部位の、ＭＰＧＮＩＩとの有意な関連性が、２２例のＭＰＧＮＩＩ症例および１３１例の民族的に適合させた対照の試験において見出された。Ｈ因子遺伝子における１１個の多型を表１１および１２に列挙する。これらのうちで、６個が、ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ（ＮＣＢＩ）において見出され得るＳＮＰデータベース（ｄｂＳＮＰ）に見出される。ｄｂＳＮＰは、ヒトゲノムにおけるＳＮＰのコレクションである。Ｈ因子遺伝子におけるＳＮＰは、Ｈ因子遺伝子の２２個のコーディングエキソンの間に、ならびにＨ因子遺伝子のプロモーター、５’非翻訳領域、イントロン、および３’非翻訳領域の間に分散している。ｄｂＳＮＰデータベースにおいて見出されるヒトＨ因子遺伝子における３７９個のＳＮＰについてのアクセッション番号は、上記に列挙されている。これらのＳＮＰは本発明の方法を実行する際に使用することができる。

【０１３９】

表１１および１２における５個のさらなる多型はＳＮＰデータベースにおいて見出されない：２つのＴヌクレオチドが挿入されているイントロン２における多型（ＩＶＳ２－１８ｉｎｓＴＴ）；イントロン７における多型（ＩＶＳ７－５３Ｇ＞Ｔ）；イントロン１５における多型（ＩＶＳ１５－３０Ｃ＞Ａ）；イントロン１８における多型（ＩＶＳ１８－８９Ｔ＞Ｃ）；およびエキソン２０における多型（Ｎ１０５０Ｙ）。これらの多型は、本発明の方法において有用である。さらに、これらのＣＦＨＲ５多型は、連鎖および関連性研究、臨床集団の遺伝子型決定、表現型情報に対する遺伝子型情報の相関、ヘテロ接合性の喪失の分析、および細胞サンプルの供給源の同定のために有用であることが認識される。

【０１４０】

表１１の第１の行は、Ｈ因子遺伝子におけるＳＮＰのエキソンまたはイントロンの位置を列挙する。エキソンＳＮＰについては、存在する場合、アミノ酸の位置および変化が列挙される。例えば、エキソン２　ＳＮＰはＨ因子ポリペプチドの６２位にあり、バリン（Ｖ）からイソロイシン（Ｉ）に変化している。イントロンＳＮＰについては、ＳＮＰの性質が示される。例えば、イントロン２　ＳＮＰは、２つのヌクレオチド、ＴＴの挿入であ

る。表１１の第２の行は、存在する場合、多型についてのｄｂＳＮＰ番号を列挙する。例えば、ｒｓ８００２９２は、Ｈ因子遺伝子のエキソン２における多型についてのｄｂＳＮＰ指定である。この多型の説明、ならびにｄｂＳＮＰにおける他のＨ因子（ＣＦＨ）遺伝子多型は、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｅｎｔｒｅｚ／ｑｕｅｒｙ．ｆｃｇｉ？ｄｂ＝ｓｎｐ＆ｃｍｄ＝ｓｅａｒｃｈ＆ｔｅｒｍ＝）において利用可能である。表１１の第３から第５までの行は、２２例のＭＰＧＮＩＩ患者の間に存在する特定のディプロタイプの回数を列挙する。例えば、エキソン２　ＳＮＰについては、ＧＧがＭＰＧＮＩＩを有する２０例の患者の中に存在し、ＧＡはその２例の患者の中に存在し、そしてＡＡはその患者の中に存在しない。表１１の第６および第７の行は、特定のハプロタイプが、２２例のＭＰＧＮＩＩ患者の間に存在する頻度を列挙する。例えば、エキソン２　ＳＮＰについては、Ｇは、２２例のＭＰＧＮＩＩ患者のアレルの９５％に存在し、Ａは、その５％に存在する。第８の行は、２２例のＭＰＧＮＩＩ患者についてのＨ因子遺伝子における共通のハプロタイプのヌクレオチドを列挙する。例えば、２２例のＭＰＧＮＩＩ患者についてのＨ因子遺伝子において、Ｇはエキソン２　ＳＮＰにおけるより頻繁なヌクレオチドであり、９Ｔヌクレオチドは、イントロン２　ＳＮＰにおける１１Ｔヌクレオチドよりも頻繁に観察される。残りの行は、２２例のＭＰＧＮＩＩ患者の各々についてのＨ因子遺伝子における１１個のＳＮＰについてのディプロタイプを列挙する。

【０１４１】

表１１に列挙されていないＨ因子遺伝子におけるさらなる多型部位がＭＰＧＮＩＩと関連する可能性があることが理解されるべきである。例えば、Ｈ因子遺伝子における例示的な多型部位が上記に列挙され、これには限定されない。

【０１４２】

表１２は、ＡＭＤ－陰性である民族的に適合させられた対照個体に対する、ＭＰＧＮＩＩを有する患者におけるＳＮＰ頻度の比較を示す。表１２の第１のカラムは、Ｈ因子遺伝子におけるＳＮＰを列挙する。表１２の第２および第３のカラムは、特定のハプロタイプが２２例のＭＰＧＮＩＩ患者の間に存在する頻度を列挙する。表１２の第４および第５のカラムは、特定のハプロタイプが１３１例の対照個体の間に存在する頻度を列挙する。表１２の第６のカラムは、各データセットについて計算したＰ－値を列挙する。

【０１４３】

表１１および１２に示されるように、２つの高頻度の非同義語変異体であるエキソン２におけるＩ６２ＶおよびエキソンＹ４２０Ｈ、同義語変異体であるエキソン１０におけるＡ３０７Ａ、ならびにイントロン２における多型は、ＭＰＧＮＩＩとの有意な関連性を示した。

【０１４４】

表１４および１５に示されるように、ＣＦＨＲ５遺伝子における多型部位のＭＰＧＮＩＩとの有意な関連性は、２２例のＭＰＧＮＩＩの症例および１０３例の民族的に適合させられた対照の試験において見出された。ＣＦＨＲ５遺伝子中の５個の多型は表１４および１５に列挙され；これらは、ＮＣＢＩのｄｂＳＮＰにおいて見出される。ＣＦＨＲ５遺伝子中のＳＮＰは、ＣＦＨＲ５遺伝子の１０個のコーディングエキソンの間に、ならびにＣＦＨＲ５遺伝子のプロモーター、５’非翻訳領域、イントロン、および３’非翻訳領域の間に分散している。以下に列挙するのは、ｄｂＳＮＰデータベースにおいて見出されるヒトＣＦＨＲ５遺伝子における８２個のＳＮＰについてのアクセッション番号である。これらのＳＮＰは本発明の方法を実行する際に使用することができる。

【０１４５】

【化２】

表 B

rs16840956	rs12116643	rs10922151	rs9427662	rs7535993	rs6694672	rs1332664
rs16840946	rs12097879rs	rs10801584	rs9427661	rs7532441	rs6692162	rs1325926
rs16840943	12097550	rs10801583	rs9427660	rs7532068	rs6657256	rs1170883
rs12755054	rs12092294	rs10622350	rs9427659	rs7528757	rs6657171	rs1170882
rs12750576	rs12091602	rs10614978	rs7555407	rs7527910	rs5779855	rs1170881
rs12745733	rs12064805	rs10613146	rs7555391	rs7522952	rs3748557	rs1170880
rs12736097	rs12049041	rs10588279	rs7554757	rs7522197	rs2151137	rs1170879
rs12736087	rs12039272	rs9727516	rs7550970	rs7419075	rs2151136	rs1170878
rs12735776	rs11583363	rs9427942	rs7550735	rs7366339	rs1855116	rs928440
rs12731848	rs11306823	rs9427941	rs7550650	rs6702632	rs1759016	rs928439
rs12731209	rs10922153	rs9427664	rs7547265	rs6702340	rs1750311	
rs12142971	rs10922152	rs9427663	rs7537588	rs6674853	rs1412636	

表１４の第１の行は、ＣＦＨＲ５遺伝子におけるＳＮＰのエキソン、プロモーターまたはイントロンの位置を列挙する。エキソンＳＮＰについては、存在する場合、アミノ酸の位置および変化が列挙される。例えば、エキソン２　ＳＮＰはＣＦＨＲ５ポリペプチドの４６位にあり、プロリン（Ｐ）からセリン（Ｓ）に変化している。プロモーターおよびイントロンＳＮＰについては、ＳＮＰの性質が示される。例えば、－２４９位のプロモーターＳＮＰは、ＴをＣで置換している。表１４の第２の行は、存在する場合、多型についてのｄｂＳＮＰ番号を列挙する。例えば、ｒｓ９４２７６１は、ＣＦＨＲ５遺伝子のプロモーター領域における多型についてのｄｂＳＮＰ指定である。この多型の説明、ならびにｄｂＳＮＰにおける他のＣＦＨＲ５遺伝子多型は、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｅｎｔｒｅｚ／ｑｕｅｒｙ．ｆｃｇｉ？ｄｂ＝ｓｎｐ＆ｃｍｄ＝ｓｅａｒｃｈ＆ｔｅｒｍ＝）において利用可能である。表１４の第３から第５までの行は、２２例のＭＰＧＮＩＩ患者の間に存在する特定のディプロタイプの回数を列挙する。例えば、エキソン２　ＳＮＰについては、ＣＣがＭＰＧＮＩＩを有する１９例の患者の中に存在し、ＣＴはその３例の患者の中に存在し、そしてＴＴはその患者の中に存在しない。表１４の第６および第７の行は、特定のハプロタイプが、２２例のＭＰＧＮＩＩ患者の間に存在する頻度を列挙する。例えば、エキソン２　ＳＮＰについては、Ｃ（プロリンをコードする）は、２２例のＭＰＧＮＩＩ患者のアレルの９３％に存在し、Ｔ（セリンをコードする）は、その７％に存在する。第８の行は、２２例のＭＰＧＮＩＩ患者についてのＣＦＨＲ５遺伝子における共通のハプロタイプのヌクレオチドを列挙する。例えば、２２例のＭＰＧＮＩＩ患者についてのＣＦＨＲ５遺伝子において、Ｃはエキソン２　ＳＮＰにおけるより頻繁なヌクレオチドである。残りの行は、２２例のＭＰＧＮＩＩ患者の各々についてのＣＦＨＲ５遺伝子における５個のＳＮＰについてのディプロタイプを列挙する。

【０１４６】

表１４に列挙されていないＣＦＨＲ５遺伝子におけるさらなる多型部位がＭＰＧＮＩＩと関連する可能性があることが理解されるべきである。例えば、ＣＦＨＲ５遺伝子における例示的な多型部位が上記に列挙され、これには限定されない。

【０１４７】

表１５は、ＡＭＤ－陰性である民族的に適合させた対照個体に対する、ＭＰＧＮＩＩを有する患者におけるＳＮＰ頻度の比較を示す。表１５の第１のカラムは、ＣＦＨＲ５遺伝子におけるＳＮＰを列挙する。表１５の第２および第３のカラムは、特定のハプロタイプが２２例のＭＰＧＮＩＩ患者についての間に存在する頻度を列挙する。表１５の第４および第５のカラムは、特定のハプロタイプが１０３例の対照個体の間に存在する頻度を列挙する。表１５の第６のカラムは、各データセットについて計算したＰ－値を列挙する。

【０１４８】

表１４および１５に示されるように、１つの非同義語変異体であるエキソン２における

Ｐ４６Ｓ、および２つのプロモーター多型、－２４９Ｔ＞Ｃおよび－２－Ｔ＞Ｃは、ＭＰＧＮＩＩとの有意な関連性を示した。

【０１４９】

ＭＰＧＮＩＩ患者において同定されるリスク関連（「リスク」）多型およびハプロタイプ

ＭＰＧＮＩＩのリスクの増加と関連するＨ因子およびＣＦＨＲ５における多型を含む部位は、表１１および１２、ならびに表１４および１５にそれぞれ示される。Ｈ因子およびＣＦＨＲ５のリスクの増加と特に関連する多型には、それぞれ、ｒｓ１０６１１７０（エキソン９におけるＹ４２０Ｈ）およびｒｓ１２０９７５５０（エキソン２におけるＰ４６Ｓ）における変異体アレルが含まれる。

【０１５０】

ＭＰＧＮＩＩについてのリスクの増加と関連する特定のハプロタイプは、表１２および１５に示される。表１２に示されるように、Ｈ因子遺伝子における１つのアットリスクハプロタイプは、４０２位において変異体アレル（ヒスチジンをコードする）を含み、これはＭＰＧＮＩＩ症例の６４％において見出されるが、対照の３３％においてしか見出されない。表１５に示されるように、ＣＦＨＲ５遺伝子における１つのアットリスクハプロタイプは、４６位において変異体アレル（セリンをコードする）を含み、これはＭＰＧＮＩＩ症例の７％において見出されるが、対照の＜１％においてしか見出されない。

【０１５１】

表１１～１２および１４～１５に列挙されない、Ｈ因子遺伝子およびＣＦＨＲ５遺伝子におけるさらなる多型部位は、これらのハプロタイプ分析をさらに洗練し得ることが認められる。Ｈ因子遺伝子またはＣＦＨＲ５遺伝子における非同義語多型を使用するハプロタイプ分析は、変異体Ｈ因子ポリペプチドまたはＣＦＨＲ５ポリペプチドを同定するために有用である。リスクと関連する他のハプロタイプは、中性または防御的ハプロタイプによってコードされるタンパク質と同じ配列を有するタンパク質をコードし得るが、例えば、Ｈ因子またはＣＦＨＲ５の発現のレベルまたは部位を変化させる、プロモーターまたはイントロンにおけるアレルを含む可能性がある。

【０１５２】

防御的多型およびハプロタイプ

予想外に、防御的多型またはハプロタイプもまた発見された。例えば、表１２に示すように、エキソン２中の変異体アレル（ｒｓ８００２９２、Ｉ６２Ｖ）を有するハプロタイプは、対照の２３％に存在するがＭＰＧＮＩＩ症例の＜３％にしか存在せず、ＩＶＳ２中の変異体アレル（イントロン２、－１８ｉｎｓＴＴ）を有するハプロタイプは、対照の２６％に存在するがＭＰＧＮＩＩ症例の＜３％にしか存在しない。エキソン１０中の変異体アレル（ｒｓ２２７４７００、Ａ４７３Ａ）を有するハプロタイプは、ＭＰＧＮＩＩ症例よりも対照においてより高頻度で存在する。

【０１５３】

ある場合において、防御的ハプロタイプによって特徴付けられる遺伝子によってコードされるタンパク質は、リスクハプロタイプタンパク質とは異なる配列を有する。例えば、防御型のＨ因子タンパク質は、一般的には、４０２位にヒスチジンを有しない。ある実施形態において、防御型は、６２位にイソロイシンを有する。さらなる防御型は、（１）防御的ハプロタイプを有する単数または複数の個体を同定すること、および（２）個体からのＨ因子のｃＤＮＡまたはタンパク質の配列を決定することによって同定することができる。ある防御型は全長よりも短い。ＣＦＨＲ５タンパク質の防御型は同様に同定されてもよい。

【０１５４】

中性多型およびハプロタイプ

特定のハプロタイプは、ＭＰＧＮＩＩを発症するリスクの増加または減少のいずれとも関連付けられず、これは「中性」と呼ばれる。中性ハプロタイプによって特徴付けられる遺伝子によってコードされるタンパク質は「中性」Ｈ因子タンパク質またはＣＦＨＲ５タ

ンパク質である。例えば、中性ハプロタイプによって特徴付けられた遺伝子によってコードされる例示的なタンパク質には、４０２位にヒスチジンを有しないＨ因子タンパク質、および／または６２位にイソロイシンを有しないＨ因子タンパク質、ならびに４６位にセリンを有しないＣＦＨＲ５タンパク質が含まれる。

【０１５５】

ＭＰＧＮＩＩ患者における多型の有意性

実施例２に示されるように、ＡＭＤを発症する性向と関連する同じＣＦＨ多型がまた、ＩＩ型膜性増殖性糸球体腎炎（ＭＰＧＮ　ＩＩ）の発症とも関連することが発見された。確かに、ＡＭＤ患者においてもともと見出されたリスクハプロタイプ（Ｙ４０２ＨおよびＩＶＳ１０）はまた、ＩＩ型膜性増殖性糸球体腎炎（ＭＰＧＮ　ＩＩ）を有する試験された患者の７０％において見出され、このことは、本発明の診断方法がこの病気を検出するために有用であることを示す。加えて、ＣＦＨＲ５遺伝子中の変異およびハプロタイプは、ＭＰＧＮＩＩを有するリスクの増加と強力に関連した。これらのデータから浮かび上がる強力な結論は、ＭＰＧＮＩＩおよびＡＭＤが同じ遺伝子損傷の代替的な出現であることである。顕著には、ＭＰＧＮＩＩを有する患者はドルーゼンを発症し、これは、ＡＭＤにおいて形成するドルーゼンと、臨床的かつ組成的に区別できない。これらの２つの基底部の表現型を区別する単一の特徴は発症の年齢であり－ＭＰＧＮＩＩにおけるドルーゼンは、初期、しばしば、１０歳代に発症するのに対して、ＡＭＤにおけるドルーゼンは高齢期に発症する。本発明者らは、いずれかの集団（ＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩ）において同定されたＨ因子遺伝子およびＣＦＨＲ５遺伝子における多型が、両方の疾患に対する感受性を予測すると結論付けた。ＭＰＧＮＩＩに寄与し、および初期の徴候の原因である他の因子が存在していると思われる。ＡＭＤは非常に一般的であり、ＭＰＧＮＩＩはまれであるので、ＣＦＨとＣＦＨＲ５遺伝子の両方のハプロタイプ分析および本明細書に記載される他の方法は、ＡＭＤを有するか、またはＡＭＤを発症する可能性の増加を有する患者のスクリーニングおよび治療のために有用である。

【０１５６】

機能の喪失

Ｈ因子またはＣＦＨＲ５の通常または野生型の機能の喪失は、ＡＭＤと関連する可能性がある。Ｈ因子遺伝子における非同義語多型、例えば、ＡＭＤと最強の相関を示し、かつ変異体Ｈ因子ポリペプチドまたは変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドを生じる、表１Ａ、１Ｂ、１Ｃ、１１、１４および１５に示されるものが、ＡＭＤにおいて原因となる役割を有するようである。このような役割は、このような非同義語多型を有するヒトＨ因子またはＣＦＨＲ５を発現するトランスジェニック非ヒト動物を作製すること、およびこの動物がＡＭＤを発症するか否かを決定することによって確認することができる。終止コドンを導入するＨ因子またはＣＦＨＲ５コード領域における多型は、機能的Ｈ因子またはＣＦＨＲ５タンパク質を減少または除去することによってＡＭＤを引き起こす可能性がある。終止コドンはまた、全長タンパク質と比較して異常な活性を有する短縮型Ｈ因子またはＣＦＨＲ５ペプチドの産生を引き起こす可能性がある。プロモーターおよびイントロンなどの調節領域における多型は、Ｈ因子またはＣＦＨＲ５遺伝子発現を減少させることによってＡＭＤを引き起こす可能性がある。イントロン（例えば、ＣＦＨのイントロン２）における多型もまた、遺伝子スプライシングパターンを変化させて、変化したＨ因子またはＣＦＨＲ５タンパク質を生じることによってＡＭＤを引き起こす可能性がある。ＣＦＨ　ＲＮＡまたはタンパク質は、スプライシング変異体の発現の変化を検出するためにアッセイすることができ、ここで、上記変化は、ＡＭＤを発症する性向を示す。選択的スプライシングパターンは、Ｈ因子遺伝子それ自体について報告されてきた。

【０１５７】

ＡＭＤに対するＨ因子遺伝子またはＣＦＨＲ５遺伝子における多型の効果は、いくつかの手段によって決定することができる。変異体Ｈ因子またはＣＦＨＲ５ポリペプチドの発現レベルの変化は、ＡＭＤまたはＡＭＤの種々のサブタイプを有するかまたは有しない個体の群からのサンプル中のタンパク質レベルを測定することによって決定することができ

る。変異体Ｈ因子またはＣＦＨＲ５ポリペプチドの生物学的活性の変化は、上記の個体の群からのサンプル中で、Ｈ因子またはＣＦＨＲ５のインビトロ活性、例えば、Ｃ３ｂまたはヘパリンへの結合をアッセイすることによって検出することができる。

【０１５８】

ＶＩ．ゲノム複製の部位における多型

図１８において図示されるように、ＣＦＨについての遺伝子およびＨ因子関連（ＣＦＨＲ）１～５遺伝子は、ゲノム複製からおそらく生じる、共有される、保存性の配列の領域を有する。ＣＦＨまたはＣＦＨＲ５において見出される特定のＳＮＰおよび変異、例えば、本明細書に記載されるものはまた、ＣＦＨＲ１、ＣＦＨＲ２、ＣＦＨＲ３、およびＣＦＨＲ４の対応する配列中にあることが予測される。例えば、ＣＦＨエキソン２２に対応する配列は、ＣＦＨ、ＣＦＨＲ１およびＣＦＨＲ２において見出され、ＣＦＨのエキソン２２において同定される多型（例えば、Ｒ１２１０Ｃ）もまたＣＦＨＲ１および／またはＣＦＨＲ２において見出されることが可能であり、これらの変異体は、ＡＭＤ、ＭＰＧＮＩ、および他の補体関連の病気の発症への性向と連関する可能性がある。ＣＦＨおよびＣＦＨＲ５において同定された多型部位に隣接する配列の相同性ブロックは、これらの領域におけるｃＤＮＡ配列またはゲノム配列のアラインメントによって同定することができる。多型部位に隣接するこれらの保存配列は、通常、ヌクレオチドレベルで少なくとも９５％同一性を有し、および時折、少なくとも９８％同一性、少なくとも９９％同一性、または１００％同一性をさえ有する、少なくとも１０ｂｐ（多型部位のいずれかの側で）、およびより頻繁には少なくとも２０ｂｐ、または少なくとも５０ｂｐ、または少なくとも１００ｂｐを含む。同一性は検査または周知のアルゴリズム（ＳｍｉｔｈおよびＷａｔｅｒｍａｎ、１９８１またはＮｅｅｄｌｅｍａｎおよびＷｕｎｓｃｈ、１９７０、両方とも前出）を使用することによって決定することができる。それゆえに、本発明は、ＣＦＨまたはＣＦＨＲ５遺伝子における相同多型部位に対応するＨ因子関連遺伝子の多型部位における変異の存在または非存在を検出することによって、加齢性黄斑変性（ＡＭＤ）または他の病気を発症する被験体の性向を決定する方法を提供する。

【０１５９】

ＣＦＨおよびＨ因子関連遺伝子についての配列は当該分野で公知である（本明細書の他の箇所で提供される配列およびアクセッション番号を参照のこと）。以下もまた参照のこと：Ｒｏｄｒｉｑｕｅｚ ｄｅ Ｃｏｒｄｏｂａ, Ｓ.ら、２００４, Ｍｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ ４１：３５５－６７；Ｚｉｐｆｅｌら、１９９９, Ｉｍｍｕｎｏｐｈａｒｍｏｃｏｌｏｇｙ ４２：５３－６０；Ｚｉｐｆｅｌら、Ｆａｃｔｏｒ Ｈ ｆａｍｉｌｙ ｐｒｏｔｅｉｎｓ：ｏｎ ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ, ｍｉｃｒｏｂｅｓ ａｎｄ ｈｕｍａｎ ｄｉｓｅａｓｅｓ, Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｓｏｃ Ｔｒａｎｓ. ２００２ Ｎｏｖ；３０（Ｐｔ ６）：９７１－８；Ｄｉａｚ－Ｇｕｉｌｌｅｎ ＭＡら、Ａ ｒａｄｉａｔｉｏｎ ｈｙｂｒｉｄ ｍａｐ ｏｆ ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ ｆａｃｔｏｒ Ｈ ａｎｄ ｆａｃｔｏｒ Ｈ－ｒｅｌａｔｅｄ ｇｅｎｅｓ, Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ, １９９９ Ｊｕｎ；４９（６）：５４９－５２；Ｓｋｅｒｋａ Ｃら、Ａ ｎｏｖｅｌ ｓｈｏｒｔ ｃｏｎｓｅｎｓｕｓ ｒｅｐｅａｔ－ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ｍｏｌｅｃｕｌｅ ｉｓ ｒｅｌａｔｅｄ ｔｏ ｈｕｍａｎ ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ ｆａｃｔｏｒ Ｈ, Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ. １９９３ Ｆｅｂ ５；２６８（４）：２９０４－８；Ｓｋｅｒｋａ Ｃら、Ｔｈｅ ｈｕｍａｎ ｆａｃｔｏｒ Ｈ－ｒｅｌａｔｅｄ ｇｅｎｅ ２（ＦＨＲ２）：ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ａｎｄ ｌｉｎｋａｇｅ ｔｏ ｔｈｅ ｃｏａｇｕｌａｔｉｏｎ ｆａｃｔｏｒ ＸＩＩＩｂ ｇｅｎｅ, Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ, １９９５；４２（４）：２６８－７４；Ｍａｌｅ ＤＡら、Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ ｆａｃｔｏｒ Ｈ：ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ ２２１ ｋｂ ｏｆ ｈｕｍａｎ ｇｅｎｏｍｉｃ ＤＮＡ ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ｔｈｅ ｅｎｔｉｒｅ ｆＨ, ｆＨＲ－１ ａｎｄ ｆＨＲ－３ ｇｅｎｅｓ, Ｍｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ. ２０００ Ｊａｎ－Ｆｅｂ；３７（１－２）：４１－５２；Ｈｅｌｌｗａｇｅ Ｊら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ ａｎｄ ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ

of the factor−H−related protein 4（FHR−4）, Immunopharmacology. 1997 Dec；38（1～2）：149−57；Skerka Cら、The human factor H−related protein 4（FHR−4）. A novel short consensus repeat−containing protein is associated with human triglyceride−rich lipoproteins, J Biol Chem. 1997 Feb 28；272（9）：5627−34；Hellwage Jら、Functional properties of complement factor H−related proteins FHR−3 and FHR−4: binding to the C3d region of C3b and differential regulation by heparin, FEBS Lett. 1999 Dec 3；462（3）：345−52；Jozsi Mら、FHR−4A: a new factor H−related protein is encoded by the human FHR−4 gene, Eur J Hum Genet. 2005 Mar；13（3）：321−9；McRae JLら、Location and structure of the human FHR−5 gene, Genetica. 2002 Mar；114（2）：157−61；McRae JLら、Human factor H−related protein 5 has cofactor activity, inhibits C3 convertase activity, binds heparin and C−reactive protein, and associates with lipoprotein, J Immunol. 2005 May 15；174（10）：6250−6；Murphy Bら、Factor H−related protein−5: a novel component of human glomerular immune deposits, Am J Kidney Dis. 2002 Jan；39（1）：24−7。

【0160】

ＶＩＩ．ＡＭＤと関連するＨ因子多型の検出および分析

Ｈ因子遺伝子およびＣＦＨＲ５遺伝子における多型部位およびハプロタイプがＡＭＤ（およびＭＰＧＮＩＩ）と関連するという発見は、ＡＭＤを発症するリスクを確認するために個体をスクリーニングすること、およびＡＭＤに苦しんでいる個体、またはＡＭＤのリスクの増加を有する個体の新規なまたは最適な治療的アプローチの同定を含む、多数の具体的な応用を有する。特定のメカニズムに限定されることを意図することはないが、Ｈ因子遺伝子における多型は、さまざまなやり方で個体の表現型に寄与し得る。Ｈ因子のタンパク質コード領域中に存在する多型は、タンパク質の構造および／または機能に影響を与えることによって表現型に寄与し得る。Ｈ因子の非コード領域中に存在する多型は、複製、転写および／または翻訳に対するそれらの影響を介して間接的に表現型の効果を発揮し得る。Ｈ因子遺伝子における特定の多型は、特定のＡＭＤ表現型に原因として関係している別個の突然変異を個体に生じやすくし得る。もしくは、上述のように、ＣＦＨ遺伝子またはＣＦＨＲ５中の多型は、隣接する遺伝子（ＣＦＨＲ−１、２、３、または４を含むが、これに限定されない）における変異に連鎖され得る。この隣接する遺伝子における変異は、コードされるタンパク質の発現および型の変化を生じる可能性があり、キャリアにおいて有害なまたは防御的な効果を有する可能性がある。

【0161】

Ａ．分析のためのサンプルの調製

多型は、評価される個体から単離された標的核酸において検出される。典型的には、ゲノムＤＮＡが分析される。ゲノムＤＮＡのアッセイのためには、ゲノムＤＮＡまたはＲＮＡを含む実質的に任意の生物学的サンプル、例えば、有核細胞が適切である。例えば、実施例１に記載される実験において、ゲノムＤＮＡは、症例および対照の被験体から採取された末梢血白血球から得られた（ＱＩＡａｍｐ ＤＮＡ Ｂｌｏｏｄ Ｍａｘｉ ｋｉｔ

，Ｑｉａｇｅｎ，Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）。他の適切なサンプルには、唾液、頬かきとり物、網膜の生検、腎臓または肝臓または他の器官または組織、皮膚生検；羊水またはＣＶＳサンプルなどが含まれる。もしくは、ＲＮＡまたはｃＤＮＡをアッセイすることができる。もしくは、以下に議論されるように、アッセイは、変異体Ｈタンパク質を検出することができる。診断アッセイまたは他のアッセイにおける使用のための、患者サンプルからの核酸またはタンパク質の精製または部分精製のための方法は周知である。

【０１６２】

Ｂ．標的核酸における多型の検出

表１Ａ、１Ｂ、１Ｃ、１１、１４および１５において示されるＨ因子遺伝子およびＨ因子関連５遺伝子における多型部位、ならびにＨ因子遺伝子またはＣＦＨＲ５遺伝子に局在するか、またはそれに隣接するｄｂＳＮＰコレクションにおける他の多型部位（上記のリストを参照のこと）を占める塩基の同定は、個体、例えば、分析される個体において、当該分野で公知であるいくつかの方法のいずれかを使用して決定することができる。例には以下が含まれる：アレル特異的プローブの使用；アレル特異的プライマーの使用；直接的配列分析；変性勾配ゲル電気泳動（ＤＧＧＥ）分析；一本鎖コンホメーション多型（ＳＳＣＰ）分析；および変性高速液体クロマトグラフィー（ＤＨＰＬＣ）分析。ＤＮＡにおける多型を検出するための他の周知の方法には以下の使用が含まれる：分子ビーコン技術（例えば、Ｐｉａｔｅｋら、１９９８；Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１６：３５９－６３；ＴｙａｇｉおよびＫｒａｍｅｒ，１９９６，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １４：３０３－３０８；ならびにＴｙａｇｉら、１９９８，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１６：４９－５３を参照のこと）、インベーダー技術（例えば、Ｎｅｒｉら、２０００，Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ ａｎｄ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａｎａｌｙｓｉｓ ３８２６：１１７－１２５および米国特許第６，７０６，４７１号を参照のこと）、核酸配列ベースの増幅（Ｎａｓｂａ）（Ｃｏｍｐｔｏｎ、１９９１）、スコーピオン技術（Ｔｈｅｌｗｅｌｌら、２０００，Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ，２８：３７５２－３７６１およびＳｏｌｉｎａｓら、２００１，「Ｄｕｐｌｅｘ Ｓｃｏｒｐｉｏｎ ｐｒｉｍｅｒｓ ｉｎ ＳＮＰ ａｎａｌｙｓｉｓ ａｎｄ ＦＲＥＴ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ」Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ，２９：２０．）、制限フラグメント長多型（ＲＦＬＰ）分析など。さらなる方法は当業者に明らかである。

【０１６３】

多型を分析するためのアレル特異的プローブの設計および使用は、例えば、Ｓａｉｋｉら、１９８６；Ｄａｔｔａｇｕｐｔａ，ＥＰ ２３５，７２６，Ｓａｉｋｉ，ＷＯ ８９／１１５４８によって記載されている。手短に述べると、アレル特異的プローブは、２つのセグメントが異なる多型を表すならば、１例の個体からの標的ＤＮＡのセグメントにハイブリダイズするが、別の個体からの対応するセグメントにはハイブリダイズしないように設計される。所定のプローブが２つのアレルの一方のみに本質的にハイブリダイズするように十分にストリンジェントであるハイブリダイゼーション条件が選択される。典型的には、アレル特異的プローブは、標的ＤＮＡのセグメントにハイブリダイズして、多型部位がプローブの中心位置に整列するように設計される。

【０１６４】

Ｈ因子多型を分析するための例示的なアレル特異的プローブを表１６Ａに示す。例示として多型ｄｂＳＮＰ番号ｒｓ１０６１１７０を使用して、アレル特異的プローブの例には以下が含まれる：５’－ＴＴＴＣＴＴＣＣＡＴＡＡＴＴＴＴＧ－３’［配列番号２３４］（参照アレルプローブ）および５’－ＴＴＴＣＴＴＣＣＡＴＧＡＴＴＴＴＧ－３’［配列番号２３５］（変異体アレルプローブ）；ならびに５’－ＴＡＡＴＣＡＡＡＡＴＴＡＴＧＧＡＡ－３’［配列番号２３２］（参照アレルプローブ）および５’－ＴＡＡＴＣＡＡＡＡＴＣＡＴＧＧＡＡ－３’［配列番号２３３］（変異体アレルプローブ）。この例において、アレル特異的プローブの第１のセットは、エキソン９多型に及ぶＨ因子遺伝子の非コード鎖にハイブリダイズする。アレル特異的プローブの第２のセットは、エキソン９多型に及ぶＨ因子遺伝子のコード鎖にハイブリダイズする。これらのプローブは１７塩基長で

ある。アレル特異的プローブの最適な長さは、当該分野において公知である方法を使用して容易に決定することができる。

【０１６５】

アレル特異的プローブは、しばしば対で使用され、対の１つのメンバーは標的配列の参照アレルにハイブリダイズするように設計され、他方のメンバーは変異体アレルにハイブリダイズするように設計される。いくつかの対のプローブは、同じ標的遺伝子配列中の複数の多型の同時分析のために同じ支持体上に固定化することができる。

【０１６６】

多型を分析するためのアレル特異的プライマーの設計および使用は、例えば、ＷＯ　９３／２２４５６およびＧｉｂｂｓ、１９８９によって記載される。手短に述べると、アレル特異的プライマーは、プライマーが特定のアレル型に完全に相補性を示す場合にのみ、多型と重複する標的ＤＮＡの部位にハイブリダイズし、かつ標準的なＰＣＲプロトコールに従うＤＮＡ増幅を開始するように設計される。一塩基のミスマッチはＤＮＡ増幅を妨害し、検出可能なＰＣＲ産物が形成されない。この方法は、多型部位がプライマーの極度に３’末端にあるときに最高に機能する。なぜなら、この位置は、プライマーからの伸長に対して最も不安定であるからである。

【０１６７】

Ｈ因子多型を分析するための例示的なアレル特異的プライマーを表１６Ｂに示す。例示として多型ｄｂＳＮＰ番号ｒｓ１０６１１７０を使用して、アレル特異的プライマーの例には以下が含まれる：５’－ＣＡＡＡＣＴＴＴＣＴＴＣＣＡＴＡ－３’［配列番号２９４］（参照アレルプライマー）および５’－ＣＡＡＡＣＴＴＴＣＴＴＣＣＡＴＧ－３’［配列番号２９５］（変異体アレルプライマー）；ならびに５’－ＧＧＡＴＡＴＡＡＴＣＡＡＡＡＴＴ－３’［配列番号２９２］（参照アレルプライマー）および５’－ＧＧＡＴＡＴＡＡＴＣＡＡＡＡＴＣ－３’［配列番号２９３］（変異体アレルプライマー）。この例において、アレル特異的プライマーの第１のセットは、エキソン９における多型に直に隣接するＨ因子遺伝子の非コード鎖にハイブリダイズし、示されるように、最後のヌクレオチドが、参照または変異体多型アレルに相補的である。これらのプライマーは、多型から下流の特定の位置においてＨ因子遺伝子のコード鎖にハイブリダイズする別の共通のプライマーとともに、標準的なＰＣＲプロトコールにおいて使用される。アレル特異的プライマーの第２のセットは、エキソン９における多型に直に隣接するＨ因子遺伝子のコード鎖にハイブリダイズし、示されるように、最後のヌクレオチドが、参照または変異体多型アレルに相補的である。これらのプライマーは、多型から上流の特定の位置においてＨ因子遺伝子の非コード鎖にハイブリダイズする別の共通のプライマーとともに、標準的なＰＣＲプロトコールにおいて使用される。共通のプライマーは、得られるＰＣＲ産物が、約１００～約３００塩基長、または約１５０～約２５０塩基長で変動可能であるように選択されるが、より小さな（約５０～約１００塩基長）またはより大きな（約３００～約５００塩基長）のＰＣＲ産物もまた可能である。プライマーの長さは、約１０～約３０塩基長、または約１５～２５塩基長で変動可能である。共通のプライマーの配列は、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＬ０４９７４４の下で見出されるＨ因子ゲノム配列の検査によって決定することができる。

【０１６８】

多型を検出するための方法の多くは、標的サンプルからＤＮＡまたはＲＮＡを増幅する工程（例えば、Ｈ因子特異的プライマーを使用して個体のＨ因子遺伝子のセグメントを増幅する工程）および増幅した遺伝子を分析する工程を包含する。これは、標準的なポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲおよびＲＴ－ＰＣＲ）プロトコールおよび当該分野で公知である他の方法によって達成することができる。この増幅する工程は、Ｈ因子遺伝子における単一ヌクレオチド多型部位に及ぶ、Ｈ因子アレル特異的オリゴヌクレオチドの生成を生じ得る。Ｈ因子特異的プライマー配列およびＨ因子アレル特異的オリゴヌクレオチドは、Ｈ因子遺伝子のコード（エキソン）または非コード（プロモーター、５’非翻訳、イントロンまたは３’非翻訳）領域から誘導され得る。

【０１６９】
ＰＣＲを使用して生成した増幅産物は、変性勾配ゲル電気泳動（ＤＧＧＥ）の使用によって分析することができる。異なるアレルは、溶液中での配列依存的な融解特性および電気泳動の移動度に基づいて同定することができる。Ｅｒｌｉｃｈ編、ＰＣＲ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｆｏｒ ＤＮＡ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ，Ｃｈａｐｔｅｒ ７（Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９９２）を参照のこと。
【０１７０】
標的配列のアレルは、一本鎖コンホメーション多型（ＳＳＣＰ）分析を使用して識別することができる。異なるアレルは、一本鎖ＰＣＲ産物の配列および構造依存的な電気泳動の移動度に基づいて同定することができる（Ｏｒｉｔａら、１９８９）。増幅されるＰＣＲ産物は、標準的なプロトコールに従って生成することができ、加熱するか、あるいは変性させて一本鎖産物を形成し、これは、塩基配列に部分的に依存している二次構造を再フォールディングまたは形成し得る。
【０１７１】
標的配列のアレルは、変性高速液体クロマトグラフィー（ＤＨＰＬＣ）分析を使用して識別することができる。異なるアレルは、一本鎖ＰＣＲ産物のクロマトグラフィーの移動度の変化によって、塩基の違いに基づいて同定することができる（ＦｒｕｅｈおよびＮｏｙｅｒ－Ｗｅｉｄｎｅｒ、２００３）。増幅されるＰＣＲ産物は、標準的なプロトコールに従って生成することができ、加熱するか、あるいは変性させて一本鎖産物を形成し、これは、塩基配列に部分的に依存している二次構造を再フォールディングまたは形成し得る。
【０１７２】
多型の直接的配列分析は、当該分野において周知であるＤＮＡ配列決定手順を使用して達成することができる。Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（第２版、ＣＳＨＰ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ １９８９）およびＺｙｓｋｉｎｄら、Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ＤＮＡ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（Ａｃａｄ．Ｐｒｅｓｓ，１９８８）を参照のこと。
【０１７３】
生物学的サンプル中で多型を検出するための広範な種々の他の方法が当該分野において公知である。例えば、Ｕｌｌｍａｎら、「Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ ｓｉｎｇｌｅ ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈｉｓｍ ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ」米国特許第６，６３２，６０６号；Ｓｈｉ、２００２，「Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ ｆｏｒ ｉｎｄｉｖｉｄｕａｌ ｇｅｎｏｔｙｐｉｎｇ：ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｏｆ ｇｅｎｅｔｉｃ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈｉｓｍｓ ｉｎ ｄｒｕｇ ｔａｒｇｅｔｓ ａｎｄ ｄｉｓｅａｓｅ ｇｅｎｅｓ」Ａｍ Ｊ Ｐｈａｒｍａｃｏｇｅｎｏｍｉｃｓ ２：１９７－２０５；Ｋｗｏｋら、２００３，「Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｏｆ ｓｉｎｇｌｅ ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈｉｓｍｓ」Ｃｕｒｒ Ｉｓｓｕｅｓ Ｂｉｏｌ． ５：４３－６０を参照のこと。
【０１７４】
本開示により指導される当業者には、種々の多型およびハプロタイプを、Ｈ因子関連の病気を発症する個体の性向を評価するために検出することができることが明らかである。以下の例および組み合わせ、ならびに本明細書に提供される他のものは、例示のために提供され、限定のためではない。本発明の１つの局面において、Ｈ因子遺伝子における以下の多型部位の１つ以上において患者のアレルが決定される：ｒｓ５２９８２５；ｒｓ８００２９２；ｒｓ３７６６４０４；ｒｓ１０６１１４７；ｒｓ１０６１１７０；およびｒｓ２０３６７４。１つの実施形態において、ｒｓ５２９８２５において患者のアレルが決定される。１つの実施形態において、ｒｓ８００２９２において患者のアレルが決定される。１つの実施形態において、ｒｓ３７６６４０４において患者のアレルが決定される。１つの実施形態において、ｒｓ１０６１１４７において患者のアレルが決定される。１つの

実施形態において、ｒｓ１０６１１７０において患者のアレルが決定される。１つの実施形態において、ｒｓ２０３６７４において患者のアレルが決定される。１つの実施形態において、ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２の少なくとも１つが決定される。１つの実施形態において、ｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の少なくとも１つが決定される。１つの実施形態において、ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２の少なくとも１つが決定され、ｒｓ３７６６４０４が決定され、ｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の少なくとも１つが決定される。１つの実施形態において、ｒｓ５２９８２５、ｒｓ８００２９２、ｒｓ３７６６４０４、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４におけるアレルが決定される。上述の多型および多型の組み合わせは、例示のために本明細書に提供され、いかなる場合においても、本発明を限定することを意図しない。すなわち、本発明を実施する際に有用な他の多型およびハプロタイプは、本開示から明らかである。

【０１７５】

本発明の関連する局面において、Ｈ因子遺伝子における以下の多型部位の１つ以上において患者のアレルが決定される：ｒｓ５２９８２５；ｒｓ８００２９２；イントロン２（ＩＶＳ２またはｉｎｓＴＴ）；ｒｓ３７６６４０４；ｒｓ１０６１１４７；ｒｓ１０６１１７０；エキソン１０Ａ；ｒｓ２０３６７４；ｒｓ３７５０４６；およびエキソン２２（１２１０）。１つの実施形態において、ｒｓ５２９８２５において患者のアレルが決定される。１つの実施形態において、ｒｓ８００２９２において患者のアレルが決定される。１つの実施形態において、イントロン２において患者のアレルが決定される。１つの実施形態において、ｒｓ３７６６４０４において患者のアレルが決定される。１つの実施形態において、ｒｓ１０６１１４７において患者のアレルが決定される。１つの実施形態において、ｒｓ１０６１１７０において患者のアレルが決定される。１つの実施形態において、エキソン１０Ａにおいて患者のアレルが決定される。１つの実施形態において、ｒｓ２０３６７４において患者のアレルが決定される。１つの実施形態において、ｒｓ３７５０４６において患者のアレルが決定される。１つの実施形態において、エキソン２２（１２１０）において患者のアレルが決定される。１つの実施形態において、ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２の少なくとも１つが決定され；イントロン２が決定され；ｒｓ３７６６４０４が決定され；ｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の少なくとも１つが決定され；エキソン１０Ａが決定され；ｒｓ３７５０４６が決定され；エキソン２２（１２１０）が決定される。１つの実施形態において、ｒｓ５２９８２５、ｒｓ８００２９２、イントロン２；ｒｓ３７６６４０４、ｒｓ１０６１１７０、エキソン１０Ａ、ｒｓ２０３６７４、ｒｓ３７５０４６、およびエキソン２２（１２１０）においてアレルが決定される。１つの実施形態において、Ｈ因子遺伝子における１個、２個、３個、４個、５個、または５個より多くの以下の多型部位が決定される：ｒｓ５２９８２５；ｒｓ８００２９２；イントロン２（ＩＶＳ２またはｉｎｓＴＴ）；ｒｓ３７６６４０４；ｒｓ１０６１１４７；ｒｓｌ０６１１７０；ｒｓ２２７４７００；エキソン１０Ａ；ｒｓ２０３６７４；ｒｓ３７５０４６；およびエキソン２２（１２１０）。上述の多型および多型の組み合わせは、例示のために本明細書に提供され、いかなる場合においても、本発明を限定することを意図しない。

【０１７６】

上記に議論したように、Ｈ因子遺伝子のエキソン２２の中の１２１０位のアミノ酸における非同義語多型はＡＭＤと強力に関連しており、それゆえに、Ｈ因子の１２１０位のアミノ酸におけるシステインの存在は、個体がＡＭＤを有するか、またはＡＭＤを発症する可能性があることの強力な指標を提供する。顕著には、１２１０Ｃは、さもなくば保護的であるアレル上で検出されるときでさえ（例えば、Ｙ４０２）、ＡＭＤまたは他の補体媒介の病気を発症する性向を示す。従って、エキソン２２（１２１０）における患者のアレルは、ＡＭＤまたは他のＨ因子関連疾患を発症するリスクに関して高度に情報を与える。

【０１７７】

本発明の関連する局面において、ＣＦＨＲ５遺伝子における以下の多型部位の１つ以上

における個体のアレルが決定される：ｒｓ９４２７６６１（－２４９Ｔ＞Ｃ）；ｒｓ９４２７６６２（－２０Ｔ＞Ｃ）；およびｒｓ１２０９７５５０（Ｐ４６Ｓ）。１つの実施形態において、ｒｓ９４２７６６１において患者のアレルが決定される。１つの実施形態において、ｒｓ９４２７６６２において患者のアレルが決定される。１つの実施形態において、ｒｓ１２０９７５５０において患者のアレルが決定される。１つの実施形態において、ｒｓ９４２７６６１およびｒｓ９４２７６６２の少なくとも１つが決定される。１つの実施形態において、ｒｓ９４２７６６１およびｒｓ９４２７６６２の少なくとも１つが決定され、ｒｓ１２０９７５５０が決定される。１つの実施形態において、ｒｓ９４２７６６１、ｒｓ９４２７６６２およびｒｓ１２０９７５５０が決定される。上述の多型および多型の組み合わせは、例示のために本明細書に提供され、いかなる場合においても、本発明を限定することを意図しない。すなわち、本発明を実施する際に有用な他の多型およびハプロタイプは、本開示から明らかである。

【０１７８】

Ｃ．タンパク質変異体の検出

本発明の１つの実施形態において、タンパク質アッセイが、被験体のＣＦＨ遺伝子またはＣＦＨＲ５遺伝子における多型を特徴付けするために実行される。変異体ＣＦＨ、ＨＦＬ１およびＣＦＨＲ５の検出のために適合可能な方法は周知である。これらの方法には、電気泳動（キャピラリー電気泳動および二次元電気泳動を含む）などの分析生化学的方法、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、薄層クロマトグラフィー（ＴＬＣ）、超拡散クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー法、質量スペクトル分析、および流体またはゲル沈降素反応、免疫拡散（一重または二重）免疫電気泳動、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、免疫蛍光アッセイ、ウェスタンブロッティングなどの種々の免疫学的方法が含まれる。

【０１７９】

例えば、本発明の実施のために適切な多数の十分に確立された免疫学的結合アッセイ形式が知られている（例えば、Ｈａｒｌｏｗ，Ｅ．；Ｌａｎｅ，Ｄ．Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：ａ ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｍａｎｕａｌ．Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ；１９８８；およびＡｕｓｕｂｅｌら、（２００４）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ ＮＹを参照のこと）。このアッセイは、例えば、競合的または非競合的であり得る。典型的には、免疫学的結合アッセイ（またはイムノアッセイ）は、分析物に特異的に結合し、およびしばしば、これを固定化するための「捕捉剤」を利用する。１つの実施形態において、この捕捉剤は、変異体ＣＦＨまたはＣＦＨＲ５ポリペプチドまたはサブ配列に特異的に結合する部分である。結合したタンパク質は、例えば、検出可能に標識された抗ＣＦＨ／ＣＦＨＲ５抗体を使用して検出されてもよい。１つの実施形態において、この抗体の少なくとも１つは、変異体形態に特異的である（例えば、野生型ＣＦＨまたはＣＦＨＲ５ポリペプチドに結合しない）。１つの実施形態において、変異体ポリペプチドは、イムノブロット（ウェスタンブロット）形式を使用して検出される。

【０１８０】

Ｄ．患者のＡＭＤのスクリーニング／診断

ＡＭＤまたはＡＭＤの特定のサブタイプと相関する、Ｈ因子遺伝子における多型、例えば、表１Ａ、表１Ｂ、表１Ｃに示されるもの、または本明細書に記載されるように同定されるものは、ＡＭＤもしくはＡＭＤの特異的サブタイプ、またはそれに対する感受性を診断する際に有用である。ＡＭＤまたはＡＭＤの特定のサブタイプと相関する、ＣＦＨＲ５遺伝子における多型、例えば、表１４および１５に示されるもの、または本明細書に記載されるように同定されるものは、ＡＭＤもしくはＡＭＤの特異的サブタイプ、またはそれに対する感受性を診断する際に有用である。これらの多型はまた、ＭＰＧＮＩＩおよび他のＨ因子関連疾患をスクリーニングするために有用である。

【０１８１】

ＡＭＤを発症する高いリスクがあると同定された個体は、以下に記載され、当該分野において公知であり、または将来開発される、頻繁な眼科的な検査および治療を含む、リスクを減少させるための段階を経ることができる。

【０１８２】

実施例１に記載されるように、誘発性の事象（例えば、感染）と組み合わせたアットリスクＣＨＦハプロタイプは、疾患の出現のために十分であるように思われる。ＡＭＤのリスクがあると同定された患者は、感染の初期の徴候において積極的治療（例えば、抗生物質、抗炎症薬剤、防御型のＣＦＨ／ＣＦＨＲ５を用いる治療、またはＣＦＨ活性の他の調節因子を用いる治療）を受けることができる。

【０１８３】

このようないくつかの多型型の組み合わせた検出（すなわち、特定の部位における多型の存在または非存在）、例えば、単独でまたは表１Ａ～１Ｃには含まれないさらなるＨ因子遺伝子の多型と組み合わせた、表１Ａ、表１Ｂおよび／または表１Ｃにおいて列挙されたＨ因子遺伝子における多型の１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、またはすべてが、正確な診断の確率を増加させり可能性がある。同様に、ＣＦＨＲ５遺伝子におけるいくつかの多型の組み合わせた検出、例えば、単独でまたは表１４および１５には含まれないさらなるＣＦＨＲ５遺伝子の多型と組み合わせた、表１４および１５において列挙されたＣＦＨＲ５遺伝子における多型の１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、またはすべてが、正確な診断の確率を増加させる可能性がある。１つの実施形態において、スクリーニングは、Ｈ因子遺伝子における少なくとも１つの多型、およびＣＦＨＲ５遺伝子における少なくとも１つの多型の存在または非存在を決定する工程を含む。１つの実施形態において、スクリーニングは、ＣＦＨＲ５遺伝子における少なくとも２個、３個、または４個の多型と組み合わせて、Ｈ因子遺伝子における少なくとも２個、３個、または４個の多型の存在または非存在を決定する工程を含む。

【０１８４】

Ｈ因子遺伝子およびＣＦＨＲ５遺伝子における多型は、ＡＭＤを有する患者の家族メンバーにおいて、ならびに一般的集団において、ＡＭＤもしくはＡＭＤの特異的サブタイプ、またはそれに対する感受性を診断する際に有用である。

【０１８５】

診断方法において、Ｈ因子多型および／またはＣＦＨＲ５多型の分析は、ＡＭＤと関連する他の遺伝子における多型の分析、ＡＭＤのタンパク質マーカーの検出（例えば、Ｈａｇｅｍａｎら、特許出願ＵＳ２００３００１７５０１；ＵＳ２００２０１０２５８１；ＷＯ０１８４１４９；およびＷＯ０１０６２６２を参照のこと）、ＡＭＤの他のリスク要因（例えば、家族歴）の評価、眼科的検査、ならびに他のアッセイおよび手順と組み合わせることができる。

【０１８６】

Ｅ）薬物治療のための患者の同定

Ｈ因子遺伝子およびＣＦＨＲ５遺伝子における多型はまた、ＡＭＤのための薬物候補についての臨床試験を実施するために適切な患者を同定するために有用である。このような試験は、Ｈ因子遺伝子および／もしくはＣＦＨＲ５遺伝子における多型部位の規定されたコレクションにおいて同様のまたは同一の多型を有し、または同様のもしくは同一のＨ因子ハプロタイプおよび／もしくはＣＦＨＲ５ハプロタイプを有する、治療された集団または対照集団において実施される。遺伝子が一致する集団の使用は、遺伝要因に起因する治療の結果の変動を除去または減少し、潜在的な薬物の効力のより正確な評価に導く。

【０１８７】

Ｆ）移植のためのドナー組織のスクリーニング

臓器（例えば、肝臓）および組織（例えば、血液、肝細胞）の移植は、ますます一般的になりつつある。このような移植を実行する際に、Ｈ因子またはＨ因子関連タンパク質の有害な型をレシピエントに導入し、それによって、ＡＭＤを発症するレシピエントのリス

クを増加することを回避することが望ましい。従って、本発明の１つの局面において、ドナー組織は、リスクハプロタイプまたは他の有害な配列を有する宿主組織を同定するために、Ｈ因子またはＣＦＨＲ５遺伝子の多型部位における変異の存在または非存在を検出するために試験される。加えて、または代替的に、臓器および組織は、例えば、本明細書に記載されるような免疫学的アッセイを使用することによって、Ｈ因子タンパク質またはＣＦＨＲタンパク質の発現について試験することができる。１つの実施形態において、移植される組織は血液または血漿である（すなわち、輸血または血漿補充における場合）。リスクを伴うタンパク質（例えば、ＣＦＨの１２１０Ｃ型）の投与を回避するための、提供された血液の日常的なスクリーニングは、レシピエントを傷つけることを回避する可能性がある。

【０１８８】

Ｇ）表現型のカテゴリー

ＡＭＤの特定のサブタイプに対する感受性は、特定のハプロタイプとの関連に基づいて同定することができる。従って、スクリーニングは、ＡＭＤの異なる遺伝子サブタイプを有する患者の群のために適切な治療を決定するために使用することができる。

【０１８９】

方法は、表現型のカテゴリー（例えば、初期ＡＭＤ（ＡＲＭ）地図状萎縮症（ＧＡ）および滲出性ＡＭＤ（ＣＮＶ））に下位分類され得るＡＭＤの診断のために使用されてもよい。ＡＲＭおよびＧＡ表現型は、別個の表現型（例えば、ＲＰＥ変化単独、＞１０黄斑硬性ドルーゼン、黄斑軟性ドルーゼン、ＢＢ（表皮）ドルーゼン、色素上皮剥離（ＰＥＤ）、「チェロキー」萎縮症、半島地図状萎縮症、およびパターン地図状萎縮症）にさらに下位分類されてもよい。これらの表現型の説明については、例えば、Ｂｉｒｄら、１９９５，Ｓｕｒｖ Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ ３９，３６７－７４；およびＫｌａｖｅｒら、２００１，Ｉｎｖｅｓｔ Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ Ｖｉｓ Ｓｃｉ ４２，２２３７－４１を参照のこと。

【０１９０】

Ｈ）他の疾患

Ｈ因子およびＣＦＨＲ５遺伝子における多型、例えば、表１Ａ、１Ｂ、１Ｃ、１１、１４および１４において示されるものはまた、既知であるがこれまでにマッピングされていない遺伝子成分である、代替補体経路の調節異常を伴う、他の疾患（例えば、アルツハイマー病、多発性硬化症、狼瘡、および喘息）および病気（例えば、熱傷、移植、および脳卒中）との関連について試験することができる。特定の作用のメカニズムに何ら限定されることなく、変異体Ｈ因子および／またはＣＦＨＲ５ポリペプチドの発現が代替補体経路の調節異常と関連することが本明細書で示唆される。Ｈ因子および／またはＣＦＨＲ５の変異体形態は、代替補体経路の欠損を伴う疾患に対して因果効果を有する可能性があり、またはＨ因子および／またはＣＦＨＲ５の変異体形態の存在は、代替補体経路に関与する別の遺伝子が因果効果を有することを示す可能性がある。

【０１９１】

Ｈ因子遺伝子における多型はまた、染色体１ｑ、特に、Ｈ因子遺伝子が位置する１ｑ３２またはその近傍にマッピングされる疾患を、マッピングおよび治療する際に有用であり得る。この特定の遺伝子座は、多数の補体経路関連遺伝子を含む。補体活性化遺伝子クラスターの調節因子（ＲＣＡ）と呼ばれる、これらの遺伝子の１つの群は、Ｈ因子、５つのＨ因子関連遺伝子および凝固第ＸＩＩＩ因子のβサブユニットをコードする遺伝子を含む。Ｃ４ＢＰＡ、Ｃ４ＢＰＢ、Ｃ４ＢＰＡＬ２、ＤＡＦ（ＣＤ５５）ＣＲ１、ＣＲ２、ＣＲ１ＬおよびＭＣＰ（ＣＤ４６）を含む、補体関連遺伝子の第２のクラスターは、１ｑ２５－３１遺伝子座に直に隣接して存在する。

【０１９２】

ＶＩＩＩ．ＡＭＤの予防および治療

Ｈ因子多型を有する患者は、変異体Ｈ因子ポリペプチドおよび／または変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドのアンタゴニストを患者に投与することによって治療することができる。

アンタゴニストは、変異体H因子ポリペプチドおよび／もしくは変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドのヌクレオチド配列に相補的なＲＮＡ、または変異体H因子ポリペプチドおよび／または変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドと特異的に相互作用し、その活性を中和する抗体の治療量を含んでもよい。もしくは、H因子多型および／またはＣＦＨＲ５多型と関連するＡＭＤは、リスクの増加と関連しない型のH因子および／またはＣＦＨＲ５、例えば、正常もしくは野生型のH因子タンパク質および／または正常もしくは野生型のＣＦＨＲ５ポリペプチドを患者に投与することによって治療することができる。本発明の１つの方法において、H因子の防御的変異体形態および／またはＣＦＨＲ５の防御的変異体形態が患者に投与される。

【０１９３】

ＡＭＤについて高いリスクがあると同定された被験体における治療的および予防的アプローチには以下が含まれるがこれらに限定されない：（１）H因子の中性型もしくは防御型および／またはＣＦＨＲ５の中性型もしくは防御型の量または発現を増加させること；（２）H因子のリスク関連型および／またはＣＦＨＲ５のリスク関連型の量または発現を減少させること；ならびに（３）補体代替経路の活性化を減少させること。このような治療的および予防的アプローチの例には以下が含まれる：（１）H因子タンパク質もしくはその治療活性フラグメントの中性型もしくは防御型、および／またはＣＦＨＲ５もしくはその治療活性の投与フラグメントの中性型もしくは防御型の投与；（２）さもなくばH因子の中性型または防御型の発現または活性を増加させること；（３）リスクハプロタイプを有する個体によってコードされる変異体H因子タンパク質および／または変異体ＣＦＨＲ５タンパク質の発現に干渉すること（例えば、アンチセンスＲＮＡの投与によって）；（４）有害な変異体形態の活性の量を減少させること。

【０１９４】

治療薬剤（例えば、野生型もしくは変異体H因子のレベルを増加もしくは減少させ、またはその活性を調節する薬剤、あるいは野生型もしくは変異体ＣＦＨＲ５のレベルを増加もしくは減少させ、またはその活性を調節する薬剤）は、全身的に（例えば、静脈内注射または注入によって）または局所的に（例えば、ＡＭＤの治療のために眼ＲＰＥの近傍に）投与することができる。眼への薬剤の投与のための方法は医学分野において周知であり、本明細書に記載されているＡＭＤ治療剤を投与するために使用することができる。例示的な方法には、眼内注射（例えば、眼球後、網膜下、硝子体内および角膜内（ｉｎｔｒａｃｈｏｒｉｄａｌ））、イオン泳動、点眼、および眼内移植（例えば、硝子体内、テノン嚢下および結膜下）が含まれる。例えば、抗ＶＥＧＦ抗体は、硝子体内注射によって、カニクイザルに導入されており（例えば、Ｇａｕｄｒｅａｕｌｔら、２００５，「Ｐｒｅｃｌｉｎｉｃａｌ ｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅｔｉｃｓ ｏｆ Ｒａｎｉｂｉｚｕｍａｂ（ｒｈｕＦａｂＶ２）ａｆｔｅｒ ａ ｓｉｎｇｌｅ ｉｎｔｒａｖｉｔｒｅａｌ ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ」Ｉｎｖｅｓｔ Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ Ｖｉｓ Ｓｃｉ ４６：７２６－３３を参照のこと）、生物活性ＶＥＧＦおよびｂＦＧＦが、持続放出ペレットの硝子体内移植を介して眼において発現されてきた（Ｗｏｎｇら、２００１，「Ｉｎｔｒａｖｉｔｒｅａｌ ＶＥＧＦ ａｎｄ ｂＦＧＦ ｐｒｏｄｕｃｅ ｆｌｏｒｉｄ ｒｅｔｉｎａｌ ｎｅｏｖａｓｃｕｌａｒｉｚａｔｉｏｎ ａｎｄ ｈｅｍｏｒｒｈａｇｅ ｉｎ ｔｈｅ ｒａｂｂｉｔ」Ｃｕｒｒ Ｅｙｅ Ｒｅｓ．２２：１４０－７）。重要なことには、H因子は網膜色素上皮によって局所的に合成されることが発見されており（実施例１を参照のこと）、薬剤の局所的投与が治療的利点を有することを示す。

【０１９５】

Ａ．治療的H因子ポリペプチドの投与

ＡＭＤを発症するリスクがある（および／または早期の疾患を有する）被験体への、H因子ポリペプチドの中性型もしくは防御型および／またはＣＦＨＲ５ポリペプチドの中性型もしくは防御型の投与は、疾患の進行を改善するために使用することができる。

【０１９６】

１つのアプローチにおいて、組換えH因子ポリペプチドが患者に投与される。１つの実

施形態において、組換えＨ因子は、全長（ＣＦＨ／ＨＦ１）、短縮型（ＦＨＬ１）、または選択的スプライシング型、またはその生物学的に活性なフラグメントであってもよい、中性ハプロタイプ配列によってコードされる。別の実施形態において、組換えＨ因子は、全長もしくは短縮型のいずれかである防御的アレル、またはその生物学的に活性なフラグメントの配列を有する。治療用組換えタンパク質の産生のための方法は周知であり、本明細書中以下に記載される方法を含む。治療用ポリペプチドは、全身的に（例えば、静脈内にまたは注入によって）または局所的に（例えば、眼または肝臓などの臓器または組織に直接的に）投与することができる。

【０１９７】

Ｈ因子およびＣＨＦＬ１タンパク質のある防御型は全長未満である。例えば、Ｈ因子の中性型または防御型のフラグメントは、ＡＭＤまたはＭＰＧＮＩＩの治療または予防のために投与されてもよい。特定の実施形態において、防御的表現型を有する個体において発現されるＣＦＨスプライシング変異体によってコードされるポリペプチドが投与される。これらのタンパク質は、防御的または中性ハプロタイプについてホモ接合性である個体においてＣＦＨ関連ＲＮＡの発現をスクリーニングすることによって同定することができる。

【０１９８】

特定の実施形態において、防御的タンパク質は、ＣＦＨ遺伝子配列の１つ以上のエキソンに対応する配列を有する。例えば、防御的タンパク質は、１個、２個、３個またはそれ以上のエキソン（これらは連続していてもよいし、そうでなくてもよい）によってコードされるアミノ酸残基が削除されている以外は、全長または短縮型のＣＦＨタンパク質の配列を有してもよい。

【０１９９】

１つの実施形態において、本発明の防御的Ｈ因子タンパク質は、４０２位の残基がヒスチジンではなく、１２１０位の残基がシステインではないという条件で、配列番号２に対して実質的に同一であるアミノ酸配列を有する。１つの実施形態において、６２位の残基はバリンではない。好ましくは、６２位の残基はイソロイシンである。好ましくは、６２位の残基はイソロイシンであり、４０２位の残基はチロシンであり、１２１０位の残基はアルギニンである。好ましくは、防御的Ｈ因子タンパク質は、配列番号２またはそのフラグメントに対して９５％のアミノ酸同一性を有し；時折、配列番号２の参照Ｈ因子ポリペプチドに対して、少なくとも９５％のアミノ酸同一性、時折少なくとも９８％のアミノ酸同一性、そして時折少なくとも９９％の同一性を有する。ヒトＨ因子の例示的な防御的変異体のポリペプチド配列［配列番号５］は図１０に示される。この防御的変異体Ｈ因子ポリペプチドは、アミノ酸６２位にイソロイシンを有し、アミノ酸４０２位にチロシンを有する（太字で示される）。例示的なＨＦＬ１の防御的変異体、ヒトＨ因子の短縮型のポリペプチド配列（配列番号６）は図１１に示される。この防御的変異体短縮型Ｈ因子ポリペプチドは、アミノ酸６２位にイソロイシンを、アミノ酸４０２位にチロシンを有する（太字で示される）。

【０２００】

１つの実施形態において、本発明の防御的Ｈ因子タンパク質は、配列番号４（ＦＨＬ１）と実質的に同一のアミノ酸配列を有する。１つの実施形態において、６２位の残基はバリンではない。好ましくは、６２位の残基はイソロイシンである。好ましくは、防御的Ｈ因子タンパク質は、配列番号４またはそのフラグメントに対して９５％のアミノ酸同一性を有し；時折、配列番号４の参照Ｈ因子ポリペプチドに対して、少なくとも９５％のアミノ酸同一性、時折少なくとも９８％のアミノ酸同一性、そして時折少なくとも９９％の同一性を有する。

【０２０１】

ある実施形態において、防御的Ｈ因子タンパク質は、参照Ｈ因子ポリペプチドの１つ以上の活性を有する。１つの実施形態において、活性はヘパリンに結合することである。１つの実施形態において、活性はＣＲＰに結合することである。１つの実施形態において、

活性はＣ３ｂに結合することである。１つの実施形態において、活性は内皮細胞表面に結合することである。１つの実施形態において、活性はＣ３ｂコファクター活性である。１つの実施形態において、防御的Ｈ因子タンパク質は、配列番号２のタンパク質よりも、その通常の機能に関してより高い活性を有する。１つの実施形態において、防御的Ｈ因子タンパク質は、配列番号４のタンパク質よりも、その通常の機能に関してより高い活性を有する。

【０２０２】

Ｈ因子活性についてのアッセイは周知であり、科学文献に記載されている。限定のためではなく例示のために、アッセイの例を手短に記載する。

【０２０３】

防御的タンパク質（ＣＦＨ変異体）のＣ３ｂまたはＣＲＰへの結合

Ｃ３ｂタンパク質とＣＦＨタンパク質との間の相互作用は、以前に記載されたように（Ｍａｎｕｅｌｉａｎら、２００３，Ｍｕｔａｔｉｏｎｓ ｉｎ ｆａｃｔｏｒ Ｈ ｒｅｄｕｃｅ ｂｉｎｄｉｎｇ ａｆｆｉｎｉｔｙ ｔｏ Ｃ３ｂ ａｎｄ ｈｅｐａｒｉｎ ａｎｄ ｓｕｒｆａｃｅ ａｔｔａｃｈｍｅｎｔ ｔｏ ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ ｃｅｌｌｓ ｉｎ ｈｅｍｏｌｙｔｉｃ ｕｒｅｍｉｃ ｓｙｎｄｒｏｍｅ．Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ １１１，１１８１－９０）、Ｂｉａｃｏｒｅ ３０００システム（Ｂｉａｃｏｒｅ ＡＢ，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）を使用して、表面共鳴によって分析することができる。手短に述べると、Ｃ３ｂ（ＣａｌＢｉｏｃｈｅｍ，Ｉｎｃ）を、センサーチップ（カルボキシル化デキストランチップ（Ｃａｒｂｏｘｙｌａｔｅｄ Ｄｅｘｔｒａｎ Ｃｈｉｐ）ＣＭ５，Ｂｉａｃｏｒｅ ＡＢ，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）のフローセルに、標準的なアミンカップリングを使用してカップリングする。２つのセルを活性化し、Ｃ３ｂ（５０μｇ／ｍｌ、１０ｍＭ酢酸緩衝液、ｐＨ５．０に対して透析）を、４０００共鳴単位に対応するカップリングのレベルに到達するまで、１つのフローセルに注入する。未反応の基は、エタノールアミン－ＨＣｌを使用して不活性化する。他のセルは、Ｃ３ｂを含まないカップリング緩衝液を注入することによって参照セルとして調製する。各結合アッセイの前に、１０ｍＭ酢酸緩衝液、ｐＨ４．６中の２Ｍ ＮａＣｌおよび実行緩衝液（ＰＢＳ、ｐＨ７．４）の２回の注入によりフローセルを徹底的に洗浄する。Ｈ因子タンパク質を、Ｃ３ｂをカップリングしたフローセルおよび対照セルに、５μｌ／分の流速で２５℃において注入する。Ｃ３ｂへのの結合は、Ｍａｎｕｅｌｉａｎら、２００３、前出において記載されるように、経時的に共鳴単位を測定することによって定量する。

【０２０４】

ＣＲＰタンパク質とＣＨＦタンパク質との間の相互作用は、センサーチップのフローセル中でＣ３ｂをＣＲＰで置換することによって同一の様式で表面共鳴によって分析することができる。

【０２０５】

内皮細胞表面への結合

内皮細胞表面へのＣＨＦタンパク質の結合を、ＨＵＶＥＣの免疫蛍光染色およびＦＡＣＳ分析によってアッセイする。ＨＵＶＥＣ細胞は、無血清ＤＭＥＭ（ＢｉｏＷｈｉｔｔａｋｅｒ）中に、アッセイの前２４時間保持する。細胞は、ＤＰＢＳ／ＥＤＴＡを用いて表面から脱離させ、ＤＰＢＳで２回洗浄する；5×10^{5}細胞をプラスチックチューブに移し、非特異的結合部位を、１％ＢＳＡ／ＤＰＢＳで１５分間ブロックし、その後、Ｈ因子の精製アレル変異体（５μｇ）とのインキュベーションを行う。対照は、Ｈ因子アイソフォームの非存在下で実施する。Ｈ因子の結合後、細胞をＤＰＢＳで徹底的に洗浄する。ポリクローナルヤギ抗ヒトＦＨ抗血清を一次抗体（ＣａｌＢｉｏｃｈｅｍ）（１：１００希釈）として使用し、細胞を４℃で１５分間インキュベートする。ブロッキング緩衝液中で１：１００希釈したＡｌｅｘａ－ｆｌｕｏｒ ４８８－結合体化ヤギ抗血清を二次抗体として使用する。細胞を、フローサイトメトリー（ＦＡＣＳｃａｌｉｂｕｒ，Ｂｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏｃｙｔｏｍｅｔｒｙ，Ｍｏｕｎｔａｉｎ Ｖｉｅｗ

，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ，ＵＳＡ）によって試験する。典型的には、１０，０００個の事象が計数される。

【０２０６】

流体相におけるコファクター活性

流体相コファクターアッセイのために、Ｃ３ｂビオチン（１００ｎｇ／反応）、Ｉ因子（２００ｎｇ／反応）および１００ｎｇの精製Ｈ因子を、総量３０μｌ中で使用する。Ｉ因子の添加の前後に採取したサンプルを、還元条件下でのＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分離し、ウェスタンブロッティングによって分析し、ストレプトアビジン（Ｓｔｒｅｐａｖｉｄｉｎ）－ＰＯＤ－結合体（１：１００００）によって、Ｃ３ｂ分解産物を検出および定量する。Ｃ３ｂ（４０μｇ）（ＣａｌＢｉｏｃｈｅｍ）は、製造業者の説明書に従ってビオチン標識キット（Ｒｏｃｈｅ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ，Ｍａｎｎｈｅｉｍ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用してビオチン化する。手短に述べると、３０μｇのＣ３ｂ（ＣａｌＢｉｏｃｈｅｍ）を、Ｄ－ビオチニル－ε－アミノカプロン酸－Ｎ－ヒドロキシスクシニミドエステルで、２５℃にて２時間標識する。過剰のビオチンは、ＰＢＳで平衡化したＰＤ１０カラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用するゲル濾過によって除去する。Ｓａｎｃｈｅｚ－Ｃｏｒｒａｌら、２００２，Ａｍ Ｊ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔ．７１：１２８５－９５もまた参照のこと。

【０２０７】

ヘパリン結合活性

ヘパリンへの精製ＣＦＨタンパク質（ＣＦＨ４０２ＹおよびＣＦＨ４０２Ｈ）の結合は、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）システムにおいてヘパリンアフィニティークロマトグラフィーを使用して分析する。１０μｇのＣＦＨタンパク質を１／２×ＰＢＳ中で希釈し、ヘパリンセファロースアフィニティーカラム（ＨｉＴｒａｐ，Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）に０．５ｍｌ／分の流速で適用する。このカラムを、１／２×ＰＢＳで広範に洗浄し、結合したＣＦＨタンパク質を、総量の１０ｍｌで０．５ｍｌ／分の流速で、７５～５００ｍＭ ＮａＣｌの範囲の直線状塩勾配を使用して溶出する。溶出した画分はＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびウェスタンブロット分析によってアッセイする。異なる画分中のアイソフォームの溶出は、ＣＦＨタンパク質中の特異的アミノ酸変異がヘパリンへのタンパク質の結合を調節させ得ることを示す。例えば、Ｐａｎｇｂｕｒｎら、１９９１，Ｌｏｃａｌｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ｈｅｐａｒｉｎ－ｂｉｎｄｉｎｇ ｓｉｔｅ ｏｎ ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ Ｆａｃｔｏｒ Ｈ，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．２６６：１６８４７－５３もまた参照のこと。

【０２０８】

ＣＦＨＲ５投与

別のアプローチにおいて、組換えＣＦＨＲ５ポリペプチドが患者に投与される。１つの実施形態において、組換えＣＦＨＲ５は、中性型配列またはその生物学的に活性なフラグメントを有する。別の実施形態において、組換えＣＦＨＲ５は、防御的アレルの配列またはその防御的な生物学的に活性なフラグメントを有する。治療用組換えタンパク質の産生のための方法は周知であり、本明細書中以下に記載される方法を含む。治療用ポリペプチドは、全身的に（例えば、静脈内にまたは注入によって）または局所的に（例えば、眼または肝臓などの臓器または組織に直接的に）投与することができる。

【０２０９】

ＣＦＨポリペプチドまたはＣＦＨＲ５ポリペプチドを含む治療用組成物

本発明は、野生型または変異体であり得（例えば、中性または防御的変異体）、変異体Ｈ因子ポリペプチドの全長型、短縮型、または生物学的に活性なフラグメントであり得る、Ｈ因子ポリペプチドの治療用製剤を提供する。本明細書に記載されるように、防御的Ｈ因子タンパク質（およびそれらをコードする遺伝子）は、防御的ハプロタイプを有する個体を同定すること、および個体のゲノム中にコードされるＨ因子のアミノ酸配列を決定することによって同定することができ、ここで、防御的Ｈ因子タンパク質は、防御的ハプロタイプを有するアレルによってコードされる。生物学的に活性なフラグメントは、変異体

タンパク質に生物学的機能を付与する、全長H因子ポリペプチドの任意の部分を含んでもよい。ある場合において、防御的ハプロタイプは、例えば、遺伝子中の未成熟終止コドンの存在に起因して、全長型未満のH因子（すなわち、ＦＨＬ－１に加えて）の発現と関連する。

【０２１０】

治療活性フラグメントはまた、ＡＭＤバイオマーカーの発現に対するタンパク質の効果を試験することによって同定することができる。例示的なＡＭＤバイオマーカーには、補体経路成分（例えば、Ｉ因子、H因子、Ｃ１ｒ、Ｃ３、Ｃ３ａ）、Ｃ反応性タンパク質、ハプトグロビン、アポリポタンパク質Ｅ、免疫グロブリン重鎖または軽鎖、α１アンチトリプシン、α２マクログロブリン、トランスサイレチン、クレアチニン、および「Ｂｉｏｍａｒｋｅｒｓ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ Ｗｉｔｈ Ａｇｅ－Ｒｅｌａｔｅｄ Ｍａｃｕｌａｒ Ｄｅｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ」という表題の同時係属の仮出願番号６０／７１５，５０３に記載されるその他のものが含まれる。

【０２１１】

本発明は、野生型または変異体であり得（例えば、中性または防御的変異体）、変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドの全長型または生物学的に活性なフラグメントであり得る、ＣＦＨＲ５ポリペプチドの治療用製剤を提供する。本明細書に記載されるように、防御的ＣＦＨＲ５タンパク質（およびそれらをコードする遺伝子）は、防御的ハプロタイプを有する個体を同定すること、および個体のゲノム中にコードされるＣＦＨＲ５のアミノ酸配列を決定することによって同定することができ、ここで、防御的ＣＦＨＲ５タンパク質は、防御的ハプロタイプを有するアレルによってコードされる。生物学的に活性なフラグメントは、変異体タンパク質に生物学的機能を付与する、全長ＣＦＨＲ５ポリペプチドの任意の部分を含んでもよい。治療的に活性なフラグメントはまた、H因子についての上記のようなＡＭＤバイオマーカーの発現に対するタンパク質の効果を試験することによって同定することができる。

【０２１２】

H因子およびＣＦＨＲ５のある型は、遺伝子型決定されたドナーの血液から、遺伝子型決定された眼ドナーに由来する培養もしくは形質転換されたＲＰＥ細胞から、または内因性H因子を発現する細胞株（例えば、グリア細胞または肝細胞）から単離することができる。もしくは、治療用タンパク質は、当該分野で公知の方法および本明細書に記載される方法を使用して、組換え的に産生し（例えば、培養した細菌細胞または真核細胞中で）、精製することができる。上述のように、H因子およびＣＦＨＲ５のある型は、研究目的のために組換え的に発現されてきた。しかし、このような研究製剤は、治療用途のために適切ではない。本発明は、医薬品製造品質管理基準（ＧＭＰ）要件に従って製造および試験されるポリペプチドを含む、患者への投与のために適切な組換えポリペプチドを提供する。例えば、ＦＤＡ認可に従う組換えポリペプチドは、効力および同一性について試験されなければならず、滅菌されなければならず、外来性の物質を含んではならず、製品中のすべての成分（すなわち、保存剤、希釈剤、アジュバントなど）が、純度、品質の規準に合致しなければならず、患者に対して有害であってはならない。

【０２１３】

本発明は、H因子ポリペプチドまたはＣＦＨＲ５ポリペプチド、および薬学的に受容可能な賦形剤またはキャリアを含む組成物を提供する。「薬学的に受容可能な賦形剤またはキャリア」という用語は、化合物の所望の剤形を調製するために使用される媒体をいう。薬学的に受容可能な賦形剤またはキャリアには、１種以上の溶媒、希釈剤、または他の液体ビヒクル；分散または懸濁補助剤；界面活性剤；等張剤；濃化剤または乳化剤；保存剤；固体結合剤；潤滑剤などを含めることができる。Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，第５版，Ｅ．Ｗ．Ｍａｒｔｉｎ（Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡ，１９７５）およびＨａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｅｘｃｉｐｉｅｎｔｓ，第３版，Ａ．Ｈ．Ｋｉｂｂｅ編（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ａｓｓｏｃ．２０００）

は、薬学的組成物を製剤化する際に使用される種々のキャリアおよびその調製のための既知の技術を開示する。１つの実施形態において、薬学的に受容可能な賦形剤は、眼に投与される場合に（例えば、眼内注射によって）、哺乳動物（例えば、ヒト患者）に対して有害ではない。眼内投与のために、例えば、および非限定的に、治療薬剤は、平衡塩類溶液（ＢＳＳ）または平衡塩類溶液プラス（ＢＳＳ　Ｐｌｕｓ）（Ａｌｃｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｆｏｒｔ　Ｗｏｒｔｈ，Ｔｅｘａｓ，ＵＳＡ）中で投与することができる。関連する局面において、本発明は、治療的に受容可能なＨ因子タンパク質、任意に凍結乾燥製剤を含む滅菌容器、例えば、バイアルを提供する。治療用Ｈ因子タンパク質またはＣＦＨＲ５ポリペプチドは、上記のように、組換え的に作製することができる。もしくは、Ｈ因子タンパク質またはＣＦＨＲ５ポリペプチドは、培養ＲＰＥ細胞（例えば、初代培養）またはＨ因子もしくはＣＦＨＲ５を内因性に発現する他の細胞から単離することができる。

【０２１４】

個体に投与される、Ｈ因子もしくは短縮型Ｈ因子もしくはその生物学的に活性なフラグメントの中性型もしくは防御型、またはＣＦＨＲ５もしくはその生物学的に活性なフラグメントの中性型もしくは防御型の量を決定することができる。Ｈ因子の通常の血漿濃度は、１１６から５６２マイクログラム／ｍｌの間で変動し、血漿中のＨ因子の半減期は約６１／２日である（最近の概説については、Ｅｓｐａｒｚａ－Ｇｏｒｄｉｌｌｏら、２００４「Ｇｅｎｅｔｉｃ ａｎｄ ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔａｌ ｆａｃｔｏｒｓ ｉｎｆｌｕｅｎｃｉｎｇ ｔｈｅ ｈｕｍａｎ ｆａｃｔｏｒ Ｈ ｐｌａｓｍａ ｌｅｖｅｌｓ」Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ　５６：７７－８２を参照のこと）。１つの実施形態において、内因性Ｈ因子は、健常個体におけるＨ因子の血漿濃度と同様のレベルを達成するために十分な量、すなわち、５０～６００ｍｇ／ｍｌ、例えば、１００～５６０ｍｇ／ｍｌの血漿レベルを達成するために十分な量で個体に投与することができる。個体（例えば、１６０ポンドの被験体）に投与されるＨ因子の量は、例えば、しかし非限定的に、用量あたり１０ミリグラム～５０００ミリグラム、用量あたり５０ミリグラム～２０００ミリグラム、用量あたり１００ミリグラム～１５００ミリグラム、用量あたり２００ミリグラム～１０００ミリグラム、または用量あたり２５０ミリグラム～７５０ミリグラムであり得る。Ｈ因子が個体に投与され得る頻度は、例えば、しかし非限定的に、１日に２回、１日に１回、１週間に２回、１週間に１回、２週間毎に１回、１ヶ月に１回、２ヶ月毎に１回、６ヶ月毎に１回、または１年に１回であり得る。個体へのＨ因子の投与の量および頻度は、治療の経過をモニターすることによって、医師によって容易に決定可能である。

【０２１５】

Ｂ）遺伝子治療方法

別のアプローチにおいて、Ｈ因子タンパク質またはＣＦＨＲ５ポリペプチドは、外因性ポリペプチドによってコードされるタンパク質のインビボ発現によって（すなわち、遺伝子治療を介して）投与される。１つの例において、遺伝子治療は、Ｈ因子ポリペプチドもしくは生物学的に活性なフラグメントまたはＣＦＨＲ５ポリペプチドもしくは生物学的に活性なフラグメントを発現するベクターを細胞に導入する工程を含む。

【０２１６】

ベクターはウイルス性または非ウイルス性であり得る。動物ウイルス由来の多数のベクターが利用可能であり、これには、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、レトロウイルス、ポックスウイルス、アルファウイルス、ラブドウイルス（ｒｈａｄｂｏｖｉｒｕｓｅｓ）、およびパピローマウイルスに由来するものが含まれる。通常、ウイルスは、もはや複製しないように弱毒化されている（例えば、Ｋａｙら、２００１，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ　７：３３－４０を参照のこと）。

【０２１７】

Ｈ因子ポリペプチドまたはＣＦＨＲ５ポリペプチドをコードする核酸は、典型的には、個体の標的細胞においてＤＮＡの転写を駆動する、プロモーターまたはエンハンサーなどの調節エレメントに連結される。プロモーターは、すべての細胞型においてＨ因子遺伝子

またはＣＦＨＲ５遺伝子の発現を駆動し得る。もしくは、プロモーターは、特定の最奥型において、例えば、網膜または腎臓の細胞においてのみ、Ｈ因子遺伝子またはＣＦＨＲ５遺伝子の発現を駆動し得る。Ｈ因子ポリペプチドまたはＣＦＨＲ５ポリペプチドをコードする核酸に作動可能に連結されている調節エレメントは、しばしば、ベクターにクローニングされる。

【０２１８】

当業者によって理解されるように、遺伝子治療ベクターは、挿入されたコード配列の転写および翻訳のために必要なエレメントを含む（例えば、プロモーター、エンハンサー、他の調節エレメントを含んでもよい）。プロモーターは、構成的または誘導性であり得る。プロモーターは、ＲＰＥなどの標的組織における優先的な遺伝子発現を標的とするように選択することができる（最近の概説については以下を参照のこと：Ｓｕｔａｎｔｏら、２００５，「Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ａｎｄ ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ ｏｆ ａ ｃａｔｈｅｐｓｉｎ Ｄ ｐｒｏｘｉｍａｌ ｐｒｏｍｏｔｅｒ ｉｎ ｔｈｅ ｅｙｅ」Ｃｕｒｒ Ｅｙｅ Ｒｅｓ．３０：５３－６１；Ｚｈａｎｇら、２００４，「Ｃｏｎｃｕｒｒｅｎｔ ｅｎｈａｎｃｅｍｅｎｔ ｏｆ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎａｌ ａｃｔｉｖｉｔｙ ａｎｄ ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ ｏｆ ａ ｒｅｔｉｎａｌ ｐｉｇｍｅｎｔ ｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ ｃｅｌｌ－ｐｒｅｆｅｒｅｎｔｉａｌ ｐｒｏｍｏｔｅｒ」Ｍｏｌ Ｖｉｓ．１０：２０８－１４；Ｅｓｕｍｉら、２００４，「Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ ｔｈｅ ＶＭＤ２ ｐｒｏｍｏｔｅｒ ａｎｄ ｉｍｐｌｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｅ－ｂｏｘ ｂｉｎｄｉｎｇ ｆａｃｔｏｒｓ ｉｎ ｉｔｓ ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ」Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７９：１９０６４－７３；Ｃａｍａｃｈｏ－Ｈｕｂｎｅｒら、２０００，「Ｔｈｅ Ｆｕｇｕ ｒｕｂｒｉｐｅｓ ｔｙｒｏｓｉｎａｓｅ ｇｅｎｅ ｐｒｏｍｏｔｅｒ ｔａｒｇｅｔｓ ｔｒａｎｓｇｅｎｅ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｔｏ ｐｉｇｍｅｎｔ ｃｅｌｌｓ ｉｎ ｔｈｅ ｍｏｕｓｅ」Ｇｅｎｅｓｉｓ．２８：９９－１０５；およびこれらの中の参考文献）。

【０２１９】

適切なウイルスベクターには、ＤＮＡウイルスベクター（例えば、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、レンチウイルスベクター、およびワクシニアウイルスベクター）およびＲＮＡウイルスベクター（例えば、レトロウイルスベクター）が含まれる。１つの実施形態において、アデノ関連ウイルス（ＡＡＶ）ベクターが使用される。最近の概説については以下を参照のこと：Ａｕｒｉｃｃｈｉｏら、２００５，「Ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｖｉｒａｌ ｖｅｃｔｏｒｓ ｆｏｒ ｒｅｔｉｎａｌ ｇｅｎｅ ｔｒａｎｓｆｅｒ ａｎｄ ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｏｆ ｒｅｔｉｎａｌ ｄｉｓｅａｓｅｓ」Ｃｕｒｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．５：３３９－４８；Ｍａｒｔｉｎら、２００４，Ｇｅｎｅ ｔｈｅｒａｐｙ ｆｏｒ ｏｐｔｉｃ ｎｅｒｖｅ ｄｉｓｅａｓｅ，Ｅｙｅ １８：１０４９－５５；Ａｌｉ、２００４，「Ｐｒｏｓｐｅｃｔｓ ｆｏｒ ｇｅｎｅ ｔｈｅｒａｐｙ」Ｎｏｖａｒｔｉｓ Ｆｏｕｎｄ Ｓｙｍｐ．２５５：１６５－７２；Ｈｅｎｎｉｇら、２００４，「ＡＡＶ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｉｎｔｒａｖｉｔｒｅａｌ ｇｅｎｅ ｔｈｅｒａｐｙ ｒｅｄｕｃｅｓ ｌｙｓｏｓｏｍａｌ ｓｔｏｒａｇｅ ｉｎ ｔｈｅ ｒｅｔｉｎａｌ ｐｉｇｍｅｎｔｅｄ ｅｐｉｔｈｅｌｉｕｍ ａｎｄ ｉｍｐｒｏｖｅｓ ｒｅｔｉｎａｌ ｆｕｎｃｔｉｏｎ ｉｎ ａｄｕｌｔ ＭＰＳ ＶＩＩ ｍｉｃｅ」Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．１０：１０６－１６；Ｓｍｉｔｈら、２００３，「ＡＡＶ－Ｍｅｄｉａｔｅｄ ｇｅｎｅ ｔｒａｎｓｆｅｒ ｓｌｏｗｓ ｐｈｏｔｏｒｅｃｅｐｔｏｒ ｌｏｓｓ ｉｎ ｔｈｅ ＲＣＳ ｒａｔ ｍｏｄｅｌ ｏｆ ｒｅｔｉｎｉｔｉｓ ｐｉｇｍｅｎｔｏｓａ」Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．８：１８８－９５；Ｂｒｏｄｅｒｉｃｋら、２００５，「Ｌｏｃａｌ ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ ｏｆ ａｎ ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｖｉｒａｌ ｖｅｃｔｏｒ ｅｘｐｒｅｓｓｉｎｇ ＩＬ－１０ ｒｅｄｕｃｅｓ ｍｏｎｏｃｙｔｅ ｉｎｆｉｌｔｒａｔｉｏｎ ａｎｄ ｓｕｂｓｅｑｕｅｎｔ ｐｈｏｔｏｒｅｃｅｐｔｏｒ ｄａｍａｇｅ ｄｕｒｉｎ

g experimental autoimmune uveitis」Mol Ther. 12：369－73；Chengら、2005,「Efficient gene transfer to retinal pigment epithelium cells with long－term expression. Retina 25：193－201；Rexら、「Adenovirus－mediated delivery of catalase to retinal pigment epithelial cells protects neighboring photoreceptors from photo－oxidative stress. Hum Gene Ther. 15：960－7；およびこれらの中で引用される参考文献。

【0220】

遺伝子治療ベクターは、製造物を患者への投与のために適切にする、医薬品製造品質管理基準（GMP）要件に従って製造されなければならない。本発明は、GMP要件に従って製造および試験される遺伝子治療ベクターを含む、患者への投与のために適切な遺伝子治療ベクターを提供する。FDA認可に従う遺伝子治療ベクターは、効力および同一性について試験されなければならず、滅菌されなければならず、外来性の物質を含んではならず、製品中のすべての成分（すなわち、保存剤、希釈剤、アジュバントなど）が、純度、品質の規準に合致しなければならず、患者に対して有害であってはならない。例えば、核酸製剤は、マイコプラズマを含まないことが実証される。例えば、Islamら、1997 An academic centre for gene therapy research and clinical grade manufacturing capability, Ann Med 29, 579－583を参照のこと。

【0221】

遺伝子治療ベクターを投与するための方法は既知である。1つの実施形態において、H因子またはCFHR5発現ベクターは全身的に導入される（例えば、静脈内にまたは注入によって）。1つの実施形態において、H因子またはCFHR5発現ベクターは局所的に導入される（例えば、特定の組織または臓器、すなわち肝臓に直接的に）。1つの実施形態において、H因子またはCFHR5発現ベクターは眼に局所的に導入される（例えば、眼内注射によって）。最近の概説については、例えば、以下を参照のこと：Dinculescuら、2005,「Adeno－associated virus－vectored gene therapy for retinal disease」Hum Gene Ther. 16：649－63；Rexら、2004,「Adenovirus－mediated delivery of catalase to retinal pigment epithelial cells protects neighboring photoreceptors from photo－oxidative stress」Hum Gene Ther. 15：960－7；Bennett、2004,「Gene therapy for Leber congenital amaurosis」Novartis Found Symp. 255：195－202；Hauswirthら、「Range of retinal diseases potentially treatable by AAV－vectored gene therapy」Novartis Found Symp. 255：179－188、およびこれらの中で引用される参考文献。

【0222】

従って、1つの局面において、本発明は、H因子タンパク質またはCFHR5ポリペプチドをコードする遺伝子治療ベクター、任意に、ウイルスベクターを含む製剤を提供し、ここで、この遺伝子治療ベクターは、ヒト被験体への投与のために適切であり、ヒト被験体への投与のために適切な賦形剤中にある（例えば、GLP技術を使用して製造される）。任意に、遺伝子治療ベクターは、網膜色素上皮細胞において優先的にまたは特異的に発現されるプロモーターを含む。

【0223】

H因子またはＣＦＨＲ５配列の導入のための非ウイルス的方法、例えば、生物分解性ポリマー（例えば、ポリ乳酸（ＰＬＡ）；ポリグリコール酸（ＰＧＡ）；およびコポリマー（ＰＬＧＡ））中でのカプセル化もまた使用することができる（最近の概説については、例えば、以下を参照のこと：Ｂｅｊｊａｎｉら、２００５，「Ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ｆｏｒ ｇｅｎｅ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｔｏ ｒｅｔｉｎａｌ ｐｉｇｍｅｎｔ ｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ ｃｅｌｌｓ」Ｍｏｌ Ｖｉｓ．１１：１２４－３２；Ｍａｎｎｅｒｍａａら、２００５，「Ｌｏｎｇ－ｌａｓｔｉｎｇ ｓｅｃｒｅｔｉｏｎ ｏｆ ｔｒａｎｓｇｅｎｅ ｐｒｏｄｕｃｔ ｆｒｏｍ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｅｄ ａｎｄ ｆｉｌｔｅｒ－ｇｒｏｗｎ ｒｅｔｉｎａｌ ｐｉｇｍｅｎｔ ｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ ｃｅｌｌｓ ａｆｔｅｒ ｎｏｎｖｉｒａｌ ｇｅｎｅ ｔｒａｎｓｆｅｒ」Ｃｕｒｒ Ｅｙｅ Ｒｅｓ．２００５ ３０：３４５－５３；およびこれらの中で引用される参考文献）。もしくは、H因子ポリペプチドまたはＣＦＨＲ５ポリペプチドをコードする核酸は、リポソームにパッケージされてもよく、または核酸はパッケージングなしで、ベクターを使用することなく、個体に送達することができる。

【０２２４】

Ｃ）ＤＮＡ修復

別のアプローチにおいて、ＡＭＤを発症するリスクがある被験体（および／または初期段階の疾患を有する被験体）は、ＤＮＡ修復によって中性型または防御型のH因子またはＣＦＨＲ５によって置き換えられた、リスク型のH因子またはＣＦＨＲ５を有することができる。１つの実施形態において、リスクハプロタイプと関連するH因子またはＣＦＨＲ５遺伝子における多型部位に特異的に結合するように設計された三重鎖形成オリゴヌクレオチドを、ウイルス性または非ウイルス性方法によって個体に投与することができる。三重鎖形成オリゴヌクレオチドは、配列特異的な様式で二重鎖ＤＮＡの深い溝に結合しかつＤＮＡ修復を引き起こし、標的化されたゲノムの修飾を生じる（最近の概説については、Ｋｕａｎら、２００４，「Ｔａｒｇｅｔｅｄ ｇｅｎｅ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｕｓｉｎｇ ｔｒｉｐｌｅｘ－ｆｏｒｍｉｎｇ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ」Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．２６２：１７３－９４を参照のこと）。リスクハプロタイプと関連する多型に及ぶ配列に結合する三重鎖形成オリゴヌクレオチドはＤＮＡ修復を引き起こし、リスクアレルから、中性または防御的アレルへの修飾を生じ、疾患の発症または進行を改善することができる。

【０２２５】

Ｄ）H因子タンパク質またはＣＦＨＲ５ポリペプチドの中性型または防御型を発現する細胞、組織、または臓器の導入

別のアプローチにおいて、中性型または防御型のH因子またはH因子関連タンパク質（例えば、ＣＦＨＲ５）を発現する細胞が患者に投与される。１つの実施形態において、レシピエントは、リスクハプロタイプについて、ヘテロ接合性であり、またはより頻繁には、ホモ接合性である。例えば、肝細胞移植は、多くの型の肝不全に対応するために、全臓器移植に対する代替として使用されてきた（例えば、Ｏｈａｓｈｉら、Ｈｅｐａｔｏｃｙｔｅ ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ：ｃｌｉｎｉｃａｌ ａｎｄ ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ，Ｊ Ｍｏｌ Ｍｅｄ．２００１ ７９：６１７－３０を参照のこと）。この方法に従うと、肝細胞または他のＣＦＨもしくはＣＦＨＲ５－発現細胞は、治療の必要がある患者に投与される（例えば、注入される）。これらの細胞は肝臓または他の器官に移動し、治療タンパク質を産生する。例えば、以下もまた参照のこと：Ａｌｅｘａｎｄｒｏｖａら、２００５，「Ｌａｒｇｅ－ｓｃａｌｅ ｉｓｏｌａｔｉｏｎ ｏｆ ｈｕｍａｎ ｈｅｐａｔｏｃｙｔｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ」Ｃｅｌｌ Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ．１４（１０）：８４５－５３；Ｃｈｅｏｎｇら、２００４，「Ａｔｔｅｍｐｔｅｄ ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｏｆ ｆａｃｔｏｒ Ｈ ｄｅｆｉｃｉｅｎｃｙ ｂｙ ｌｉｖｅｒ ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ」Ｐｅｄｉａｔｒ Ｎｅｐｈｒｏｌ．１９：４５４－８；Ｏｈａｓｈｉら、２００１，「Ｈｅｐａｔｏｃｙｔｅ ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ：ｃｌｉｎｉｃａｌ ａ

nd experimental application」J Mol Med.79：617－30；Serraltaら、2005,「Influence of preservation solution on the isolation and culture of human hepatocytes from liver grafts」Cell Transplant.14（10）：837－43；Yokoyamaら、2006,「In vivo engineering of metabolically active hepatic tissues in a neovascularized subcutaneous cavity」Am.J.Transplant.6（l）：50－9；Dhawanら、2005,「Hepatocyte transplantation for metabolic disorders, experience at King's College hospital and review of literature.」Acta Grastroenterol.Belg.68（4）：457－60；Brunsら、2005,「Injectable liver：a novel approach using fibrin gel as a matrix for culture and intrahepatic transplantation of hepatocytes」Tissue Eng.11（11－12）：1718－26。使用してもよい他の細胞型には、例示のためでありかつ非限定的に、腎臓および膵臓の細胞が含まれる。1つの実施形態において、投与される細胞は、組換え型のタンパク質を発現するように操作される。

【0226】

別の関連するアプローチにおいて、治療用臓器移植が使用される。身体の全身的なH因子の大部分は、肝臓によって産生され、肝臓組織の移植を好ましい方法にしている。例えば、Gerberら、2003,「Successful（?）therapy of hemolytic－uremic syndrome with factor H abnormality」Pediatr Nephrol.18：952－5を参照のこと。

【0227】

別のアプローチにおいて、防御型のCFHタンパク質は、眼への注射（例えば、硝子体内）によって、またはカプセル化された細胞を介して、眼の後ろに送達される。1つの例として、Neurotechのカプセル化細胞技術（Neurotech's Encapsulated Cell Technology）（ECT）は、眼の後ろへの治療因子の持続性の長期的な送達を可能にする独特な技術である。（http：／／www.neurotech.fr）を参照のこと。ECT移植物は、半透性の中空繊維膜中にカプセル化された特異的治療タンパク質を産生するように遺伝子改変された細胞からなる。細胞は継続的に治療タンパク質を産生し、これは移植物から、眼まで拡散する（Bushら、2004）。ECTデバイスによってヒトの眼に送達されたCNTFは、フェーズI臨床試験に登録された10例の患者において完全に成功し、かつ最小限の合併症を伴うことが最近示された（Sievingら、2005）。Songら、2003；Tao 2002.，およびHammangら、米国特許第6，649，184号もまた参照のこと。本発明の1つの実施形態において、防御型のH因子（いわゆる中性型を含む）は細胞中で発現され、カプセル化型で投与される。1つの実施形態において、使用される細胞は、the American Type Culture Collection P.O.Box 1549，Manassas，VA 20108から入手可能であるNTC－201ヒトRPE株（ATCC番号CRL－2302）である。

【0228】

E）H因子またはCFHR5のリスク変異体のレベルを減少させるための治療

H因子またはCFHR5の正常または防御的な機能の喪失は、AMDと関連する可能性がある。AMDと最も強い相関を示し、かつ変異体のH因子ポリペプチドまたはCFHR5ポリペプチドを生じる、H因子およびCFHR5の遺伝子における非同義語多型、例え

ば、表１Ａ、１Ｂ、１Ｃ、１１、１４および１５に示されるものは、ＡＭＤにおいて原因となる役割を有するようである。例えば、変異体のＨ因子またはＣＦＨＲ５は、正常なＨ因子またはＣＦＨＲ５の機能と干渉するいわゆる「ドミナントネガティブ」突然変異体として働く可能性がある。

【０２２９】

眼においてまたは全身的に、リスク型のＨ因子またはＣＦＨＲ５のレベルを減少させる任意の方法が、例えば、Ｈ因子またはＣＦＨＲ５の遺伝子の転写を阻害すること、Ｈ因子またはＣＦＨＲ５のＲＮＡの翻訳を阻害すること、中性型または防御型のＨ因子または短縮型Ｈ因子またはその生物学的に活性なフラグメントの量または活性を増加させること、中性型または防御型のＣＦＨＲ５ポリペプチドまたはその生物学的に活性なフラグメントの量または活性を増加させること、あるいはＨ因子タンパク質またはＣＦＨＲ５ポリペプチドの量または活性を減少させること（例えば、血漿分離交換法、抗体指向性血漿分離交換法、またはＨ因子もしくはＣＦＨＲ５結合部分、例えば、ヘパリンもしくは変異体特異的抗体との複合体化によって）を含む治療のために、使用されてもよい。ある実施形態において、Ｈ因子またはＣＦＨＲ５のレベルは、他の組織と比較して、眼（例えば、ＲＰＥ）において優先的に減少される。例示のためにかつ限定のためではなく、いくつかの方法が以下に手短に記載される。

【０２３０】

１つのアプローチにおいて、ＡＭＤについてのリスクがあると同定された被験体は、ヘパリンの投与によって治療される。ヘパリンおよびヘパリン誘導体（ヘパリノイドを含む）は、ＭＰＧＮＩＩを含む、種々の補体関連疾患の治療のための有望な治療特性を有する可能性がある（Ｆｌｏｅｇｅら、１９９３；Ｇｉｒａｒｄｉ、２００５；ＤｉａｍｏｎｄおよびＫａｒｎｏｖｓｋｙ、１９８６；Ｓｔｒｉｋｅｒ、１９９９；Ｒｏｐｓら、２００４）。本明細書に開示されているＡＭＤとＭＰＧＮＩＩとの間の関連を考慮すると、ヘパリンおよびヘパリン誘導体（ヘパリノイドを含む）は、ＡＭＤの治療のために有効である可能性がある。１年間にわたって毎日ヘパリンの皮下注射を受けた慢性増殖性糸球体腎炎を有する患者の臨床試験において、Ｃａｄｅおよび共同研究者は、クレアチンクリアランスの改善および糸球体細胞過多の後退を報告した（Ｃａｄｅら、１９７１）。ヘパリンと低分子量ヘパリン（エノキサパリン）は、補体カスケードの代替経路および古典的経路をブロックすることによって、マウスにおける抗リン脂質抗体症候群の進行を妨害することが示された（Ｇｉｒａｒｄｉら、２００４）。ヘパリンの抗補体活性は、Ｃ３ｂＢｂの形成の遮断、代替経路によるコンバターゼの増幅を含み；流体相ヘパリンはＢ因子およびＤ因子とのＣ３ｂの相互作用を阻害することによって、Ｃ３ｂＢｂの生成を妨害する（Ｗｅｉｌｅｒら、１９７６）。

【０２３１】

Ｆ）阻害性核酸の投与

アンチセンス核酸－アンチセンス核酸、例えば、変異体Ｈ因子ポリペプチドをコードするＲＮＡに対して相補的な精製アンチセンスＲＮＡは、リスクハプロタイプと関連するＨ因子遺伝子の発現を阻害するために使用することができる。最近の概説については、例えば以下を参照のこと：Ｇｏｍｅｓら、２００５，「Ｉｎｔｒａｏｃｕｌａｒ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ」Ｃｕｒｒ Ｐｈａｒｍ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．６：７－１５；およびＨｅｎｒｙら、２００４，「Ｓｅｔｔｉｎｇ ｓｉｇｈｔｓ ｏｎ ｔｈｅ ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｏｆ ｏｃｕｌａｒ ａｎｇｉｏｇｅｎｅｓｉｓ ｕｓｉｎｇ ａｎｔｉｓｅｎｓｅ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ」Ｔｒｅｎｄｓ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｓｃｉ ２５：５２３－７；およびこれらの中で引用される参考文献。

【０２３２】

ＲＮＡ干渉－二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）阻害法は、ＨＦ１の発現を阻害するためにも使用することができる。このような方法において使用されるＲＮＡは、ｄｓＲＮＡの少なくとも１つの領域が、ＨＦ１遺伝子の１つの領域に対して実質的に同一であるように設計

される；ある例において、この領域はＨＦ１遺伝子に対して１００％同一である。哺乳動物における使用のために、ｄｓＲＮＡは、典型的には約１９～３０ヌクレオチド長であり（すなわち、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡまたはＲＮＡｉ）が使用される）、最も頻繁には約２１ヌクレオチド長である。ｄｓＲＮＡｉおよびｓｉＲＮＡを実施するために有用な方法および組成物は、例えば、ＰＣＴ公開ＷＯ　９８／５３０８３；ＷＯ　９９／３２６１９；ＷＯ　９９／５３０５０；ＷＯ　００／４４９１４；ＷＯ　０１／３６６４６；ＷＯ　０１／７５１６４；ＷＯ　０２／４４３２１；および米国特許第６，１０７，０９４号において議論されている。ｓｉＲＮＡは、インビトロで合成し、患者に投与することができる。もしくは、ＲＮＡｉストラテジーは、トランスフェクトされた細胞においてＤＮＡ鋳型からの低分子ＲＮＡの合成を達成するために、ベクターに基づくアプローチと首尾よく組み合わせることができる（例えば以下を参照のこと：Ｓｕｉら、２００２，「ＡＤＮＡ ｖｅｃｔｏｒ－ｂａｓｅｄ ＲＮＡｉ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ｔｏ ｓｕｐｐｒｅｓｓ ｇｅｎｅ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｉｎ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｃｅｌｌｓ」Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ９９：５５１５－２０；ならびにＫａｓａｈａｒａおよびＡｏｋｉ、２００５，「Ｇｅｎｅ ｓｉｌｅｎｃｉｎｇ ｕｓｉｎｇ ａｄｅｎｏｖｉｒａｌ ＲＮＡｉ ｖｅｃｔｏｒ ｉｎ ｖａｓｃｕｌａｒ ｓｍｏｏｔｈ ｍｕｓｃｌｅ ｃｅｌｌｓ ａｎｄ ｃａｒｄｉｏｍｙｏｃｙｔｅｓ」Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｍｅｄ．１１２：１５５－７２；ならびにこれらの中で引用される参考文献）。

【０２３３】

リボザイム－リボザイムはＲＮＡの特異的切断を触媒することが可能である酵素的ＲＮＡ分子である。リボザイムの作用のメカニズムは、相補的標的ＲＮＡへのリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーション、続いてエンドヌクレアーゼ的切断を伴う。ヒトＨ因子をコードする配列のエンドヌクレアーゼ的切断を特異的かつ効率的に触媒することができる操作されたハンマーヘッドモチーフリボザイムは、本発明の範囲内にある。任意の潜在的なＲＮＡ標的の中の特異的リボザイム切断部位は、ＧＵＡ、ＧＵＵおよびＧＵＣなどの配列を含むリボザイム切断部位について標的分子をスキャンすることによって最初に同定される。一旦同定されると、切断部位を含む標的遺伝子の領域に対応する１５から２０リボヌクレオチドの間の低分子ＲＮＡ配列は、オリゴヌクレオチドを操作不可能にし得る二次構造の特徴について評価されてもよい。候補標的の適合性はまた、リボヌクレアーゼ保護アッセイを使用して、相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションに対する接近可能性を試験することによって評価されてもよい。リボザイムの特性は当該分野で周知である；一般的な説明については、Ｃｅｃｈによる特許（ＵＳ６１８０３９９；ＵＳ５８６９２５４；ＵＳ６０２５１６７；ＵＳ５８５４０３８；ＵＳ５５９１６１０；ＵＳ５６６７９６９；ＵＳ５３５４８５５；ＵＳ５０９３２４６；ＵＳ５１８０８１８；ＵＳ５１１６７４２；ＵＳ５０３７７４６；およびＵＳ４９８７０７１）を参照のこと。リボザイムおよび他の阻害核酸は、リスクハプロタイプと関連する配列を有する遺伝子の発現を優先的に阻害するように設計することができる。従って、多型に及ぶ配列を認識し、ＧＵＡに隣接して切断するリボザイムは、リスク型を認識するが中性または防御型を認識せず、選択的切断を可能にする（Ｄａｗｓｏｎら、２０００，「Ｈａｍｍｅｒｈｅａｄ ｒｉｂｏｚｙｍｅｓ ｓｅｌｅｃｔｉｖｅｌｙ ｓｕｐｐｒｅｓｓ ｍｕｔａｎｔ ｔｙｐｅ Ｉ ｃｏｌｌａｇｅｎ ｍＲＮＡ ｉｎ ｏｓｔｅｏｇｅｎｅｓｉｓ ｉｍｐｅｒｆｅｃｔａ ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔｓ」Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２８：４０１３－２０；Ｂｌａｌｏｃｋら、２００４「Ｈａｍｍｅｒｈｅａｄ ｒｉｂｏｚｙｍｅ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｃｏｎｎｅｃｔｉｖｅ ｔｉｓｓｕｅ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ ｍＲＮＡ ｂｌｏｃｋｓ ｔｒａｎｓｆｏｒｍｉｎｇ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ－ｂｅｔａ ｍｅｄｉａｔｅｄ ｃｅｌｌ ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ」Ｅｘｐ Ｅｙｅ Ｒｅｓ．７８：１１２７－３６）。

【０２３４】

三重鎖形成オリゴヌクレオチド－三重鎖形成オリゴヌクレオチドは、配列特異的な様式

で二重鎖ＤＮＡの深い溝に結合しかつＤＮＡ修復を引き起こし、標的化されたゲノムの修飾を生じる（最近の概説については、Ｋｕａｎら、２００４，「Ｔａｒｇｅｔｅｄ ｇｅｎｅ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｕｓｉｎｇ ｔｒｉｐｌｅｘ－ｆｏｒｍｉｎｇ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ」Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．２６２：１７３－９４を参照のこと）。オリゴヌクレオチドは、リスクハプロタイプと関連するＨ因子遺伝子における多型部位に特異的に結合するように設計することができる。リスクハプロタイプと関連する多型に及ぶ配列に結合する三重鎖形成オリゴヌクレオチドはＤＮＡ修復を引き起こし、リスクアレルから、中性または防御的アレルへの配列の修飾を生じる。

【０２３５】

上記と同様のアンチセンス核酸、ＲＮＡ干渉、リボザイムおよび三重鎖形成オリゴヌクレオチドの方法論は、ＡＭＤの治療のために、眼においてまたは全身的に、リスク型のＣＦＨＲ５のレベルを減少するために使用されてもよい。

【０２３６】

阻害核酸は、薬学的組成物として、または遺伝子治療方法を使用して投与することができることが理解される。

【０２３７】

Ｇ）抗体治療

１つの局面において、変異体Ｈ因子ポリペプチドと特異的に相互作用し、その活性を中和する抗ＨＦ１抗体は、ＡＭＤを有するか、またはそのリスクがある個体に投与される。１つの実施形態において、抗体は、野生型と変異体の両方のＨ因子タンパク質を認識する。１つの実施形態において、抗体は、変異体Ｈ因子タンパク質を認識するが、野生型Ｈ因子タンパク質を認識しない。別の局面において、変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドと特異的に相互作用し、その活性を中和する抗ＣＦＨＲ５抗体は、ＡＭＤを有するか、またはそのリスクがある個体に投与される。１つの実施形態において、抗体は、野生型と変異体の両方のＣＦＨＲ５タンパク質を認識する。１つの実施形態において、抗体は、変異体ＣＦＨＲ５タンパク質を認識するが、野生型ＣＦＨＲ５タンパク質を認識しない。抗体は、全身的にまたは局所的に投与することができる（例えば、Ｇａｕｄｒｅａｕｌｔら、２００５，「Ｐｒｅｃｌｉｎｉｃａｌ ｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅｔｉｃｓ ｏｆ Ｒａｎｉｂｉｚｕｍａｂ（ｒｈｕＦａｂＶ２）ａｆｔｅｒ ａ ｓｉｎｇｌｅ ｉｎｔｒａｖｉｔｒｅａｌ ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ」Ｉｎｖｅｓｔ Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ Ｖｉｓ Ｓｃｉ．４６：７２６－３３を参照のこと）。抗ＨＦ１抗体および抗ＣＦＨＲ５抗体を作製するための方法は当該分野で公知であり、これには以下に記載される方法が含まれる。関連する局面において、変異体のＨ因子ポリペプチドおよび／またはＣＦＨＲ５ポリペプチドと優先的に相互作用し、その活性を減少させる薬剤は、ＡＭＤを有するか、またはそのリスクがある個体に投与される。

【０２３８】

Ｈ）代替経路の調節因子

１つの局面において、本発明は、眼の中に局所的に、または全身レベルでのいずれかで、補体カスケードの代替経路（ＡＰ）を調節する薬剤（例えば、ネイティブタンパク質、組換えタンパク質、抗体、または小分子）を投与することによって、ＡＭＤを治療するための方法を提供する。１つの実施形態において、治療は、ＡＰを調節する薬剤を直接的に投与する工程を含む。１つの実施形態において、治療は、ＡＰの誘発を調節する薬剤（例えば、微生物）を投与する工程を含む。１つの実施形態において、治療は、ＡＰから下流の経路を調節する薬剤を投与する工程を含む。ＡＰを調節する例示的な薬剤は当該分野で公知であり、これには以下が含まれるがこれらに限定されない：ＤＦＰ、ＰＲ２２６、ＢＣＸ－１４７０、ＦＵＴ－１７５、ｓＭＣＰ、ＰＳ－オリゴ、コンプスタチン（Ｃｏｍｐｓｔａｔｉｎ）、フカン（Ｆｕｃａｎ）、およびＧＣＲＦ（例えば以下を参照のこと：Ｍａｋｒｉｄｅｓ、１９９８，「Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ ｓｙｓｔｅｍ」Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｒｅｖ．５０：５９－８７；Ｈｏｌｌａｎｄら、２００４，「Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ ｓｍａｌｌ ｍｏｌｅ

cule complement inhibitors」Curr Opin Investig Drugs 5：1163－73；Holersら、2004，「The alternative pathway of complement in disease：opportunities for therapeutic targeting」Mol Immunol．41：147－52）。AP調節因子は、全身的に、または眼内注射によって、または眼への化合物の送達のために既知である他の方法によって投与することができる。

【0239】

I）リスク変異体H因子または変異体CFHR5の薬物スクリーニング／アンタゴニスト

本発明は、変異体タンパク質、H因子もしくはCFHR5変異体を発現する宿主細胞、またはH因子もしくはCFHR5変異体を発現するトランスジェニック動物を接触させること、およびその変異体の結合、発現、プロセシング、または活性をモニターすることによって、AMDの治療のために有効な薬剤をスクリーニングする方法を提供する。1つの実施形態において、H因子変異体は、62位のアミノ酸にバリンを有し、および／または402位のアミノ酸にヒスチジンを有し、および／または1210位のアミノ酸にシステインを有する。1つの実施形態において、CFHR5変異体は46位のアミノ酸にセリンを有する。

【0240】

変異体H因子ポリペプチド（例えば、リスクハプロタイプと関連する変異体）のアンタゴニストは、AMDを治療するために使用することができる。アンタゴニストは、変異体H因子の発現を抑制し、活性を抑制し、またはRNAもしくはタンパク質の安定性を抑制することができる。アンタゴニストは、多くの型の化合物について段階的かつ高スループットな様式で作製することが可能である、大規模なコンビナトリアルライブラリーを作製およびスクリーニングすることによって得ることができる。このような化合物には、ペプチド、ポリペプチド、β－ターン模倣物、ポリサッカリド、リン脂質、ホルモン、プロスタグランジン、ステロイド、芳香族化合物、複素環式化合物、ベンゾジアゼピン、オリゴマー性N置換グリシンおよびオリゴカルバメートなどが含まれる。化合物の大規模なコンビナトリアルライブラリーは、当該分野で既知の方法によって構築することができる。例えば、WO 95／12608；WO 93／06121；WO 94／08051；WO 95／35503；WO 95／30642およびWO 91／18980を参照のこと。化合物のライブラリーは、最初に、変異体H因子ポリペプチドへの特異的結合についてスクリーニングされる。インビトロ結合活性を有する化合物はまた、変異体H因子ポリペプチドの生物学的活性、例えば、C3bまたはヘパリンへの結合と干渉するそれらの能力についてアッセイすることができる。アンタゴニスト活性は、細胞ベースの系において、または外因性変異体H因子ポリペプチドが発現されるトランスジェニック動物モデルにおいてのいずれかでアッセイすることができる。

【0241】

変異体CFHR5ポリペプチド（例えば、リスクハプロタイプと関連する変異体）のアンタゴニストはAMDを治療するために使用することができ、変異体H因子アンタゴニストについて上記に記載したように得ることができる。

【0242】

J）患者特異的治療

AMDにおいて原因となる役割を有し、変異体のH因子ポリペプチドまたはCFHR5ポリペプチドの発現レベルおよび／または生物学的活性に対するこれらの多型の効果が説明されている、H因子遺伝子またはCFHR5遺伝子における特定の多型の存在に基づいて、カスタマイズされた治療を、AMDの異なる遺伝子サブタイプを有する患者の群のために考案することができる。例えば、H因子またはCFHR5における多型が、変異体のH因子ポリペプチドまたはCFHR5ポリペプチドの発現レベルおよび／または生物学的活性を増加させることによって動物モデルにおいてAMDを引き起こすならば、H因子ま

たはＣＦＨＲ５の多型に関連するＡＭＤは、変異体Ｈ因子ポリペプチドまたは変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドのアンタゴニストを患者に投与することによって治療することができる。

【０２４３】

Ｋ）ＡＭＤバイオマーカーを使用する治療的効力の評価

上述のように、ＣＦＨまたはＣＦＨＲタンパク質の特定のフラグメントの治療的効力はまた、ＡＭＤバイオマーカーの発現に対するタンパク質の効果を試験することによって決定することができる。例示的なＡＭＤバイオマーカーには、本明細書中上記に記載したものが含まれる。これらのＡＭＤ関連タンパク質（バイオマーカー）は、健常個体と比較して、異なる（上昇しているかまたは減少している）レベルでＡＭＤを有する個体中に存在する。本発明は、疾患について治療されるＡＭＤを有する個体におけるバイオマーカーのレベルを決定する工程、およびそのバイオマーカーのレベルを、バイオマーカーのより初期に決定したレベルまたは参照レベルと比較する工程によって、ＡＭＤの治療の効力を評価する方法およびＡＭＤの進行をモニターする方法を提供する。同時係属の仮出願番号６０／７１５，５０３において記載されるように、バイオマーカーのレベルは、例えば、非限定的に、分離に基づく方法（例えば、ゲル電気泳動）、イムノアッセイ法（例えば、抗体に基づく検出）、および機能に基づく方法（例えば、酵素活性または結合活性）を含む、当該分野において既知の従来の任意の適切な方法によって決定することができる。１つの実施形態において、個体におけるＡＭＤの治療の効力を評価する方法は、個体からサンプルを入手する工程、および二次元差ゲル電気泳動（２－ｄｉｍｅｎｓｉｏｎａｌ ｄｉｆｆｅｒｅｎｃｅ ｇｅｌ ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ）（ＤＩＧＥ）によってタンパク質を分離することによってバイオマーカーのレベルを決定する工程を含む。

【０２４４】

ＶＩＩＩ．Ｈ因子およびＣＦＨＲ５核酸

Ａ）プライマーおよびプローブ

本発明は、多型部位に隣接し、またはそれに及ぶ核酸を提供する。核酸は、Ｈ因子多型を検出するためのプローブまたはプライマー（インベーダー、分子ビーコンおよび他の蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）型プローブを含む）として使用することができる。１つの実施形態において、プローブまたはプライマーは、イントロン２における挿入を認識するが、野生型配列を認識しない。例示的な核酸は、多型の位置がその位置のための代替的な塩基によって占められている、表１Ａ、１Ｂ、１Ｃ、１１、１４および１５において列挙される多型の少なくとも１つに及ぶ配列を含む。対照集団においてより頻繁に見出されるその位置についての塩基は、正常または野生型配列を意味するのに対して、対照集団において見出される頻度のより低いその位置についての代替的な塩基は、変異体配列を意味する。核酸はまた、Ｈ因子遺伝子およびＣＦＨＲ５遺伝子において知られている他の多型、例えば、上記の表ＡおよびＢにおいて同定される多型に及ぶ配列を含む。

【０２４５】

Ｂ）発現ベクターならびにＨ因子およびＣＦＨＲ５ポリペプチドの組換え産生

本発明は、Ｈ因子ポリペプチドをコードする核酸を含むベクターを提供する。Ｈ因子ポリペプチドは野生型または変異体（例えば、防御的変異体）であり得、全長型（例えば、ＨＦ１）または短縮型であり得る。核酸は、ＤＮＡまたはＲＮＡであり得、一本鎖または二本鎖であり得る。

【０２４６】

ある核酸は、全長の変異体形態のＨ因子ポリペプチドをコードする。変異体Ｈ因子ポリペプチドは、Ｈ因子遺伝子において既知である任意の非同義語多型の位置の１つを含むコドンによってコードされるアミノ酸において、正常または野生型のＨ因子とは異なり得る。１つの実施形態において、変異体Ｈ因子ポリペプチドは、表１Ａ、表１Ｂおよび／または表１Ｃに示される非同義語多型の位置の１つを含むコドンによってコードされるアミノ酸において、正常または野生型のＨ因子ポリペプチドとは異なる。その多型の位置は表１Ａ、表１Ｂおよび／または表１Ｃに示されるアミノ酸によって占められる。Ｈ因子遺伝子

における複数の多型部位において代替的なアミノ酸を有する変異体H因子ポリペプチドをコードする変異体H因子遺伝子が生成されてもよいことが理解される。

【０２４７】

本発明は、ＣＦＨＲ５ポリペプチドをコードする核酸を含むベクターを提供する。ＣＦＨＲ５ポリペプチドは、野生型または変異体（例えば、防御的変異体）であり得る。核酸は、ＤＮＡまたはＲＮＡであり得、一本鎖または二本鎖であり得る。

【０２４８】

ある核酸は、全長の変異体形態のＣＦＨＲ５ポリペプチドをコードする。変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドは、ＣＦＨＲ５遺伝子において既知である任意の非同義語多型の位置の１つを含むコドンによってコードされるアミノ酸において、正常または野生型のＣＦＨＲ５とは異なり得る。１つの実施形態において、変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドは、表１４および表１５に示される非同義語多型の位置の１つを含むコドンによってコードされるアミノ酸において、正常または野生型のＣＦＨＲ５ポリペプチドとは異なる。その多型の位置は表１４および表１５に示されるアミノ酸によって占められる。ＣＦＨＲ５遺伝子における複数の多型部位において代替的なアミノ酸を有する変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドをコードする変異体ＣＦＨＲ５遺伝子が生成されてもよいことが理解される。

【０２４９】

組換えタンパク質およびペプチドの産生のための発現ベクターは周知である（Ａｕｓｕｂｅｌら、２００４，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ Ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋを参照のこと）。このような発現ベクターは、ＤＮＡの転写を駆動し、かつ原核生物（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ）宿主および真核生物（例えば、酵母、昆虫または哺乳動物細胞）宿主における発現のために適合される、プロモーターなどの調節エレメントに連結された、H因子ポリペプチドをコードする核酸配列を含む。変異体H因子またはＣＦＨＲ５ポリペプチドは、変異体H因子またはＣＦＨＲ５遺伝子がプロモーターに作動可能に連結されている発現ベクターにおいて発現可能である。通常、プロモーターは哺乳動物細胞中での発現のための真核生物プロモーターである。通常、転写調節配列は、異種プロモーターおよび任意にエンハンサーを含み、これは、宿主細胞によって認識される。市販の発現ベクターを使用することができる。発現ベクターは、宿主に認識される複製系、増幅可能な遺伝子、選択可能なマーカー、宿主ゲノムへの挿入のために有用な宿主配列などを含むことができる。

【０２５０】

適切な宿主細胞には、Ｅ．ｃｏｌｉなどの細菌、酵母、糸状菌、昆虫細胞、ならびに典型的には不死化されている、マウス、ハムスター、ヒト、およびサルの細胞株を含む哺乳動物細胞、ならびにこれらの派生物が含まれる。宿主細胞は、変異体H因子またはＣＦＨＲ５の遺伝子産物をプロセシングして、適切にプロセシングされた成熟ポリペプチドを産生することが可能であり得る。このようなプロセシングは、グリコシル化、ユビキチン化、ジスルフィド結合形成などを含んでもよい。

【０２５１】

変異体のH因子またはＣＦＨＲ５の遺伝子を含む発現構築物は、特定の構成および標的宿主に依存して、宿主細胞に導入される。適切な方法、および原核生物細胞と真核生物細胞の両方の宿主細胞は、当該分野において周知である。組換え全長ヒトH因子は、Ｓｆ９昆虫細胞中で研究目的のために発現されてきた（ＳｈａｒｍａおよびＰａｎｇｂｕｒｎ、１９９４，Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｌｙ ａｃｔｉｖｅ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ｈｕｍａｎ ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ ｆａｃｔｏｒ Ｈ：ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ ｓｅｃｒｅｔｉｏｎ ｂｙ ｔｈｅ ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ ｓｙｓｔｅｍ，Ｇｅｎｅ １４３：３０１－２を参照のこと）。ヒトH因子の組換えフラグメントは、種々の細胞型において研究目的のために発現されてきた（例えば、以下を参照のこと：Ｃｈｅｎｇら、２００５，「Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ ｆａｃｔｏｒ Ｈ ａｓ ａ ｍａｒｋｅｒ ｆｏｒ ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｏｆ ｂｌａｄｄｅｒ ｃａｎｃｅｒ」Ｃｌｉｎ Ｃｈｅｍ．５：

８５６－６３；Ｖａｚｉｒｉ－Ｓａｎｉら、２００５，「Ｆａｃｔｏｒ Ｈ ｂｉｎｄｓ ｔｏ ｗａｓｈｅｄ ｈｕｍａｎ ｐｌａｔｅｌｅｔｓ」Ｊ Ｔｈｒｏｍｂ Ｈａｅｍｏｓｔ．３：１５４－６２；Ｇｏｒｄｏｎら、１９９５，「Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ ｄｏｍａｉｎｓ ｉｎ ｈｕｍａｎ ｆａｃｔｏｒ Ｈ」Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５５：３４８－５６）。組換え全長ヒトＣＦＨＲ５は、Ｓｆ９昆虫細胞中で研究目的のために発現されてきた（ＭｃＲａｅら、２００１，Ｈｕｍａｎ Ｆａｃｔｏｒ Ｈ－ｒｅｌａｔｅｄ Ｐｒｏｔｅｉｎ ５（ＦＨＲ－５），Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７６：６７４７－６７５４を参照のこと）。

【０２５２】

変異体のＨ因子またはＣＦＨＲ５ポリペプチドは、実質的に純粋な生成物を得るために、タンパク質生化学および精製の従来の手段によって単離されてもよい。一般的な方法については、Ｊａｃｏｂｙ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ 第１０４巻，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８４）；Ｓｃｏｐｅｓ，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ，Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ，第２版，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８７）；およびＤｅｕｔｓｃｈｅｒ（編）Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，第１８２巻（１９９０）を参照のこと。Ｈ因子またはＣＦＨＲ５のような分泌タンパク質は、宿主細胞が培養されている培地から単離することができる。変異体のＨ因子またはＣＦＨＲ５ポリペプチドが分泌されない場合、これは細胞溶解物から単離することができる。

【０２５３】

１つの実施形態において、ベクターは、表１Ａ、１Ｂおよび／または１Ｃに示される１つ以上の多型部位において野生型ではない配列を有する配列を有する変異体Ｈ因子タンパク質の産生のための発現ベクターである。

【０２５４】

１つの実施形態において、ベクターは、Ｈ因子の防御的変異体の配列を有する変異体Ｈ因子タンパク質の産生のための発現ベクターである。

【０２５５】

１つの実施形態において、ベクターは、表１４および１５に示される１つ以上の多型部位における野生型ではない配列を有する配列を有する変異体ＣＦＨＲ５タンパク質の産生のための発現ベクターである。

【０２５６】

１つの実施形態において、ベクターは、Ｈ因子の防御的変異体の配列を有する変異体ＣＦＨＲ５タンパク質の産生のための発現ベクターである。

【０２５７】

Ｃ）遺伝子治療ベクター

遺伝子治療のためのＨ因子ポリペプチドまたはＣＦＨＲ５ポリペプチドの発現のための方法は既知であり、上記のＩＶ（Ａ）節において記載される。

【０２５８】

ＸＩ．抗体

本発明は、正常もしくは野生型Ｈ因子ポリペプチド、または１つ以上の非同義語一ヌクレオチド変異多型（ＳＮＰ）がＨ因子コード領域中に存在する変異体Ｈ因子ポリペプチドを認識し得るＨ因子特異的抗体を提供する。１つの実施形態において、本発明は、変異体Ｈ因子ポリペプチドまたはそのフラグメントを特異的に認識するが、多型部位において変異を有しないＨ因子ポリペプチドを認識しない抗体を提供する。

【０２５９】

本発明はまた、正常もしくは野生型ＣＦＨＲ５ポリペプチド、または１つ以上の非同義語一ヌクレオチド変異多型（ＳＮＰ）がＣＦＨＲ５コード領域中に存在する変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドを認識し得るＣＦＨＲ５特異的抗体を提供する。１つの実施形態において、本発明は、変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチドまたはそのフラグメントを特異的に認識す

るが、多型部位において変異を有しないＣＦＨＲ５ポリペプチドを認識しない抗体を提供する。

【０２６０】

抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであり得、標準的なプロトコールに従って作製される。抗体は、変異体H因子または変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチド、またはそのフラグメント、またはその合成ペプチドフラグメントを適切な動物に注射することによって作製することができる。モノクローナル抗体は、標準的なプロトコールに従ってスクリーニングされる（ＫｏｅｈｌｅｒおよびＭｉｌｓｔｅｉｎ １９７５，Ｎａｔｕｒｅ ２５６：４９５；Ｄｏｗｅｒら、ＷＯ ９１／１７２７１およびＭｃＣａｆｆｅｒｔｙら、ＷＯ ９２／０１０４７；ならびにＶａｕｇｈａｎら、１９９６，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１４：３０９；ならびに以下に提供される参考文献）。１つの実施形態において、モノクローナル抗体は、変異体のH因子またはＣＦＨＲ５ポリペプチドとの特異的免疫反応性についてアッセイされるが、それぞれ対応する野生型のH因子またはＣＦＨＲ５ポリペプチドについてはアッセイされない。変異体ポリペプチドに特異的に結合するが、対応する野生型ポリペプチドに結合しない抗体を同定するための方法は、当該分野において周知である。抗体のスクリーニングおよび差し引きの方法を含む方法については、以下を参照のこと：ＨａｒｌｏｗおよびＬａｎｅ，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８８）；Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（Ｊ．Ｅ．Ｃｏｌｉｇａｎら編、１９９９，２００５までの補遺を含む）；Ｇｏｄｉｎｇ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ（第２版）Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８６）；Ｂｕｒｉｏｎｉら、１９９８，「Ａ ｎｅｗ ｓｕｂｔｒａｃｔｉｏｎ ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ ｆｏｒ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｃｌｏｎｉｎｇ ｏｆ ｒａｒｅ ａｎｔｉｖｉｒａｌ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｉｅｓ ｆｒｏｍ ｐｈａｇｅ ｄｉｓｐｌａｙ ｌｉｂｒａｒｉｅｓ」Ｒｅｓ Ｖｉｒｏｌ．１４９（５）：３２７－３０；Ａｍｅｓら、１９９４，Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ ｏｆ ｎｅｕｔｒａｌｉｚｉｎｇ ａｎｔｉ－Ｃ５ａ ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｆｒｏｍ ａ ｆｉｌａｍｅｎｔｏｕｓ ｐｈａｇｅ ｍｏｎｏｖａｌｅｎｔ Ｆａｂ ｄｉｓｐｌａｙ ｌｉｂｒａｒｙ．Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５２（９）：４５７２－８１；Ｓｈｉｎｏｈａｒａら、２００２，Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ ｏｆ ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｒｅｃｏｇｎｉｚｉｎｇ ｒａｒｅ ａｎｄ ｄｏｍｉｎａｎｔ ｅｐｉｔｏｐｅｓ ｉｎ ｐｌａｎｔ ｖａｓｃｕｌａｒ ｃｅｌｌ ｗａｌｌｓ ｂｙ ｐｈａｇｅ ｄｉｓｐｌａｙ ｓｕｂｔｒａｃｔｉｏｎ．Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ２６４（１－２）：１８７－９４。免疫付与またはスクリーニングは、全長変異体タンパク質に対して、または代替的には（およびしばしばより好都合に）、変異体形態と野生型の間で異なるエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドフラグメントに対して、向けることができる。特定の変異体には、ＣＦＨおよびＨＦＬ１のＹ４０２ＨまたはＩ６２Ｖ変異体、ＣＦＨのＲ１２１０Ｃ変異体、ＣＦＨＲ５のＰ４６Ｓ変異体、およびＣＦＨの短縮型が含まれる。１つの実施形態において、ＨＦ１が測定される。上記に議論したように、１つの実施形態において、ＨＦＬ１およびＣＨＦの比率が測定される。変異体のH因子ポリペプチドまたはＣＦＨＲ５ポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体（すなわち、野生型タンパク質には結合しないか、またはより低い親和性で結合する）は、変異体形態のH因子もしくはＣＦＨＲ５の検出のための診断アッセイにおいて、または薬学的組成物中の活性成分として有用である。

【０２６１】

本発明は、医薬品製造品質管理基準（ＧＭＰ）要件に従って製造および試験される抗体を含む、患者への投与のために適切な組換えポリペプチドを提供する。例えば、ＦＤＡ認可に従う組換え抗体は、効力および同一性について試験されなければならず、滅菌されなければならず、外来性の物質を含んではならず、製品中のすべての成分（すなわち、保存

剤、希釈剤、アジュバントなど）が、純度、品質の規準に合致しなければならず、患者に対して有害であってはならない。

【０２６２】

本発明は、Ｈ因子またはＣＦＨＲ５ポリペプチド（例えば、正常もしくは野生型のＨ因子ポリペプチドまたは変異体Ｈ因子ポリペプチド、あるいは正常もしくは野生型のＣＦＨＲ５ポリペプチドまたは変異体ＣＦＨＲ５ポリペプチド）を特異的に認識する抗体、および薬学的に受容可能な賦形剤またはキャリアを含む組成物を提供する。

【０２６３】

関連する局面において、本発明は、治療的に受容可能なＨ因子特異的またはＣＦＨＲ５特異的抗体を含む滅菌容器、例えば、バイアルを提供する。１つの実施形態において、これは凍結乾燥製剤である。

【０２６４】

関連する局面において、本発明は、患者への投与のための、ヒトまたはヒト化抗Ｈ因子抗体または抗ＣＦＨＲ５抗体の薬学的製剤を提供する。ヒト化抗体は、実質的にヒト抗体からの可変領域フレームワーク残基（アクセプター抗体と呼ばれる）および実質的にマウス抗体からの相補性決定領域（ドナー免疫グロブリンといわれる）を有する。以下を参照のこと：Ｐｅｔｅｒｓｏｎ、２００５，Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：ｇｅｎｅｔｉｃ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｏｆ ｍｉｃｅ，ｃｅｌｌｓ，ａｎｄ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎｓ，ＩＬＡＲ Ｊ．４６：３１４－９，Ｋａｓｈｍｉｒｉら、２００５，ＳＤＲ ｇｒａｆｔｉｎｇ－ａ ｎｅｗ ａｐｐｒｏａｃｈ ｔｏ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｈｕｍａｎｉｚａｔｉｏｎ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ３５６：２５－３４、Ｑｕｅｅｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ：Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：１００２９－１００３３（１９８９）、ＷＯ ９０／０７８６１、米国特許第５，６９３，７６２号、同第５，６９３，７６１号、同第５，５８５，０８９号、同第５，５３０，１０１号、およびＷｉｎｔｅｒ、同第５，２２５，５３９号。存在する場合、定常領域もまた、実質的にまたは完全にヒト免疫グロブリン由来である。ヒト可変ドメインは、通常はヒト抗体から選択され、そのフレームワーク配列は、ＣＤＲがそこから導き出されたマウス可変領域ドメインと高度な配列同一性を示す。重鎖および軽鎖の可変領域フレームワーク残基は、同じまたは異なるヒト抗体配列に由来し得る。ヒト抗体配列は、天然に存在するヒト抗体の配列であり得、またはいくつかのヒト抗体のコンセンサス配列であり得る。Ｃａｒｔｅｒら、ＷＯ ９２／２２６５３を参照のこと。ヒト可変領域フレームワーク残基からの特定のアミノ酸は、ＣＤＲコンホメーションおよび／または抗原への結合に対するそれらの考えられる影響に基づいて、置換のために選択される。このような考えられる影響の研究は、モデリング、特定の位置におけるアミノ酸の特徴の試験、または特定のアミノ酸の置換もしくは突然変異生成の効果の経験的観察による。

【０２６５】

例えば、マウス可変領域フレームワーク残基と、選択されたヒト可変領域フレームワーク残基の間でアミノ酸が異なるならば、そのアミノ酸が、（１）直接的に抗原に非共有結合的に結合し、（２）ＣＤＲ領域に隣接し、（３）さもなくばＣＤＲ領域と相互作用し（例えば、ＣＤＲ領域の約６Ａ以内に存在する）、または（４）ＶＬ－ＶＨ界面に関与することが合理的に予測される場合には、ヒトフレームワークアミノ酸は、通常、マウス抗体からの等価なフレームワークアミノ酸によって置換されるべきである。

【０２６６】

置換のための他の候補は、その位置においてヒト免疫グロブリンについて異常なアクセプターヒトフレームワークアミノ酸である。これらのアミノ酸は、マウスドナー抗体の等価な位置から、またはより典型的なヒト免疫グロブリンの等価な位置からのアミノ酸で置換することができる。置換のための他の候補は、その位置においてヒト免疫グロブリンについて異常なアクセプターヒトフレームワークアミノ酸である。ヒト化免疫グロブリンの可変領域フレームワークは、通常、ヒト可変領域フレームワーク配列またはこのような配列のコンセンサスに対して少なくとも８５％の配列同一性を示す。

【０２６７】
ＩＸ．リスク、防御的、および中性の変異およびハプロタイプの同定
本発明は、表１Ａ、１Ｂ、１Ｃ、１１、１４および１５に記載されるＨ因子遺伝子および／またはＣＦＨＲ５遺伝子における多型部位と連鎖する多型部位についてのスクリーニングの方法を提供する。これらの方法は以下の工程を包含する：Ｈ因子遺伝子またはＣＦＨＲ５遺伝子における多型部位と連鎖している遺伝子における多型部位を同定し、ここで、Ｈ因子遺伝子またはＣＦＨＲ５遺伝子における多型部位の多型型がＡＭＤと関連している（例えば、リスクの増加または減少）工程、および連鎖した多型部位が、ＡＭＤ表現型と相関するＨ因子遺伝子またはＣＦＨＲ５遺伝子の多型型と平衡または不平衡にある多型型を有するか否かを示すために個体の集団におけるハプロタイプを決定する工程。

【０２６８】
Ｈ因子遺伝子またはＣＦＨＲ５遺伝子における多型、例えば、表１Ａ、１Ｂ、１Ｃ、１１、１４および１５に示されるものは、目的の形質と関連する遺伝子座と、形質と関連しないが形質の原因である遺伝子座とは物理的に近接でありかつそれと同時分離される多型マーカーとの間の物理的な連鎖を確立するために使用することができる。目的の形質と関連する遺伝子座をマッピングすることは、当該分野において周知である手順に従って形質の原因である遺伝子をクローニングすることを容易にする。

【０２６９】
Ｈ因子遺伝子またはＣＦＨＲ５遺伝子における多型、例えば、表１Ａ、１Ｂ、１Ｃ、１１、１４および１５に示されるものは、治療が必要な個体を決定するため、および治療の効力を決定するために、多型が表現型形質と同時分離されることを決定するための家族連鎖研究において使用することができる。

【０２７０】
連鎖は、ＬＯＤ（オッズのｌｏｇ）スコアの計算によって分析され、これは、マーカーと遺伝子座について、２つが組換え割合シータに位置するときに、２つが連鎖しない（独立して分離する）状況に対して、観察された分離データを得ることの尤度の比率の$\log_{10}$である。ＴｈｏｍｐｓｏｎおよびＴｈｏｍｐｓｏｎ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ｉｎ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ（第５版、Ｗ．Ｂ．Ｓａｕｎｄｅｒｓ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，１９９１）ならびにＳｔｒａｃｈａｎ，「Ｍａｐｐｉｎｇ ｔｈｅ ｈｕｍａｎ ｇｅｎｏｍｅ」Ｔｈｅ Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｏｍｅ（ＢＩＯＳ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ Ｌｔｄ，Ｏｘｆｏｒｄ）Ｃｈａｐｔｅｒ ４）所収を参照のこと。３のＬＯＤスコアは、見かけの観察される連鎖に対する１０００対１のオッズが偶然の一致であることを示す。＋３以上のＬＯＤスコアは、２つの遺伝子座が連鎖していることの明確な証拠と見なされるのに対して、－２以下のＬＯＤスコアは、連鎖ではないことの明確な証拠と見なされる。

【０２７１】
Ｘ．トランスジェニック非ヒト動物
本発明は、ヒト変異体Ｈ因子またはＣＦＨＲ５ポリペプチドを発現可能であるトランスジェニック非ヒト動物を提供する。トランスジェニック非ヒト動物は、不活性化された内因性Ｈ因子またはＣＦＨＲ５遺伝子のアレルの一方または両方を有し得る。外因性変異体Ｈ因子またはＣＦＨＲ５遺伝子の発現は、通常、プロモーターおよび選択的にエンハンサーに遺伝子を作動可能に連結すること、次いで、標準的なプロトコールに従って接合子に構築物をマイクロインジェクションすることによって達成される。Ｈｏｇａｎら「Ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｎｇ ｔｈｅ Ｍｏｕｓｅ Ｅｍｂｒｙｏ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ」Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙを参照のこと。内因性Ｈ因子またはＣＦＨＲ５遺伝子は、当該分野において既知の方法によって不活性化することができる（Ｃａｐｅｃｃｈｉ、１９８９）。Ｈ因子欠損マウスは、外因性ヒト変異体Ｈ因子遺伝子の導入のために利用可能である。ヒトまたは非ヒト変異体Ｈ因子またはＣＦＨＲ５ポリペプチドを発現するトランスジェニック動物は、有用な薬物スクリーニングシステムならびにＡＭＤおよび他の補体関連疾患のモデルを提供する。トランス

ジェニック動物はまた、本発明の組換えＣＦＨタンパク質およびＣＦＨＲ５タンパク質の産生のために使用されてもよい（例えば、米国特許第６，０６６，７２５号；同第６，０１３，８５７号；同第５，９９４，６１６号；および同第５，９５９，１７１号；Ｌｉｌｌｉｃｏら、２００５；Ｈｏｕｄｅｂｉｎｅ、２０００を参照のこと）。

【０２７２】

ＸＩ．キット

本発明は、Ｈ因子およびＣＦＨＲ５の多型およびハプロタイプを検出する試薬、デバイス、およびキットを提供する。ＡＭＤを発症するリスクについてスクリーニングするために、および／または被験体におけるＡＭＤを予防または改善するための適切な治療を同定するために特に適しているが、特定の実施形態において、これらの試薬、デバイス、およびキットは、ＭＰＧＮＩＩまたは任意の他の補体関連の病気を発症するリスクを決定することを含むがこれらに限定されない任意の目的のために、Ｈ因子およびＣＦＨＲ５の多型およびハプロタイプの分析のために使用可能であることが理解される。

【０２７３】

多数のアッセイシステムが当該分野において既知であり、ＡＭＤと関連する変異の存在を決定するための手段に到達することは当該技術の技能の範囲内である。複数のプライマー、複数のプローブ、プライマーの組み合わせ、またはプローブの組み合わせなどであるキットの試薬は、診断またはスクリーニングのためのそれらの使用の前に別々の容器に含まれてもよい。１つの実施形態において、このキットは、本明細書に記載される第１のＣＦＨまたはＣＦＨＲ５のアレルについてのプローブ、プライマー、またはプライマー対を含む第１の容器、および本明細書に記載される第２のＣＦＨまたはＣＦＨＲ５のアレルについてのプローブ、プライマー、またはプライマー対を含む第２の容器を含む。

【０２７４】

１つの実施形態において、本発明は、Ｈ因子またはＣＦＨＲ５の遺伝子における特異的多型にハイブリダイズする少なくとも１つのＨ因子またはＣＦＨＲ５のアレル特異的オリゴヌクレオチドを含むキットを提供する。これらのキットは、異なる型の多型にハイブリダイズするＨ因子またはＣＦＨＲ５アレル特異的オリゴヌクレオチドの１つ以上の対を含んでもよい。Ｈ因子またはＣＦＨＲ５のアレル特異的オリゴヌクレオチドは、Ｈ因子またはＣＦＨＲ５の遺伝子のコード（エキソン）または非コード（プロモーター、５’非翻訳、イントロンまたは３’非翻訳）領域に由来する配列を含んでもよい。Ｈ因子またはＣＦＨＲ５のアレル特異的オリゴヌクレオチドは基材上に固定化されて提供されてもよい。この基材は、表１Ａ、１Ｂ、１Ｃ、１１、１４および１５に示される多型、ならびに／またはＨ因子もしくはＣＦＨＲ５の遺伝子における他の多型（例えば、ＳＮＰデータベースにおいて見出される上記に列挙した多型を含む）の少なくとも２個、３個、４個、５個、５個より多く（例えば、少なくとも６個、７個、または８個）を検出するためのＨ因子またはＣＦＨＲ５のアレル特異的オリゴヌクレオチドプローブを含んでもよい。１つの実施形態において、このキットはＡＭＤを診断するために使用される。関連する実施形態において、このキットはＨ因子またはＣＦＨＲ５の遺伝子における変異と関連する別の疾患についてスクリーニングするために使用される。

【０２７５】

このキットは、Ｈ因子またはＣＦＨＲ５遺伝子における特異的多型にわたって、またはそれに隣接してハイブリダイズする少なくとも１つのＨ因子またはＣＦＨＲ５特異的プライマーを含んでもよい。Ｈ因子またはＣＦＨＲ５特異的プライマーは、Ｈ因子またはＣＦＨＲ５の遺伝子のコード（エキソン）または非コード（プロモーター、５’非翻訳、イントロンまたは３’非翻訳）領域に由来する配列を含んでもよい。しばしば、これらのキットは、Ｈ因子またはＣＦＨＲ５遺伝子における特異的多型に隣接する核酸の逆鎖にハイブリダイズする、Ｈ因子またはＣＦＨＲ５特異的プライマーの１つ以上の対を含む。適切な緩衝液および酵素の存在下で、Ｈ因子またはＣＦＨＲ５特異的プライマー対は、Ｈ因子またはＣＦＨＲ５の遺伝子における特異的多型を増幅する際に有用である。

【０２７６】

本開示により指導される当業者には、種々の多型およびハプロタイプを、Ｈ因子関連の病気を発症する個体の性向を評価するために検出することができることが明らかである。以下の例および組み合わせは、例示のために提供され、限定のためではない。ある場合において、アッセイは、Ｈ因子またはＣＦＨＲ５遺伝子における少なくとも１個、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個または少なくとも６個の多型部位においてアレルを同定する。ある場合において、アッセイは、表１Ａ、１Ｂ、１Ｃ、１１、１４および１５に列挙されるＨ因子またはＣＦＨＲ５の遺伝子における１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、またはすべての多型においてアレルを同定する。１つの実施形態において、部位はｒｓ５２９８２５；ｒｓ８００２９２；ｒｓ３７６６４０４；ｒｓ１０６１１４７；ｒｓ１０６１１７０；およびｒｓ２０３６７４から選択され；任意にエキソン２２（Ｒ１２０Ｃ）を含む。１つの実施形態において、部位はｒｓ５２９８２５；ｒｓ８００２９２；イントロン２（ＩＶＳ２またはｉｎｓＴＴ）；ｒｓ３７６６４０４；ｒｓ１０６１１４７；ｒｓ１０６１１７０；エキソン１０Ａ；ｒｓ２０３６７４；ｒｓ３７５０４６から選択され；任意にエキソン２２（Ｒ１２０Ｃ）を含む。１つの実施形態において、部位はｒｓ３７５３３９４；ｒｓ５２９８２５；ｒｓ８００２９２；イントロン２（ＩＶＳ２またはｉｎｓＴＴ）；ｒｓ３７６６４０４；ｒｓ１０６１１４７；ｒｓ１０６１１７０；ｒｓ２２７４７００；ｒｓ２０３６７４；ｒｓ３７５３３９６；ｒｓ１０６５４８９から選択され；任意にエキソン２２（Ｒ１２０Ｃ）を含む。１つの実施形態において、部位はｒｓ８００２９２（Ｉ６２Ｖ）；ＩＶＳ　２（－１８ｉｎｓＴＴ）；ｒｓ１０６１１７０（Ｙ４０２Ｈ）；およびｒｓ２２７４７００（Ａ４７３Ａ）から選択される。１つの実施形態において、部位はｒｓ９４２７６６１（－２４９Ｔ＞Ｃ）；ｒｓ９４２７６６２（－２０Ｔ＞Ｃ）；およびｒｓ１２０９７５５０（Ｐ４６Ｓ）から選択される。好ましい実施形態において、本発明の診断／スクリーニングアッセイは、Ｈ因子またはＣＦＲＨ５遺伝子における少なくとも２つの多型部位におけるアレルを同定する。好ましい実施形態において、本発明の診断／スクリーニングアッセイは、Ｈ因子またはＣＦＲＨ５遺伝子における少なくとも３つの多型部位におけるアレルを同定する。好ましい実施形態において、本発明の診断／スクリーニングアッセイは、Ｈ因子またはＣＦＲＨ５遺伝子における少なくとも４つの多型部位におけるアレルを同定する。

【０２７７】

ある場合において、キットは、表１Ａ、１Ｂ、１Ｃ、１１、１４および１５に列挙されるＨ因子またはＣＦＨＲ５の遺伝子における１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、またはすべての多型においてアレルを同定するためのプライマーまたはプローブ（「オリゴヌクレオチド」）を含む。１つの実施形態において、このキットは、以下の多型部位の少なくとも１つにおけるアレルを決定するためのプライマーまたはプローブを含む：ｒｓ５２９８２５；ｒｓ８００２９２；ｒｓ３７６６４０４；ｒｓ１０６１１４７；ｒｓ１０６１１７０；およびｒｓ２０３６７４；そして任意にエキソン２２（Ｒ１２０Ｃ）を含む。１つの実施形態において、このキットは、以下の多型部位の少なくとも１つにおけるアレルを決定するためのプライマーまたはプローブを含む：ｒｓ５２９８２５；ｒｓ８００２９２；イントロン２（ＩＶＳ２またはｉｎｓＴＴ）；ｒｓ３７６６４０４；ｒｓ１０６１１４７；ｒｓ１０６１１７０；エキソン１０Ａ；ｒｓ２０３６７４；ｒｓ３７５０４６；そして任意にエキソン２２（Ｒ１２０Ｃ）を含む。１つの実施形態において、このキットは、以下の多型部位の少なくとも１つにおけるアレルを決定するためのプライマーまたはプローブを含む：ｒｓ３７５３３９４；ｒｓ５２９８２５；ｒｓ８００２９２；イントロン２（ＩＶＳ２またはｉｎｓＴＴ）；ｒｓ３７６６４０４；ｒｓ１０６１１４７；ｒｓ１０６１１７０；ｒｓ２２７４７００；ｒｓ２０３６７４；ｒｓ３７５３３９６；ｒｓ１０６５４８９；そして任意にエキソン２２（Ｒ１２０Ｃ）を含む。１つの実施形態において、部位はｒｓ８００２９２（Ｉ６２Ｖ）；ＩＶＳ　２（－１８ｉｎｓＴＴ）；ｒｓ１０６１１７０（Ｙ４０２Ｈ）；およびｒｓ２２７４７００（Ａ４７３Ａ）から選択される。１つの実施形態において、部位はｒｓ９４２７６６１（－２４９

Ｔ＞Ｃ）；ｒｓ９４２７６６２（－２０Ｔ＞Ｃ）；およびｒｓ１２０９７５５０（Ｐ４６Ｓ）から選択される。

【０２７８】

このキットは、上記の部位の２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、または少なくとも６つにおいてアレルを決定するためのプライマーまたはプローブを含むことができる。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、ｒｓ５２９８２５におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、ｒｓ８００２９２におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、ｒｓ３７６６４０４におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、ｒｓ１０６１１４７におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、ｒｓ１０６１１７０におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、ｒｓ２０３６７４におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、エキソン２２（Ｒ１２１０Ｃ）におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、ｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の２つまたは３つにおけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２の少なくとも１つ；ならびにｒｓ３７６６４０４；ならびにｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の少なくとも１つにおけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、ｒｓ５２９８２５、ｒｓ８００２９２、ｒｓ３７６６４０４、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、エキソン２２（Ｒ１２１０Ｃ）において、ならびに（ａ）ｒｓ５２９８２５；ｒｓ８００２９２；ｒｓ３７６６４０４；ｒｓ１０６１１４７；ｒｓ１０６１１７０；ｒｓ２０３６７４；ｒｓ５２９８２５　ｒｓ８００２９２において；（ｂ）ｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の２つもしくは３つにおいて；ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２、ｒｓ３７６６４０４、ならびにｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の２つもしくは３つにおいて；またはｒｓ５２９８２５、ｒｓ８００２９２、ｒｓ３７６６４０４、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４においてアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２の少なくとも１つ；ならびにｒｓ３７６６４０４；、ならびにｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の少なくとも１つにおけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、ｒｓ５２９８２５、ｒｓ８００２９２、ｒｓ３７６６４０４、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４においてアレルを区別する。

【０２７９】

このキットは、上記の部位の２つ、または上記の部位の少なくとも３つにおけるアレルを決定するためのプライマーまたはプローブを含むことができる。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、ｒｓ８００２９２におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、ｒｓ１０６１１７０におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、エキソン２２（Ｒ１２１０Ｃ）におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、エキソン２２（Ｒ１２１０Ｃ）ならびにｒｓ８００２９２ならびに／またはエキソン２２ならびにｒｓ１０６１１７０およびエキソン２２におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、ｒｓ８００２９２、ｒｓ１０６１１７０およびエキソン２２（Ｒ１２１０Ｃ）におけるアレルを区別する。

【０２８０】

このキットは、上記の部位の２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、または少なくとも６つにおいてアレルを決定するためのプライマーまたはプローブを含むことができる。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、ｒｓ５２９８２５におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、ｒｓ８００２９２におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、イントロン２（ＩＶＳ２またはｉｎｓＴＴ）におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、ｒｓ３７６６４０４におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、ｒｓ１０６１１４７におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、ｒｓ１０６１１７０におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、ｒｓ２２７４７００におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、エキソン１０Ａにおけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、ｒｓ２０３６７４におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、ｒｓ３７５０４６におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、エキソン２２（Ｒ１２１０Ｃ）におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、ｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の２つまたは３つにおけるアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２において；イントロン２において、ｒｓ３７６６４０４において、ｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の２つまたは３つにおいて、ｒｓ２２７４７００において、エキソン１０Ａにおいて、ならびにｒｓ３７５０４６においてアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、ｒｓ５２９８２５、ｒｓ８００２９２、イントロン２（ＩＶＳ２またはｉｎｓＴＴ）、ｒｓ３７６６４０４、ｒｓ１０６１１７０、ｒｓ２２７４７００、エキソン１０Ａ、ｒｓ２０３６７４、およびｒｓ３７５０４６においてアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、エキソン２２（Ｒ１２１０Ｃ）において、ならびにｒｓ５２９８２５；ｒｓ８００２９２；イントロン２（ＩＶＳ２またはｉｎｓＴＴ）；ｒｓ３７６６４０４；ｒｓ１０６１１４７；ｒｓ１０６１１７０；ｒｓ２２７４７００；エキソン１０Ａ；ｒｓ２０３６７４；ｒｓ３７５０４６；ｒｓ５２９８２５；およびｒｓ８００２９２の任意の１つ以上においてアレルを区別する。１つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、エキソン２２（Ｒ１２１０Ｃ）において、ならびに（ａ）ｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の２つもしくは３つにおいて；（ｂ）ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２、イントロン２（ＩＶＳ２またはｉｎｓＴＴ）、ｒｓ３７６６４０４において、ｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の２つもしくは３つ、ｒｓ２２７４７００、エキソン１０Ａ、ｒｓ３７５０４６において；またはｒｓ５２９８２５、ｒｓ８００２９２、イントロン２（ＩＶＳ２またはｉｎｓＴＴ）、ｒｓ３７６６４０４、ｒｓ１０６１１７０、ｒｓ２２７４７００、エキソン１０Ａ、ｒｓ２０３６７４、およびｒｓ３７５０４６においてアレルを区別する。

【０２８１】

１つの実施形態において、このキットは、Ｈ因子遺伝子における少なくとも１つの変異を検出するためのプローブまたはプライマー、ならびにＣＦＨＲ－５遺伝子における少なくとも１つの変異を検出するためのプローブまたはプライマーを含む。この実施形態において、このキットは、Ｈ因子およびＣＦＨＲ－５の遺伝子のいずれかまたは両方における２つ以上の変異、例えば、２つ、３つまたは４つ以上の変異を検出するためのプローブまたはプライマーを任意に含む。

【０２８２】

ハプロタイプを決定するための多数のアッセイ形式が既知であり、これらは本発明に適

合させることができる。例えば、Ｇｏｅｒｇｅｎｓら、２００４，「Ｏｎｅ－Ｓｔｅｐ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ Ｔｅｎ Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ Ｈａｐｌｏｔｙｐｅ Ｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｂａｓｉｃ ＲＥＴ Ｐｒｏｍｏｔｅｒ ｗｉｔｈ ａ ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ Ａｓｓａｙ」Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ５０：１６９３－１６９５；Ｄａｗｓｏｎ、１９８９，「Ｃａｒｒｉｅｒ ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｃｙｓｔｉｃ ｆｉｂｒｏｓｉｓ ｂｙ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ＤＮＡ ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ．」Ｍａｙｏ Ｃｌｉｎ Ｐｒｏｃ ６４：３２５－３４；Ｌｅｅら、２００５，「Ｇｅｎｅ ＳＮＰｓ ａｎｄ ｍｕｔａｔｉｏｎｓ ｉｎ ｃｌｉｎｉｃａｌ ｇｅｎｅｔｉｃ ｔｅｓｔｉｎｇ：ｈａｐｌｏｔｙｐｅ－ｂａｓｅｄ ｔｅｓｔｉｎｇ ａｎｄ ａｎａｌｙｓｉｓ．」Ｍｕｔａｔ Ｒｅｓ．５７３：１９５－２０４を参照のこと。

【０２８３】

１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは以下においてアレルを区別する：（ａ）ｒｓ５２９８２５；ｒｓ８００２９２；ｒｓ３７６６４０４；ｒｓ１０６１１４７；ｒｓ１０６１１７０；およびｒｓ２０３６７４のいずれか１つ以上；（ｂ）イントロン２（ＩＶＳ２もしくはｉｎｓＴＴ）；ｒｓ２２７４７００；エキソン１０Ａ；およびｒｓ３７５０４６のいずれか１つ以上；（ｃ）ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２の一方もしくは両方；（ｄ）ｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の１つ以上；（ｅ）ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２の少なくとも１つ；ならびにｒｓ３７６６４０４；ならびにｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の少なくとも１つ；（ｆ）少なくともｒｓ５２９８２５、ｒｓ８００２９２、ｒｓ３７６６４０４、ｒｓ１０６１１７０、およびｒｓ２０３６７４；（ｇ）エキソン２２（Ｒ１２１０Ｃ）；（ｈ）エキソン２２（Ｒ１２１０Ｃ）および（ａ）～（ｇ）のいずれか；または（ｉ）ｒｓ５２９８２５；ｒｓ８００２９２；ｒｓ３７６６４０４；ｒｓ１０６１１４７；ｒｓ１０６１１７０；ｒｓ２０３６７４；イントロン２（ＩＶＳ２もしくはｉｎｓＴＴ）；ｒｓ２２７４７００；エキソン１０Ａ；ｒｓ３７５０４６；およびエキソン２２（Ｒ１２１０Ｃ）のいずれか１つ以上、ならびにｒｓ９４２７６６１、ｒｓ９４２７６６２およびｒｓ１２０９７５５０のいずれか１つ以上。１つの実施形態において、このキットは、デバイスの状況において以下に列挙される部位におけるアレルの任意の組み合わせを区別するために十分なオリゴヌクレオチドを含む。

【０２８４】

このキットは、Ｈ因子またはＣＦＨＲ５ポリペプチドを特異的に認識する抗体を含んでもよい。このＨ因子またはＣＦＨＲ５に特異的な抗体は、正常な機能的Ｈ因子もしくはＣＦＨＲ５ポリペプチド、または、１つ以上の非同義語一ヌクレオチド変異多型（ＳＮＰ）がＨ因子もしくはＣＦＨＲ５コード領域に存在する変異体Ｈ因子もしくはＣＦＨＲ５ポリペプチドを認識し得る。

【０２８５】

ＸＩＩ．診断デバイス

診断方法、予後診断方法、薬物スクリーニング方法、および他の方法のために有用であるデバイスおよび試薬が提供される。１つの局面において、１つ以上のＨ因子および／またはＣＦＨＲ５の多型部位に特異的な固定化プライマーまたはプローブを含むデバイスが提供される。１つの実施形態において、Ｈ因子および／またはＣＦＨＲ５の多型部位は、ＡＭＤと関連すると本明細書で記載されているものである。

【０２８６】

１つの局面において、１つ以上のＨ因子および／またはＣＦＨＲ５の遺伝子産物（ポリヌクレオチドまたはタンパク質）に特異的な固定化プライマーまたはプローブを含むデバイスが提供される。プライマーまたはプローブは、ポリヌクレオチド（例えば、特異的多型部位へのハイブリダイゼーションに基づいて）またはポリペプチド（例えば、変異体ポリペプチドへの特異的結合に基づいて）に結合することができる。

【０２８７】

１つの実施形態において、複数の（少なくとも２つ、通常は少なくとも３つ以上の）異なるプライマーまたはプローブが固定化されているアレイ形式が使用される。「アレイ」という用語は、その通常の意味において使用され、通常は基材に固定化されている複数のプライマーまたはプローブの各々が、例えば、基材上の規定された位置（アドレス）を有することを意味する。アレイ上のプライマーまたはプローブの数は、デバイスの性質および用途に依存して変化し得る。例えば、ディップスティック形式アレイは、わずか２つの別個のプライマーまたはプローブを有することができるが、通常は、３つ以上のプライマー、しばしばさらに多くが存在する。表面に核酸を結合するための１つの方法は、高密度オリゴヌクレオチドアレイを作製することによる（Ｆｏｄｏｒら、１９９１，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５１：７６７－７３；Ｌｏｃｋｈａｒｔら、１９９６，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ １４：１６７５；ならびに米国特許第５，５７８，８３２号；同第５，５５６，７５２号；および同第５，５１０，２７０号を参照のこと）。ある実施形態において、単一の固定化プローブを含むデバイスを使用することができることもまた意図される。

【０２８８】

１つの実施形態において、複数の（少なくとも２つ、通常は少なくとも３つ以上の）異なるプライマーまたはプローブが固定化されているアレイ形式が使用される。「アレイ」という用語は、その通常の意味において使用され、通常は基材に固定化されている複数のプライマーまたはプローブの各々が、例えば、基材上の規定された位置（アドレス）を有することを意味する。アレイ上のプライマーまたはプローブの数は、デバイスの性質および用途に依存して変化し得る。

【０２８９】

１つの実施形態において、固定化プローブは、抗体または他のＨ因子もしくはＣＦＨＲ５結合部分である。

【０２９０】

本開示により指導される当業者には、種々の多型およびハプロタイプを、Ｈ因子関連の病気を発症する個体の性向を評価するために検出することができることが明らかである。以下の例および組み合わせは、例示のために提供され、限定のためではない。ある場合において、アレイは、表１Ａ、１Ｂ、１Ｃ、１１、１４および１５に列挙されるＨ因子またはＣＦＨＲ５の遺伝子における１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、またはすべての多型においてアレルを同定するためのプライマーまたはプローブを含む。１つの実施形態において、アレイは、以下の多型部位：ｒｓ５２９８２５；ｒｓ８００２９２；ｒｓ３７６６４０４；ｒｓ１０６１１４７；ｒｓ１０６１１７０；ｒｓ２０３６７４の少なくとも１つにおけるアレルを決定するためのプライマーまたはプローブを含み、任意にエキソン２２（Ｒ１２１０Ｃ）を含む。１つの実施形態において、アレイは、以下の多型部位：ｒｓ５２９８２５；ｒｓ８００２９２；イントロン２（ＩＶＳ２またはｉｎｓＴＴ）；ｒｓ３７６６４０４；ｒｓ１０６１１４７；ｒｓ１０６１１７０；エキソン１０Ａ；ｒｓ２０３６７４：ｒｓ３７５０４６の少なくとも１つにおけるアレルを決定するためのプライマーまたはプローブを含み、任意にエキソン２２（Ｒ１２１０Ｃ）を含む。１つの実施形態において、アレイは、以下の多型部位：（ａ）ｒｓ３７５３３９４；（ｂ）ｒｓ５２９８２５；（ｃ）ｒｓ８００２９２；（ｄ）イントロン２（ＩＶＳ２またはｉｎｓＴＴ）；（ｅ）ｒｓ３７６６４０４；（ｆ）ｒｓ１０６１１４７；（ｇ）ｒｓ１０６１１７０；（ｈ）ｒｓ２２７４７００；（ｉ）ｒｓ２０３６７４；（ｊ）ｒｓ３７５３３９６；（ｊ）ｒｓ１０６５４８９の少なくとも１つにおけるアレルを決定するためのプライマーまたはプローブを含み、任意にエキソン２２（Ｒ１２１０Ｃ）を含む。１つの実施形態において、アレイは、以下の多型部位：ｒｓ８００２９２（Ｉ６２Ｖ）；ＩＶＳ ２（－１８ｉｎｓＴＴ）；ｒｓ１０６１１７０（Ｙ４０２Ｈ）；およびｒｓ２２７４７００（Ａ４７３Ａ）の少なくとも１つにおけるアレルを決定するためのプライマーまたはプローブを含む。１つの実施形態において、アレイは、以下の多型部位：ｒｓ９４２７６６１（－２４９Ｔ＞Ｃ）；ｒｓ９４２７６６２（－２０Ｔ＞Ｃ）；およびｒｓ１２０９７５５０（Ｐ４６Ｓ）の少なくとも１つにおけるアレルを決定するためのプライマー

またはプローブを含む。

【０２９１】

アレイは、上記の部位の２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個または少なくとも６個におけるアレルを決定するプライマーまたはプローブを含むことができる。１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、ｒｓ５２９８２５におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、ｒｓ８００２９２におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、ｒｓ３７６６４０４におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、ｒｓ１０６１１４７におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、ｒｓ１０６１１７０におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、ｒｓ２０３６７４におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、エキソン２２（Ｒ１２１０Ｃ）におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、ｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の２つまたは３つにおけるアレルを区別する。１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２において、ｒｓ３７６６４０４において、ｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の２つまたは３つにおいてアレルを区別する。１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、ｒｓ５２９８２５、ｒｓ８００２９２、ｒｓ３７６６４０４、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、エキソン２２（Ｒ１２１０Ｃ）において、およびｒｓ５２９８２５において；ｒｓ８００２９２において；ｒｓ３７６６４０４において；ｒｓ１０６１１４７において；ｒｓ１０６１１７０において；ｒｓ２０３６７４において；ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２において；ｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の２つもしくは３つにおいて；ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２、ｒｓ３７６６４０４、およびｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の２つもしくは３つにおいて；またはｒｓ５２９８２５、ｒｓ８００２９２、ｒｓ３７６６４０４、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４においてアレルを区別する。１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、（ａ）ｒｓ５２９８２５；ｒｓ８００２９２；ｒｓ３７６６４０４；ｒｓ１０６１１４７；ｒｓ１０６１１７０；およびｒｓ２０３６７４のいずれか１つ以上；（ｂ）イントロン２（ＩＶＳ２もしくはｉｎｓＴＴ）；ｒｓ２２７４７００；エキソン１０Ａ；およびｒｓ３７５０４６のいずれか１つ以上；（ｃ）ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２の一方もしくは両方；（ｄ）ｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の１つ以上；（ｅ）ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２の少なくとも１つ；ならびにｒｓ３７６６４０４；ならびにｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の少なくとも１つ；（ｆ）少なくともｒｓ５２９８２５、ｒｓ８００２９２、ｒｓ３７６６４０４、ｒｓ１０６１１７０、およびｒｓ２０３６７４；（ｇ）エキソン２２（Ｒ１２１０Ｃ）；（ｈ）エキソン２２（Ｒ１２１０Ｃ）および（ａ）～（ｇ）のいずれか；または（ｉ）ｒｓ５２９８２５；ｒｓ８００２９２；ｒｓ３７６６４０４；ｒｓ１０６１１４７；ｒｓ１０６１１７０；ｒｓ２０３６７４；イントロン２（ＩＶＳ２もしくはｉｎｓＴＴ）；ｒｓ２２７４７００；エキソン１０Ａ；ｒｓ３７５０４６；およびエキソン２２（Ｒ１２１０Ｃ）のいずれか１つ以上、ならびにｒｓ９４２７６６１、ｒｓ９４２７６６２およびｒｓ１２０９７５５０のいずれか１つ以上においてアレルを区別する。

【０２９２】

アレイは、上記の部位の２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個または少なくとも６個におけるアレルを決定するプライマーまたはプローブを含むことができる。１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、ｒｓ５２９８２５における

アレルを区別する。１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、ｒｓ８００２９２におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、イントロン２（ＩＶＳ２またはｉｎｓＴＴ）におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、ｒｓ３７６６４０４におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、ｒｓ１０６１１４７におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、ｒｓ１０６１１７０におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、エキソン１０Ａにおけるアレルを区別する。１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、ｒｓ２２７４７００におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、ｒｓ２０３６７４におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、ｒｓ３７５０４６におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、エキソン２２（Ｒ１２１０Ｃ）におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、ｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の２つまたは３つにおけるアレルを区別する。１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、ｒｓ５２９８２５、ｒｓ８００２９２、イントロン２（ＩＶＳ２またはｉｎｓＴＴ）、ｒｓ３７６６４０４、ｒｓ１０６１１７０、エキソン１０Ａ、ｒｓ２２７４７００、ｒｓ２０３６７４、およびｒｓ３７５０４６におけるアレルを区別する。１つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、エキソン２２（Ｒ１２１０Ｃ）において、ならびに、ｒｓ５２９８２５において；ｒｓ８００２９２において；イントロン２（ＩＶＳ２またはｉｎｓＴＴ）において；ｒｓ３７６６４０４において；ｒｓ１０６１１４７において；ｒｓ１０６１１７０において；ｒｓ２２７４７００において、エキソン１０Ａにおいて；ｒｓ２０３６７４において；ｒｓ３７５０４６において；ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２において；ｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４の２つまたは３つにおいて；ｒｓ５２９８２５およびｒｓ８００２９２、イントロン２（ＩＶＳ２またはｉｎｓＴＴ）、ｒｓ３７６６４０４において；ｒｓ１０６１１４７、ｒｓ１０６１１７０およびｒｓ２０３６７４、ｒｓ２２７４７００、エキソン１０Ａ、およびｒｓ３７５０４６の２つもしくは３つにおいて；またはｒｓ５２９８２５、ｒｓ８００２９２、イントロン２（ＩＶＳ２またはｉｎｓＴＴ）、ｒｓ３７６６４０４、ｒｓ１０６１１７０、ｒｓ２２７４７００、エキソン１０Ａ、ｒｓ２０３６７４、およびｒｓ３７５０４６のいずれかにおいてアレルを区別する。１つの実施形態において、このデバイスは、キットの状況において上記に列挙される部位におけるアレルの任意の組み合わせを区別する。

【０２９３】

１つの実施形態において、基材は、約１０００個未満の別個のプライマーまたはプローブ、しばしば約１００個未満の別個のプライマーまたはプローブ、約５０個未満の別個のプライマーまたはプローブ、または約１０個未満の別個のプライマーまたはプローブを含む。この状況において使用される場合、プライマーは、２つのプライマーが同じポリヌクレオチド（すなわち、異なる遺伝子についてのｃＤＮＡプライマーなど）に特異的に結合しない場合に２つ目のプライマーとは「別個である」。この状況において使用される場合、プローブは、２つのプローブが同じポリペプチドまたはポリヌクレオチド（すなわち、異なる遺伝子についてのｃＤＮＡプローブなど）に特異的に結合しない場合に２つ目のプローブとは「別個である」。プライマーまたはプローブはまた、同じ遺伝子の異なるアレル（すなわち、ＣＦＨまたはＣＦＨＲ５）を認識する場合に、別個であると記載されてもよい。従って、１つの実施形態において、本発明の診断デバイスは、ＣＦＨのみ、ＣＦＨ

Ｒ５のみ、ＣＦＨおよびＣＦＨＲ５のみ、またはＣＦＨ、ＣＦＨＲ５、ならびに２０個まで、好ましくは１０個まで、または好ましくは５個までのＣＦＨおよび／またはＣＦＨＲ５以外の遺伝子のアレルを検出する。すなわち、このデバイスは、ＡＭＤおよび関連する補体関連疾患についてのスクリーニングに特に適している。１つの実施形態において、このデバイスは、ＣＦＨおよび／またはＣＦＨＲ１～５の１つ以上のみを認識するプライマーまたはプローブを含む。関連する実施形態において、このデバイスは、２０個まで、好ましくは１０個まで、または好ましくは５個までのＣＦＨまたはＣＦＨＲ１～５以外の遺伝子のためのプライマーまたはプローブを含む。

【０２９４】

１つの実施形態において、固定化プライマーは、Ｈ因子またはＣＨＲＦ５の遺伝子中の多型部位においてアレル間を区別することができるアレル特異的プライマーである。Ｈ因子遺伝子中の多型部位におけるアレルを同定するための例示的なアレル特異的プライマーは、表１６Ａに示される。固定化アレル特異的プライマーは、プライマーに対して相補的である配列を有する、ＲＮＡまたはＤＮＡのいずれかである核酸に優先的にハイブリダイズする。ハイブリダイゼーションは、蛍光検出を伴う一塩基伸長、オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイなどを含む、種々の方法によって検出されてもよい（Ｓｈｉ，Ｍ．Ｍ．、２００１，「Ｅｎａｂｌｉｎｇ ｌａｒｇｅ－ｓｃａｌｅ ｐｈａｒｍａｃｏｇｅｎｅｔｉｃ ｓｔｕｄｉｅｓ ｂｙ ｈｉｇｈ－ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ ｍｕｔａｔｉｏｎ ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ａｎｄ ｇｅｎｏｔｙｐｉｎｇ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ」Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．４７（２）：１６４－１７２を参照のこと）。多型部位を検出するためのマイクロアレイに基づくデバイスは市販されており、これには、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ（Ｓａｎｔａ Ｃａｌａｒ，ＣＡ）、Ｐｒｏｔｏｇｅｎｅ（Ｍｅｎｌｏ Ｐａｒｋ，ＣＡ）、Ｇｅｎｏｍｅｔｒｉｘ（Ｔｈｅ Ｗｏｏｄｌａｎｄ，ＴＸ）、Ｍｏｔｏｒｏｌａ ＢｉｏＣｈｉｐ Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｎｏｒｔｈｂｒｏｏｋ，ＩＬ）、およびＰｅｒｌｅｇｅｎ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｍｏｕｎｔａｉｎ Ｖｉｅｗ，ＣＡ）が含まれる。

【０２９５】

１つの実施形態において、固定化プローブは、Ｈ因子またはＣＦＨＲ５の遺伝子中の多型部位においてアレル間を区別することができるアレル特異的プローブである。Ｈ因子遺伝子中の多型部位におけるアレルを同定するための例示的なアレル特異的プローブは、表１６Ｂに示される。固定化アレル特異的プローブは、プローブに対して相補的である配列を有する、ＲＮＡまたはＤＮＡのいずれかである核酸に優先的にハイブリダイズする。ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイズした核酸の蛍光を含む、種々の方法によって検出されてもよい（Ｓｈｉ，Ｍ．Ｍ．、２００１，Ｅｎａｂｌｉｎｇ ｌａｒｇｅ－ｓｃａｌｅ ｐｈａｒｍａｃｏｇｅｎｅｔｉｃ ｓｔｕｄｉｅｓ ｂｙ ｈｉｇｈ－ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ ｍｕｔａｔｉｏｎ ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ａｎｄ ｇｅｎｏｔｙｐｉｎｇ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ．Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．４７（２）：１６４－１７２を参照のこと）。多型部位を検出するためのマイクロアレイに基づくデバイスは市販されており、これには、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ（Ｓａｎｔａ Ｃａｌａｒ，ＣＡ）、Ｐｒｏｔｏｇｅｎｅ（Ｍｅｎｌｏ Ｐａｒｋ，ＣＡ）、Ｇｅｎｏｍｅｔｒｉｘ（Ｔｈｅ Ｗｏｏｄｌａｎｄ，ＴＸ）、Ｍｏｔｏｒｏｌａ ＢｉｏＣｈｉｐ Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｎｏｒｔｈｂｒｏｏｋ，ＩＬ）、およびＰｅｒｌｅｇｅｎ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｍｏｕｎｔａｉｎ Ｖｉｅｗ，ＣＡ）が含まれる。

【０２９６】

特定の実施形態において、特定のＳＮＰおよび変異のために特異的なプローブまたはプライマーは、本発明のキットまたはデバイスから除外される。例えば、ある実施形態において、以下のＳＮＰの１つ以上を含まないキットまたはデバイスは除外することができる：（ｉ）ｒｓ５２９８２５；（ｉｉ）ｒｓ９００２９２；（ｉｉｉ）イントロン２（ＩＶＳ２またはｉｎｓＴＴ）；（ｉｖ）ｒｓ３７６６４０４；（ｖ）ｒｓ１０６１１４７；（ｖｉ）ｒｓ１０６１１７０；（ｖｉｉ）ｒｓ２２７４７００；（ｖｉｉｉ）エキソン１０Ａ；（ｉｘ）ｒｓ２０３６７４；（ｘ）ｒｓ３７５０４６；（ｘｉ）ｒｓ３７５３３９６

；（ｘｉｉ）ｒｓ１０６５４８９；または（ｘｉｉｉ）エキソン２２（Ｒ１２１０Ｃ）。

【実施例】

【０２９７】

ＸＩＩＩ．実施例

実施例１

Ｈ因子遺伝子における共通のハプロタイプ（ＨＦ１／ＣＦＨ）は個体を加齢性黄斑変性に対して素因化する

加齢性黄斑変性（ＡＭＤ）は、先進国における高齢者の不可逆的な失明の最も頻繁な原因であり、世界中で５千万人を超える個人に罹患している。本発明者らの以前の研究は、ＡＭＤの特徴的な病変である、眼ドルーゼンの形成における代替補体経路の活性化を関連付けた。本発明者らはまた、ＡＭＤ患者における黄斑ドルーゼンが、補体カスケードの代替経路の制御されない活性化によって特徴付けられる疾患であるＩＩ型膜性増殖性糸球体腎炎（ＭＰＧＮＩＩ）を有する患者における早期の年齢において形成するものと区別不可能であることを示した。ここで本発明者らは、代替補体経路の主要な阻害剤であるＨ因子タンパク質（ＨＦ１）が、ドルーゼン中に蓄積し、網膜色素上皮によって局所的に合成されることを示す。以前の連鎖分析は染色体１ｑ２５－３２を同定し、これは、主要なＡＭＤ感受性遺伝子座としてＨ因子遺伝子（ＨＦ１／ＣＦＨ）を有する。本発明者らは、約９００例のＡＭＤの症例および４００例の適合させた対照から構成される２つの独立するコホート中の遺伝子の変異について、ＨＦ１を分析した。本発明者らは、これらのコホート中で、ＡＭＤとの８つの共通のＨＦ１　ＳＮＰの高度に有意な関連性を見出している；２つの共通のミスセンス変異体は、高度に有意な関連性を示す（Ｉ６２Ｖ；χ^2＝３６．１、ｐ＝３．２×１０$^{-7}$およびＹ４０２Ｈ；χ^2＝５４．４、ｐ＝１．６×１０$^{-13}$）。ハプロタイプ分析は、複数のＨＦ１変異体がＡＭＤのリスクの増加または減少のいずれかを付与することを示唆する。１つの共通のアットリスクハプロタイプは、ＡＭＤの症例の４９％の頻度で存在し、対照において２６％の頻度で存在する（ＯＲ＝２．６７、９５％ＣＩ［１．８０－２．８５］）。このハプロタイプについてのホモ接合性は症例の２２．１％、および対照の５．１％を占める（ＯＲ＝５．２６、９５％ＣＩ［２．８４－９．７６］）。いくつかの防御的ハプロタイプもまた同定される（ＯＲ＝０．４４－０．５５）。これらのデータをさらに強化するのは、７０％のＭＰＧＮＩＩ患者におけるリスクハプロタイプの発見である。本発明者らは、補体系の調節因子における遺伝子によってあらかじめ決定された変異が、感染などの誘発性の事象と組み合わされたときに、ヒト集団におけるＡＭＤの主要な割合の根底にあることを示唆する。

【０２９８】

序論

加齢性黄斑変性（ＡＭＤ）は、６０歳を超えた個人の１５％に罹患し、または６億人の個人が見積もられている、先進国における不可逆的な失明の主要な原因である（Ｋｌｅｉｎら、２００４；ｖａｎ　Ｌｅｅｕｗｅｎら、２００３を参照のこと）。ＡＭＤは、神経網膜とその下にある脈絡膜との間の界面で発生する変性的かつ新生血管性の変化に起因する中心視の進行性の喪失によって特徴付けられる。この位置には光受容体、隣接する網膜色素上皮（ＲＰＥ）、ブルーフ膜、ＢＭとして知られる基底膜複合体、および脈絡膜毛細血管のネットワークが存在する。

【０２９９】

現在広く行き渡っている見解は、ＡＭＤは、複数の遺伝的および環境的リスク因子の相互作用に起因されるべき複雑な障害であるということである（Ｋｌｅｉｎら、２００３；Ｔｕｏら、２００４）。家族集積性研究は、遺伝子成分は症例の２５％もにおいて同定することができることを示す（Ｋｌａｖｅｒら、１９９８）。このようにして、ＡＭＤは、単一遺伝子障害の蓄積ではなく、むしろ、複数の感受性遺伝子座の相互作用の産物であるらしい。関与する遺伝子座の数、付与される起因し得るリスク、および種々の遺伝子座間の相互作用は不明瞭なままである。

【０３００】

連鎖分析および候補遺伝子スクリーニングは、ＡＭＤの遺伝学に限られた洞察を提供してきた。リスクの増加を伴う１つの遺伝子、ＡＢＣＡ４（Ａｌｌｉｋｍｅｔｓら、１９９７；Ａｌｌｉｋｍｅｔｓ、２０００）およびリスクの減少を伴う１つの遺伝子、ＡｐｏＥ４（Ｋｌａｖｅｒら、１９９８、Ｓｏｕｉｅｄら、１９９８）の信頼できる関連性が報告されてきた。いくつかのグループは、ゲノム規模での連鎖分析の結果を報告している（Ｔｕｏら、２００４；Ｗｅｅｋｓら、２００１）。今日まで、特定の染色体領域、１ｑ２５－ｑ３１に対する１つのＡＭＤ表現型（ＡＲＭＤ１：ＭＩＭ　６０３０７５）の連鎖が実証されている（Ｋｌｅｉｎら、１９９８）。Ｆｉｂｌ６としても知られるＨＥＭＩＣＥＮＴＩＮ－１は、原因遺伝子であることが暫定的に同定されてきたが（Ｓｃｈｕｌｔｚら、２００３）、これは有意な疾患負荷を説明しない（Ａｂｅｃａｓｉｓら、２００４；　Ｈａｙａｓｈｉら、２００４）。いくつかのグループによる染色体１ｑ上の重複する遺伝子座の同定（Ｗｅｅｋｓら、２００１；Ｉｙｅｎｇａｒら、２００３）は、この遺伝子座が主要なＡＭＤ関連遺伝子を保有していると思われることを示す。

【０３０１】

ＡＭＤ、ならびにアルツハイマー病（Ａｋｉｙａｍａら、２０００）、アテローム性動脈硬化症（Ｔｏｒｚｅｗｓｋｉら、１９９７）および糸球体腎炎（Ｓｃｈｗｅｒｔｚら、２００１）などの多くの他の疾患において、特徴的な病変および沈着が疾患の機序および疾患の進行に寄与する。これらの疾患の分子的な機序は多様であり得るが、沈着は、部分的には、局所的な炎症、および生得的な免疫系における宿主防御の主要な要素である補体カスケードの活性化に起因する、多くの共有される分子成分を含む。ドルーゼンは初期のＡＭＤと関連する特徴的な沈着であり、最近の研究は、それらの形成において、局所的炎症および補体カスケードの活性化を同様に関連付けてきた（Ｈａｇｅｍａｎら、１９９９；Ｅｓｐｉｎｏｓａ－Ｈｅｉｄｍａｎら、２００３）。ドルーゼンは、種々の補体の活性化因子、阻害因子、活性化特異的補体フラグメント、および終末経路の成分を含み、これには、膜攻撃複合体（ＭＡＣ）、補体活性化の結果として形成された溶解複合体が含まれる。ＭＡＣは、宿主細胞および組織ならびに外来性病原体に対して致死的となり得る。

【０３０２】

補体の代替活性化経路の制御されない全身的な活性化によって特徴付けられるまれな腎臓疾患であるＩＩ型膜性増殖性糸球体腎炎（ＭＰＧＮＩＩ）を有する多くの個体もまた、ＡＭＤにおけるものと組成および外見において区別できない、黄斑における眼ドルーゼンを発症する（Ｍｕｌｌｉｎｓら、２００１；Ｏ’Ｂｒｉｅｎら、１９９３；ＭｃＡｖｏｙら、２００４）。さらに、ＭＰＧＮＩＩと診断された１人の患者は、補体活性化の代替経路の主要な阻害因子であるＨＦ１（ＨＦ１）に変異を有する（Ｚｉｐｆｅｌ、私信）。さらに、関連する障害であるＭＰＧＮＩＩＩを有するいくつかの大家族における個体は、ＡＭＤについてのゲノム規模の連鎖研究において同定された遺伝子座に重なる、１ｑ３１－３２にマッピングされた染色体の領域（Ｎｅａｒｙら、２００２）への連鎖を示す。まとめると、これらの知見は、ＨＦ１がＡＭＤおよびＭＰＧＮＩＩの発症に関与するか否かを試験するための推進力を提供した。

【０３０３】

本研究において、本発明者らは、ＡＭＤおよびＭＰＧＮＩＩ患者および適合させられた対照におけるＨＦ１配列変異体の頻度を決定し、そして疾患表現型とのそれらの関連を分析した。本発明者らはまた、正常ドナーおよびＡＭＤドナーからの黄斑ＲＰＥ－脈絡膜複合体において、ＨＦ１転写およびＨＦ１タンパク質の分布を試験した。

【０３０４】

方法

患者、表現型決定およびＤＮＡ－２つの独立したＡＭＤ症例の群および年齢を適合させた対照をこの研究に使用した。すべての参加した個体は、６０歳を超えたヨーロッパアメリカ人血統であり、インフォームドコンセントに従ってＩＲＢ認可プロトコールの下で登録された。これらの群は、アイオワ大学からの臨床的に記録されたＡＭＤを有する４０４例の血縁関係のない患者（平均年齢７９．５±７．８歳）および１３１例の血縁関係のな

い対照患者（平均年齢７８．４±７．４歳；年齢および民族によって適合させた）、ならびにコロンビア大学からの臨床的に記録されたＡＭＤを有する５５０例の血縁関係のない患者（平均年齢７１．３２±８．９歳）および２７５例の血縁関係のない、年齢および民族によって適合させた対照患者（平均年齢６８．８４±８．６歳）から構成された。患者は、網膜フェローシップ訓練された眼科医による間接検眼鏡検査および細隙灯顕微鏡検査によって調べた。

【０３０５】

Ｃａｒｏｌｉｎｅ Ｋｌａｖｅｒ博士、および後にはＫｌａｖｅｒ博士によって訓練された個人が、標準化された国際分類システムに従って、両方の機関において基底部の写真を等級付けした（Ｂｉｒｄら、１９９５）。対照患者は、彼らが黄斑疾患のいかなる際立った徴候も示さず、またはＡＭＤの既知の家族歴を有しなかった場合に、選択されかつ含められた。ＡＭＤ患者は、彼らが研究に参加した時点での彼らの最も重篤な眼の分類に基づいて、以下の表現型のカテゴリーに下位分類された－初期ＡＭＤ（ｅＡＭＤ）、地図状萎縮症（ＧＡ）、および滲出性（ＣＮＶ）ＡＭＤ。アイオワ大学のｅＡＭＤおよびＧＡの症例は、さらに、別個の表現型（ＲＰＥ変化単独、＞１０黄斑硬性ドルーゼン、黄斑軟性ドルーゼン、ＢＢ（表皮）ドルーゼン、ＰＥＤ、「チェロキー」萎縮症、半島地図状萎縮症、およびパターン地図状萎縮症）に下位分類された。すべての症例についての最初期の記録可能な表現型もまた、分析において記録および利用した。

【０３０６】

ゲノムＤＮＡは、ＱＩＡａｍｐ ＤＮＡ Ｂｌｏｏｄ Ｍａｘｉキット（Ｑｉａｇｅｎ，Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）を使用して、症例および対照の被験体から採取した末梢血白血球から生成した。

【０３０７】

ラパヌイ－ｔｈｅ Ｕｎｉｄａｄ ｄｅ Ｂｉｏｅｔｉｃａ，Ｍｉｎｉｓｔｅｒｉｏ ｄｅ Ｓａｌｕｄ（Ｓａｎｔｉａｇｏ，Ｃｈｉｌｅ）によって認可されたインフォームドコンセントプロセスに従って、４４７名（６６％女性；３４％男性）のイースター島住民に、拡張眼底検査を含んだ完全な眼の検査を受診させた。医学的な家族歴および眼科歴が取られ、地域の医師および地域社会の指導者からの記録および援助を使用して、被験体の民族性を分類した。これらの試験した患者の４９％が純粋なラパヌイであり、９％は混血であり（ラパヌイおよびヨーロッパ人、チリ人、マピューチおよび／または最近のポリネシア人の混血）、４２％が大陸系（大部分がチリ系ヨーロッパ人）であった。末梢静脈血および血清を、高齢の２０１例の個体から採取した；これらの個体のうち１１４例が純粋なラパヌイであった（１０８例は＞５０歳；８９例は＞６０歳）。６５歳より上である、６０例の純粋なラパヌイ住民および１３例のチリ人居住者からのＤＮＡを本研究において使用した。

【０３０８】

ヒトドナーの眼－ヒドドナーの眼を、ｔｈｅ Ｉｏｗａ Ｌｉｏｎｓ Ｅｙｅ Ｂａｎｋ（Ｉｏｗａ Ｃｉｔｙ，ＩＡ）、ｔｈｅ Ｏｒｅｇｏｎ Ｌｉｏｎｓ Ｅｙｅ Ｂａｎｋ（Ｐｏｒｔｌａｎｄ，ＯＲ）およびｔｈｅ Ｃｅｎｔｒａｌ Ｆｌｏｒｉｄａ Ｌｉｏｎｓ Ｅｙｅ ａｎｄ Ｔｉｓｓｕｅ Ｂａｎｋ（Ｔａｍｐａ，ＦＬ）から、死亡の５時間以内に入手した。これらの肉眼的病理特徴、ならびに、利用可能な場合、基底部写真および血管造影図を、網膜の専門家によって読み取りかつ分類した。基底部を、国際的ＡＭＤ等級付けシステム（Ｂｉｒｄら、１９９５）の改変バージョンに従って、少なくとも２名の個人によって等級付けした。

【０３０９】

総ＲＮＡを、網膜、ＲＰＥ／脈絡膜、および眼に由来するＲＰＥ細胞から、ＲＮｅａｓｙ Ｍｉｎｉキット（Ｑｉａｇｅｎ，Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）を使用して調製した。ゲノムＤＮＡは、ＱｉａＳｈｒｅｄｄｅｒ（Ｑｉａｇｅｎ，Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）を使用して剪断し、残渣のゲノムＤＮＡはＤＮＡｓｅ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を用いて消化した。ＲＮＡの完全性は、Ａｇｉｌｅｎｔ ＢｉｏＡｎａｌｙｚｅｒを使用して評価した。

【０３１０】
臨床的にＡＭＤであると実証された３８例の血縁関係のないドナーに由来するＤＮＡ（平均年齢８１．５±８．６）、および１９例の血縁関係のない対照ドナー（平均年齢８０．５±８．８；年齢および民族性を適合させた）をＳＳＣＰ分析のため、および潜在的な遺伝子型－表現型相関を評価するために利用した。
【０３１１】
免疫組織化学－鋸状縁および黄斑を含む後極のくさび状生検（ｗｅｄｇｅｓ）を固定し、以前に記載されたように処理した（Ｈａｇｅｍａｎら、１９９９）。ある後極は事前の固定なしでＯＣＴ中に直接的に包埋した。組織を、クライオスタット上で６～８μｍの厚さに切片化し、免疫標識を以前に記載されたように実施した（Ｈａｇｅｍａｎら、１９９９）。隣接する切片を、対照に供するために、二次抗体単独とインキュベートした。いくつかの免疫標識試料を調製し、以前に記載されたように共焦点レーザー走査顕微鏡によって観察した（Ａｎｄｅｒｓｏｎら、２００２）。
【０３１２】
ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）－第１鎖ｃＤＮＡを、総ＲＮＡから、Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ逆転写酵素（Ｇｉｂｃｏ　ＢＲＬ）およびランダムヘキサマーを使用して合成した。ＰＣＲ反応は、以下のプライマーセットを使用して実行した：ＦＨ１（エキソン８からエキソン１０まで）５’－ＧＡＡＣＡＴＴＴＧＡＧＡＣＴＣＣＧＴＣ－３’［配列番号３２４］および５’－ＡＣＣＡＴＣＣＡＴＣＴＴＴＣＣＣＡＣ－３’［配列番号３２５］；ＦＨ１（エキソン９からエキソン１０まで）５’－ＴＣＣＴＧＧＣＴＡＣＧＣＴＣＴＴＣ－３’［配列番号３２６］および５’－ＡＣＣＡＴＣＣＡＴＣＴＴＴＣＣＣＡＣ－３’［配列番号３２５］；ＨＦＬ１（エキソン８からエキソン１０まで）５’－ＴＣＣＧＴＣＡＧＧＡＡＧＴＴＡＣＴＧＧ－３’［配列番号３２７］および５’－ＡＧＴＣＡＣＣＡＴＡＣＴＣＡＧＧＡＣＣＣ－３’［配列番号３２８］；ＨＦＬ１（エキソン９からエキソン１０まで）、５’－ＧＧＣＴＡＣＧＣＴＣＴＴＣＣＡＡＡＡＧ－３’［配列番号３２９］および５’－ＡＧＴＣＡＣＣＡＴＡＣＴＣＡＧＧＡＣＣＣ－３’［配列番号３３０］。ＰＣＲプライマー（ＩＤＴ，Ｃｏｒａｌｖｉｌｌｅ，ＩＡ）は、ＭａｃＶｅｃｔｏｒソフトウェア（Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）を使用して設計した。反応パラメーターは、９４℃で３分間の１サイクル、９４℃で４５秒間、５１．４℃（ＦＨ１）／５５℃（ＨＦＬ１）で１分間、７２℃で１分間の４０サイクル、および７２℃で３分間の１サイクルであった。ＰＣＲ産物は２％アガロースゲル上で泳動させ、Ｑｕａｎｔｉｔｙ　Ｏｎｅ（登録商標）ソフトウェア（Ｂｉｏ－Ｒａｄ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）を伴うＧｅｌ　Ｄｏｃ　２０００（商標）Ｄｏｃｕｍｅｎｔａｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して記録した。
【０３１３】
マイクロアレイ分析：ＤＮＡマイクロアレイ分析は、死亡の５時間未満に採取したネイティブなヒトＲＰＥまたはＲＰＥ－脈絡膜複合体から抽出した（ＲＮｅａｓｙ　ｍｉｎｉキット，Ｑｉａｇｅｎ，Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）総ＲＮＡを使用して実施した。３つの異なるプラットフォーム：１８，３８０個の非重複ＤＮＡマイクロアレイ（Ｉｎｃｙｔｅ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ；Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）；Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ遺伝子チップシステム；および全ヒトゲノムまたはヒト１Ａ　Ｖ２オリゴ－マイクロアレイ（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｉｎｃ．，Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ，ＣＡ）を使用した。個々のプロトコールは、製造業者の説明書に従った。Ｉｎｃｙｔｅ分析のために、黄斑および中央の末梢領域の６ｍｍパンチに由来するｃＤＮＡを、ランダムプライミング反応において３３－Ｐで標識し、精製し、１８，３８０個の非重複ｃＤＮＡを含むナイロンベースのアレイにハイブリダイズした。メンブレンをリン画像化し、シグナルを標準化し、データを、Ｇｅｎｏｍｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙソフトウェアパッケージを使用して分析した。Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ分析については、ＲＰＥおよびＲＰＥ／脈絡膜（６～８ｍｍ黄斑および末梢パンチ）ｃＲＮＡを、標準的なプロトコールを使用して、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　Ｇｅｎｅ　Ｃｈｉｐｓ（ＨＧ－Ｕ１３３Ａ）に直接的にハイブリダイズした。これらの手順は、流体

工学ステーションおよびＧｅｎｅＡｒｒａｙスキャナーを備えた、アイオワ大学のＤＮＡ中核設備によって実施された。Ａｇｉｌｅｎｔデータは、黄斑および中央の末梢領域のパンチから入手した。黄斑および末梢ＲＰＥ／脈絡膜に由来するＣＹ３およびＣＹ５標識された増幅されたｃＲＮＡは、Ａｇｉｌｅｎｔ Ｌｏｗ Ｉｎｐｕｔ ＲＮＡ増幅キットを使用して、同じドナーからの黄斑および末梢のＲＮＡを使用して生成した。Ａｇｉｌｅｎｔアレイデータは、３例の正常若年ドナー、３例のＡＭＤドナー、および３例の年齢を適合させた非ＡＭＤ対照から、ＶｅｒｓＡｒｒａｙスキャナーを使用して収集した；データは、ＶｅｒｓＡｒｒａｙ Ａｎａｌｙｚｅｒソフトウェア（ＢｉｏＲａｄ）を使用して定量した。各スポットの正味のメジアン強度は、グローバルバックグラウンド減算を使用して計算し、データは局所的回帰法を使用して標準化した。

【０３１４】

変異のスクリーニングおよび分析－ＨＦ１のコード領域および隣接するイントロン領域（転写されて短縮型ＦＨＬ１アイソフォームを生成するエキソン１０Ａを含む）を、一本鎖コンホメーション多型（ＳＳＣＰ）分析、変性高速液体クロマトグラフィー（ＤＨＰＬＣ）および直接的配列決定を使用して、変異体について試験した。残りのＳＮＰは５’ヌクレアーゼ（Ｔａｑｍａｎ，ＡＢＩ）方法論によって決定した。Ｔａｑｍａｎ遺伝子型決定および関連する分析は、記載されたように（Ｇｏｌｄら、２００４）実施した。ＳＳＣＰ、ＤＨＰＬＣおよびＤＮＡ配列決定分析のためのプライマー（表５）は、ＭａｃＶｅｃｔｏｒソフトウェア（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）を使用して、各エキソンおよびその隣接するイントロン性領域を増幅するように設計した。ＰＣＲ由来のアンプリコンは、以前に記載されたように（Ａｌｌｉｋｍｅｔｓら、１９９７；Ｈａｙａｓｈｉら、２００４）、ＳＳＣＰおよびＤＨＰＬＣによって配列の変異についてスクリーニングした。ＳＳＣＰおよびＤＨＰＬＣによって検出されるすべての変化は、標準的なプロトコールに従う二方向性配列決定によって確認した。統計学的分析は、カイ二乗（χ^2）およびフィッシャーの直接確率検定を使用して実施した。

【０３１５】

結果

ＲＰＥ－脈絡膜界面におけるＨ因子

黄斑および黄斑外からのＲＰＥ－脈絡膜複合体におけるＨ因子タンパク質の分布は、初期のＡＭＤの病歴を有する６例のドナー、およびＡＭＤまたはドルーゼンを有しない同様の年齢の３例のドナーから得た眼において評価した（図１Ａ～１Ｌ）。ＡＭＤを有するドナーにおいては、強烈なＨＦ１免疫反応性（ＩＲ）が、ドルーゼン、ＲＰＥの下（すなわち、ＲＰＥの下の空間）、および脈絡膜毛細血管の周囲において存在する（図１Ａ～１Ｄ、１Ｅ、１Ｇ）。一次抗体の非存在下では、ＲＰＥ／脈絡膜における標識は存在しない（図１Ｆ）。Ｈ因子抗体のすべてが、ある程度まで、均質な様式でドルーゼンを標識した（図１Ｃおよび１Ｅ）。１つの抗体はまた、ドルーゼン中の下位構造エレメントを標識した（図１Ａおよび１Ｂ）。このような構造は、ＨＦ１を結合する活性化された補体成分Ｃ３ｂ／ｉＣ３ｂに対する抗体を使用して標識される（Ａｎｄｅｒｓｏｎら、２００４；Ｊｏｈｎｓｏｎら、２００１）。Ｈ因子の免疫反応性は、年齢を適合させた対照と比較して、ＡＭＤを有するドナーにおいてより強固である；これはまた、末梢におけるよりもＡＭＤドナーの黄斑においてより顕著である（図１Ｇおよび１Ｈ）。黄斑中の抗ＨＦ１パターン（図１Ｇ）は、抗Ｃ５ｂ－９パターンと高度に類似している（図１Ｉおよび１Ｋ）；両方の場合において、標識は、典型的には、脈絡膜毛細血管を含む。黄斑外局在は、はるかにより少ない抗Ｃ５ｂ－９免疫反応性を示す（図１Ｊ）。ＲＰＥ－脈絡膜におけるＣ５ｂ－９の免疫反応性がほとんどないこと、または全くないことが、５０歳よりも下でかつＡＭＤを有しないドナーにおいて観察される（図１Ｌ）。

【０３１６】

図１の説明

（Ａ～Ｂ）萎縮性ＡＭＤと診断された８４歳の男性ドナーからの高倍率共焦点免疫蛍光画像。ドルーゼンおよびＲＰＥ下空間における下位構造エレメントの抗ＨＦ１（Ａｄｖａ

ｎｃｅｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）標識（白矢印）は、Ｃｙ２／フルオレセインチャンネル上で画像化する。ＲＰＥ下空間は、基底ＲＰＥ表面とブルーフ膜の内部コラーゲン層の間の細胞外区画である。このようなエレメントもまた、補体活性化表面に共有結合するＣ３フラグメント（ｉＣ３ｂ、Ｃ３ｄ、Ｃ３ｄｇ）に対して指向されるモノクローナル抗体を使用して免疫反応性（ＩＲ）を示す（Ｊｏｈｎｓｏｎら、２００１；２００３）。このドナーからの脈絡膜毛細血管の内腔における強烈な抗Ｈ因子標識（星印）は、血流中でのＨＦ１の高い循環レベルを反映する可能性が最も高い。ＲＰＥ細胞質における自己蛍光リポフスチン顆粒は、Ｃｙ３／テキサスレッドチャンネルで標識する。拡大バー、Ａ）５μｍ；Ｂ）３μｍ。

【０３１７】

（Ｃ～Ｄ）異なるＨＦ１ポリクローナル抗体（Ｑｕｉｄｅｌ）を使用する、ＡＭＤを有する８３歳男性におけるドルーゼンおよびＲＰＥ下空間中でのＨＦ１の共焦点免疫蛍光局在（Ｃｙ２／フルオレセインチャンネル；緑色）。Ｃ）このドナーの眼においては、ドルーゼン（Ｄｒ）標識パターンは均質である。Ｄ）ＲＰＥ－脈絡膜の低倍率画像。抗ＨＦ１ＩＲは、脈絡膜の全体を通して、およびＲＰＥ下空間において存在し（矢印）、これは、ドルーゼンおよび他の沈着物が加齢およびＡＭＤ型に関連する解剖学的な区画である。リポフスチン自己蛍光（Ｃｙ３チャンネル；赤色）。拡大バー、Ｃ）１０μｍ；Ｄ）２０μｍ。

【０３１８】

（Ｅ～Ｆ）ドルーゼン中のＨＦ１の免疫組織化学的局在。Ｅ）紫色のアルカリホスファターゼ反応生成物によって示される抗ＨＦ１モノクローナル抗体（Ｑｕｉｄｅｌ）標識は、ドルーゼン中で、ブルーフ膜に沿って、および脈絡膜毛細血管壁上で明白である（矢印）。Ｆ）同じ眼からの対照切片。一次抗体の非存在下では標識が存在しない。ＲＰＥ細胞質および脈絡膜における茶色の色素形成はメラニンである。拡大バー＝１０μｍ。

【０３１９】

（Ｇ～Ｈ）黄斑におけるＨＦ１の免疫局在。Ｇ）広範な標識が、ＡＭＤを有するドナーにおいて、ＢＭ、脈絡膜毛細血管壁、および毛細血管間柱（矢印）に沿って存在する。Ｈ）ＡＭＤを有しないドナーの黄斑からの対照切片；はるかに少ない標識が、同じ構造中で明白である。拡大バー＝２０μｍ。

【０３２０】

（Ｉ～Ｊ）同じＡＭＤドナーの眼からの黄斑（図１Ｉ）および黄斑外（図１Ｊ）の根底にあるＲＰＥ－脈絡膜における補体膜攻撃複合体（Ｃ５ｂ－９）の免疫組織化学局在。黄斑において、強烈な抗Ｃ５ｂ－９標識が、ドルーゼン、ブルーフ膜、および脈絡膜毛細血管内皮と関連する。黄斑の外側の抗Ｃ５ｂ－９標識は、ブルーフ膜の近傍における狭いゾーンに制限されている。ＲＰＥ細胞質および脈絡膜における茶色の色素はメラニン色素形成を表す。拡大バー＝２０μｍ。

【０３２１】

（Ｋ－Ｌ）ＡＭＤを有するドナー（図１Ｋ）およびＡＭＤを有しない第２のドナー（図１Ｌ）からの黄斑におけるＣ５ｂ－９の免疫組織化学局在。ＲＰＥ細胞質および脈絡膜における茶色の色素形成はメラニンを表す。抗Ｃ５ｂ－９標識は、脈絡膜毛細血管壁（黒色矢印）および毛細血管間柱（白色矢印）と主として関連する。標識は、ＡＭＤ眼においてはるかにより強烈である。図Ｇに示されるように、同じドナーからの黄斑における抗ＨＦ１標識パターンとの強力な類似性に注目のこと。拡大バー、Ｋ＝１５μｍ；Ｌ＝２０μｍ。

【０３２２】

網膜色素上皮はＨ因子の局所的供給源である

ＲＰＥ、ＲＰＥ／脈絡膜および網膜におけるＨＦ１およびＦＨＬ１の発現は、ＲＴ－ＰＣＲおよびＤＮＡマイクロアレイ分析によって評価した。両方の遺伝子産物についての適切なサイズのＰＣＲ産物が、ＡＭＤを有するかまたは有しないドナー由来のヒトの眼における、新たに単離されたＲＰＥおよびＲＰＥ／脈絡膜複合体において存在するが、神経網

膜には存在しない（図２）。プライマーは、ＨＦ１コード配列のエキソン８、９、１０Ａ（このエキソンは短縮型アイソフォームＦＨＬ１を生成するために利用される）および１０の中で選択した。ＰＣＲ反応は、ＡＭＤの病歴が臨床的に記録されていたドナーに由来する、ヒト感覚神経網膜（レーン２）、ＲＰＥ、および脈絡膜（レーン３）、および新たに単離したＲＰＥ細胞（レーン４）から抽出したＲＮＡから調製したｃＤＮＡを用いて実施した。ゲノムＤＮＡは、増幅のための鋳型として利用した（レーン５）；レーン６に示される混合物には鋳型を加えなかった。レーン１は１００ｂｐラダーを含む。ＨＦ１のエキソン８からエキソン１０まで（左のパネル）、およびエキソン９からエキソン１０まで（右のパネル）、ならびに、ＦＨＬ１のエキソン８からエキソン１０Ａまで（左のパネル）、およびエキソン８からエキソン１０Ａまで（右のパネル）に及ぶアンプリマーは、予想したサイズ（それぞれ、３７６、２１０、４２４および２４８ｂｐ）であった。ＦＨＲ１－５についての転写物は、ＲＰＥまたはＲＰＥ／脈絡膜において検出されないが、ＦＨＲ１－４は、ＲＴ－ＰＣＲによって神経網膜において検出される（データ示さず）。

【０３２３】

３つのプラットフォームから導き出された遺伝子発現アレイデータは、ＨＦ１およびＦＨＬ１転写物はＲＰＥおよび脈絡膜細胞によって局所的に発現されるが、ＨＦ１関連タンパク質転写物は、もしあるとしても、ＲＰＥおよび脈絡膜細胞によって局所的に発現されることはほとんどない（ＦＨＲ１が考えられる例外である）ことを確認する。ＡＭＤを有する９例のドナーおよび３例の年齢を適合させた対照に由来するＲＰＥ／脈絡膜ｃＤＮＡでプローブしたＩｎｃｙｔｅアレイから導き出されたデータは、ＡＭＤを有するドナーにおけるＨＦ１　ｍＲＮＡのレベルの平均２～３倍の上昇レベルを示す。黄斑外領域と比較して、黄斑領域においてわずかにより高いレベルに向かう傾向もまた存在するが、この違いは統計学的に有意ではない。Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘアッセイを使用して、ＡＭＤを有する２例のドナーおよび２例の年齢を適合させた対照ドナーから単離されたＲＰＥおよび隣接するＲＰＥ／脈絡膜製剤の試験から生じた結果は、これらの組織間でのＨＦ１転写物の存在を確認し、ＨＦ１メッセージの有意な割合がＲＰＥ層の中に存在することを示す（データ示さず）。

【０３２４】

ＨＦ１における変異体はＡＭＤおよびＭＰＧＮ　ＩＩと関連する

ＨＦ１遺伝子のアレル変異体がＡＭＤと関連するか否かを試験するために、アイオワ大学の４０４例のＡＭＤ患者および１３１例の適合させた対照のコホートにおいて、２２個すべてのコードエキソン配列および５０～１００ｂｐの隣接するイントロン配列をスクリーニングした。全体で２６個の配列変異体を検出する；５個の同義語置換および１２個の非同義語置換を含むコード領域における１７個のＳＮＰ（ｃＳＮＰ）、および９個のイントロンＳＮＰである（変異体のいくつかを図３に示す）。図３は、分析において使用される１１個のＳＮＰ、２０個の短いコンセンサスリピート（ＳＣＲ）、および連鎖不均衡（ＬＤ）ブロックのおよその位置を示し、病原体および他の基質についてのおよその結合部位は、以前に公開されたデータに基づいてダイアグラムの下に示される（Ｚｉｐｆｅｌら、２００２；Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚ　ｄｅ　Ｃｏｒｄｏｂａら、２００４）。ｃＳＮＰは、以前に記載された一般的な非同義語変異体、例えば、エキソン２におけるＩ６２Ｖ、エキソン９におけるＹ４０２Ｈ、およびエキソン１８におけるＤ９３６Ｅを含んだ（図３）。潜在的な機能的効果を有する一般的なイントロンＳＮＰの例は、ＩＶＳ２－１８ｉｎｓＴＴ変異体である。５個のまれな（＜０．５％）変異体もまた、ＡＭＤ患者と対照の両方において検出され（データ示さず）、疾患表現型がＨＦ１レアアレルによって引き起こされる（すなわち、疾患が引き起こす突然変異の）可能性を除外した。詳細な遺伝子型決定データは、４０４例の患者および１３１例の対照の数人または全員において６個のＳＮＰについて得られ（表４および６Ａ～６Ｃ）、関連分析は、症例－対照研究設計を使用して実施した。高度に有意な関連性は、Ｉ６２Ｖ（$\chi^2=15.0$，$P=1.1\times10^{-4}$）およびＹ４０２Ｈ（$\chi^2=49.4$，$p=2.1\times10^{-12}$）を含むいくつかの個体変異体を用いて見出される。このコホートにおいてＡＭＤとの最も強い関連は、エキソン１０

における同義語Ａ４７３Ａ変異体について観察され、これは、３．４２のオッズ比（ＯＲ）（９５％信頼区間（ＣＩ）［２．２７－５．１５］）を生じる。

【０３２５】

これらの結果は、コロンビア大学、ニューヨークにおいて得られたＡＭＤ患者（ｎ＝５５０）および適合させた対照（ｎ＝２７５）の独立したコホートにおいて確認された（表４）。同じ２つの非同義語ＳＮＰがまた、この第２のコホートにおいてＡＭＤと高度に関連している（Ｉ６２Ｖ；χ^2＝３６．１，ｐ＝３．２×１０$^{-7}$およびＹ４０２Ｈ；χ^2＝５４．４，ｐ＝１．６×１０$^{-13}$）。加えて、いくつかの他のイントロンＳＮＰが、市販のアッセイの頻度および利用可能性に基づいて選択された（全体で１１個のＳＮＰについて）。このコホートにおける最も強い関連は、イントロン１０におけるＳＮＰ　ｒｓ２０３６７４を用いて観察される（χ^2＝６６．１，ｐ＝４．２９×１０$^{-16}$）。この変異体は、ＡＭＤとの２．４４のＯＲを示す（９５％　ＣＩ＝１．９７－３．０３）。ＯＲは控えめであるが、変異体は非常に一般的である；症例の３０．５％がアレルＢについてホモ接合性であるが、対照ではわずか１２．９％である。エキソン１３および１８におけるＱ６７２ＱおよびＤ９３６Ｅアレルは、統計学的に有意な関連を示さず、病原体および基質分子認識に関与するドメインを含むＨＦ１のＮ末端の半分における変異（図３、以下もまた参照のこと）は、ＡＭＤと関連することを示唆する。２セットのデータは、遺伝子型決定したＳＮＰが、高度に有意な様式でＡＭＤと関連するのみならず、関連の頻度および程度が２つのコホートにおいて非常に類似しているという点で著しく類似している（表４および６）。

【０３２６】

関連は、全体のＡＭＤ患者コホートが対照と比較されるときに高度に有意である（表４）。ＡＭＤの主要な下位表現型、例えば、初期ＡＭＤ（ｅＡＭＤ、黄斑ドルーゼンおよび／または色素的異常によって特徴付けられる）、ＣＮＶ（新生血管膜および／または円板状瘢痕）、およびＧＡ（地図状萎縮症）が別々に分析されるときに、関連は、ｅＡＭＤおよびＣＮＶの症例においてとりわけ顕著である。ＧＡ群は、ある場合において、とりわけ、エキソン１３（Ｑ６７２Ｑ）および１８（Ｄ９３６Ｅ）アレルによって規定されるハプロタイプについて、一般的な傾向からのある程度の逸脱を示す（データ示さず）。この逸脱は、様々な機序について有意であり得るが、おそらくはＧＡを有する比較的少ない数の患者に起因して、統計学的な有意さにまで到達しなかった。

【０３２７】

連鎖不均衡（ＬＤ）分析は、全体のＨＦ１遺伝子にわたる広範なＬＤを示した（表２および図３）。エキソン２～３領域における３つのＳＮＰは、エキソン７および９におけるＡ３０７ＡおよびＹ４０２Ｈ変異体、ならびにエキソン１３および１８におけるＱ６７２ＱおよびＤ９３６Ｅ変異体のように、実質的に完全なＬＤにある（表６および図５）。症例および対照におけるハプロタイプの見積もりは、対照のわずか２６％のみに対して、症例の４９％において最も頻繁なアットリスクハプロタイプを同定した（ＯＲ＝２．９３　９５％ＣＩ［２．２９－３．７４］）。このハプロタイプについてのホモ接合性は、コロンビアの症例の２２．１％および対照の５．１％に存在する（ＯＲ＝５．２６、９５％ＣＩ［２．８４－９．７６］）。２つの一般的な防御的ハプロタイプは、対照の３０％および症例の１８％において見出される（ＯＲ＝０．４７６　９５％ＣＩ［０．３４９－０．６５０］およびＯＲ＝０．４７２、９５％ＣＩ［０．３２０－０．６９８］）。これらのハプロタイプは、エキソン２～３遺伝子座ＳＮＰおよびイントロン１０　ＳＮＰにおいてのみ異なる。図４および表２に示されるように、これらの防御的ハプロタイプは互いに密接に関連し、両方ともリスクハプロタイプとは少なくとも５段階離れている。興味深いことに、以前にＨＵＳと関連することが示された３つのＳＮＰ（プロモーター－２５７Ｃ＞Ｔ、Ａ４７３Ａ、およびＤ９３６Ｅ）は、すべてがＡＭＤのリスクについて中性である１つの比較的一般的なハプロタイプ（１２％）上にある。各ＳＮＰについて、本発明者らは、コンセンサスチンパンジーゲノムに存在する塩基を同定した。生成したハプロタイプは、可能性のある祖先のヒトハプロタイプを表し、防御的ハプロタイプと密接に関連する

（データ示さず）。

【０３２８】

ＳＮＰ　ＩＶＳ２－１８ｉｎｓＴＴおよびＹ４０２Ｈもまた、２０例の血縁関係のないＭＰＧＮＩＩ患者、５２例のラパヌイネイティブ、ならびにヒスパニック系アメリカ人、アフリカ系アメリカ人、およびヨーロッパ系アメリカ人の小さなコホートにおいて遺伝子型決定した（表７）。アットリスクハプロタイプの頻度は、Ｙ４０２Ｈ変異体および／またはＩＶＳ１０遺伝子座の遺伝子型からの異なる集団からのサンプル中で見積もった。これらには、６５歳を超えるラパヌイネイティブ（このイースター島集団においては、ＡＭＤは極度にまれであり、存在しない可能性が最も高い）、コロンビア大学からの対照（年齢＞６５歳）、ヒスパニック一般集団、アイオワ大学からの対照（年齢＞６５歳）、アフリカ系アメリカ人一般集団、コロンビア大学からのＡＭＤ症例、ヨーロッパ系アメリカ人一般集団、アイオワ大学からのＡＭＤ症例、およびＭＰＧＮＩＩを有する個体が含まれる。Ｎ＝個体の数である。ＭＰＧＮＩＩコホートにおいて、リスクハプロタイプの頻度はおよそ７０％である。加えて、リスクハプロタイプは、ＡＭＤのより低い発生率を有する群である、ヒスパニック系アメリカ人およびアフリカ系アメリカ人において頻度がより低いようである（３５～４５％）。しかし、これらの集団にタイプ分けされたサンプルの数は小さい。イースター島のラパヌイ集団は、顕著に低いレベルのＡＭＤを有する。６５歳を超える５２例のＡＭＤを有しないラパヌイネイティブの分析から、本発明者らは、リスクハプロタイプの頻度がわずか１９％であると見積もっている。

【０３２９】

考察

Ｈ因子多型およびＡＭＤ

本明細書に提示されるデータは、補体調節遺伝子、Ｈ因子（ＨＦ１／ＣＦＨ）における特異的多型に、２つの独立したコホート中のＡＭＤ症例の主要な集団を関連付ける（Ｚｉｐｆｅｌ、２００１；Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚ　ｄｅ　Ｃｏｒｄｏｂａら、２００４）。ハプロタイプ分析は、対照の約２５％と比較して、ＡＭＤを有する個体のほぼ半数において、最も高頻度のアットリスクハプロタイプが存在することを示す。ＳＮＰの関連性の頻度および程度は、２つのコホートで非常に類似しており、遺伝子型決定したＳＮＰは、各々においてＡＭＤとの高度に有意な関連性を示す。この関連性は初期のＡＭＤまたは脈絡膜新血管形成の症例においてとりわけ顕著であり、地図状萎縮症についてはそれほど顕著でない。ＡＭＤとの特異的ＨＦ１ハプロタイプの観察された関連の規模は、以前にＡＭＤと関連付けられた遺伝子の異常と比較した場合に顕著である。

【０３３０】

特異的ＨＦ１ハプロタイプがＡＭＤ疾患表現型についてのリスクの増加を付与するという結論のさらなる裏付けは、患者が初期の発症である黄斑ドルーゼンを発現する、ＨＦ１突然変異と関連した腎臓疾患であるＭＰＧＮＩＩを有する２０例の血縁関係のない患者において、および、もしあっても顕著に低いＡＭＤの発生率を有する人種である５２例のラパヌイネイティブにおいて、ＳＮＰ　ＩＶＳ２－１８ｉｎｓＴＴおよびＹ４０２Ｈの遺伝子型決定によって得られた。ＭＰＧＮ　ＩＩ患者のおよそ７０％およびラパヌイの１９％が、本研究において、アットリスクハプロタイプであるＨＦ１を有することが見出された。より大きなサンプルセットの分析は、これらの結果を確認するために必要とされるが、データは、ＡＭＤとのＨＦ１の関連が、ヨーロッパ人に由来する集団に制限されない可能性があることを確かに示唆する。本発明者らは、ＨＦ１機能を、ＡＭＤの根底にある病原性メカニズムにおいてさらに関連付けて、防御的ハプロタイプを同定した。

【０３３１】

Ｈ因子多型の機能的意味合い

ヒトにおけるＨ因子欠損は、ＭＰＧＮ　ＩＩおよび非定型的溶血性尿毒症性症候群（ａＨＵＳ）と関連付けられている。（Ｚｉｐｆｅｌら、２００１）。ＨＦ１欠損は、小胞体におけるタンパク質の保持を生じる、タンパク質短縮化またはアミノ酸置換に導く突然変異から生じる。血漿ＨＦ１のレベルの減少が続いて起こり、同時に起こるＣ３および他の

補体成分の消費を伴う、代替補体経路の制御されない活性化に導く。対照的に、ａＨＵＳに導くＨＦ１突然変異は、典型的には、細胞表面におけるＦＨ１の補体阻害機能を制限するミスセンス突然変異である。最近の研究は、ＦＨ１突然変異を有する個体とＦＨ１突然変異を有しない個体の両方における、３つの一般的なＳＮＰとａＨＵＳとの間の結合を明らかにしている（Ｃａｐｒｉｏｌｉら、２００３）。さらに、感染などの侵襲は、ａＨＵＳの出現を誘発することが実証されている。

【０３３２】

遺伝子型決定されたＨＦ１のＳＮＰの大部分は、コードされるタンパク質の重要な機能的ドメインの中に位置し（図３）、これは、６０アミノ酸の２０個の短いコンセンサスリピート（ＳＣＲ）からなる。ＳＣＲは、Ｃ３ｂ（ＳＣＲ１－４、ＳＣＲ１２－１４およびＳＣＲ１９－２０）、ヘパリン、シアル酸（ＳＣＲ７、ＳＣＲ１３およびＳＣＲ１９－２０）およびＣ反応性タンパク質（ＣＲＰ）（ＳＣＲ７）についての結合部位を含む。それゆえに、ＳＮＰは、機能的ドメインの中に位置するが、一般的に、おそらく、発現レベル、結合効率、および他の分子特性の変動性を通してタンパク質機能に影響を与える。例えば、エキソン２　Ｉ６２Ｖ変異体はＳＣＲ２に位置し、これは第１のＣ３ｂ結合部位に含まれ、エキソン９　Ｙ４０２Ｈ変異体はＳＣＲ７ドメイン中にあり、これはヘパリンおよびＣＲＰの両方を結合する。イントロンＳＮＰ、例えば、ＩＶＳ２－１８ｉｎｓＴＴ変異体はスプライシングに影響を与え得る。例えば、ＴＴ挿入の効果の分析は（ｈｔｔｐｓ：／／ｓｐｌｉｃｅ．ｃｍｈ．ｅｄｕ／ｓｅｒｖｅｒにおいて）、天然のアクセプター部位の６ｂｐ上流の新規な潜在性スプライシングアクセプター６の作製を示唆した（データ示さず）。研究されたＳＮＰのいくつかはＨＦ１アイソフォームの発現に影響を与えることもまた可能である。例えば、Ｉ６２Ｖは、予測されたエキソンスプライシングエンハンサー中に存在する（Ｗａｎｇら、２００４）（データ示さず）。

【０３３３】

一般的なＳＮＰの機能的な結果は控えめであり得る。なぜなら、これらは、後期に発生した表現型に含まれ、（厳格な）進化の制約に供されていないからである。より実質的な効果、すなわち、疾患を引き起こす突然変異を有するＨＦ１変異体は、初期の発症、重篤な（劣性の）疾患、例えば、ＨＦ１欠損およびａＨＵＳに関わるとされる（Ｚｉｐｆｅｌら、２００２；　Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚ　ｄｅ　Ｃｏｒｄｏｂａら、２００４；Ｃａｐｒｉｏｌｉら、２００３；Ｚｉｐｆｅｌ、２００１）。関心が持たれるものは、真の疾患を引き起こす突然変異は、ＨＦ１遺伝子の完全なスクリーニング後に、ＨＵＳ患者の約２５％～３５％のみにおいて同定されているという事実である（Ｃａｐｒｉｏｌｉら、２００３）。同時に、変異体－２５７Ｃ＞Ｔ（プロモーター）、Ａ４７３Ａ（エキソン１３）およびＤ９３６Ｅ（エキソン１８）によって規定された疾患関連ハプロタイプが、ＨＵＳ患者において、優勢には、疾患を引き起こす突然変異を有しないヒトにおいて同定されてきた（Ｃａｐｒｉｏｌｉら、２００３）。さらに、同じ研究は、罹患した発端者が、一方の親から突然変異したアレルを、およびもう一方の親から感受性のアレルを遺伝したいくつかの血統を同定した。対照的に、疾患を引き起こす突然変異のキャリアである、罹患した発端者の健常な同胞は、防御的アレルを遺伝した。これらの血統からの罹患した個体において、症例の＞６０％おける細菌またはウイルスの感染として特定される、疾患誘発効果は、すべての症例の＞８０％において、および見かけの疾患関連変異を伴わない症例の＞９０％において同定された（Ｃａｐｒｉｏｌｉら、２００３）。

【０３３４】

まとめると、これらのデータは、感染性誘発事象と組み合わせたアットリスクＨＦ１ハプロタイプが、疾患の出現のために十分であることを強く示唆する。興味深いことに、ＨＵＳ中の（主としてＣ末端の）アットリスクＨＦ１ハプロタイプは、ＡＭＤおよび／またはＭＰＧＮＩＩにおけるアットハプロタイプと重複せず（表２）、ＭＰＧＮＩＩおよびＡＭＤとは反対に、ＨＵＳにおける異なるトリガーを示唆する。ＨＵＳではなく、ＭＰＧＮＩＩにおける初期の発症のドルーゼンの観察およびＡＭＤにおける同じ組成物のそれらの観察は、これらの疾患についての異なる機序を裏付ける。

【０３３５】
ＨＦ１における疾患を引き起こす突然変異は、ＭＰＧＮ　ＩＩにおいてはまれであり、ＡＭＤにおいては報告されておらず、また本研究における広範なスクリーニング後に本発明者らもそれらの突然変異を見出していない。しかし、本発明者らは、ＭＰＧＮ　ＩＩを有する患者の７０％の頻度で、およびＡＭＤを有する患者のおよそ５０％の頻度で、同じアットリスクハプロタイプを観察した。これらのデータは、感染性因子によって誘発される場合、ヒトの疾患に対する感受性を実質的に増加するアットリスクＨＦ１ハプロタイプと一貫している。これらの因子の組み合わせた効果は、ＡＭＤからＭＰＧＮＩＩまでの範囲で、得られる表現型の重篤度を決定する。

【０３３６】
ＨＦ１ハプロタイプの進化分析は、リスクハプロタイプが、チンパンジーにおいて見出される先祖ハプロタイプから有意に進化したことを示す。図４は、ハプロタイプの間の関連性を示すＨＦ１　ＳＮＰのハプロタイプネットワークダイアグラムを示し、円のサイズがハプロタイプの頻度に比例している。大きな黒丸は主要なリスクハプロタイプを表し、垂直線を付した円は２つの有意な防御的ハプロタイプであり、大きな白丸は非定型的溶血性尿毒症性症候群（ＨＵＳ）と関連する３つのＳＮＰを含むハプロタイプであり、これはＡＭＤリスクについては中性である。推定の先祖ハプロタイプもまた示す。異なる型のＨＦ１遺伝子が病原体に応答して出現し、これが代替補体経路を活性化することが可能である。弱く作用するＨＦ１ハプロタイプは、補体阻害の減少および細菌感染に対する強力な防御を提供し得る。しかし、このような弱いアレルは、個体に素因を与えることの結果から、補体系の機能不全の結果までを有し得る。ＡＭＤリスクハプロタイプは、全長のＨＦ１タンパク質とＦＨＬ１タンパク質の両方を産生する遺伝子の５’末端において原理的に異なっていることが興味深い。対照的に、遺伝子の３’部分におけるＨＵＳ突然変異クラスターは、ＨＦ１においてのみ見出される。それゆえに、疾患におけるこれら２つの型のタンパク質の役割を決定することが重要である。

【０３３７】
ＡＭＤにおけるＨ因子機能不全の生物学的モデル
補体系の主要な機能の１つは、このような感染因子に対する防御を提供することである。これは、オプソニン作用および微生物の溶解、外来性粒子の除去、炎症性細胞の補充、抗体産生の調節、および免疫複合体の排出を媒介する（Ｍｏｒｇａｎら、１９９１；Ｋｉｎｏｓｈｉｔａ、１９９１）。補体系の活性化は、連続的な、増幅する、タンパク質分解カスケードを誘発し、これは表面を活性化する修飾を生じ、炎症性細胞を刺激する可溶性アナフィラトキシンの放出を生じ、そして最終的には、膜貫通ポアの形成を通して細胞の溶解を促進する高分子複合体である、膜攻撃複合体（ＭＡＣ）の形成を生じる。補体の制御されない活性化は、宿主細胞および組織に対するバイスタンダー損傷を導き得る。結果として、ＨＦ１、ならびに他の循環タンパク質および膜結合タンパク質は、補体系を調節するように進化してきた（Ｍｏｒｇａｎ、１９９９）。

【０３３８】
補体成分のスペクトルは、ドルーゼン（および／またはそれに隣接するかまたはそれに重層するＲＰＥ細胞）中、ブルーフ膜に沿って、および／または脈絡膜内皮細胞膜上のいずれかで同定されてきた（Ｈａｇｅｍａｎら、２００１；Ｍｕｌｌｉｎｓら、２０００；Ｍｕｌｌｉｎｓら、２００１；Ａｎｄｅｒｓｏｎら、２００２；Ｊｏｈｎｓｏｎら、２０００；Ｊｏｈｎｓｏｎら、２００１；Ｃｒａｂｂら、２００２；Ｊｏｈｎｓｏｎら、２００２；Ｍｕｌｌｉｎｓら、１９９７）。これらには、終末経路補体成分、終末経路の活性化特異的フラグメント、ならびに種々の補体調節因子が含まれる。細胞媒介事象もまたこのプロセスに寄与し得るという証拠が存在する（Ｐｅｎｆｏｌｄら、２００１；Ｓｅｄｄｏｎら、２００４；Ｍｉｌｌｅｒら、２００４）。

【０３３９】
本発明者らは、ここで、ＡＭＤの前歴を有するヒトドナーにおいて、ＨＦ１もまたドルーゼンの構成成分であることを示す。第２に、本発明者らは、ＨＦ１が、ドルーゼンの中

で、アミロイド含有下位構造エレメント中のそのリガンドＣ３ｂとともに同時局在することを示し、候補補体活性化因子としてのこれらの構造をさらに関係付ける（Ａｎｄｅｒｓｏｎら、２００４；Ｊｏｈｎｓｏｎら、２００２）。本発明者らはまた、Ｃ５ｂ－９免疫反応性によって示されるように、ＨＦ１およびＭＡＣがＲＰＥ－脈絡膜界面に同時分布すること、ならびにこれらの沈着物がＡＭＤの前歴を有するドナーからの眼においてより強固であることを実証する。最後に、ＨＦ１およびＣ５ｂ－９免疫反応性は、同じ眼からのより末梢の位置と比較して、黄斑においてより強い。これらの知見のすべては、ＡＭＤ病理が黄斑において主として現れるという事実と一致し、ブルーフ膜のレベルにおける補体活性化が、ドルーゼンの形成のプロセスにおける主要な要素であり、ならびにＡＭＤの病因に寄与する因子であるという結論と一致する（Ｈａｇｅｍａｎら、２００１；Ａｎｄｅｒｓｏｎら、２００２）。

【０３４０】

ＲＰＥ－脈絡膜界面におけるＨＦ１の分布は、Ｃ５ｂ－９のそれと著しく類似しており、有意な量のＭＡＣが生成され、ＲＰＥ－脈絡膜界面に沈着されることを暗示する。このことは、アットリスクＨＦ１ハプロタイプと関連するタンパク質が、補体活性化を減弱するその正常な能力の減少を受ける可能性があることを示唆する。従って、ＡＭＤと関連するＨＦ１変異体は、ＲＰＥおよび脈絡膜細胞を、代替経路媒介補体攻撃の持続的なリスク、ドルーゼン形成、および後期段階の新生血管ＡＭＤと関連するブルーフ膜の完全性の破壊にさらす可能性がある。ブルーフ膜は、他の箇所よりも黄斑中で有意に薄いので（Ｃｈｏｎｇら、２００５）、これは引き続く新生血管の侵襲に対してより感受性である可能性がある。ブルーフ膜は末梢におけるよりも黄斑において有意に薄いので、これは、新生血管の侵襲に対して感受性である程度まで、分解される可能性がより高い。

【０３４１】

要約すると、本研究の結果は、ＨＦ１中の一般的なハプロタイプが個体をＡＭＤに対して素因化するという強い証拠を提供する。本発明者らは、補体系を活性化する事象と組み合わせた、補体カスケードの代替経路を調節する遺伝子における変化が、ヒト集団中のＡＭＤの多くの割合の根底にあることを示唆する。

【０３４２】

実施例２

補体調節遺伝子Ｈ因子（ＣＦＨ）およびＨ因子関連５（ＣＦＨＲ５）における変異はＩＩ型膜性増殖性糸球体腎炎（高密度沈着疾患）と関連する

序論

膜性増殖性糸球体腎炎は多様な疾患であり、しばしば、病因がはっきりせず、小児および成人のネフローゼ症候群の主要な腎臓性の原因の４％および７％をそれぞれ占める（Ｏｒｔｈら、１９９８）。腎臓の免疫病理学および超構造研究に基づいて、３つのサブタイプが認められている。Ｉ型およびＩＩＩ型膜性増殖性糸球体腎炎（ＭＰＧＮ）は、免疫複合体媒介疾患の変種であり；対照的に、ＭＰＧＮＩＩの免疫複合体との関連は知られていない（Ａｐｐｅｌら、２００５）。

【０３４３】

ＭＰＧＮＩＩは、小児におけるＭＰＧＮの症例の２０％未満を占め、成人においては症例のわずかなパーセンテージのみを占めている（Ｏｒｔｈら、１９９８；Ｈａｂｉｂら、１９７５；Ｈａｂｉｂら、１９８７）。両性が等しく罹患し、診断は、通常、血尿、タンパク尿、急性腎炎症候群またはネフローゼ症候群のような非特異的な所見を呈する５～１５歳間の年代の小児においてなされる（Ａｐｐｅｌら、２００５）。ＭＰＧＮＩＩを有する患者の８０％より多くがまた、血清Ｃ３腎炎因子（Ｃ３ＮｅＦ）、Ｃ３ｂＢｂに対して指向される自己抗体、補体カスケードの代替経路のコンバターゼについて陽性である（Ｓｃｈｗｅｒｔｚら、２００１）。Ｃ３ＮｅＦは、Ｉ型およびＩＩＩ型ＭＰＧＮを有する人の半数もに見出され、そしてまた健常個体においても見出され、ＭＰＧＮ　ＩＩの決定的な診断のために必要な糸球体基底膜（ＧＢＭ）における高密度の沈着の電子顕微鏡的な実証を行う（Ａｐｐｅｌら、２００５）。この形態学的な特徴はＭＰＧＮ　ＩＩに特徴的で

あるので、この疾患はより正確には高密度沈着疾患（ＭＰＧＮＩＩ／ＤＤＤ）と呼ばれる（図１２）。

【０３４４】

ＭＰＧＮＩＩ／ＤＤＤの自発的な寛解は一般的ではない（Ｈａｂｉｂら、１９７５；Ｈａｂｉｂら、１９８７；Ｃａｍｅｒｏｎら、１９８３；Ｂａｒｂｉａｎｏ ｄｉ Ｂｅｌｇｉｏｊｏｓｏら、１９７７）。より一般的な結果は、１０年以内の診断において患者の約半数において末期の腎臓疾患（ＥＳＲＤ）に導く腎機能の慢性的な低下である（Ｂａｒｂｉａｎｏ ｄｉ Ｂｅｌｇｉｏｊｏｓｏら、１９７７；Ｓｗａｉｎｓｏｎら、１９８３）。ある患者において、タンパク尿の急速な変動が、明白な誘発事象の非存在下で急性の腎臓変質のエピソードを伴って起こり；他の患者においては、持続的なタンパク尿にも関わらず、疾患は何年間も安定したままである。

【０３４５】

Ｃ３ＮｅＦは、５０％を超えるＭＰＧＮＩＩ／ＤＤＤを有する患者において疾患の経過を通して持続する（Ｓｃｈｗｅｒｔｚら、２００１）。その存在は、典型的には、補体活性化の証拠、例えば、ＣＨ５０の減少、Ｃ３の減少、Ｃ３ｄｇ／Ｃ３ｄの増加、および補体カスケードの代替経路の持続的に高いレベルの活性化と関連する。血清中に最も豊富な（～１．２ｍｇ／ｍｌ）補体タンパク質であるＣ３は、通常、チックオーバーとして知られるプロセスにおけるチオエステルの加水分解による低いレベルの連続的自己活性化を受ける。Ｃ３加水分解は、タンパク質の大きなコンホメーションの変化を誘導し、Ｃ３（H_2O）を、Ｃ３の切断生成物であるＣ３ｂと類似にする。Ｃ３（H_2O）はＢ因子と結合してＣ３（H_2O）Ｂｂを形成し、これは、Ｃ３を消費してＣ３ｂＢｂ^{2}を産生する増幅ループ中でＣ３をＣ３ｂに切断する（図１３）。

【０３４６】

ＭＰＧＮＩＩ／ＤＤＤにおいては、Ｃ３ＮｅＦはＣ３ｂＢｂ（またはアセンブルしたコンバターゼ）に結合して、この酵素の半減期を延長し、Ｃ３ｂＢｂおよび補体活性化のレベルを制御するための正常な調節メカニズムを圧倒する持続的なＣ３消費を生じる（Ａｐｐｅｌら、２００５）。正常な制御は少なくとも７種のタンパク質を含み、その４種は血清中に存在し（補体Ｈ因子（ＣＦＨ）、補体Ｈ因子様タンパク質１（ＣＦＨＬ１）、補体Ｉ因子（ＣＦＩ）およびＣ４結合タンパク質（Ｃ４ＢＰ））、その３種は細胞膜結合型（膜コファクタータンパク質（ＭＣＰ、ＣＤ４６）、分解促進因子（ＤＡＦ、ＣＤ５５）および補体受容体１（ＣＲ１、ＣＤ３５））である（Ａｐｐｅｌら、２００５；Ｍｅｒｉら、１９９４；Ｐａｓｃｕａｌら、１９９４）。

【０３４７】

ＭＰＧＮＩＩ／ＤＤＤと特に関連があるものはＨ因子であり、これはＨ因子ファミリーにおける７つのタンパク質の１つである。ブタおよびマウスにおいては、その欠損は、光学顕微鏡または電子顕微鏡のレベルにおいてＭＰＧＮＩＩ／ＤＤＤに類似する腎臓疾患の発症と関連し、ヒトにおいては、その欠損ならびにＨ因子遺伝子の突然変異は、ＭＰＧＮＩＩ／ＤＤＤを有する患者において報告されてきた（Ｍｅｒｉら、１９９４；Ｄｒａｇｅｎ－Ｄｕｒｅｙら、２００４；Ｚｉｐｆｅｌら、２００５）（図１４）。

【０３４８】

Ｈ因子ファミリーの他の６種のメンバーには、Ｈ因子のスプライシングアイソフォームであるＦＨＬ１、および別個の遺伝子（ＣＦＨＲ１～５）によってコードされる５種のＣＦＨ関連タンパク質が含まれる。後者の５種のタンパク質についてはほとんど知られていないが、これらは、Ｈ因子に対する種々の程度の構造類似性を示す（Ａｐｐｅｌら、２００５）。ＭＰＧＮＩＩ／ＤＤＤに関連して、この群の中で最も興味深いものはＣＦＨＲ５である。なぜなら、これは、Ｈ因子に対して最高の類似性を示し、かつ他の型の糸球体腎炎を有する患者の腎生検において実証されたからである（Ａｐｐｅｌら、２００５；Ｍｕｒｐｈｙら、２００２）。インビトロ研究はまた、Ｖが、補体攻撃に曝される表面上に存在することを示し、補体カスケードにおける考えられる役割を示唆する（Ｍｕｒｐｈｙら、２００２）。

【０３４９】
Ｆａｃｔｏｒ Ｈ／ＣＦＨＲ５とＭＰＧＮＩＩ／ＤＤＤとの間の可能性のある関係は、ＭＰＧＮＩＩ／ＤＤＤを有する患者がドルーゼンと呼ばれる眼表現型を発症するという観察によってさらに強化される。ドルーゼンは、網膜色素上皮の下の眼のブルーフ膜の中の網膜における異常な細胞外沈着物の沈着から生じる。ＭＰＧＮＩＩ／ＤＤＤのドルーゼンは、高齢者の視力障害の最も一般的な型である加齢性黄斑変性（ＡＭＤ）（Ｋｌｅｉｎら、２００４；ｖａｎ Ｌｅｅｕｗｅｎら、２００３）における型のドルーゼンと、臨床的かつ組成的に区別不可能である（Ｍｕｌｌｉｎｓら、２００１；Ａｎｄｅｒｓｏｎら、２００２）。これらの２つの型のドルーゼンを区別する唯一の特徴は、発症の年齢であり、ＭＰＧＮＩＩ／ＤＤＤにおけるドルーゼンは早期に、しばしば、１０歳代において発症するのに対して、ＡＭＤにおけるドルーゼンは高齢者において見出される。

【０３５０】
４つの最近の研究は、因子の特異的アレル変異体をＡＭＤと関連付けており、補体の代替経路のＨ因子媒介調節におけるかすかな違いが、ＡＭＤの症例のかなりの割合において役割を果たし得ることを示唆する（Ｈａｇｅｍａｎら、２００５；Ｅｄｗａｒｄｓら、２００５；Ｈａｉｎｅｓら、２００５；Ｋｌｅｉｎら、２００５）。これらの研究の１つはまた、ＭＰＧＮＩＩ／ＤＤＤ患者およびＡＭＤ患者が、同じＨ因子リスクアレルのいくつかを分離することを示した（Ｈａｇｅｍａｎら、２００５）。本研究において、本発明者は、Ｈ因子およびＣＦＨＲ５のアレルの変異の、ＭＰＧＮＩＩ／ＤＤＤとの関連を絞り込むことを追求した。

【０３５１】
材料および方法
患者および対照。生検で判明したＭＰＧＮＩＩ／ＤＤＤを有する患者は、腎臓病学部門において確認され、ＩＲＢ認可ガイドラインの下で本研究に加入させた。対照群は、眼科的試験によってＡＭＤが除外された、民族的に適合させられたが、年齢が一致しない、血縁関係のないヒトから確認した。

【０３５２】
変異のスクリーニングおよび分析。Ｈ因子およびＣＦＨＲ５のコード領域および隣接するイントロン領域を、９４℃変性、６１℃アニーリングおよび７０℃伸長における各々３０秒間の３５サイクルでＰＣＲ増幅した。Ｈ因子およびＣＦＨＲ５のコード配列を増幅するために使用したプライマーの配列は、表１０および１１にそれぞれ示す。産物の生成は、アガロースゲル電気泳動によって確認し、次いで、ＭＰＧＮＩＩ／ＤＤＤを有する患者におけるアンプリコンを二方向的に配列決定した。データマイニング（Ｅｎｓｅｍｂｌｅ ｄａｔａｂａｓｅ，ｄｂＳＮＰ，Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を通して同定したすべての新規なおよび報告されたＳＮＰを、変性高速液体クロマトグラフィー（ＤＨＰＬＣ）によって、対照集団中で型決定した（表９および１０）。手短に述べると、各アンプリコンのＤＨＰＬＣ分析は、３つの異なる温度で実施した。アンプリコンは、Ｗａｖｅｍａｋｅｒソフトウェアを使用して分析し、最適温度、実行時間およびアセトニトリル勾配を見積もった。予測温度は＋／－２℃で括弧書きし、感度を最適化し、新規な突然変異が検出される確率を最大化した（Ｐｒａｓａｄら、２００４）。

【０３５３】
ハプロタイプ分析。ハプロタイプの分布を有するブロック構造の構築は、ｔｈｅ Ｗｈｉｔｅｈｅａｄ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅにおいて開発された公的に利用可能なソフトウェアプログラムであるＨａｐｌｏｖｉｅｗ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｂｒｏａｄ．ｍｉｔ．ｅｄｕ／ｍｐｇ／ｈａｐｌｏｖｉｅｗ／）（Ｂａｒｒｅｔｔらを参照のこと）を使用して完成した。１つは各対照の性別および遺伝子型からなり、他方はＳＮＰ同定および染色体位置を含むマーカー情報を記載する２つのデータセットを、エクセルファイル中で同じにし、これをＨａｐｌｏｖｉｅｗプログラムにアップロードした。出力は、連鎖不均衡（ＬＤ）プロットおよび交叉のパーセンテージを伴う対応する集団の頻度からなった。

【０３５４】

統計学的分析。カイ二乗独立性検定を、ＭＰＧＮＩＩ／ＤＤＤを有する患者と対照との間のＳＮＰ頻度の違いを検出するために使用した。Ｐ値≦０．０５を有意と見なした。Ｈ因子およびＣＦＨＲ５についてのＬＤプロットは対照集団を使用して作製した。

【０３５５】

結果

患者および対照。生検で判明したＭＰＧＮＩＩ／ＤＤＤを有する２２例の患者および１３１例のＡＭＤを有しない人を本研究に参加させた。対照群の平均年齢は７８．４歳であり、ＡＭＤを除外するための本発明者らの確認判断基準を反映した。

【０３５６】

Ｈ因子、ＣＦＨＲ５およびＭＰＧＮＩＩ／ＤＤＤ。ＭＰＧＮＩＩ／ＤＤＤ患者群および対照集団において遺伝子型決定した７つのＨ因子ＳＮＰのうちの４つのアレル頻度が、ｐ＜０．０５でＭＰＧＮＩＩ／ＤＤＤ疾患表現型との有意な関連を示した。これらのＳＮＰは、エキソン２　１６２Ｖ、ＩＶＳ　２－１８ｉｎｓＴＴ、エキソン９　Ｙ４０２Ｈおよびエキソン１０　Ａ４７３Ａを含んだ。エキソン７　Ａ３０７Ａ、エキソン１３　Ｑ６７２Ｑおよびエキソン１８　Ｄ９３６Ｅについてのアレル頻度は、群間で有意な違いはなかった（表１１～１３）。

【０３５７】

１つの非同義語ＳＮＰ（エキソン２　Ｐ４６Ｓ）２つのプロモーターＳＮＰ（－２４９Ｔ＞Ｃ、－２０Ｔ＞Ｃ）および２つのイントロンＳＮＰ（ＩＶＳ１＋７５Ｔ＞Ａ、ＩＶＳ２＋５８Ｃ＞Ｔ）を含む、５つのＣＦＨＲ５　ＳＮＰを、ＭＰＧＮＩＩ／ＤＤＤ患者群および対照集団において遺伝子型決定した。３つのＳＮＰ－エキソン２　Ｐ４６Ｓ、－２４９Ｔ＞Ｃおよび－２０Ｔ＞Ｃ－のアレル頻度は、ｐ＜０．０５で群間で有意な違いがあった（表１４および１５）。

【０３５８】

ハプロブロック。ハプロタイプブロックは、Ａ３０７ＡおよびＹ４０２ＨがＨ因子において連鎖不均衡にあるのに対し、－２４９Ｔ＞Ｃおよび－２０Ｔ＞ＣはＣＦＨＲ５において連鎖不均衡にあることを示した（図１５）。

【０３５９】

考察

補体の代替経路は、病原体から人を防御するための洗練された系を表す。その中心的な成分であるＣ３は、血漿中で高濃度で循環し、体液全体に分配される（Ｗａｌｐｏｒｔ、２００１）。その活性化は、外来性の表面を損傷させる毒性の局所的環境を作製し、微生物の除去を生じる。制限されない補体活性化を妨害するために、宿主細胞および組織表面は、表面結合および膜結合の補体の調節因子の組み合わせを使用して、増幅ループをダウンレギュレートする。ある宿主細胞は高コピー数で単一の補体の膜結合調節因子を発現するのに対して、他の細胞は、いくつかの膜結合調節因子を発現し、また可溶性流体相調節因子を結合する。いくつかの組織は膜結合調節因子を欠き、可溶性調節因子の結合のみに依存している（Ａｐｐｅｌら、２００５）。

【０３６０】

腎臓においては、内皮細胞およびメサンギウム細胞が、２種の膜結合の補体の調節因子、ＭＣＰおよびＤＡＦを発現する（ｖａｎ　ｄｅｎ　Ｄｏｂｂｅｌｓｔｅｅｎら、１９９４；Ｔｉｍｍｅｒｍａｎら、１９９６）。有足細胞は４種：ＭＣＰ、ＤＡＦ、ＣＲ１およびＣＤ５９を発現する。メサンギウム細胞と有足細胞の両方はまた、可溶性調節因子、Ｈ因子を分泌し、これは、補体活性化および炎症に応答して、膜性腎症においてアップレギュレートされる（Ａｎｇａｋｕら、１９９８；Ｂａｏら、２００２）。Ｈ因子は、分泌メサンギウム細胞および有足細胞に直接的に結合することによって、オートクリン様式で作用する。

【０３６１】

ＧＢＭは、対照的に独特である。これは、補体媒介損傷からこれを防御するための内因性膜結合調節因子を欠くが、その高度に負に荷電した表面はＨ因子を結合しかつ吸収する

（Ｚｉｐｆｅｌら、２００５）。局所的補体制御のためのH因子へのＧＢＭの依存性は、ＭＰＧＮＩＩ／ＤＤＤを有する数人の人のH因子における病理学的突然変異の知見と一貫している（Ａｕｌｔら、１９９７；Ｄｒａｇｅｎ－Ｄｕｒｅｙら、２００４）。

【０３６２】

ＭＰＧＮＩＩ／ＤＤＤと関連しているH因子およびＣＦＨＲ５のいくつかのアレル変異体を同定する本発明者らのデータは、補体制御がこの疾患の病因において役割を果たすという仮説と一致している。報告されたＡＭＤのデータと、本発明者らのデータの比較は、さらなる裏付けを加える。本発明者らがH因子において観察した同定されたアットリスクＳＮＰ変異体の各々についてのアレル頻度は、ＡＭＤ患者コホートにおいてよりも、ＭＰＧＮＩＩ／ＤＤＤ患者コホートにおいてより高く、強力な証拠がＡＭＤ中でH因子を関係付ける（Ｈａｇｅｍａｎら、２００５；Ｅｄｗａｒｄｓら、２００５；Ｈａｉｎｅｓら、２００５；Ｋｌｅｉｎら、２００５）。H因子のエキソン２および９のアミノ酸変化が機能に影響を与えるか否かは未知であるが、これらの変化は、Ｃ３ｂおよびヘパリンと相互作用するドメイン中で見出され、Ｃ３ｂ／Ｃ３ｄおよびヘパリンの結合における違いは、別の腎臓疾患、非定型的溶血性尿毒症性症候群と関連するH因子のいくつかのアミノ酸変化を用いて実証された。（Ｍａｎｕｅｌｉａｎら、２００３）（表１２および１３）。

【０３６３】

H因子を例外として、H因子関連ファミリーの他のメンバーの機能は大部分が未知であり、それらの発現パターンは探索されていないが、ＣＦＨＲ５の研究は、これがヘパリン、ＣＲＰおよびＣ３ｂ結合を含む、H因子に類似する特性を有することを示した（Ｍｕｒｐｈｙら、２００２）（図１４）。この類似性は、H因子と同様に、ＣＦＨＲ５がＭＰＧＮＩＩ／ＤＤＤにおいて役割を果たすことを示唆する。これは、ＭＰＧＮＩＩ／ＤＤＤを有する２例の患者からの腎生検におけるＣＦＨＲ５発現の本発明者らの知見と一致する（データ示さず）。

【０３６４】

本発明者らの遺伝子型決定データは、ＣＦＨＲ５のいくつかのアレル変異体が、ＭＰＧＮＩＩ／ＤＤＤ疾患表現型と優先的に関連することを示す。ＣＦＨＲ５のプロモーター領域中に２つのＳＮＰが含まれ、これらは、１つはＣ／ＥＢＰβについての結合部位を除去することによって、他方はＧＡＴＡ－１結合部位を加えることによって、転写に影響を与え得る。他の有意な関連は、エキソン２におけるプロリンをセリンに変化する。ＣＦＨＲ５のエキソン１および２は、ヘパリンおよびＣＲＰ結合のために完全である、H因子の短いコンセンサスリピート６（ＳＣＲ６）に対して相同なドメインをコードするので、この変化は、補体の活性化および制御に影響を与え得る。

【０３６５】

実施例３

H因子タンパク質の防御型の産生

例示的な防御型のヒト補体H因子（ＣＦＨ）を、ハプロタイプＨ２に基づいて調製した（図５）。手短に述べると、ＲＮＡは、４例のドナーの眼組織（ＲＰＥ／脈絡膜複合体）から単離した。ＲＮＡは、以下のプライマーを使用して、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応によって増幅した：

５’－ＧＡＡＧＡＴＴＧＣＡＡＴＧＡＡＣＴＴＣＣＴＣＣＡＡＧ－３’［配列番号３３１］

５’－ＡＡＧＴＴＣＴＧＡＡＴＡＡＡＧＧＴＧＴＧＣ－３’［配列番号３３２］

ＲＴ－ＰＣＲ反応は、製造業者（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）によって記載されるように、Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ ＩＩＩ Ｏｎｅ－Ｓｔｅｐ Ｈｉｇｈ Ｆｉｄｅｌｉｔｙ ｗｉｔｈ Ｐｌａｔｉｎｕｍ Ｔａｑを使用して実施した。適切なサイズの産物（３，７６９ｂｐ）をアガロースゲルから切り出し、スピンカラムを使用して単離した。

【０３６６】

ＰＣＲ産物を、製造業者（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）によって推奨されるように、ＴＯＰ

Ｏ－ＴＡクローニングシステムを使用して、ベクターｐＣＲ２．１－ＴＯＰＯにクローニングした。４例の各々の患者に由来するクローンの完全な遺伝子配列を、直接的配列決定によって決定した。１例の患者（患者番号４９８－０１）に由来するＤＮＡは、例示的な保護的参照配列（Ｈ２）のそれと比較して、最も少ない数のヌクレオチド多型を有したが、このＤＮＡは、４０２位のアミノ酸（ヒスチジン）のリスク配列をコードし、６２位のアミノ酸にバリンをコードしていた。防御型のＣＦＨをコードする遺伝子を調製するために、本発明者らは、ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ　Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓシステム（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）を使用して、６２位のアミノ酸をコードする塩基がイソロイシンをコードするように、４０２位のアミノ酸をコードする塩基がチロシンをコードするように変化させ、配列番号３３５を得た。このタンパク質の１２１０位のアミノ酸はアルギニンである。利用したオリゴヌクレオチドは以下の通りであった（および適切なアンチセンスバージョン）：

６２：５’－ＴＡＴＡＧＡＴＣＴＣＴＴＧＧＡＡＡＴＡＴＡＡＴＡＡＴＧＧＴＡＴＧＣＡＧＧ－３’［配列番号３３３］

４０２：　５’－ＡＴＧＧＡＴＡＴＡＡＴＣＡＡＡＡＴＴＡＴＧＧＡＡＧＡＡＡＧＴＴＴＧＴＡＣ－３’［配列番号：３３４］

導入した突然変異の忠実度は、遺伝子全体の直接的配列決定によって確認した。得られた防御的遺伝子は、真核生物発現ベクターｐｃＤＮＡ３．１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に、サイトメガロウイルスプロモーターの制御下でクローニングした。この発現ベクターは、Ｅｘｇｅｎ　５００トランスフェクション試薬（Ｆｅｒｍｅｎｔａｓ，Ｈａｎｏｖｅｒ，ＭＤ）を使用して、ヒト肺癌腫細胞株Ａ５４９（ＡＴＣＣ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）にトランスフェクトした。トランスフェクションに続き、細胞を無血清培地（Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ，Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中で増殖させた。

【０３６７】

上清をトランスフェクションの４８時間後に採取し、ウェスタンブロット分析に供した。適切なサイズの産物（約１５０ｋＤａ）の存在を、ヒトＣＦＨに対して指向されるモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体（Ｑｕｉｄｅｌ，ＳａｎＤｉｅｇｏ，ＣＡ）を使用して確認した。

患者番号４９８－０１（６２Ｉ、４０２Ｙ）ＣＦＨ遺伝子［配列番号３３５］

【０３６８】

【化３】

AGTTAGCTGGTAAATGTCCTCTTAAAAGATCCAAAAAATGAGACTTCTAG
CAAAGATTATTTGCCTTATGTTATGGGCTATTTGTGTAGCAGAAGATTGC
AATGAACTTCCTCCAAGAAGAAATACAGAAATTCTGACAGGTTCCTGGTC
TGACCAAACATATCCAGAAGGCACCCAGGCTATCTATAAATGCCGCCCTG
GATATAGATCTCTTGGAAATATAATAATGGTATGCAGGAAGGGAGAATGG
GTTGCTCTTAATCCATTAAGGAAATGTCAGAAAAGGCCCTGTGGACATCC
TGGAGATACTCCTTTTGGTACTTTTACCCTTACAGGAGGAAATGTGTTTG
AATATGGTGTAAAAGCTGTGTATACATGTAATGAGGGGTATCAATTGCTA
GGTGAGATTAATTACCGTGAATGTGACACAGATGGATGGACCAATGATAT
TCCTATATGTGAAGTTGTGAAGTGTTTACCAGTGACAGCACCAGAGAATG
GAAAAATTGTCAGTAGTGCAATGGAACCAGATCGGGAATACCATTTTGGA
CAAGCAGTACGGTTTGTATGTAACTCAGGCTACAAGATTGAAGGAGATGA
AGAAATGCATTGTTCAGACGATGGTTTTTGGAGTAAAGAGAAACCAAAGT
GTGTGGAAATTTCATGCAAATCCCCAGATGTTATAAATGGATCTCCTATA
TCTCAGAAGATTATTTATAAGGAGAATGAACGATTTCAATATAAATGTAA
CATGGGTTATGAATACAGTGAAAGAGGAGATGCTGTATGCACTGAATCTG
GATGGCGTCCGTTGCCTTCATGTGAAGAAAAATCATGTGATAATCCTTAT
ATTCCAAATGGTGACTACTCACCTTTAAGGATTAAACACAGAACTGGAGA
TGAAATCACGTACCAGTGTAGAAATGGTTTTTATCCTGCAACCCGGGGAA
ATACAGCAAAATGCACAAGTACTGGCTGGATACCTGCTCCGAGATGTACC
TTGAAACCTTGTGATTATCCAGACATTAAACATGGAGGTCTATATCATGA
GAATATGCGTAGACCATACTTTCCAGTAGCTGTAGGAAAATATTACTCCT
ATTACTGTGATGAACATTTTGAGACTCCGTCAGGAAGTTACTGGGATCAC
ATTCATTGCACACAAGATGGATGGTCGCCAGCAGTACCATGCCTCAGAAA
ATGTTATTTTCCTTATTTGGAAAATGGATATAATCAAAATTATGGAAGAA
AGTTTGTACAGGGTAAATCTATAGACGTTGCCTGCCATCCTGGCTACGCT
CTTCCAAAAGCGCAGACCACAGTTACATGTATGGAGAATGGCTGGTCTCC
TACTCCCAGATGCATCCGTGTCAAAACATGTTCCAAATCAAGTATAGATA
TTGAGAATGGGTTTATTTCTGAATCTCAGTATACATATGCCTTAAAAGAA
AAAGCGAAATATCAATGCAAACTAGGATATGTAACAGCAGATGGTGAAAC
ATCAGGATCAATTACATGTGGGAAAGATGGATGGTCAGCTCAACCCACGT
GCATTAAATCTTGTGATATCCCAGTATTTATGAATGCCAGAACTAAAAAT
GACTTCACATGGTTTAAGCTGAATGACACATTGGACTATGAATGCCATGA
TGGTTATGAAAGCAATACTGGAAGCACCACTGGTTCCATAGTGTGTGGTT
ACAATGGTTGGTCTGATTTACCCATATGTTATGAAAGAGAATGCGAACTT

【０３６９】

【化４】

CCTAAAATAGATGTACACTTAGTTCCTGATCGCAAGAAAGACCAGTATAA
AGTTGGAGAGGTGTTGAAATTCTCCTGCAAACCAGGATTTACAATAGTTG
GACCTAATTCCGTTCAGTGCTACCACTTTGGATTGTCTCCTGACCTCCCA
ATATGTAAAGAGCAAGTACAATCATGTGGTCCACCTCCTGAACTCCTCAA
TGGGAATGTTAAGGAAAAAACGAAAGAAGAATATGGACACAGTGAAGTGG
TGGAATATTATTGCAATCCTAGATTTCTAATGAAGGGACCTAATAAAATT
CAATGTGTTGATGGAGAGTGGACAACTTTACCAGTGTGTATTGTGGAGGA
GAGTACCTGTGGAGATATACCTGAACTTGAACATGGCTGGGCCCAGCTTT
CTTCCCCTCCTTATTACTATGGAGATTCAGTGGAATTCAATTGCTCAGAA
TCATTTACAATGATTGGACACAGATCAATTACGTGTATTCATGGAGTATG
GACCCAACTTCCCCAGTGTGTGGCAATAGATAAACTTAAGAAGTGCAAAT
CATCAAATTTAATTATACTTGAGGAACATTTAAAAAACAAGAAGGAATTC
GATCATAATTCTAACATAAGGTACAGATGTAGAGGAAAAGAAGGATGGAT
ACACACAGTCTGCATAAATGGAAGATGGGATCCAGAAGTGAACTGCTCAA
TGGCACAAATACAATTATGCCCACCTCCACCTCAGATTCCCAATTCTCAC
AATATGACAACCACACTGAATTATCGGGATGGAGAAAAAGTATCTGTTCT
TTGCCAAGAAAATTATCTAATTCAGGAAGGAGAAGAAATTACATGCAAAG
ATGGAAGATGGCAGTCAATACCACTCTGTGTTGAAAAAATTCCATGTTCA
CAACCACCTCAGATAGAACACGGAACCATTAATTCATCCAGGTCTTCACA
AGAAAGTTATGCACATGGGACTAAATTGAGTTATACTTGTGAGGGTGGTT
TCAGGATATCTGAAGAAAATGAAACAACATGCTACATGGGAAAATGGAGT
TCTCCACCTCAGTGTGAAGGCCTTCCTTGTAAATCTCCACCTGAGATTTC
TCATGGTGTTGTAGCTCACATGTCAGACAGTTATCAGTATGGAGAAGAAG
TTACGTACAAATGTTTTGAAGGTTTTGGAATTGATGGGCCTGCAATTGCA
AAATGCTTAGGAGAAAAATGGTCTCACCCTCCATCATGCATAAAAACAGA
TTGTCTCAGTTTACCTAGCTTTGAAAATGCCATACCCATGGGAGAGAAGA
AGGATGTGTATAAGGCGGGTGAGCAAGTGACTTACACTTGTGCAACATAT
TACAAAATGGATGGAGCCAGTAATGTAACATGCATTAATAGCAGATGGAC
AGGAAGGCCAACATGCAGAGACACCTCCTGTGTGAATCCGCCCACAGTAC
AAAATGCTTATATAGTGTCGAGACAGATGAGTAAATATCCATCTGGTGAG
AGAGTACGTTATCAATGTAGGAGCCCTTATGAAATGTTTGGGGATGAAGA
AGTGATGTGTTTAAATGGAAACTGGACGGAACCACCTCAATGCAAAGATT
CTACAGGAAAATGTGGGCCCCCTCCACCTATTGACAATGGGGACATTACT
TCATTCCCGTTGTCAGTATATGCTCCAGCTTCATCAGTTGAGTATCAATG
CCAGAACTTGTATCAACTTGAGGGTAACAAGCGAATAACATGTAGAAATG
GACAATGGTCAGAACCACCAAAATGCTTACATCCGTGTGTAATATCCCGA
GAAATTATGGAAAATTATAACATAGCATTAAGGTGGACAGCCAAACAGAA
GCTTTATTCGAGAACAGGTGAATCAGTTGAATTTGTGTGTAAACGGGGAT
ATCGTCTTTCATCACGTTCTCACACATTGCGAACAACATGTTGGGATGGG
AAACTGGAGTATCCAACTTGTGCAAAAAGATAGAATCAATCATAAAGTGC
ACACCTTTATTCAGAACTT

【０３７０】

【表１Ａ】

表 1A

dbSNP 番号	位置	多型に及ぶ配列	配列番号	アミノ酸変化	アレル頻度、対照	アレル頻度、AMD	カイ２およびP値
	プロモーター 1	GGGGTTTTCTGGGATGTAAT[A/G]ATGTTCAGTGTTTTGACCTT CCCCAAAAGACCCTACATTA[T/C]TACAAGTCACAAAACTGGAA	9		1-0.944 : 2-0.056	1-0.96 : 2-0.04	
rs3753394	プロモーター 4	TTATGAAATCCAGAGGATAT[C/T]ACCAGCTGCTGATTTGCACA AATACTTTAGGTCTCCTATA[G/A]TGGTCGACGACTAAACGTGT	10		1-0.31 : 2-0.69	1-0.25 : 2-0.75	6.485 : 0.039
rs529825	イントロン 1	AGTCCAAGTTTACACAGTAC[G/A]ATAGACTTACCCATTGCCAA TCAGTTCAAATGTGTCATG[C/T]TATCTGAATGGGTAACGGTT	11		1-0.74 : 2-0.26	1-0.84 : 2-0.16	26.07 : 2.18E-06
rs800292	エキソン 2	GATATAGATCTCTTGGAAAT[G/A]TAATAATGGTATCCAGGAAG CTATATCTAGAGAACCTTTA[C/T]ATTATTACCATACAGTCCTTC	12	I62V	1-0.78 : 2-0.22	1-0.91 : 2-0.09	16.19 : 5.74E-05
	イントロン 2	TAATTCATAACTTTTTTTTTT[-/TT]CGTTTAGAAAGGCCCTGTG ATTAAGTATTGAAAAAAAAA[-/AA]GCAAAATCTTTCCGGGACAC	13		1-0.77 : 2-0.23	1-0.89 : 2-0.11	22.19 : 2.47E-06
rs3766404	イントロン 6	AAAGGATACATTTAGGACT[C/T]ATTTGAGTTAGTGTCAACA TTTCCTTATGTAAATCCTGA[G/A]TAAACTTCAATCACAGTTGT	14		1-0.83 : 2-0.17	1-0.91 : 2-0.09	23.82 : 6.71E-06
rs1061147	エキソン 7	CAACCCGGGGAAATACAGC[A/C]AAATGCACAAGTACTGGCTG GTTGGGCCCCTTTATGTCG[T/G]TTACGTGTTCATGACCGAC	15	A307A	1-0.34 : 2-0.66	1-0.59 : 2-0.41	50.39 : 1.26E-12
rs1061170	エキソン 9	AAAATGGATATAATCAAAAT[T/C]ATGGAAGAAAGTTTGTACAG TTTTACCTATATTAGTTTTA[A/G]TACCTTCTTTCAAACATGTC	16	Y402H	1-0.66 : 2-0.34	1-0.46 : 2-0.54	55.20 : 1.03E-12
rs2274700	エキソン 10	TATGCCTTAAAAGAAAAAGC[G/A]AAATATCAATGCAAACTAGG ATACGGAATTTCTTTTTCG[C/T]TTTATAGTTACGTTTGATCC	17	A473A	1-0.54 : 2-0.46	1-0.80 : 2-0.20	36.48 : 1.55E-09
	エキソン 10A	CAGCTTGAGTGGATCAAAGA[-/N]TGACAAGGGCCAATGGAACC GTCGAACTCACCTAGTTTCT[-/N]ACTGTTCCCGGTTACCTTGG	18		1-1.00 : 2-0.00	1-0.933 : 2-0.067	
rs203674	イントロン 10	ACGGTACCTATTTATTAGTA[G/T]ATCTAATCAATAAAGCTTT TGCCATGGATAAATAATCAT[C/A]TAGATTAGTTATTTCGAAA	19		1-0.66 : 2:0.34	1-0.44 : 2-0.56	66.97 : 2.86E-15
rs203674	イントロン 10*	AAAAGCTTTATTGATTAGAT[A/C]TACTAATAAATAGGTACCGT	63		1-0.66 : 2:0.34	1-0.44 : 2-0.56	66.97 : 2.86E-15
rs3753396	エキソン 13	AAGGGACCTAATAAAATTCA[A/G]TGTGTTGATGGAGATGGAC TTCCCTGGATTATTTAAGT[T/C]ACACAACTACCTCTCACCTG	20	Q672Q	1-0.84 : 2-0.16	1-0.86 : 2-0.14	0.308 : 0.579
rs375046	イントロン 15	TTTTTTATTTTTTATTATAA[C/A]ATTAATTATATTTTTAATAT AAAAAATAAAAAAATAATATT[G/T]TAATTAATATAAAAATTATA	21		1-0.67 : 2-0.31	1-0.85 : 2-0.14	
rs1065489	エキソン 18	CCTTGTAAATCTCCACCTGA[G/T]ATTTCTCATGCTGTTGTAGC GGAACATTTAGAGGTGGACT[C/A]TAAAGAGTACCACAACATCG	22	D936E	1-0.87 : 2-0.13	1-0.85 : 2-0.15	0.165 : 0.684
	エキソン 22	GGGGATATCGTCTTTCATCA[C/T]GTTCTCACACATTGCGAACA CCCCTATAGCAGAAAGTAGT[G/A]CAAGAGTGTGTAACGCTTGT	23	R1210C	1-1.00 : 2-0.00	1-0.95 : 2-0.05	

(*) ゲノム配列の非コード鎖を示す

【０３７１】

【表１Ｂ】

表 1B

(1)

SNP 名	配列番号	チャンジー	位置	AA
rs3753394	24	C	プロモーター	
rs529825	25	T	イントロン 1	
rs800292	26	T	エキソン 2	I 62V
イントロン 2 insTT	27		イントロン 2	
rs3766404	28	C	イントロン 6	
rs1061147	29	A	エキソン 7	A307A
rs1061170	30	T	エキソン 9	Y402H
rs2274700	31	G	エキソン 10	A473A
rs203674	32	A	イントロン 10	
rs3753396	33	A	エキソン 13	Q672Q
rs1065489	34	G	エキソン 18	D936E

(2)

SNP 名	フォワードプライマーまたは AOD 番号	配列番号	リバースプライマー	配列番号
rs3753394	C_2530387_10			
rs529825	C_2250476_10			
rs800292	C_2530382_10			
イントロン 2 insTT	ACTTGTTCCCCCACTCCTAC	36	CCTCTTTTCGTATGGACTAC	36
rs3766404	C_11890065_10			
rs1061147	TGAAATCACGTACCAGTGTAGAAATGG	37	CAGGTATCCAGCCAGTACTTGT	38
rs1061170	CTTTATTTATTTATCATTGTTATGGTCCTTAGGAAAATGTTATTT	39	GGCAGGCAACGTCTATAGATTTACC	40
rs2274700	TCACCATCTGCTGTTACATATCCTAGT	41	TGGGTTTATTTCTGAATCTCAGTATACATATGC	42
rs203674	C_2530311_10			
rs3753396	C_2530296_10			
rs1065489	C_2530274_10			

(3)

SNP 名	VIC プローブ	配列番号	FAM プローブ	配列番号
rs1061147	AATACAGCAAAATGC	43	ATACAGCCAAATGC	46
rs1061170	TTTCTTCCATGATTTTG	44	TTCTTCCATAATTTTG	47
rs2274700	AAGAAAAAGCGAAATAT	45	AAGAAAAAGCAAAATAT	48

【０３７２】

【表１Ｃ】

表 1C

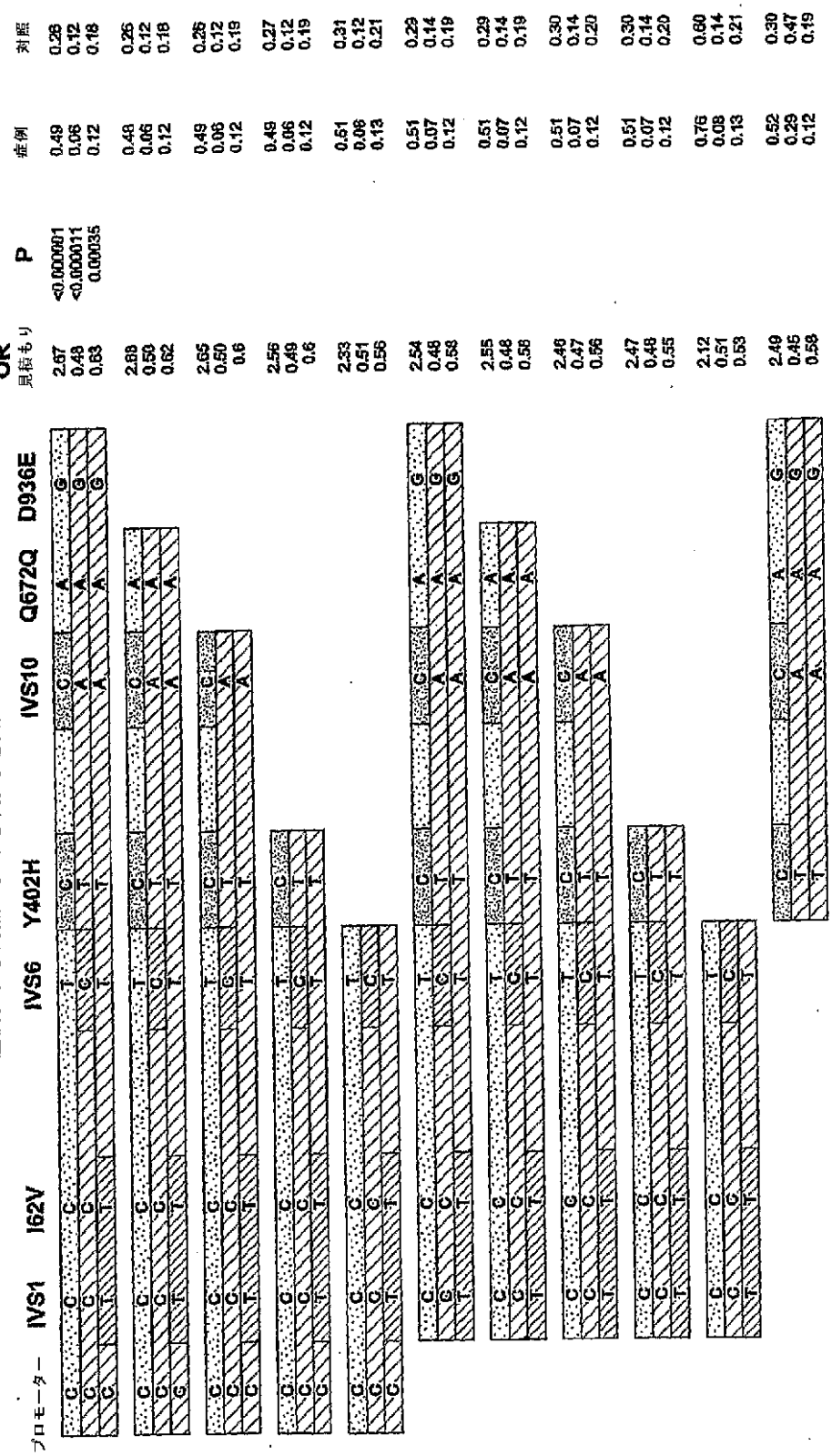
位置	多型に及ぶ配列	アミノ酸位置	配列番号
エキソン2	CCAGGCTATCTATAAATGCC [G/A] CCCTGGATATAGATCTCTTG	R53H	49
エキソン3	TTGGTACTTTTACCCTTACA [G/T] GAGGAAATGTGTTTTGAATAT	G100R	50
エキソン5	ACGATGGTTTTTGGAGTAAA[G/G(ではない)]AGAAACCAAAGTGTGTGGGT	201	51
エキソン6	TTATTTATAAGGAGAATGAA [C/C(ではない)]GATTTCAATATAAATGTAAC	R232X	52
エキソン6	CACTGAATCTGGATGGCGTC [C/C(ではない)]GTTGCCTTCATGTGAAG (終了 エキソン6)	258	53
エキソン8	AAGATGGATGGTCGCCAGCA [G/C] [-/C] TACCATGCCTCA (終了 エキソン8)	V383L	54
エキソン16	ACAATTATGCCCACCTCCAC [C/G] TCAGATTCCCAATTCTCACA	815	55
エキソン17	CAACCACCTCAGATAGAACA [C/T] GGAACCATTAATTCATCCAG	H878H	56
エキソン17	GTCTTCACAAGAAAGTTATG [C/T] ACATGGGACTAAATTGAGTT	A892V	57
エキソン18	CACATGTCAGACAGTTATCA [G/T] TATGGAGAAGAAGTTACGTA	Q950H	58
エキソン18	TCAGTATGGAGAAGAAGTTA [C/T] GTACAAATGTTTTGAAGGTT	S956L	59
イントロン18	(開始 IVS18) GTATGG [G/T] GCATTGAATTTTATTATATG		60
エキソン20	(開始 エキソン 20) ACACCTCCTGTGTG [A/T] ATCCGCCCACAGTACAAAAT	N1050Y	61
エキソン21	CTTGTATCAACTTGAGGGTA [-/N] A [-/N] CAAGCGAATAACATGTAGAAA	1147	62

【０３７３】

【表２】

表 2

AMD症例および対照におけるHF1 SNPのハプロタイプ分析



【０３７４】

【表３】

表 3

rs3753394 プロモーター	rs529825 イントロン 1	rs3766404 イントロン 6	rs203674 イントロン 10	rs3753396 エキソン 13	rs1065489 エキソン 18	ハプロタイプ	頻度、対照	頻度、AMD
1	1	1	2	1	1	111211	0.28436	0.478059
1	2	1	1	1	1	121111	0.210856	0.131313
2	1	1	1	2	2	211122	0.149247	0.126697
1	1	2	1	1	1	112111	0.129893	0.061917
2	1	1	1	1	1	211111	0.094861	0.07125
2	1	1	2	1	1	211211	0.046438	0.06834
1	2	2	1	1	1	122111	0.026677	0.014859
2	1	2	1	1	1	212111	0.012731	0.01473
1	1	1	1	1	1	111111	0.012686	0.007305
1	2	1	2	1	1	121211	0.012684	0.004723
1	2	1	1	2	2	121122	0.009249	0.000945
1	1	1	1	2	2	111122	0.007487	0.008705
2	1	2	1	2	1	212121	0.002049	
1	2	2	2	1	1	122211	0.00078	0.000488
2	1	2	1	2	2	212122	0.000001	
2	2	1	2	1	2	211212		0.002175
2	1	1	1	1	2	211112		0.001869
2	2	1	1	1	1	221111		0.00169
2	1	2	2	1	1	212211		0.001061
1	2	1	2	2	2	121222		0.00096
1	1	2	1	2	1	112112		0.00095
2	1	1	1	1	1	211121		0.00095
2	1	2	2	2	2	212212		0.00069
2	2	1	2	1	1	221211		0.000322
1	2	2	1	1	2	122112		0.000001

【０３７５】

表 4

HF1 SNP の加齢性黄斑変性との関連

		プロモーター rs3753394	IVS1 rs529825	エキソン 2 I62V	IVS2 insTT	IVS6 rs3766404	エキソン 7/9 A307A/Y402H	エキソン 10 A473A	IVS10 rs203674	エキソン 13 Q672Q	エキソン 18 D936E
アイオワ	対照数			68	126		131	68		129	67
	症例数			228	390		404	221		404	223
	X2			15	22.21		49.4	35.14		0.21	0.64
	P			0.000108	$2.44X10^{-06}$		$2.09X10^{-12}$	$3.07X10^{-09}$		0.65	0.8
	OR			2.79	2.38		2.82	3.42		1.12	0.89
	95%CI			1.67-4.65	1.65-3.44		2.11-3.78	2.27-5.15		0.76-1.64	0.51-1.56
コロンビア	対照数	126	266	261	273	271	272	264	264	265	264
	症例数	329	547	546	549	546	549	542	545	545	536
	X2	8.61	25.4	36.12	28.4	23.04	54.4	66.1	66.1	2.05	0.53
	P	0.00334	$4.66X10^{-07}$	$3.21X10^{-07}$	$9.87X10^{-08}$	$1.59X10^{-06}$	$1.64X10^{-13}$	$1.60X10^{-11}$	$4.29X10^{-16}$	0.15	0.46
	OR	0.70	1.92	1.95	2.042	2.105	2.25	2.10	2.44	1.24	1.12
	95%CI	0.56-0.89	1.49-2.48	1.51-2.52	1.57-2.63	1.56-2.85	1.79-2.75	1.69-2.61	1.97-3.03	0.937-1.65	0.846-1.49

各ＳＮＰからのアレル１およびアレル２の頻度は、症例と対照との間で比較し、Ｙａｔｅｓカイ２乗（Ｘ２）およびＰ値をオッズ比（ＯＲ）および９５％信頼区間（９５％ＣＩ）とともに計算した。各遺伝子型の実際のカウントは表６Ａ～６Ｃに示す。

【表５】

表 5

SSCP, DHPLC および配列決定プライマー

エキソン	領域	フォワードプライマー (5'-3')	配列番号	リバースプライマー (5'-3')	配列番号
1	5' 上流 -int1	GCAAAAGTTTCTGATAGGC	64	AATCTTACCTTCTGCTACAC	65
2	int-int2	TTAGATAGACCTGTGACTG	66	TCAGGCATAATTGCTAC	67
3	int2-int3	ACTTGTTCCCCCACTC	68	CCTCTTTTCGTATGGACTAC	69
	int2-ex3	TTGTTCCCCCACTCCTAC	70	ACACATTTCCTCCTGTAAGG	71
	ex3-int3	CCCTGTGGACATCCTGG	72	AACCTCTTTTCGTATGGACTAC	73
4	int3-ex4	ATGCTGTTCATTTTCC	74	CCATCCATCTGTGTCAC	75
	ex4-int4	ATTACCGTGAATGTGAC	76	TTGTATGAGAAAAAAAAAC	77
5	int4-int5	TCCAATCTTATCCTGAGG	78	TCTTACCCACACACTTTG	79
6	int5-ex6	GTCCTGGTCACAGTCC	80	GCATACAGCATCTCCTC	81
	ex6-int6	GCACTGAATCTGGATG	82	ATGAACCTTGAACACAG	83
7	int6-ex7	CGGATACTTATTTCTGC	84	CGTGATTTCATCTCCAG	85
	ex7-int7	AGAACTGGAGATGAAATC	86	TGAATGGAACTTACAGG	87
8	int7-ex8	GTGAAACCTTGTGATTATC	88	TCCCAGTAACTTCCTG	89
	ex8-int8	CTGTGATGAACATTTTGAG	90	TGCTCTCCTTTCTTCG	91
9	int8-int9	CATTGTTATGGTCCTTAGG	92	ACATGCTAGGATTTCAGAG	93
10	int9-ex9	CTTTTTCTTATTCTCTTCCC	94	TCACCATCTGCTGTTAC	95
	ex9-int10	TGTAACAGCAGATGGTG	96	CCCACAAAAAGACTAAAG	97
11	int10-ex11	GGGAAATACTCAGATTG	98	ATGGCATTCATAGTCC	99
	ex11-ex11	CCAGAACTAAAAATGACTTC	100	GGTAAATCAGACCAACC	101
	ex11-int11	ATAGTGTGTGGTTACAATG	102	GTTTATGTCAAATCAGGAG	103
12	int11-int12	CAAGAAAGAGAATGCGAAC	104	AGATTACAGGCAATGGG	105
13	int12-ex13	TTGATTGTTTAGGATGC	106	TTGAGGAGTTCAGGAGGTGG	107
	ex13-int13	CTGAACTCCTCAATGG	108	ATTACCAATACACACTGG	109
14	int13-int14	TTACATAGTGGAGGAGAG	110	TGGAAATGTTGAGGC	111
15	int14-int15	AGTTGGTTTGATTCCTATC	112	TTGAGCAGTTCACTTCTG	113
16	int15-ex16	TTATGCCCACCTCCAC	114	ATACACTACTGACCAACAC	115
	ex16-int16	GTCTATGAGAATACAAGCC	116	GAATCTGAGGTGGAGG	117
17	int16-ex17	CCCTTTGATTTTCATTC	118	AGAACTCCATTTTCCC	119
	ex17-int17	CACAACCACCTCAGATAG	120	GCCTAACCTTCACACTG	121
18	int17-ex18	GTCATAGTAGCTCCTGTATTG	122	ACGTAACTTCTTCTCCATAC	123
	ex18-int18	CTTCCTTGTAAATCTCCAC	124	CAATGCACCATACTTATGC	125
19	int18-ex19	TAAAGATTTGCGGAAC	126	GGCTCCATCCATTTTG	127
	ex19-int19	TTACAAAATGGATGGAG	128	AAGTGCTGGGATTACAGGCG	129
20	int19-ex20	CTACTCAAAATGAACACTAGG	130	TTTAACCCTGCTATACTCC	131
	ex20-int20	TAAATGGAAACTGGACG	132	ACCCTATTACTTGTGTTCTG	133
21	int20-int21	GTGTTTGCGTTTGCC	134	GAGATTTTTCCAGCCAC	135
22	int21-ex22	TCTCACACATTGCGAAC	136	ACCGTTAGTTTTCCAGG	137
	ex22-3' 下流	GGTTTGGATAGTGTTTTGAG	138	ATGTTGTTCGCAATGTG	139

【０３７７】

【表６－１】

表 6

コホート 1	プロモーター	プロモーター	rs3753394	イントロン 1		IVS1	rs529825	エキソン 2	I62V	rs800292	イントロン 2	IVS2	insTT
									CON	AMD		CON	AMD
								GG	44	190	SS	78	310
								GA	18	34	SL	38	73
								AA	6	4	LL	10	7
合計									68	228		126	390
頻度、アレル1								G	0.78	0.91	S	0.77	0.89
頻度、アレル2								A	0.22	0.09	L	0.23	0.11
AMD 関連									X2	P		X2	P
カイ2乗値									16.19	5.73703E-05		22.19	2.4667E-06
									2.79			2.38	
カウント、アレル1								Allele 1	106	414		194	693
カウント、アレル2								Allele 2	30	42		58	87
Yates χ^2/P 値									15	0.000107511		22.21	2.44398E-06
OR/95%CI									2.79	1.67-4.65		2.38	1.65-3.44
コホート 2													
			CON	全 AMD			CON	全 AMD	CON	全 AMD		CON	全 AMD
	11	CC	126	291	11	GG	149	392	148	395	SS	160	409
	12	CT	114	225	12	GA	95	140	90	135	SL	95	133
	22	TT	24	33	22	AA	22	15	23	16	LL	18	7
合計			264	549			266	547	261	546		273	549
頻度、アレル1		T	0.31	0.25		G	0.74	0.84	0.74	0.85	S	0.76	0.87
頻度、アレル2		C	0.69	0.75		A	0.26	0.16	0.26	0.15	L	0.24	0.13
			0	0.095			26.1	2.18E-06				29.18756	4.59201E-07
カウント、アレル1			366	807			393	924	386	925		415	951
カウント、アレル2			162	291			139	170	136	167		131	147
Yates χ^2/P 値			2.84	0.089			25.4	4.65918E-07	26.12	3.20843E-07		28.4	9.86653E-08
OR/95%CI			1.23	0.977-1.52			1.922	1.49-2.48	1.95	1.51-2.52		2.042	1.57-2.63

【０３７８】

【表６－２】

表 6（続き 1）

	イントロン 6		IVS6	rs376644	エキソン 7/8	A307A/Y402H	rs10611471/rs1061170	エキソン 7	A307A	rs1061147	エキソン 9	Y402H	rs1061170
コホート 1						CON	AMD		CON	AMD		CON	AMD
					AA/CC	16	146	AA	16	146	CC	16	146
					AC/CT	56	183	AC	56	183	CT	56	183
					CC/TT	59	75	CC	59	75	TT	59	74
合計						131	404		131	404		131	403
頻度、アレル1					A/C	0.34	0.59	A	0.34	0.59	C	0.34	0.59
頻度、アレル2					C/T	0.66	0.41	C	0.66	0.41	T	0.66	0.41
AMD 関連						X2	P		X2	P		X2	P
カイ2乗値						50.4	1.2593E-12		50.4	1.2593E-12		50.4	1.2593E-12
						2.82			2.82			2.82	
カウント、アレル1						88	475		88	475		88	475
カウント、アレル2						174	333		174	333		174	333
Yates χ^2/P 値						49.4	2.08746E-12		49.4	2.08746E-12		49.4	2.08746E-12
OR/95%CI						2.82	2.11-3.78		2.82	2.11-3.78		2.82	2.11-3.78
コホート 2													
			CON	全 AMD					CON	全 AMD		CON	全 AMD
	11	TT	186	452				CC	120	114	TT	122	118
	12	CT	76	89				AC	109	275	CT	113	271
	22	CC	9	5				AA	33	158	CC	37	160
合計			271	546					262	547		272	549
頻度、アレル1		T	0.83	0.91				C	0.67	0.46	T	0.66	0.46
頻度、アレル2		C	0.17	0.09				A	0.33	0.54	C	0.34	0.54
			23.82449569	6.70774E-06								55.198	1.03234E-12
			448	993					349	503		357	507
カウント、アレル1			94	99					175	591		187	591
カウント、アレル2													
Yates χ^2/P 値			23.04	1.58666E-06					59.6	1.16235E-14		54.4	1.63563E-13
OR/95%CI			2.105	1.56-2.85					2.34	1.89-2.91		2.25	1.79-2.75

【０３７９】

【表６－３】

表 6(続き 2)

	エキソン 10	A473A	rs2274700	イントロン 10	IVS10	rs203674	エキソン 13	Q672Q	rs3753396	エキソン 18	D936E	rs1065489
コホート 1		CON	AMD					CON	AMD		CON	AMD
	GG	22	145				AA	92	295	GG	51	162
	GA	30	65				GA	33	101	GT	14	56
	AA	16	11				GG	4	8	TT	2	5
合計		68	221					129	404		67	223
頻度、アレル1	G	0.54	0.80				A	0.84	0.86	G	0.87	0.85
頻度、アレル2	A	0.46	0.20				G	0.16	0.14	T	0.13	0.15
AMD 関連												
		X2	P					X2	P		X2	P
カイ2乗値		36.5	1.54526E-09					0.309	0.579		0.155	0.694
		3.42						1.12			0.893	
カウント、アレル1		74	365					217	691		116	380
カウント、アレル2		62	87					41	117		18	66
Yates χ^2/P 値		35.14	3.06833E-09					0.21	0.65		0.64	0.8
OR/95%CI		3.42	2.27-5.15					1.12	0.76-1.64		0.89	0.51-1.56
コホート 2												
		CON	全 AMD		CON	全 AMD		CON	全 AMD		CON	全 AMD
	GG	77	269	TT 11	118	103	GG	9	8	TT	9	10
	GA	131	233	GT 12	112	276	GA	72	138	TG	69	140
	AA	56	40	GG 22	34	166	AA	184	399	GG	186	386
合計		264	542		264	545		265	545		264	536
頻度、アレル1	G	0.54	0.71	T	0.66	0.44	G	0.17	0.14	T	0.16	0.15
頻度、アレル2	A	0.46	0.29	G	0.34	0.56	A	0.83	0.86	G	0.84	0.85
			9.24391E-11		66.9745	2.88191E-15		2.27	0.322		0.653	0.722
		46.2			8							
カウント、アレル1		285	771		348	482		90	154		87	160
カウント、アレル2		243	313		180	608		440	936		441	912
Yates χ^2/P 値		45.4	1.60634E-11		66.1	4.28616E-16		2.05	0.15		0.53	0.46
OR/95%CI		2.10	1.69-2.61		2.44	1.97-3.03		1.24	0.937-1.85		1.12	0.846-1.49

【０３８０】

【表７】

表 7

ＡＭＤを有するかまたは有しない種々の民族群におけるアットリスクアレルの頻度

リスクハプロタイプ		ラバヌイ	コロンビア対照	ヒスパニック	アイオワ対照	アフリカン対照	コロンビア症例	ヨーロッパ系アメリカ人	アイオワ症例	MPGN II
	N	52	272	24	131	49	549	56	404	20
		0.20	0.35	0.35	0.36	0.47	0.55	0.57	0.60	0.69

アットリスクハプロタイプの頻度は、Ｙ４０２Ｈ変異体およびまたはＩＶＳ１０遺伝子座の遺伝子型からの異なる集団からのサンプル中で見積もった。
これらには以下が含まれる：６５歳を超えたラパヌイネイティブ（ＡＭＤは、このイースター島集団においては極度にまれであり、存在しない可能性が最も高い）、コロンビア大学からの対照（年齢＞６５歳）、ヒスパニック一般集団、アイオワ大学からの対照（年齢＞６５歳）、アフリカ系アメリカ人一般集団、コロンビア大学からのＡＭＤ症例、ヨーロッパ系アメリカ人一般集団、アイオワ大学からのＡＭＤ症例、およびＭＰＧＮＩＩを有する個体。Ｎ＝個体数。

【０３８１】

【表８】

表 8

H因子ディプロタイプ

	I62V	IVS2-18	Y402H	D936E	IVS20
リスク	GG	SS	CC	GG	TT
防御的	AA	LL	TT	GG	CC
	AA	LL	CT	GG	CC
防御的	AA	LL	TT	GG	CC
	AA	LL	TT	GT	TT
	AA	LL	TT	GT	CC
	AA	LS	CT	GG	CC
	AA	SS	CC	GG	TT
	GA	LS	CT	GG	TT
	GA	LS	CT	GG	CT
	GA	LS	CT	GG	CC
防御的	GA	LS	CT	GG	CC
	GA	LS	CT	GT	CT
	GA	LS	TT	GG	CT
	GA	LS	TT	GG	CC
	GA	LS	TT	GG	TT
	GA	LS	TT	GT	CC
	GA	LS	TT	TT	CC
	GA	SS	CT	GG	CC
	GG	SS	CT	GT	CC
	GG	SS	TT	GT	TT
	GG	SS	TT	TT	CT
	GG	LL	TT	GG	TT
リスク	GG	SS	CC	GG	TT
リスク	GG	SS	CT	GG	CT
	GG	SS	CT	GG	CC
	GG	SS	CT	GG	CC
	GG	SS	CT	GT	TT
	GG	SS	CT	GT	CT
	GG	SS	CT	GT	CC
	GG	SS	CT	GT	CC
	GG	SS	CT	GT	CC
	GG	SS	CT	TT	CT
	GG	SS	TT	GG	TT
	GG	SS	TT	GG	CT
	GG	SS	TT	GT	TT
	GG	SS	TT	GT	CT
	GG	SS	TT	GT	GT
	GG	SS	TT	GT	CC
	GG	SS	TT	TT	CT
	GG	SS	TT	TT	CC
	GG	SS	CC	GG	TT
	GG	SS	CT	GG	TT
	GG	SS	CT	GT	CC

G、A、T、Cは示される多型におけるヌクレオチドをいう。S、Lはイントロン２多型の短いアレルおよび長いアレル（２つのTヌクレオチドの挿入）をいう。

【０３８２】

【表９】

表 9

H因子コード配列を増幅するために使用されるプライマー

ｴｷｿﾝ	ﾌｫﾜｰﾄﾞ	配列番号	ﾘﾊﾞｰｽ	配列番号
1	TGGGAGTGCAGTGAGAATTG	140	GCTAATGATGCTTTTCACAGGA	141
2	CCTGTGACTGTCTAGGCATTTT	142	TATGCCTGAATTATATCACTATTGCC	143
3	GCTTTGCTATGTTTAATTTTCCTT	144	AACTATGATGGAAATAATTAAATCTGG	145
4	TGCATATGCTGTTCATTTTC	146	GTCTTACATTAAAATATCTTAAAGTCTC	147
5	TTTCCTCCAATCTTATCCTGAG	148	CGTTCATTCTAAGGAATATCAGCA	149
6	CCTGATGGAAACAACATTTCTG	150	AACAGGGCCAGAAAAGTTCA	151
7	TGTTCATTTTAATGCCATTTTG	152	AGTTTTCGAAGTTGCCGAAA	153
8	CCTAGAAACCCTAATGGAATGTG	154	TGTTCAAGCAAAGTGACCAAA	155
9	TGAGCAAATTTATGTTTCTCATTT	156	ATGTCACCTTGTTTTACCAATGG	157
10	TGAATGCTTATGGTTATCCAGGT	158	AAAACCTGCAGGAACAAAGC	159
11	TCTTAGAATGGGAAATACTCAGATTG	160	TGGTTTTTCAGAAATTCATTTTCA	161
12	ATGTAAAATTAACTTTGGCAATGA	162	TTGCTGAAATAAGAATTAGAACTTTG	163
13	TGAATAAAAGAAGAAAATCTTTCCA	164	ATCTAAAACACATACATCATGTTTTCA	165
14	AAAACACATACATCATGTTTTCACAA	166	GATATGCCTCAACATTTCCAGTC	167
15	GTTGGTTTGATTCCTATCATTTG	168	TTGGAAAAGTAATAGGTATGTGTGTC	169
16	CTATGAGAATACAAGCCAAAAGTTC	170	TCTCTTGTGCTTCGTGTAAACAA	171
17	AACCCTTTGATTTTCATTCTTCA	172	TCAAAGTGAGGGGAATAATTGA	173
18	AATTTATGAGTTAGTGAAACCTGAAT	174	TCTTCATTCAAAGTGTAAGTGGTACC	175
19	ACAAAATGGCTAATATATTTTCTCAAG	176	TAATGTGTGGGCCCAGCC	177
20	CAAAATGAACACTAGGTGGAACC	178	ATTTTGGGGGAGTATAGCAGG	179
21	CTGTGTTTGCGTTTGCCTTA	180	TTCACGTGGCTGGAAAAATC	181
22	TTGAAAACCTGAAAGTCTATGAAGA	182	TCAATCATAAAGTGCACACCTTT	183

【０３８３】

【表１０】

表 10

CFHR5 コード配列を増幅するために使用されるプライマー

ｴｷｿﾝ	ﾌｫﾜｰﾄﾞ	配列番号	ﾘﾊﾞｰｽ	配列番号
1	CAGTCCCATTTCTGATTGTTCCA	184	GCTGAGGATAATTTGAAGGGG	185
2	GTGATTCATCGATGTAGCTCTTT	186	AATGACCAGAGGAGCCTGGAA	187
3	TGATGTCAGTTTTCAAAGTTTTCC	188	ACCACTCTCTCAGTTTTGCTAATTAT	189
4	CACATTAAATTTGTTTCTGCAATGA	190	AGAAGTGATGAAACAAGAATTTGA	191
5	CCATTTAAGCATTATTTATGGTTTC	192	AAACAGGACAGTTACTATTACTTTGCA	193
6	AAATATTTTCAGAGTAAGCACTCATTT	194	TTTATCATTTTGATTGGGATTGT	195
7	TGCAGATATTTTATTGACATAATTGTT	196	GTTGATCTTGTTGCTTCTTTACAAGA	197
8	CCATTTTCCTGAAACACTACCC	198	TCTGTTGCACTGTACCCCAA	199
9	AATTATTTGAATTTCCAGACACCTT	200	TTTTGGACTAATTTCATAGAATAACCC	201
10	CTTAAATGCAATTTCACTATTCTATGA	202	TAGCCATTATGTAGCC	203

【０３８４】

【表１１】

表 11

MPGNII で分離する、２２例の患者における CFH SNP

（アレル頻度（ｆ１およびｆ２）および遺伝子型による患者の数を示す）

		EX2	I62V	IVS2	-19insTT	EX7	A307A	IVS7	-53G>T	EX9	Y402H	EX10	A473A	EX13	Q672Q	IVS15	-30C>A	EX18	D936E	IVS18	-89T>C	EX20 N1050Y
		GG	rs800292			CC	rs1061147	GG		CC	rs1061170	GG	rs2274700	AA	rs3753396	CC		GG	rs1065489	TT		AA
		GA	20	(T)9(T)8	20	CA	9	GT	8	CT	9	GA	18	AG	13	CA	8	GT	13	TC	19	AT
		AA	2	(T)11(T)9	2	CA	10	GT	10	CT	10	GA	4	AG	9	CA	10	GT	9	TC	3	AT
			0	(T)11(T)11	0	AA	9	TT	4	TT	3	AA	0	GG	0	AA	4	TT	0	CC	0	TT
f1			.95G		.95 (T)9		.64A		.59G		.36Y		.90G		.80A		.56C		.80G		.93T	.98A
f2			.05A		.05 (T)11		.36C		.41T		.64H		.10A		.20G		.41A		.20T		.07C	.02T
ハプロタイプ		G			9		A		G		C		G		A		C		G		T	A
	MPGN2-1	G,G			9,9		A,C		G,T		C,T		G,G		G,A		C,A		G,T		T,T	A,A
	MPGN2-2	G,G			9,9		C,C		T,T		T,T		G,G		G,A		C,A		G,T		T,T	A,A
	MPGN2-7	G,G			9,9		A,C		G,T		C,T		G,G		G,A		C,A		G,T		T,T	A,A
	MPGN2-9	G,G			9,9		A,C		G,T		C,T		G,G		G,A		C,A		G,T		T,T	A,A
	MPGN2-10	G,G			9,9		A,C		G,T		C,T		G,G		A,A		C,A		G,T		T,T	A,A
	MPGN2-11	G,G			9,9		A,C		G,T		C,T		G,A		A,A		C,A		G,G		T,C	A,T
	MPGN2-12	G,G			9,9		A,A		T,T		C,C		G,G		A,A		C,C		G,G		T,T	A,A
	MPGN2-13	G,G			9,9		A,C		G,T		C,T		G,G		G,A		C,A		G,T		T,T	A,A
	MPGN2-14	G,G			9,9		A,C		G,T		C,T		G,G		G,A		C,A		G,T		T,T	A,A
	MPGN2-15	G,G			9,9		A,A		G,G		C,C		G,G		A,A		C,C		G,G		T,T	A,A
	MPGN2-16	G,G			9,9		C,C		T,T		T,T		G,A		G,A		A,A		G,T		T,C	A,A
	MPGN2-17	G,G			9,9		A,A		G,G		C,C		G,G		A,A		C,C		G,G		T,T	A,A
	MPGN2-18	G,G			9,9		A,C		G,T		C,T		G,G		G,A		C,A		G,G		T,T	A,A
	MPGN2-19	G,G			9,9		A,A		G,G		C,C		G,G		A,A		C,C		G,G		T,T	A,A
	MPGN2-20	G,G			9,9		A,A		G,G		C,C		G,G		A,A		C,C		G,G		T,T	A,A
	MPGN2-21	G,A			9,11		C,C		T,T		T,T		G,A		G,A		A,A		G,T		T,T	A,A
	MPGN2-22	G,G			9,9		A,A		G,G		C,C		G,G		A,A		C,C		G,G		T,T	A,A
	MPGN2-23	G,G			9,9		A,A		G,G		C,C		G,G		A,A		C,C		G,G		T,T	A,A
	MPGN2-24	G,G			9,9		A,A		G,G		C,C		G,G		A,A		C,C		G,G		T,T	A,A
	MPGN2-27-02	G,A			9,11		A,C		G,T		C,T		G,A		A,A		C,A		G,G		T,T	A,A
	MPGN2-29	G,G			9,9		A,A		G,G		C,C		G,G		A,A		A,A		G,G		T,T	A,A
	MPGN2-30	G,G			9,9		A,C		G,T		C,T		G,G		A,A		A,A		G,G		T,C	A,A

【０３８５】

【表１２】

表 12

対照に対する２２例のＭＰＧＮＩＩ患者における
Ｈ因子ＳＮＰ頻度の比較
（ｆ１およびｆ２として与えられるアレル頻度）

SNP	f1 MPGNII	f2 MPGNII	f1 対照	f2 対照	P-値
ｴｷｿﾝ 2 I62V	42 (G)	2 (A)	202 (G)	60 (A)	0.0051
IVS2 -18insTT	42 (短)	2 (長)	194 (短)	68 (長)	0.0018
ｴｷｿﾝ 7 A307A	16 (C)	28 (A)	88 (A)	174 (C)	0.72
ｴｷｿﾝ 9 Y402H	28 (H)	16 (Y)	88 (H)	174 (Y)	0.00014
ｴｷｿﾝ 10 A473A	40 (G)	4 (A)	74 (G)	62 (A)	0.000013
ｴｷｿﾝ 13 Q672Q	35 (A)	9 (G)	217 (A)	41 (G)	0.45
ｴｷｿﾝ 18 D936E	35 (D)	9 (E)	115 (D)	19 (E)	0.32

【０３８６】
【表１３】

表 13

ＭＰＧＮＩＩと関連するコードＳＮＰおよびＨ因子
の関連する短いコンセンサスリピート（ＳＣＲ）

SNP	SCR	SCR の機能
エキソン 2 I62V	1	C3b との相互作用
エキソン9 Y402H	7	ヘパリン結合 Ｃ反応性タンパク質との相互作用
エキソン 10 A473A	8	Ｃ反応性タンパク質との相互作用

【０３８７】

【表１４】

表 14

MPGNIIで分離する、２２例の患者におけるCFHR5 SNP
（アレル頻度（ｆ１およびｆ２）および遺伝子型に
よる患者の数を示す）

| | | |

【表１５】

表 15

対照に対する２２例のＭＰＧＮＩＩ患者におけるＣＦＨＲ５　ＳＮＰ頻度の比較
（ｆ１およびｆ２として与えられるアレル頻度）

SNP	f1 MPGN II	f2 MPGN II	f1 対照	f2 対照	P-値
ﾌﾟﾛﾓｰﾀｰ -249T>C	43 (T)	1 (C)	178 (G)	28(A)	0.033
ﾌﾟﾛﾓｰﾀｰ -20T>C	43 (T)	1 (C)	178 (G)	28(A)	0.033
IVS1 +75T>A	37(T)	7 (A)	161 (A)	41 (C)	0.38
ｴｷｿﾝ 2 P46S	41 (P)	3(S)	205 (P)	1 (S)	0.00023
IVS2 +58C>T	37 (C)	7 (T)	158 (C)	28 (T)	0.28

【０３８９】

【表１６－１】

表 16A

SNP 名	位置	プローブ			
		参照アレル	配列番号	変異体アレル	配列番号
	プロモーター 1	5'-TCTGGGATGTAATAATG-3'	204	5'-TCTGGGATGTAATGATG-3'	205
		5'-GAACATTATTACATCCC-3'	206	5'-GAACATCATTACATCCC-3'	207
rs3753394	プロモーター 4	5'-CAGAGGATATTCACCAGC-3'	208	5'-CAGAGGATATTACCAGC-3'	209
		5'-AGCAGCTGGTGATATCC-3'	210	5'-AGCAGCTGGTAATATCC-3'	211
rs529825	イントロン 1	5'-TACACAGTACGATAGAC-3'	212	5'-TACACAGTACAATAGAC-3'	213
		5'-TAAGTCTATTCGTACTGT-3'	214	5'-TAAGTCTATTGTACTGT-3'	215
rs800292	エキソン 2	5'-TCTTGGAAATGTAATAA-3'	216	5'-TCTTGGAAATATAATAA-3'	217
		5'-ACCATTATTACATTTCC-3'	218	5'-ACCATTATTATATTTCC-3'	219
	イントロン 2	5'-TTTTTTTTTCGTTTTAG-3'	220	5'-TTTTTTTTTTCGTTTT-3'	221
		5'-CTTTCTAAAACGAAAAA-3'	222	5'-TTCTAAAACGAAAAAAA-3'	223
rs3766404	イントロン 6	5'-TTTAGGACTCATTTGAA-3'	224	5'-TTTAGGACTTATTTGAA-3'	225
		5'-TAACTTCAAATGAGTCC-3'	226	5'-TAACTTCAAATAAGTCC-3'	227
rs1061147	エキソン 7	5'-GAAATACAGCAAAATGC-3'	228	5'-GAAATACAGCCAAATGC-3'	229
		5'-ACTTGTGCATTTTGCTG-3'	230	5'-ACTTGTGCATTTGGCTG-3'	231
rs1061170	エキソン 9	5'-TAATCAAAATTATGGAA-3'	232	5'-TAATCAAAATCATGGAA-3'	233
		5'-TTTCTTCCATAATTTTG-3'	234	5'-TTTCTTCCATGATTTTG-3'	235
rs2274700	エキソン 10	5'-AAGAAAAAAGCGAAATAT-3'	236	5'-AAGAAAAAAGCAAAATAT-3'	237
		5'-TTGATATTTTCGCTTTTTT-3'	238	5'-TTGATATTTTTGCTTTTTT-3'	239
	エキソン 10A	5'-GGATCAAAGA[-]TGACAA-3'	240	5'-GGATCAAAGA[N]TGACAA-3'	241
		5'-GCCCTTGTCA[-]TCTTTG-3'	242	5'-GCCCTTGTCA[N]TCTTTG-3'	243
rs203674	イントロン 10	5'-TTTATTAGTAGATCTAA-3'	244	5'-TTTATTAGTATATCTAA-3'	245
		5'-TTGATTAGATCTACTAA-3'	246	5'-TTGATTAGATATACTAA-3'	247
rs3753396	エキソン 13	5'-ATAAAATTCAATGTGTT-3'	248	5'-ATAAAATTCAGTGTGTT-3'	249
		5'-CCATCAACACATTGAAT-3'	250	5'-CCATCAACACACTGAAT-3'	251
rs375046	イントロン 15	5'-TTTATTATAACATTAAT-3'	252	5'-TTTATTATATAAAATTAAT-3'	253
		5'-TATAATTAATGTTATAA-3'	254	5'-TATAATTAATTTTATAA-3'	255

【０３９０】

【表１６－２】

SNP 名	位置	プローブ			
		参照アレル	配列番号	変異体アレル	配列番号
rs1065489	エキソン 18	5'-CTCCACCTGAGATTTCT-3'	256	5'-CTCCACCTGATATTTCT-3'	257
		5'-CATGAGAAATCTCAGGT-3'	258	5'-CATGAGAAATATCAGGT-3'	259
	エキソン 22	5'-TCTTTCATCACGTTCTC-3'	260	5'-TCTTTCATCATGTTCTC-3'	261
		5'-GTGTGAGAACGTGATGA-3'	262	5'-GTGTGAGAACATGATGA-3'	263

表１６Ａ（続き）

【０３９１】

【表１６－３】

表 16B

SNP 名	位置	プライマー			
		参照アレル	配列番号	変異体アレル	配列番号
	プロモーター 1	5'-TTTCTGGGATGTAATA-3'（フォワード）	264	5'-TTTCTGGGATGTAATG-3'（フォワード）	265
		5'-CAAAACACTGAACATT-3'（リバース）	266	5'-CAAAACACTGAACATC-3'（リバース）	267
rs3753394	プロモーター 4	5'-AAATCCAGAGGATATC-3'（フォワード）	268	5'-AAATCCAGAGGATATT-3'（フォワード）	269
		5'-AAATCAGCAGCTGGTG-3'（リバース）	270	5'-AAATCAGCAGCTGGTA-3'（リバース）	271
rs529825	イントロン 1	5'-AAGTTTACACAGTACG-3'（フォワード）	272	5'-AAGTTTACACAGTACA-3'（フォワード）	273
		5'-AATGGGTAAGTCTATC-3'（リバース）	274	5'-AATGGGTAAGTCTATT-3'（リバース）	275
rs800292	エキソン 2	5'-AGATCTCTTGGAAATG-3'（フォワード）	276	5'-AGATCTCTTGGAAATA-3'（フォワード）	277
		5'-TGCATACCATTATTAC-3'（リバース）	278	5'-TGCATACCATTATTAT-3'（リバース）	279
	イントロン 2	5'-TCATAACTTTTTTTTT-3'（フォワード）	280	5'-ATAACTTTTTTTTTT-3'（フォワード）	281
		5'-GGGCCTTTCTAAAACG-3'（リバース）	282	5'-GCCTTTCTAAAACGAA-3'（リバース）	283
rs3766404	イントロン 6	5'-AATACATTTAGGACTC-3'（フォワード）	284	5'-AATACATTTAGGACTT-3'（フォワード）	285
		5'-ACACTAACTTCAAATG-3'（リバース）	286	5'-ACACTAACTTCAAATA-3'（リバース）	287
rs10061147	エキソン 7	5'-CCGGGGAAATACAGCA-3'（フォワード）	288	5'-CCGGGGAAATACAGCC-3'（フォワード）	289
		5'-AGTACTTGTGCATTTT-3'（リバース）	290	5'-AGTACTTGTGCATTTG-3'（リバース）	291
rs10611170	エキソン 9	5'-GGATATAATCAAAATT-3'（フォワード）	292	5'-GGATATAATCAAAATC-3'（フォワード）	293
		5'-CAAACTTTCTTCCATA-3'（リバース）	294	5'-CAAACTTTCTTCCATG-3'（リバース）	295
rs2274700	エキソン 10	5'-CTTAAAAGAAAAAGCG-3'（フォワード）	296	5'-CTTAAAAGAAAAAGCA-3'（フォワード）	297
		5'-TTTGCATTGATATTTC-3'（リバース）	298	5'-TTTGCATTGATATTTT-3'（リバース）	299
	エキソン 10A	5'-TGAGTGGATCAAAGA[-]-3'（フォワード）	300	5'-TGAGTGGATCAAAGA[N]-3'（フォワード）	301
		5'-CATTGGCCCTTGTCA[-]-3'（リバース）	302	5'-CATTGGCCCTTGTCA[N]-3'（リバース）	303
rs203674	イントロン 10	5'-ACCTATTTATTAGTAG-3'（フォワード）	304	5'-ACCTATTTATTAGTAT-3'（フォワード）	305
		5'-CTTTATTGATTAGATC-3'（リバース）	306	5'-CTTTATTGATTAGATA-3'（リバース）	307
rs3753396	エキソン 13	5'-ACCTAATAAAATTCAA-3'（フォワード）	308	5'-ACCTAATAAAATTCAG-3'（フォワード）	309
		5'-CTCTCCATCAACACAT-3'（リバース）	310	5'-CTCTCCATCAACACAC-3'（リバース）	311
rs375046	イントロン 15	5'-TATTTTTTATTATAAC-3'（フォワード）	312	5'-TATTTTTTATTATAAA-3'（フォワード）	313
		5'-AAAAATATAATTAATG-3'（リバース）	314	5'-AAAAATATAATTAATT-3'（リバース）	315

【０３９２】

【表１６－４】

表１６Ｂ（続き）

SNP名	位置	プライマー			
		参照アレル	配列番号	変異体アレル	配列番号
rs1065489	エキソン 18	5'-TAAATCTCCACCTGAG-3' (フォワード)	316	5'-TAAATCTCCACCTGAT-3' (フォワード)	317
		5'-AACACCATGAGAAATC-3' (リバース)	318	5'-AACACCATGAGAAATA-3' (リバース)	319
	エキソン 22	5'-TATCGTCTITTCATCAC-3' (フォワード)	320	5'-TATCGTCTITTCATCAT-3' (フォワード)	321
		5'-GCAATGTGTGAGAACG-3' (リバース)	322	5'-GCAATGTGTGAGAACG-3' (リバース)	323

ＸＶ．参考文献

著者および日付で引用される参考文献についての完全な引用が以下に提供される。

【０３９３】

【化５】

[0386] Abecasis et al. "Age-related macular degeneration: a high-resolution genome scan for susceptibility loci in a population enriched for late-stage disease." *American Journal of Human Genetics* 74, 482-94 (2004).

[0387] Akiyama et al. "Inflammation and Alzheimer's disease." *Neurobiol. Aging* 2000; 21:383-421.

[0388] Allikmets et al. "Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration." *Science* 1997; 277:1805-1807.

[0389] Allikmets. "Further evidence for an association of ABCR alleles with age-related macular degeneration. The International ABCR Screening Consortium." *Am J Hum Genet* 67, 487-91 (2000).

[0390] Ambati et al. "Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies." *Surv Ophthalmol* 2003; 48(3):257-293.

[0391] Anderson et al. "A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye." *Am J Ophthalmol* 2002, 134:411-431.

[0392] Anderson et al. "Characterization of βeta-amyloid assemblies in drusen: the deposits associated with aging and age-related macular degeneration." *Exp. Eye Res.* 2004; 78:243-256.

[0393] Angaku-. "Complement regulatory proteins in glomerular diseases." *Kidney Int* 1998; 54:1419-1428.

[0394] Appel et al. "Membranoproliferative glomerulonephritis type II (Dense Deposit Disease): an update." *J am Soc Nephrol* 2005; 16:1392-1403.

[0395] Ault et al. "Human factor H deficiency. Mutations in framework cysteine residues and block in H protein secretion and intracellular catabolism." *J Biol Chem* 1997; 272:25168-25175.

[0396] Bao et al. "Decay-accelerating factor expression in the rat kidney is restricted to the apical surface of podocytes." *Kidney Int* 2002;62:2010-2021.

[0397] Barbiano di Belgiojosoet al. "The prognostic value of some clinical and histological parameters in membranoproliferative glomerulonephritis." *Nephron* 1977;19:250-258.

[0398] Barrett et al. "Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps." *Bioinformatics* 2004;21:263-5.

【０３９４】

【化６】

[0399] Bennett et al. "Mesangiocapillary glomerulonephritis type 2 (dense deposit disease): Clinical features of progressive disease." *Am J Kidney Dis* 1989; 13:469-476.

[0400] Bird et al. "An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group." *Surv Ophthalmol* 1995, 39: 367-374.

[0401] Bush RA, Lei B, Tao W, Raz D, Chan CC, Cox TA, Santos-Muffley M, Sieving PA. 2004. Encapsulated cell-based intraocular delivery of ciliary neurotrophic factor in normal rabbit: dose-dependent effects on ERG and retinal histology. Invest Ophthalmol Vis Sci. 45:2420-30.

[0402] Cade JR, DeQuesada AM, Shires DL, Levin DM, Hackett RL, Spooner GR, Schlein EM, Pickering MJ, Holcomb A. 1971. The Effect of Long Term High Dose Heparin Treatment on the Course of Chronic Proliferative Glomerulonephritis. Nephron. 8:67-80.

[0403] Cameron et al. "Idiopathic mesangiocapillary glomerulonephritis. Comparison of types I and II in children and adults and long-term prognosis." *Am J Med* 1983;74:175-192.

[0404] Capecchi. *Science* 1989; 244:1288-1292.

[0405] Caprioli et al. "Complement factor H mutations and gene polymorphisms in haemolytic uraemic syndrome: the C-257T, the A2089G and the G2881T polymorphisms are strongly associated with the disease." *Hum Mol Genet* 12, 3385-95 (2003).

[0406] Chong et al. "Decreased thickness and integrity of the macular elastic layer of Bruch's membrane correspond to the distribution of lesions associated with age-related macular degeneration" *Am J Pathol* 166, 241-51 (2005).

[0407] Colville et al. "Visual impairment caused by retinal abnormalities in mesangiocapillary (membranoprolifeative) glomerulonephritis type II ("dense deposit disease")." *Am J Kidney Dis* 2003; 42:E2-5.

[0408] Compton. *Nature* 1991; 350:91-91.

[0409] Cousins et al. "Monocyte activation in patients with age-related macular degeneration: a biomarker of risk for choroidal neovascularization?" *Arch Ophthalmol* 122, 1013-8 (2004).

[0410] Crabb et al. "Drusen proteome analysis: An approach to the etiology of age-related macular degeneration." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99:14682-14687.

[0411] de Jong. "Risk profiles for ageing macular disease." *Ophthalmologia* 2004; 218 Suppl 1:5-16.

【０３９５】

【化７】

[0412] Diamond JR, Karnovsky MJ. 1986. Nonanticoagulant Protective Effect of Heparin in Chronic Aminonucleoside Nephrosis. Renal Physiol. Basel 9:366-374.

[0413] Dragon-Durey et al. "Heterozygous and homozygous factor H deficiencies associated with hemolytic uremic syndrome or membranoproliferative glomerulonephritis: report and genetic analysis of 16 cases." *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:787-795.

[0414] Droz et al. "Évolution a long terme des glomérulonéphrites membranoproliferative de l'adulte: remissionspontanée durable chez 13 malades avec étude de biopsies rénales itératives dans 5 cas." *Neprhrologie* 1982;3:6-11.

[0415] Duvall-Young et al. "Fundus changes in (type II) mesangiocapillary glomerulonephritis stimulating drusen: a histopathologiocal report." *Br J Ophthalmol* 1989a; 73(4):297-302.

[0416] Duvall-Young et al. "Fundus changes in mesangiocapillary glomerulonephritis type II: clinical and fluorescein angiographic findings." *Br J Ophthalmol* 1989b; 73(11):900-906.

[0417] Edwards et al. "Complement factor H Polymorphism and age-related macular degeneration." *Science* 2005;308:421-424.

[0418] Esparza-Gordillo J, Goicoechea de Jorge E, Buil A, Carreras Berges L, Lopez-Trascasa M, Sanchez-Corral P, Rodriguez de Cordoba S. 2005. Predisposition to atypical hemolytic uremic syndrome involves the concurrence of different susceptibility alleles in the regulators of complement activation gene cluster in 1q32. Human Mol. Genetics 14:703-712.

[0419] Espinosa-Heidman et al. "Macrophage depletion diminishes lesion size and severity in experimental choroidal neovascularization." *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003; 44:3586-3592.

[0420] Estaller et al. "Cloning of the 1.4-kb mRNA species of human complement factor H reveals a novel member of the short consensus repeat family related to the carboxy terminal of the classical 150-kDa molecule." *J Immunol* 1991; 146(9):3190-3196.

[0421] Floege J, Eng E, Young BA, Couser WG, Johnson RJ. 1993. Heparin suppresses mesangial cell proliferation and matrix expansion in experimental mesangioproliferative glomerulonephritis. Kidney International 43:369-380.

[0422] Frueh et al. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41(4):452-461.

[0423] Gibbs. *Nucl Acids Res* 1989; 17:2427-2448.

[0424] Girardi G, Redecha P, Salmon JE. 2004. Heparin prevents antiphospholipid antibody-induced fetal loss by inhibiting complement activation. Nature Medicine 10:1222-1226.

【０３９６】

【化８】

[0425] Girardi G. 2005. Heparin treatment in pregnancy loss: Potential therapeutic benefits beyond anticoagulation. J. Reproduc. Immunol. 66:45-51.

[0426] Gold et al. "Estrogen receptor genotypes and haplotypes associated with breast cancer risk." *Cancer Res* 2004; 64:8891-8900.

[0427] Habib et al. "Dense deposit disease. A variant of membranoproliferative glomerulonephritis." *Kidney Int* 1975; 7:204-15.

[0428] Habib et al. "Glomerular lesions in the transplanted kidney in children." *Am J Kidney Diseas* 1987;10:198-207.

[0429] Hageman et al. "An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration." *Prog Retin Eye Res* 2001; 20: 705-732.

[0430] Hageman et al. "Common haplotype in the complement regulatory gene, factor H (*HF1/CFH*), predisposes individuals to age-related macular degeneration." *Proc Nat Acad Sci* 2005; 102: 7227-32.

[0431] Hageman et al. "Vitronectin is a constituent of ocular drusen and the vitronectin gene is expressed in human retinal pigmented epithelial cells." *FASEB Journal* 1999; 13:477-484.

[0432] Haines et al. "Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration." *Science* 2005;308:419-421.

[0433] Hayashi et al. "Evaluation of the ARMD1 locus on 1q25-31 in patients with age-related maculopathy: genetic variation in laminin genes and in exon 104 of HEMICENTIN-1." *Ophthalmic Genetics* 25, 111-9 (2004).

[0434] Houdebine, 2000, Transgenic animal bioreactors, *Transgenic Res*. 9:305-20

[0435] Holers. "The complement system as a therapeutic target in autoimmunity." *Clin Immunol* 2003; 107:140.

[0436] Holz. et al. "Pathogenesis of lesions in late age-related macular disease." *Am J Ophthalmol* 2004;137:504-510.

[0437] Huang et al. "Peripheral drusen in membranoproliferative glomerulonephritis." *Retina* 2003; 23(3):429-431.

[0438] Iyengar et al. "Model Free Linkage Analysis in Extended Families Confirms a Susceptibility Locus for Age Related Macular Degeneration (ARMD) on 1q31 [ARVO Abstract]." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:2113.

【０３９７】

【化９】

[0439] Jansen et al. "In situ complement activation in porcine membranoproliferative glomerulonephritis type II." *Kidney Int* 1998; 53(2):331-349.

[0440] Johnson et al. "A potential role for immune complex pathogenesis in drusen formation." *Exp Eye Res* 2000; 70:441-449.

[0441] Johnson et al. "Complement activation and inflammatory processes in drusen formation and age-related macular degeneration." *Exp. Eye Res.* 2001; 73:887-896.

[0442] Johnson et al. "The Alzheimer's A beta -peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration." *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 11830-5 (2002).

[0443] Kinoshita. "Biology of complement: the overture." *Immunol.Today* 1991; 12:291.

[0444] Klaver et al. "Genetic risk of age-related maculopathy. Population-based familial aggregation study." *Arch Ophthalmol* 1998a; 116:1646-1651.

[0445] Klaver et al. Genetic association of apolipoprotein E with age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet* 1998b; 63:200-206.

[0446] Klein et al. "Age-related macular degeneration. Clinical features in a large family and linkage to chromosome 1q." *Arch Ophthalmol* 1998; 116:1082-1088.

[0447] Klein et al. "Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration." *Science* 2005; 308:385-389.

[0448] Klein et al. "Genetics of age-related macular degeneration." *Ophthalmol Clin North Am* 2003; 16(4):575-582.

[0449] Klein et al. "Prevalence of age-related maculopathy." *Opthalmol* 1992; 99(6):933-943.

[0450] Klein et al. "The epidemiology of age-related macular degeneration." *Am J Ophthalmol* 2004; 137(3):504-510.

[0451] Leys et al. "Subretinal neovascular membranes associated with chronic membranoproliferative glomerulonephritis type II." *Graefe's Arch Clin Exper Ophthalmol* 1990; 228:499-504.

[0452] Lillico et al., 2005, Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs. *Drug Discov Today*. 10:191-6

[0453] Liszewski et al. "The role of complement in autoimmunity." *Immunol Ser* 1991; 54:13.

【０３９８】

【化１０】

[0454] Manuelian et al. "Mutations in factor H reduce binding affinity to C3b and heparin and surface attachment to endothelial cells in hemolytic uremic syndrome." *J Clin Invest* 2003;111:1181-1190.

[0455] McAvoy et al. "Retinal changes associated with type 2 glomerulonephritis." *Eye* 2005 19:985-9

[0456] McEnery. "Membranoproliferative glomerulonephritis: The Cincinnati experience cumulative renal survival from 1957 to 1989." *J Pediatr* 1990;116:S109-S114.

[0457] McRae et al. "Human factor H-related protein 5 (FHR-5). A new complement-associated protein." *J Biol Chem* 2001; 276 (9):6747-6754.

[0458] Meri et al. "Regulation of alternative pathway complement activation by glycosaminoglycans: specificity of the polyanion binding site on factor H." *Biochem Biophys Res Commun* 1994;198:52-59.

[0459] Miller et al. "The association of prior cytomegalovirus infection with neovascular age-related macular degeneration." *Am J Ophthalmol* 138, 323-8 (2004).

[0460] Morgan et al. "Complement deficiency and disease." *Immunol Today* 1991; 12:301.

[0461] Morgan. "Regulation of the complement membrane attack pathway." *Crit Rev Immunol* 19, 173-98 (1999).

[0462] Mullins et al. "Characterization of drusen-associated glycoconjugates." *Ophthalmology* 104, 288-94 (1997).

[0463] Mullins et al. "Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain molecular constituents common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis and dense deposit disease." *FASEB J.* 2000; 14:835-846.

[0464] Mullins et al. "Structure and composition of drusen associated with glomerulonephritis: Implications for the role of complement activation in drusen biogenesis." *Eye* 2001; 15:390-395.

[0465] Murphy et al. "Factor H-related protein-5: a novel component of human glomerular immune deposits." *Am J Kid Dis* 2002;39:24-27.

[0466] Neary et al. "Linkage of a gene causing familial membranoproliferative glomerulonephritis type III to chromosome 1." *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13(8):2052-2057.

[0467] Neri et al. *Adv. Nucl Acid Prot Analysis* 2000; 3826:117-125.

[0468] Niculescu et al. "Complement activation and atherosclerosis." *Mol. Immunol.* 1999; 36:949-955.

【０３９９】

【化１１】

[0469] Nielsen et al. *Science* 1991; 254:1497-1500.

[0470] O'Brien et al. "Electrophysiology of type II mesangiocapillary glomerulonephritis with associated fundus abnormalities." *Br J Ophthalmol* 1993; 77:778-80.

[0471] Orita et al. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86:2766-2770.

[0472] Orth et al. The nephrotic syndrome. *New Engl J Med* 1998; 338:1202-1211.

[0473] Pascual et al. "Identification of membrane-bound CR1 (CD35) in human urine: evidence for its release by glomerular podocytes." *J Exp Med* 1994;79:889-899.

[0474] Penfold et al. "Immunological and aetiological aspects of macular degeneration." *Progress in Retinal and Eye Research* 2001; 20:385-414.

[0475] Perez-Caballero D, Gonzalez-Rubio C, Gallardo ME, Vera M, Lopez-Trascasa M, Rodriguez de Cordoba S, Sanchez-Corral P. 2001. Clustering of Missense Mutations in the C-Terminal Region of Factor H in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. Am. J. Hum. Genet. 68:478-484.

[0476] Piatek et al. *Nat Biotechnol* 1998; 16:359-363.

[0477] Pickering et al. "Uncontrolled C3 activation causes membranoproliferative glomerulonephritis in mice deficient in complement factor H." *Nat Genet* 2002; 31:424-428.

[0478] Prasad et al. "Pendred syndrome and DFNB4 - Mutation screening of *SLC26A4* by denaturing high-performance liquid chromatography and the identification of seven novel mutations." *Am J Med Genet* 2004;124A:1-9.

[0479] Raines et al. "Fundus changes in mesangiocapillary glomerulonephritis type II: vitreous fluorophotometry." *Br J Ophthalmol* 1989; 73:907-910.

[0480] Richards A, Buddles MR, Donne RL, Kaplan BS, Kirk E, Venning MC, Tielemans CL, Goodship JA, Goodship THJ. 2001. Factor H Mutations in Hemolytic Uremic Syndrome Cluster in Exons 18-20, a Domain Important for Host Cell Recognition. Am. J. Hum. Genet. 68:485-490.

[0481] Ripoche et al. "The complete amino acid sequence of human complement factor H." *Biochem J* 1988, 249:593-602.

[0482] Rodriguez de Cordoba et al. "The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations." *Mol Immunol* 41, 355-67 (2004).

【０４００】

【化１２】

[0483] Rops Angelique L.W.M.M., Van Der Vlag J, Lensen Joost F.M., Wijnhoven Tessa J.M., Van Den Heuvel Lambert P.W.J., van Kuppevelt TH, Berden Jo H.M. 2004. Heparan sulfate proteoglycans in glomerular inflammation. Kidney International 65:768-785.

[0484] Russell et al. "Location, substructure and composition of basal laminar drusen compared with drusen associated with aging and age-related macular degeneration." *Am. J. Ophthalmol.* 2000; 129:205-214.

[0485] Saiki et al. *Nature* 1986; 324:163-166.

[0486] Sanchez-Corral P, Perez-Caballero D, Huarte O, Simckes AM, Goicoechea E, Lopez-Trascasa M, Rodriguez de Cordoba S. 2002. Structural and Functional Characterization of Factor H Mutations Associated with Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. Am. J. Genet. 71:1285-1295.

[0487] Saunders RE, Goodship THJ, Zipfel PF, Perkins SJ. An Interactive Web Database of Factor H-Associated Hemolytic Uremic Syndrome Mutations: Insights Into the Structural Consequences of Disease-Associated Mutations. Human Mutation 2006. 27:21-30.

[0488] Schultz et al. "Analysis of the ARMD1 locus: evidence that a mutation in HEMICENTIN-1 is associated with age-related macular degeneration in a large family." *Hum Mol Genet* 2003; 12(24):3315-3323.

[0489] Schwertz et al. "Complement analysis in children with idiopathic membranoproliferative glomerulonephritis: A long-term follow-up." *Pediatr Allergy Immunol* 2001; 12:166-172.

[0490] Seddon et al. "Association between C-reactive protein and age-related macular degeneration." *Jama* 291, 704-10 (2004).

[0491] Seddon et al. "The epidemiology of age-related macular degeneration." *Ophthalmol Clin* 2004; 44:17-39.

[0492] Sharma et al. "Biologically active recombinant human complement factor H: synthesis and secretion by the baculovirus system." *Gene* 143:301-302.

[0493] Sharma et al. "Identification of three physically and functionally distinct binding sites in human complement factor H by deletion mutagenesis." *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:10996-11001.

[0494] Shen et al. "Ying and Yang: complement activation and regulation of Alzheimer's disease." *Prog Neurobiol* 2003; 70(6):463-472.

【０４０１】

【化１３】

[0495] Sieving, P.A., R.C. Caruso, W. Tao, D.J.S. Thompson, K.R. Fullmer, H. Rodriquez Coleman and R.A. Bush. 2005. Phase I study of ciliary neurotrophic factor (CNF) delivered by intravitreal implant of encapsulated cell technology (ECT) device in patients with retinitis pigmentosa.

[0496] Skerka et al. "The human factor H-related protein 4 (FHR-4). A novel short consensus repeat-containing protein is associated with human triglyceride-rich lipoproteins." *J Biol Cjhem* 1997; 272(9):5627-5634.

[0497] Song Y, Zhao L,Tao W,Laties AM, Luo Z, and Wen R. Photoreceptor protection by cardiotrophin-1 in transgenic rats with the rhodopsin mutation s334ter. IOVS, 44(9):4069-75. 2003.

[0498] Souied et al. "The epsilon4 allele of the apolipoprotein E gene as a potential protective factor for exudative age-related macular degeneration." *Am J Ophthalmol.* 1998; 125:353-359.

[0499] Strausberg et al. "Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences." *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(26):16899-16903.

[0500] Striker GE. 1999. Therapeutic uses of heparinoids in renal disease patients. Nephrol. Dial. Transplant. 14:540-543.

[0501] Swainson et al. "Mesangiocapillary glomerulonephritis: A long-term study of 40 cases." *J Pathol* 1983;141:449-468.

[0502] Tao W, Wen R, Goddard MB, Sherman S, O'Rourke PJ, Stabila PF, Bell WJ, Dean BJ, Kauper KA, Budz VA, Tsiaras WG, Acland GM, Pearce-Kelling S, Laties AM, and Aguirre GD Encapsulated Cell-Based Delivery of CNTF Reduces Photoreceptor Degeneration in Animal Models of Retinitis Pigmentosa. IOVS, Vol. 43 (10) 3292-3298. 2002.

[0503] Thelwell et al. *Nucleic Acids Res* 2000; 28:3752-3761.

[0504] Timmerman et al. "Differential expression of complement components in human fetal and adult kidneys." *Kidney Int* 1996;49:730-740.

[0505] Torzerski et al. "Processes in atherogenesis complement activation." *Atherosclerosis.* 1997; 132:131-138.

[0506] Tuo et al. "Genetic factors in age-related macular degeneration." *Prog Retin Eye Res* 2004; 23(2):229-249.

[0507] van den Dobbelsteen et al. "Regulation of C3 and factor H synthesis of human glomerular mesangial cells by IL-1 and interferon-gamma." *Clin Exp Immunol* 1994;95:173-180.

【０４０２】

【化１４】

[0508] Van Leeuwen et al. "Epidemiology of age-related macular degeneration." *Eur J Epidemiol* 2003; 18(9):845-854.

[0509] Vingerling et al. "Epidemiology of age-related maculopathy." *Epidemiol Rev.* 1995;17(2):347-360.

[0510] Vingerling et al. "The prevalence of age-related maculopathy in the Rotterdam Study." *Ophthalmol* 1995 Feb;102(2):205-210.

[0511] Walport. "Complement. First of two parts." *N Engl J Med* 2001;344:1058-1066.

[0512] Wang et al. "Systematic identification and analysis of exonic splicing silencers." *Cell* 119, 831-45 (2004).

[0513] Weeks et al. "Age-related maculopathy: a genomewide scan with continued evidence of susceptibility loci within the 1q31, 10q26, and 17q25 regions." *Am J Hum Genet* 2004; 75:174.

[0514] Weeks et al. "Age-related maculopathy: an expanded genome-wide scan with evidence of susceptibility loci within the 1q31 and 17q25 regions." *Am J Ophthalmol* 2001; 132:682-692.

[0515] Weiler JM, Daha MR, Austen KF, Fearon DT. 1976. Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein β1H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:3268-3272.

[0516] Zarbin. "Age Related Macular Degeneration: a review of pathogenesis." *Eur J Ophthalmol* 1998, 8:199-206.

[0517] Zarbin. "Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration." *Arch Ophthalmol* 2004; 122(4):598-614.

[0518] Zipfel et al. "Complement factor H and hemolytic uremic syndrome." *Int Immunopharmacol* 1, 461-8 (2001).

[0519] Zipfel et al. "Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases." *Biochem Soc Trans* 30, 971-8 (2002).

[0520] Zipfel et al. "The role of complement in membranoproliferative glomerulonephritis." In *Complement and Kidney Disease* 2005

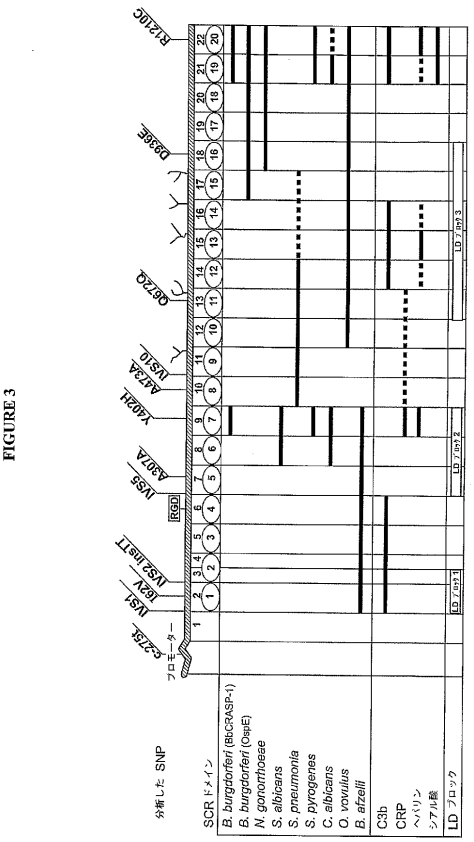
[0521] Zipfel. "Complement factor H: physiology and pathophysiology." *Semin Thromb Hemost* 27, 191-9 (2001).

[0522] Zipfel. "Hemolytic uremic syndrome: how do factor H mutants mediate endothelial damage?" *Trends Immunol* 22, 345-8 (2001).

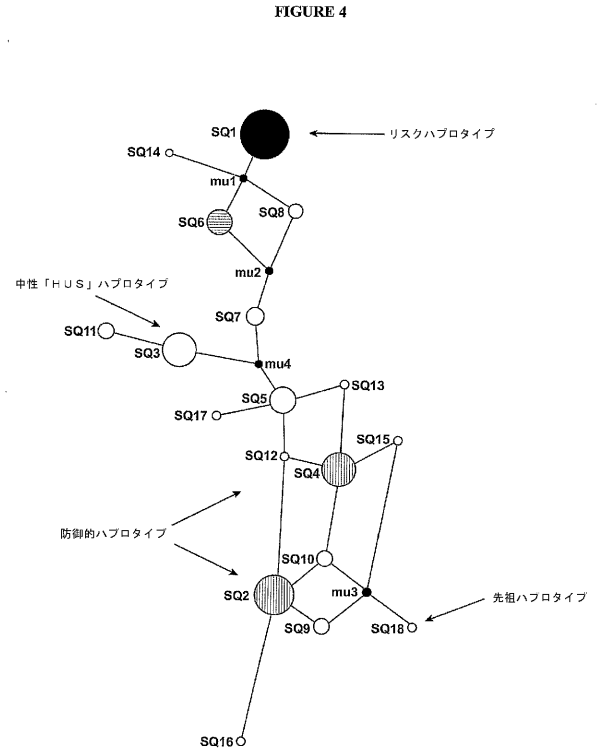
本発明を特定の実施形態を参照して詳細に説明してきたが、当業者は、修飾および改良が添付の特許請求の範囲に示されるような本発明の範囲および技術思想の範囲内にあることを認識する。本明細書に引用されるすべての刊行物および特許文書は、あたかもこのような各々の刊行物または文書が参照により本明細書に援用されることが具体的にかつ個別に示されるかのように、参照により本明細書に援用される。刊行物および特許文書（特許、公開された特許出願、および非公開の特許出願）の引用は、このようないかなる文書も関連する先行技術であることの認可を意図するものではないし、これらの内容または日付に関していかなる認可の性質を有するものでもない。本発明は文書の記載によりここで説

明されてきたので、当業者は、本発明が種々の実施形態において実施することが可能であること、および前述の記載が例示目的のためであり、添付の特許請求の範囲の限定ではないことを認識する。

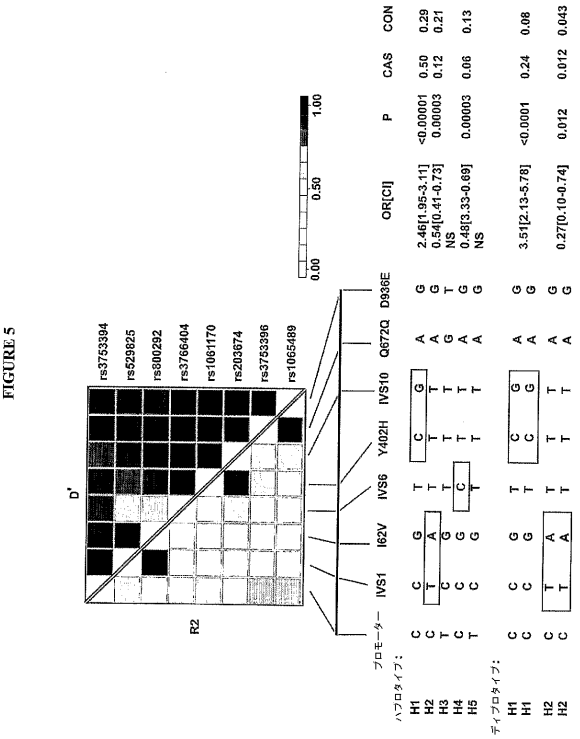
【図３】



【図４】



【図５】



【図６－１】

FIGURE 6

AATTCTTGGAAGAGGAGAACTGGACGTTGTGAACAGAGTTAGCTGGTAAATGTCCTCTTAAAAGATCCAA
AAAATGAGACTTCTAGCAAAGATTATTTGCCTTATGTTATGGGCTATTTGTGTAGCAGAAGATTGCAATG
AACTTCCTCCAAGAAGAAATACAGAAATTCTGACAGGTTCCTGGTCTGACCAAACATATCCAGAAGGCAC
CCAGGCTATCTATAAATGCCGCCCTGGATATAGATCTCTTGGAAATGTAATAATGGTATGCAGGAAGGGA
GAATGGGTTGCTCTTAATCCATTAAGGAAATGTCAGAAAAGGCCCTGTGGACATCCTGGAGATACTCCTT
TTGGTACTTTTACCCTTACAGGAGGAAATGTGTTTGAATATGGTGTAAAAGCTGTGTATACATGTAATGA
GGGGTATCAATTGCTAGGTGAGATTAATTACCGTGAATGTGACACAGATGGATGGACCAATGATATTCCT
ATATGTGAAGTTGTGAAGTGTTTACCAGTGACAGCACCAGAGAATGGAAAAATTGTCAGTAGTGCAATGG
AACCAGATCGGGAATACCATTTTGGACAAGCAGTACGGTTTGTATGTAACTCAGGCTACAAGATTGAAGG
AGATGAAGAAATGCATTGTTCAGACGATGGTTTTTGGAGTAAAGAGAAACCAAAGTGTGTGGAAATTTCA
TGCAAATCCCCAGATGTTATAAATGGATCTCCTATATCTCAGAAGATTATTTATAAGGAGAATGAACGAT
TTCAATATAAATGTAACATGGGTTATGAATACAGTGAAAGAGGAGATGCTGTATGCACTGAATCTGGATG
GCGTCCGTTGCCTTCATGTGAAGAAAAATCATGTGATAATCCTTATATTCCAAATGGTGACTACTCACCT
TTAAGGATTAAACACAGAACTGGAGATGAAATCACGTACCAGTGTAGAAATGGTTTTTATCCTGCAACCC
GGGGAAATACAGCCAAATGCACAAGTACTGGCTGGATACCTGCTCCGAGATGTACCTTGAAACCTTGTGA
TTATCCAGACATTAAACATGGAGGTCTATATCATGAGAATATGCGTAGACCATACTTTCCAGTAGCTGTA
GGAAAATTATTACTCCTATTACTGTGATGAACATTTTGAGACTCCGTCAGGAAGTTACTGGGATCACATTC
ATTGCACACAAGATGGATGGTCGCCAGCAGTACCATGCCTCAGAAAATGTTATTTTCCTTATTTGGAAAA
TGGATATAATCAAAATCATGGAAGAAAGTTTGTACAGGGTAAATCTATAGACGTTGCCTGCCATCCTGGC
TACGCTCTTCCAAAAGCGCAGACCACAGTTACATGTATGGAGAATGGCTGGTCTCCTACTCCCAGATGCA
TCCGTGTCAAAACATGTTCCAAATCAAGTATAGATATTGAGAATGGGTTTATTTCTGAATCTCAGTATAC
ATATGCCTTAAAAGAAAAAGCGAAATATCAATGCAAACTAGGATATGTAACAGCAGATGGTGAAACATCA
GGATCAATTAGATGTGGGAAAGATGGATGGTCAGCTCAACCCACGTGCATTAAATCTTGTGATATCCCAG
TATTTATGAATGCCAGAACTAAAAATGACTTCACATGGTTTAAGCTGAATGACACATTGGACTATGAATG
CCATGATGGTTATGAAAGCAATACTGGAAGCACCACTGGTTCCATAGTGTGTGGTTACAATGGTTGGTCT
GATTTACCCATATGTTATGAAAGAGAATGCGAACTTCCTAAAATAGATGTACACTTAGTTCCTGATCGCA
AGAAAGACCAGTATAAAGTTGGAGAGGTGTTGAAATTCTCCTGCAAACCAGGATTTACAATAGTTGGACC
TAATTCCGTTCAGTGCTACCACTTTGGATTGTCTCCTGACCTCCCAATATGTAAAGACGAAGTACAATCA
TGTGGTCCACCTCCTGAACTCCTCAATGGGAATGTTAAGGAAAAAACGAAAGAAGAATATGCACACAGTG
AAGTGGTGGAATATTATTGCAATCCTAGATTTCTAATGAAGGGACCTAATAAAATTCAATGTGTTGATGG
AGAGTGGACAACTTTACCAGTGTGTATTGTGGAGGAGAGTACCTGTGGAGATATACCTGAACTTGAACAT
GGCTGGGCCCAGCTTTCTTCCCCTCCTTATTACTATGGAGATTCAGTGGAATTCAATTGCTCAGAATCAT
TTACAATGATTGGACACAGATCAATTACGTGTATTCATGGAGTATGGACCCAACTTCCCCAGTGTGTGGC
AATAGATAAACTTAAGAAGTGCAAATCATCAAATTTAATTATACTTGAGGAACATTTAAAAAACAAGAAG
GAATTCGATCATAATTCTAACATAAGGTACAGATGTAGAGGAAAAGAAGGATGGATACACACAGTCTGCA
TAAATGGAAGATGGGATCCAGAAGTGAACTGCTCAATGGCACAAATACAATTATGCCCACCTCCACCTCA
GATTCCCAATTCTCACAATATGACAACCACACTGAATTATCGGGATGGAGAAAAAGTATCTGTTCTTTGC
CAAGAAAATTATCTAATTCAGGAAGGAGAAGAAATTACATGCAAAGATGGAAGATGGCAGTCAATACCAC
TCTGTGTTGAAAAAATTCCATGTTCACAACCACCTCAGATAGAACACGGAACCATTAATTCATCCAGGTC
TTCACAAGAAAGTTATGCACATGGGACTAAATTGAGTTATACTTGTGAGGGTGGTTTCAGGATACTCGAA
GAAAATGAAACAACATGCTACATGGGAAAATGGAGTTCTCCACCTCAGTGTGAAGGCCTTCCTTGTAAAT
CTCCACCTGAGATTTCTCATGGTGTTGTAGCTCACATGTCAGACAGTTATCAGTATGGAGAAGAGTTAC
GTACAAATGTTTTGAAGGTTTTGGAATTGATGGGCCTGCAATTGCAAAATGCTTAGGAGAAAAATGGTCT
CACCCTCCATCATGCATAAAAACAGATTGTCTCAGTTTACCTAGCTTTGAAAATGCCATACCCATGGGAG
AGAAGAAGGATGTGTATAAGGCGGGTGAGCAAGTGACTTACACTTGTGCAACATATTACAAAATGGATGG
AGCCAGTAATGTAACATGCATTAATAGCAGATGGACAGGAAGGCCAACATGCAGAGACACCTCCTGTGTG
AATCCGCCCACAGTACAAAATGCTTATATAGTGTCGAGACAGATGAGTAAATATCCATCTGGTGAGAGAG
TACGTTATCAATGTAGGAGCCCTTATGAAATGTTTGGGGATGAAGAAGTGATGTGTTTAAATGGAAACTG
GACGGAACCACCTCAATGCAAAGATTCTACAGGAAAATGTGGGCCCCCTCCACCTATTGACAATGGGGAC
ATTACTTCATTCCCGTTGTCAGTATATGCTCCAGCTTCATCAGTTGAGTACCAATGCCAGAACTTGTATC
AACTTGAGGGTAACAAGCGAATAACATGTAGAAATGGACAATGGTCAGAACCACCAAAATGCTTACATCC

【図６－２】

FIGURE 6（続き）

GTGTGTAATATCCCGAGAAATTATGGAAAATTATAACATAGCATTAAGGTGGACAGCCAAACAGAAGCTT
TATTCGAGAACAGGTGAATCAGTTGAATTTGTGTGTAAACGGGGATATCGTCTTTCATCACGTTCTCACA
CATTGCGAACAACATGTTGGGATGGGAAACTGGAGTATCCAACTTGTGCAAAAAGATAGAATCAATCATA
AAGTGCACACCTTTATTCAGAACTTTAGTATTAAATCAGTTCTCAATTTCATTTTTTATGTATTGTTTTA
CTCCTTTTTATTCATACGTAAAATTTGGATTAATTTGTGAAAATGTAATTATAAGCTGAGACCGGTGGC
TCTCTT

【図７】

FIGURE 7

MRLLAKIICLMLWAICVAEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGE
WVALNPLRKCQKRPCGHPGDTPFGTFTLTGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQLLGEINYRECDTDGWTNDIPI
CEVVKCLPVTAPENGKIVSSAMEPDREYHFGQAVRFVCNSGYKIEGDEEMHCSDDGFWSKEKPKCVEISC
KSPDVINGSPISQKIIYKENERFQYKCNMGYEYSERGDAVCTESGWRPLPSCEEKSCDNPYIPNGDYSPL
RIKHRTGDEITYQCRNGFYPATRGNTAKCTSTGWIPAPRCTLKPCDYPDIKHGGLYHENMRRPYFPVAVG
KYYSYYCDEHFETPSGSYWDHIHCTQDGWSPAVPCLRKCYFPYLENGYNQNHGRKFVQGKSIDVACHPGY
ALPKAQTTVTCMENGWSPTPRCIRVKTCSKSSIDIENGFISESQYTYALKEKAKYQCKLGYVTADGETSG
SIRCGKDGWSAQPTCIKSCDIPVFMNARTKNDFTWFKLNDTLDYECHDGYESNTGSTTGSIVCGYNGWSD
LPICYERECELPKIDVHLVPDRKKDQYKVGEVLKFSCKPGFTIVGPNSVQCYHFGLSPDLPICKEQVQSC
GPPPELLNGNVKEKTKEEYGHSEVVEYYCNPRFLMKGPNKIQCVDGEWTTLPVCIVEESTCGDIPELEHG
WAQLSSPPYYYGDSVEFNCSESFTMIGHRSITCIHGVWTQLPQCVAIDKLKKCKSSNLIILEEHLKNKKE
FDHNSNIRYRCRGKEGWIHTVCINGRWDPEVNCSMAQIQLCPPPPQIPNSHNMTTTLNYRDGEKVSVLCQ
ENYLIQEGEEITCKDGRWQSIPLCVEKIPCSQPPQIEHGTINSSRSSQESYAHGTKLSYTCEGGFRISEE
NETTCYMGKWSSPPQCEGLPCKSPPEISHGVVAHMSDSYQYGEEVTYKCFEGFGIDGPAIAKCLGEKWSH
PPSCIKTDCLSLPSFENAIPMGEKKDVYKAGEQVTYTCATYYKMDGASNVTCINSRWTGRPTCRDTSCVN
PPTVQNAYIVSRQMSKYPSGERVRYQCRSPYEMFGDEEVMCLNGNWTEPPQCKDSTGKCGPPPPIDNGDI
TSFPLSVYAPASSVEYQCQNLYQLEGNKRITCRNGQWSEPPKCLHPCVISREIMENYNIALRWTAKQKLY
SRTGESVEFVCKRGYRLSSRSHTLRTTCWDGKLEYPTCAKR

【図８】

FIGURE 8

AATTCTTGGAAGAGGAGAACTGGACGTTGTGAACAGAGTTAGCTGGTAAATGTCCTCTTAAAAGATCCAA
AAAATGAGACTTCTAGCAAAGATTATTTGCCTTATGTTATGGGCTATTTGTGTAGCAGAAGATTGCAATG
AACTTCCTCCAAGAAGAAATACAGAAATTCTGACAGGTTCCTGGTCTGACCAAACATATCCAGAAGGCAC
CCAGGCTATCTATAAATGCCGCCCTGGATATAGATCTCTTGGAAATGTAATAATGGTATGCAGGAAGGGA
GAATGGGTTGCTCTTAATCCATTAAGGAAATGTCAGAAAAGGCCCTGTGGACATCCTGGAGATACTCCTT
TTGGTACTTTTACCCTTACAGGAGGAAATGTGTTTGAATATGGTGTAAAAGCTGTGTATACATGTAATGA
GGGGTATCAATTGCTAGGTGAGATTAATTACCGTGAATGTGACACAGATGGATGGACCAATGATATTCCT
ATATGTGAAGTTGTGAAGTGTTTACCAGTGACAGCACCAGAGAATGGAAAAATTGTCAGTAGTGCAATGG
AACCAGATCGGGAATACCATTTTGGACAAGCAGTACGGTTTGTATGTAACTCAGGCTACAAGATTGAAGG
AGATGAAGAAATGCATTGTTCAGACGATGGTTTTTGGAGTAAAGAGAAACCAAAGTGTGTGGAAATTTCA
TGCAAATCCCCAGATGTTATAAATGGATCTCCTATATCTCAGAAGATTATTTATAAGGAGAATGAACGAT
TTCAATATAAATGTAACATGGGTTATGAATACAGTGAAAGAGGAGATGCTGTATGCACTGAATCTGGATG
GCGTCCGTTGCCTTCATGTGAAGAAAAATCATGTGATAATCCTTATATTCCAAATGGTGACTACTCACCT
TTAAGGATTAAACACAGAACTGGAGATGAAATCACGTACCAGTGTAGAAATGGTTTTTATCCTGCAACCC
GGGGAAATACAGCCAAATGCACAAGTACTGGCTGGATACCTGCTCCGAGATGTACCTTGAAACCTTGTGA
TTATCCAGACATTAAACATGGAGGTCTATATCATGAGAATATGCGTAGACCATACTTTCCAGTAGCTGTA
GGAAAATTATTACTCCTATTACTGTGATGAACATTTTGAGACTCCGTCAGGAAGTTACTGGGATCACATTC
ATTGCACACAAGATGGATGGTCGCCAGCAGTACCATGCCTCAGAAAATGTTATTTTCCTTATTTGGAAAA
TGGATATAATCAAAATTATGGAAGAAAGTTTGTACAGGGTAAATCTATAGACGTTGCCTGCCATCCTGGC
TACGCTCTTCCAAAAGCGCAGACCACAGTTACATGTATGGAGAATGGCTGGTCTCCTACTCCCAGATGCA
TCCGTGTCAGCTTTACCCTCTGAACTTCTGATCGAAGGTCATCCCTCTCCAGCTTGAGTGGATCAAAGAT
GACAAGGGCCAATGGAACCAAGTTTGAGTCTTGCCAGGTCAATACTTGGGTCCTGAGTATGGTGACTAGT
ATCTGTTTTGTTATGTGTGTATTATTCCAGCCAGAATGGGAAATGCTAATTCAGCTCCTCCAGGCAGCCA
ATGGGGCTGGTGGCTTTGAGATTATTAAACTCTTCTGGATCCTCTACG

【図９】

FIGURE 9

MRLLAKIICLMLWAICVAEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGE
WVALNPLRKCQKRPCGHPGDTPFGTFTLTGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQLLGEINYRECDTDGWTNDIPI
CEVVKCLPVTAPENGKIVSSAMEPDREYHFGQAVRFVCNSGYKIEGDEEMHCSDDGFWSKEKPKCVEISC
KSPDVINGSPISQKIIYKENERFQYKCNMGYEYSERGDAVCTESGWRPLPSCEEKSCDNPYIPNGDYSPL
RIKHRTGDEITYQCRNGFYPATRGNTAKCTSTGWIPAPRCTLKPCDYPDIKHGGLYHENMRRPYFPVAVG
KYYSYYCDEHFETPSGSYWDHIHCTQDGWSPAVPCLRKCYFPYLENGYNQNYGRKFVQGKSIDVACHPGY
ALPKAQTTVTCMENGWSPTPRCIRVSFTL

【図１０】

FIGURE 10

MRLLAKIICLMLWAICVAEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGE
WVALNPLRKCQKRPCGHPGDTPFGTFTLTGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQLLGEINYRECDTDGWTNDIPI
CEVVKCLPVTAPENGKIVSSAMEPDREYHFGQAVRFVCNSGYKIEGDEEMHCSDDGFWSKEKPKCVEISC
KSPDVINGSPISQKIIYKENERFQYKCNMGYEYSERGDAVCTESGWRPLPSCEEKSCDNPYIPNGDYSPL
RIKHRTGDEITYQCRNGFYPATRGNTAKCTSTGWIPAPRCTLKPCDYPDIKHGGLYHENMRRPYFPVAVG
KYYSYYCDEHFETPSGSYWDHIHCTQDGWSPAVPCLRKCYFPYLENGYNQNYGRKFVQGKSIDVACHPGY
ALPKAQTTVTCMENGWSPTPRCIRVKTCSKSSIDIENGFISESQYTYALKEKAKYQCKLGYVTADGETSG
SIRCGKDGWSAQPTCIKSCDIPVFMNARTKNDFTWFKLNDTLDYECHDGYESNTGSTTGSIVCGYNGWSD
LPICYERECELPKIDVHLVPDRKKDQYKVGEVLKFSCKPGFTIVGPNSVQCYHFGLSPDLPICKEQVQSC
GPPPELLNGNVKEKTKEEYGHSEVVEYYCNPRFLMKGPNKIQCVDGEWTTLPVCIVEESTCGDIPELEHG
WAQLSSPPYYYGDSVEFNCSESFTMIGHRSITCIHGVWTQLPQCVAIDKLKKCKSSNLIILEEHLKNKKE
FDHNSNIRYRCRGKEGWIHTVCINGRWDPEVNCSMAQIQLCPPPPQIPNSHNMTTTLNYRDGEKVSVLCQ
ENYLIQEGEEITCKDGRWQSIPLCVEKIPCSQPPQIEHGTINSSRSSQESYAHGTKLSYTCEGGFRISEE
NETTCYMGKWSSPPQCEGLPCKSPPEISHGVVAHMSDSYQYGEEVTYKCFEGFGIDGPAIAKCLGEKWSH
PPSCIKTDCLSLPSFENAIPMGEKKDVYKAGEQVTYTCATYYKMDGASNVTCINSRWTGRPTCRDTSCVN
PPTVQNAYIVSRQMSKYPSGERVRYQCRSPYEMFGDEEVMCLNGNWTEPPQCKDSTGKCGPPPPIDNGDI
TSFPLSVYAPASSVEYQCQNLYQLEGNKRITCRNGQWSEPPKCLHPCVISREIMENYNIALRWTAKQKLY
SRTGESVEFVCKRGYRLSSRSHTLRTTCWDGKLEYPTCAKR

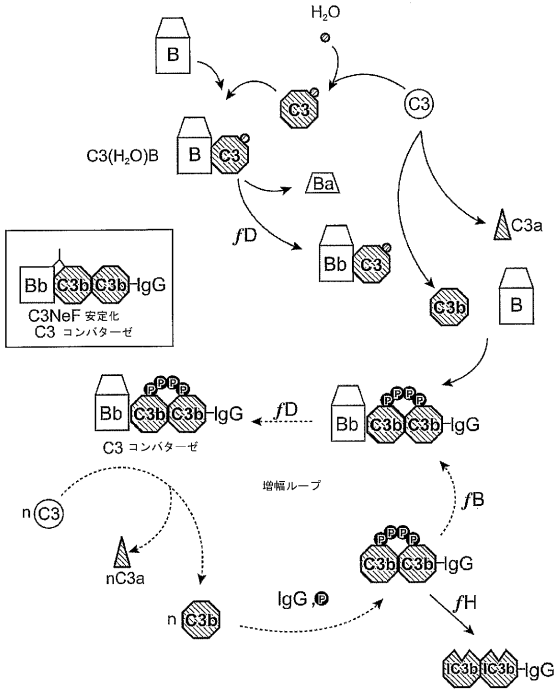
【図１１】

FIGURE 11

MRLLAKIICLMLWAICVAEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNIIMVCRKGE
WVALNPLRKCQKRPCGHPGDTPFGTFTLTGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQLLGEINYRECDTDGWTNDIPI
CEVVKCLPVTAPENGKIVSSAMEPDREYHFGQAVRFVCNSGYKIEGDEEMHCSDDGFWSKEKPKCVEISC
KSPDVINGSPISQKIIYKENERFQYKCNMGYEYSERGDAVCTESGWRPLPSCEEKSCDNPYIPNGDYSPL
RIKHRTGDEITYQCRNGFYPATRGNTAKCTSTGWIPAPRCTLKPCDYPDIKHGGLYHENMRRPYFPVAVG
KYYSYYCDEHFETPSGSYWDHIHCTQDGWSPAVPCLRKCYFPYLENGYNQNYGRKFVQGKSIDVACHPGY
ALPKAQTTVTCMENGWSPTPRCIRVSFTL

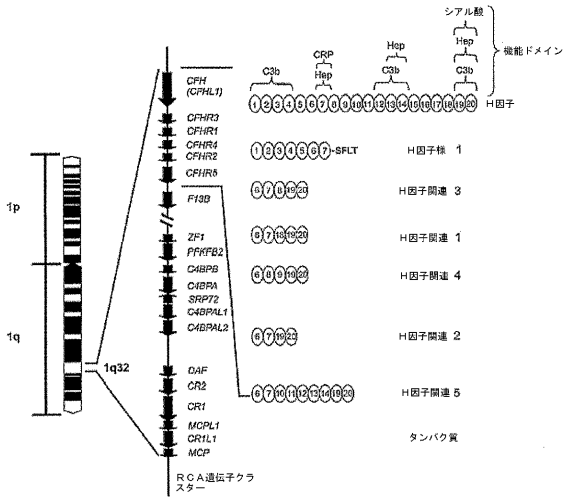
【図１３】

FIGURE 13



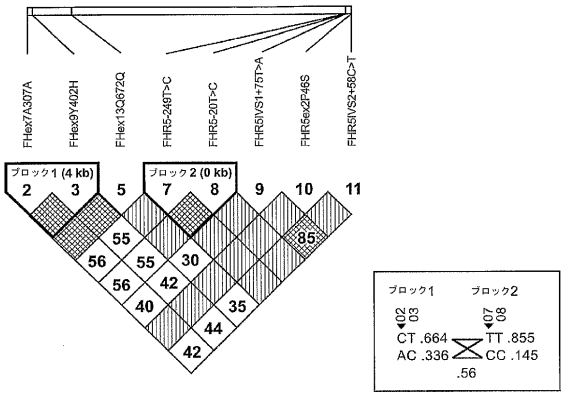
【図１４】

FIGURE 14



【図１５】

FIGURE 15



【図１６】

FIGURE 16

GGCAGGTGCTTGTTACTGTTAATGAAAGCAGATTTAAAGCAACACCACCATCACTGGAGTATTTTTAGTT
ATATACGATTGAGACTACCAAGCATGTTGCTCTTATTCAGTGTAATCCTAATCTCATGGGTATCCACTGT
TGGGGGAGAAGGAACACTTTGTGATTTTCCAAAAATACACCATGGATTTCTGTATGATGAAGAAGATTAT
AACCCTTTTTCCCAAGTTCCTACAGGGGAAGTTTTCTATTACTCCTGTGAATATAATTTTGTGTCTCCTT
CAAAATCCTTTTGGACTCGCATAACATGCACAGAAGAAGGATGGTCACCAACACCGAAGTGTCTCAGAAT
GTGTTCCTTTCCTTTTGTGAAAAATGGTCATTCTGAATCTTCAGGACTAATACATCTGGAAGGTGATACT
GTACAAATTATTTGCAACACAGGATACAGCCTTCAAAACAATGAGAAAAACATTTCGTGTGTAGAACGGG
GCTGGTCCACTCCTCCCATATGCAGCTTCACTAAAGGAGAATGTCATGTTCCAATTTTAGAAGCCAATGT
AGATGCTCAGCCAAAAAAAGAAAGCTACAAAGTTGGAGACGTGTTGAAATTCTCCTGCAGAAAAAATCTT
ATAAGAGTTGGATCAGACTCAGTTCAATGTTACCAATTTGGGTGGTCACCTAACTTTCCAACATGCAAAG
GACAAGTACGATCATGTGGTCCACCTCCTCAACTCTCCAATGGTGAAGTTAAGGAGATAAGAAAAGAGGA
ATATGGACACAATGAAGTAGTGGAATATGATTGCAATCCTAATTTTATAATAAACGGGCCTAAGAAAATA
CAATGTGTGGATGGAGAATGGACAACTTTACCCACTTGTGTTGAACAAGTGAAAACATGTGGATACATAC
CTGAACTCGAGTACGGTTATGTTCAGCCGTCTGTCCCTCCCTATCAACATGGAGTTTCAGTCGAGGTGAA
TTGCAGAAATGAATATGCAATGATTGGAAATAACATGATTACCTGTATTAATGGAATATGGACAGAGCTT
CCTATGTGTGTTGCAACACACCAACTTAAGAGGTGCAAAATAGCAGGAGTTAATATAAAAACATTACTCA
AGCTATCTGGGAAAGAATTTAATCATAATTCTAGAATACGTTACAGATGTTCAGACATCTTCAGATACAG
GCACTCAGTCTGTATAAACGGGAAATGGAATCCTGAAGTAGACTGCACAGAAAAAAGGGAACAATTCTGC
CCACCGCCACCTCAGATACCTAATGCTCAGAATATGACAACCACAGTGAATTATCAGGATGGAGAAAAAG
TAGCTGTTCTCTGTAAAGAAAACTATCTACTTCCAGAAGCAAAAGAAATTGTATGTAAAGATGGACGATG
GCAATCATTACCACGCTGTGTTGAGTCTACTGCATATTGTGGGCCCCCTCCATCTATTAACAATGGAGAT
ACCACCTCATTCCCATTATCAGTATATCCTCCAGGGTCAACAGTGACGTACCGTTGCCAGTCCTTCTATA
AACTCCAGGGCTCTGTAACTGTAACATGCAGAAATAAACAGTGGTCAGAACCACCAAGATGCCTAGATCC
ATGTGTGGTATCTGAAGAAAACATGAACAAAAATAACATACAGTTAAAATGGAGAAACGATGGAAAACTC
TATGCAAAAACAGGGGATGCTGTTGAATTCCAGTGTAAATTCCCACATAAAGCGATGATATCATCACCAC
CATTTCGAGCAATCTGTCAGGAAGGGAAATTTGAATATCCTATATGTGAATGAAGCAAGCATAATTTTCC
TGAATATATTCTTCAAACATCCATCTACGCTAAAAGTAGCCATTATGTAGCCAATTCTGTAGTTACTTCT
TTTATTCTTTCAGGTGTTGTTTAACTCAGTTTTATTTAGAACTCTGGATTTTTAGAGCTTTAGAAATTTG
TAAGCTGAGAGAACAATGTTTCACTTAATAGGAGGGTGTCTTAGTCCATATTACATTGTTATAACAGAGT
ATCACAGACTGGATAACTTCTAACCAATAGTTTATTTGTTTCATAAATCTAAAAGCTGAGAAGTCCAAGA
TGGTGGGGCTGCCTCTGGTGAGGGTCTTCTCGAAGCATCATAATATGCTGGAAGGCATCACAACATGGTG
GAAGGGATCACGTGGCAAAAGAGCATGTACATGGGAGTGAGAGAAAAAGAGAGAGAGACAGAGTGGCG
GGGGCCGGGGAGGAGCGCAAACTCATCCTTTATAAAGACACCACTCCTGAGATAACAATCCAATCCCATG
ATAATGACATTAATCCATTCAAGAAGATAGAGCTCTCGTGACTTAATCACCTTCTAAAGATCTCACCTGA
CAACACTGTTGCATTGGCAGTTAAGTTTCCACGTAAACTTTCGGGGACACATTCAAACCACAGGAGAAAC
TCAAATTGTTCCTGGGCAAATCACAACATGGGGAATTTTATTCATAAATGTCCACAGAAACAGTAAATGT
TCTCGCTTCAGAACTTAATTCATCTAATCCCTCCTGTTTGTCTCAAATTATAGGATAACTTTGAAACTTT
CTGAATTAACGTTATTTAAAAGGAAATGTAGATGTTATTTTAGTCTCTATCTTCAGGTTATTATCACTTA
AAAACCTGCGAAAGCTGTCAACTTTTGTGGTTGTAGCAAGTATTAATAAATATTTATAAATCCTCTAATG
TAAGTCTAGCTACCTATCCAATACTAAATACCCCTTAAAGTATTAAATGCACTATCTGCTGTAAACGGAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図１７】

FIGURE 17

MLLLFSVILISWVSTVGGEGTLCDFPKIHHGFLYDEEDYNPFSQVPTGEVFYYSCEYNFVSPSKSFWTRI
TCTEEGWSPTPKCLRMCSFPFVKNGHSESSGLIHLEGDTVQIICNTGYSLQNNEKNISCVERGWSTPPIC
SFTKGECHVPILEANVDAQPKKESYKVGDVLKFSCRKNLIRVGSDSVQCYQFGWSPNFPTCKGQVRSCGP
PPQLSNGEVKEIRKEEYGHNEVVEYDCNPNFIINGPKKIQCVDGEWTTLPTCVEQVKTCGYIPELEYGYV
QPSVPPYQHGVSVEVNCRNEYAMIGNNMITCINGIWTELPMCVATHQLKRCKIAGVNIKTLLKLSGKEFN
HNSRIRYRCSDIFRYRHSVCINGKWNPEVDCTEKREQFCPPPPQIPNAQNMTTVNYQDGEKVAVLCKEN
YLLPEAKEIVCKDGRWQSLPRCVESTAYCGPPPSINNGDTTSFPLSVYPPGSTVTYRCQSFYKLQGSVTV
TCRNKQWSEPPRCLDPCVVSEENMNKNNIQLKWRNDGKLYAKTGDAVEFQCKFPHKAMISSPPFRAICQE
GKFEYPICE

【図１８】

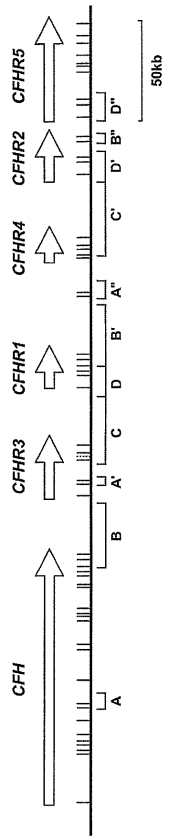
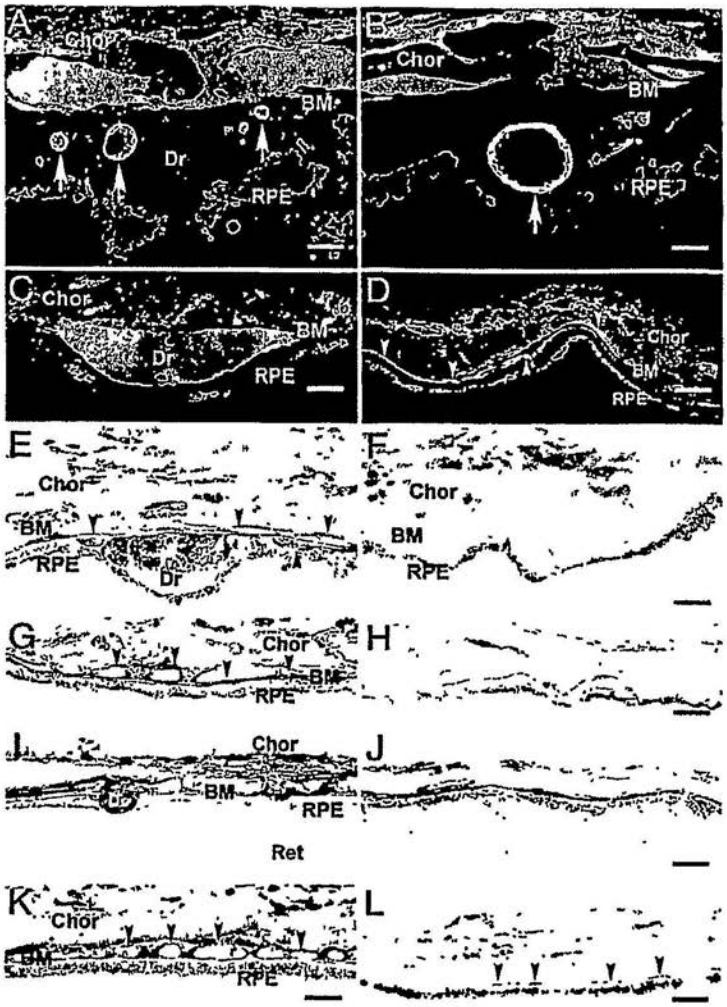


FIGURE 18

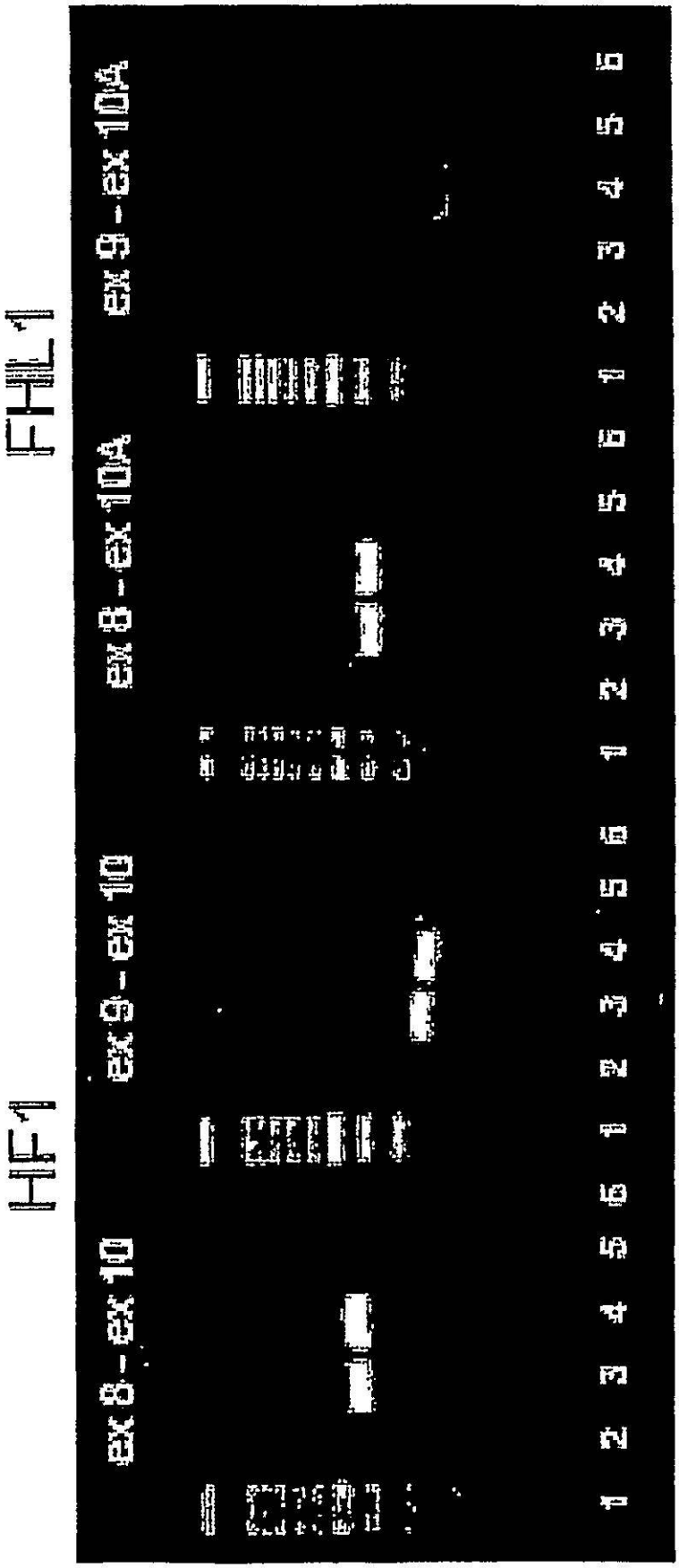
【図１】

FIGURES 1A-1L



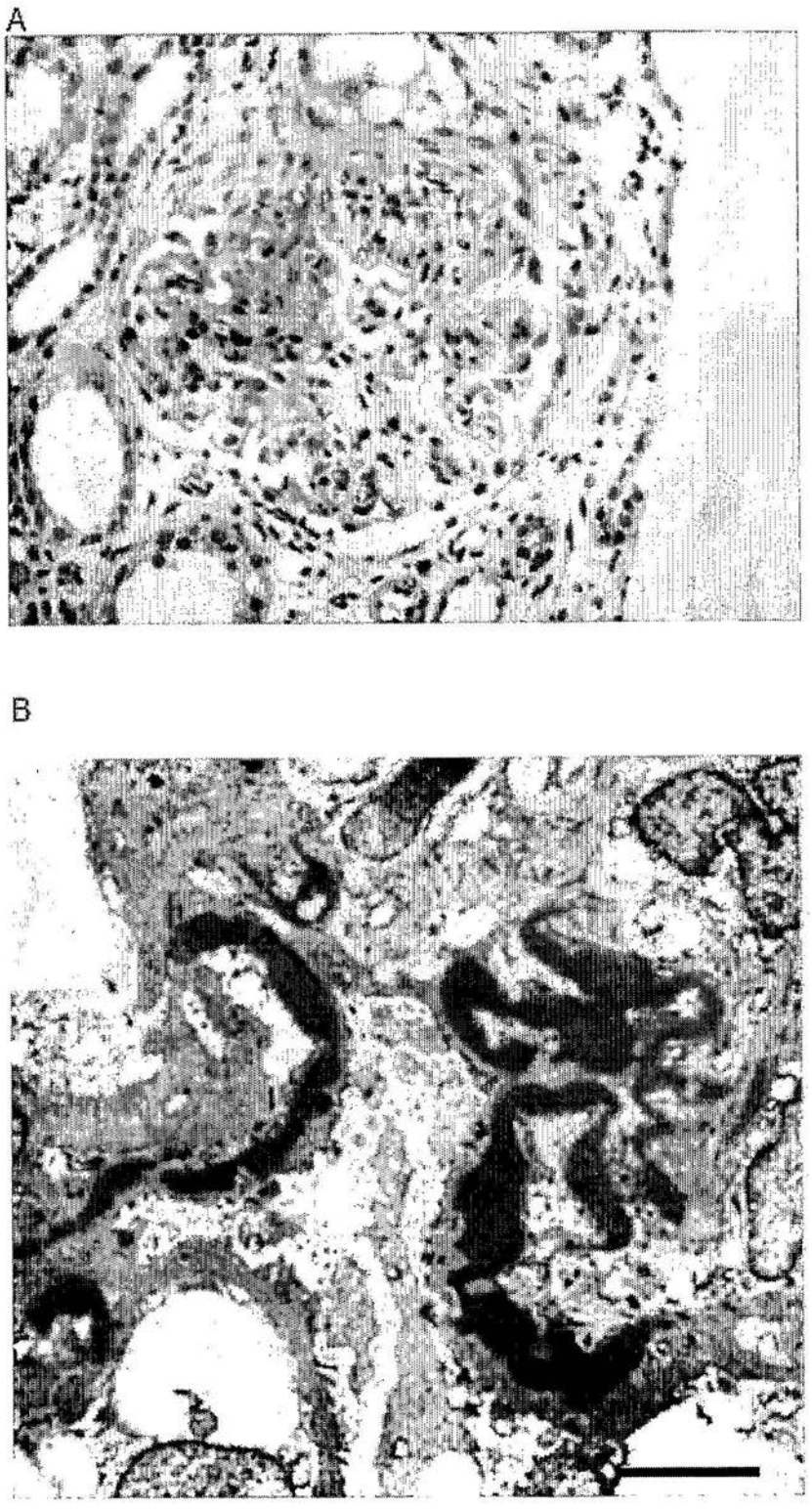
【図２】

FIGURE 2



【図１２】

FIGURE 12



【配列表】
2012139228000001.app

フロントページの続き

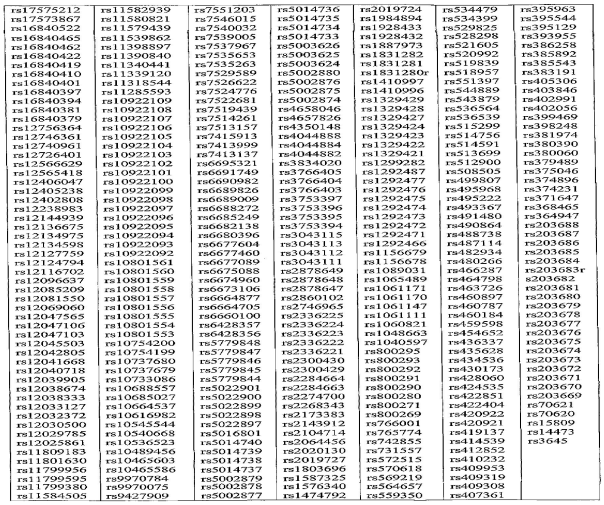
(31)優先権主張番号 60/735,697
(32)優先日 平成17年11月9日(2005.11.9)
(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 グレゴリー エス. ヘイグマン
アメリカ合衆国 アイオワ ５２２４１, コーラルビル, オーバーン ヒルズ ドライブ ５００
(72)発明者 リチャード ジェイ. スミス
アメリカ合衆国 アイオワ ５２２４１, アイオワ シティー, チェリー レーン １１

Ｆターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA04 CA20 HA08 HA11
4B063 QA01 QA19 QQ42 QR08 QR42 QR62 QS16 QS25 QS36

【外国語明細書】
2012139228000001.pdf

专利名称(译)	用于治疗和诊断年龄相关性黄斑变性的方法和试剂		
公开(公告)号	JP2012139228A	公开(公告)日	2012-07-26
申请号	JP2012049810	申请日	2012-03-06
[标]申请(专利权)人(译)	衣阿华大学研究基金会		
申请(专利权)人(译)	爱荷华州研究基金会大学		
[标]发明人	グレゴリーエスヘイグマン リチャードジェイスミス		
发明人	グレゴリー エス. ヘイグマン リチャード ジェイ. スミス		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 C12N15/09		
CPC分类号	A61P13/12 A61P17/00 A61P27/00 A61P27/02 A61P43/00 C12Q1/6883 C12Q2600/136 C12Q2600/156 C12Q2600/158 C12Q2600/172 A61K38/1703 C07K14/435 C12Q1/6827 A61K9/0048 C07K14/47		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/53.D C12N15/00.A C12Q1/68.AZN.A C12Q1/6883.C C12Q1/6883.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/HA08 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS36		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/653078 2005-02-14 US 60/715503 2005-09-09 US 60/717861 2005-09-16 US 60/735697 2005-11-09 US		
其他公开文献	JP5100901B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：确定与人类对AMD的易感性降低相关的补体因子H（CFH）基因的单倍型，作为受试者对年龄相关性黄斑变性（AMD）的易感性指标。 提供一种使用或不使用代码的方法。 解决方案：确定在CFH蛋白第62位编码异亮氨酸的序列是否存在于受试者基因组的多态性位点rs800292中的步骤，其中单倍型的存在是 结果表明该受试者对发展AMD的敏感性降低。 [选择图]无