

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 506016

(P2003 - 506016A)

(43)公表日 平成15年2月18日(2003.2.18)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027		A 0 1 K 67/027	4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 3
45/00		A 6 1 P 9/14	4 C 0 8 4
A 6 1 P 9/14		27/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 (全197数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 508612(P2001 - 508612)

(86)(22)出願日 平成12年2月22日(2000.2.22)

(85)翻訳文提出日 平成13年8月17日(2001.8.17)

(86)国際出願番号 PCT/US00/04583

(87)国際公開番号 W001/002866

(87)国際公開日 平成13年1月11日(2001.1.11)

(31)優先権主張番号 60/120,822

(32)優先日 平成11年2月19日(1999.2.19)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/120,668

(32)優先日 平成11年2月19日(1999.2.19)

(33)優先権主張国 米国(US)

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

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

(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 動脈壁破裂障害のための診断剤および治療剤

(57)【要約】

本発明は、動脈壁破裂障害の発生数と加齢性黄斑変性 (A M D) の発生数との間の高レベルな相関の発見に基づき、動脈壁破裂障害のための診断剤、治療剤、および薬物スクリーニングアッセイを提供する。1つの実施形態において、この動脈壁破裂障害は、大動脈瘤である。代表的には、本発明の方法は、被験体における動脈壁破裂障害を診断するかその発症に対する素因を決定する方法であり、眼における黄斑変性についての1つ以上の遺伝子型または表現型のマ-カーを検出する工程を包含する。ここで、該マ-カーは、動脈壁破裂障害の指標であるか、または動脈壁破裂障害の発症に対する素因の指標である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 被験体における動脈壁破裂障害を診断するかその発症に対する素因を決定する方法であって、該方法は、眼における黄斑変性についての1つ以上の遺伝子型または表現型のマーカーを検出する工程を包含し、ここで、該マーカーが、動脈壁破裂障害の指標であるか、または動脈壁破裂障害の発症に対する素因の指標である、方法。

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

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

【請求項4】 前記大動脈瘤が腹大動脈動脈瘤(AAA)である、請求項2に記載の方法。

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

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

【請求項7】 前記黄斑変性が、円板状癍痕および/もしくは脈絡膜の新生血管形成(DS/CNV)または滲出性前駆体表現型によって特徴付けられる、滲出性または血管新生(湿潤性)形態である、請求項1に記載の方法。

【請求項8】 前記マーカーが、網膜色素上皮下(RPE下)空間におけるドルーゼの存在を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項9】 前記マーカーが1つ以上のドルーゼ関連マーカーを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項10】 請求項9に記載の方法であって、前記ドルーゼ関連マーカーが、免疫グロブリン、アミロイドA(1アミロイドA)アミロイドP成分、C5およびC59b末端複合体、HLA-DR、フィブリノーゲン、第X因子、およびプロトロンビン、補体3、補体5および補体9、補体反応性タンパク質(CRP)、免疫グロブリン および 軽鎖、第X因子、HLA-DR、アポリポ

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

【請求項11】 請求項1または9のいずれか1項に記載の方法であって、前記マーカーが、蛍光眼底血管造影法(FFA)、眼底撮影法(FP)、網膜電位図(ERG)、電気眼球図(EOG)、視野、走査型レーザー検眼鏡検査(SLO)、視力測定、および暗順応測定からなる群より選択される少なくとも1つの技術を用いて検出される、方法。

【請求項12】 請求項9に記載の方法であって、前記ドルーゼ関連マーカーが、RPE細胞の死または機能不全、免疫媒介事象、RPE下空間における樹状細胞の増殖、移動、分化、成熟および活性化、円板状瘢痕の存在、脈絡膜の新生血管形成の存在ならびに/または脈絡膜線維症からなる群より選択される表現型マーカーである、方法。

【請求項13】 請求項12に記載の方法であって、RPE細胞の死または機能不全が、HLA-DR、CD68、ビトロネクチン、アポリポタンパク質E、クラスタリンおよびS-100からなる群より選択される遺伝子の発現を検出することにより検出される、請求項12に記載の方法。

【請求項14】 請求項12に記載の方法であって、前記免疫関連事象が、自己抗体の検出、脈絡膜の樹状細胞の検出、脈絡膜における白血球の蓄積の検出、網膜小グリア細胞のHLA-DR免疫反応性増加の検出、IV型コラーゲン合成の増加の検出および免疫関連分子のアップレギュレーションの検出により検出される、方法。

【請求項15】 前記自己抗体が、ドルーゼ、RPEまたは網膜抗原に対する抗体である、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 請求項14に記載の方法であって、前記免疫関連分子が、免疫グロブリン、補体、補体レセプター、ケモカイン、サイトカイン、CD抗原

、MHC抗原、急性期反応物質、プロテアーゼ、プロテアーゼインヒビター、免疫複合体、および抗原からなる群より選択される、方法。

【請求項17】 樹状細胞の成熟および増殖が、GM-CSF、IL-4、IL-3、SCF、FLT-3およびTNF を検出することにより検出される、請求項12に記載の方法。

【請求項18】 請求項12に記載の方法であって、前記RPE下空間における移動および分化が、樹状細胞マーカーまたはCD1a、CD4、CD14、CD68、CD45、CD83、CD86およびS100aからなる群より選択されるマーカーの組み合わせの存在および/またはレベルを決定することにより検出され得る、方法。

【請求項19】 請求項12に記載の方法であって、前記斑における線維症が、エラスチン、エラスチンのフラグメント、コラーゲン、またはコラーゲンのフラグメントの存在もしくはレベルを測定することによって検出され得る、方法。

【請求項20】 請求項12に記載の方法であって、前記斑における線維症が、エラスチン、フィブリリン-2、PI-1、PI-2、b-1インテグリン、エミリン、フィブリン、コラーゲン、フィコリン、HME、MMP、TIMP、ラミニン、Big H3、リシルオキシダーゼ、LTLP、PLOD、ビトロネクチン、MFAP-1およびMFAP-2からなる群より選択される少なくとも1つのマーカーの発現を調べることにより検出され得る、方法。

【請求項21】 請求項9に記載の方法であって、前記ドルーゼ関連マーカーが、HLA-DR、CD68、ビトロネクチン、アポリポタンパク質E、クラスタリンおよびS-100、熱ショックタンパク質70、死タンパク質、プロテアソーム、Cu/Znスーパーオキシドジスムターゼ、カテプシン、および死アダプタータンパク質RAIDDからなる群より選択される遺伝子型マーカーである、方法。

【請求項22】 被験体における動脈壁破裂障害を診断するかまたは動脈壁破裂障害に対する素因を測定するための方法であって、該方法は、

(a) 被験体から核酸を単離する工程、および

(b) 該核酸を遺伝子型決定する工程；
を包含し、ここで、黄斑変性関連ハプロタイプ由来の少なくとも1つの対立遺伝子が動脈壁破裂障害の危険性の増加の前兆である、方法。

【請求項23】 被験体における動脈壁破裂障害を診断、または動脈壁破裂障害に対する素因を測定するための方法であって、該被験体は、黄斑変性と診断された家族をもち、該方法は、以下

(a) 被験体から単離し；黄斑変性についての多型カーカーに対応する染色体領域を増幅するプライマーを用いて該核酸を増幅する工程、および

(b) 該増幅産物を分析する工程、
を包含し、ここで、該黄斑変性に関連した対立遺伝子型の多型指標の存在が、動脈壁破裂障害または動脈壁破裂障害の発症についての素因に関連する対立遺伝子型の指標である、方法。

【請求項24】 被験体における動脈壁破裂障害を診断するか、または動脈壁破裂障害に対する素因を測定するための方法であって、該被験体は、黄斑変性と診断された家族をもち、該方法は、

(i) 被験体からゲノム核酸を単離する工程；

(ii) 該ゲノムDNA中の短い直列反復配列を増幅して、遺伝子型を得る工程；

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

(iv) 該被験体のゲノムDNA中の多型の存在または非存在を決定する工程、
を包含し、ここで、黄斑変性に関連した対立遺伝子を示す多型の存在は、動脈壁破裂障害に関連する対立遺伝子型の指標であるか、または動脈壁破裂障害の発症についての素因の指標である、方法。

【請求項25】 請求項22、23、または24のいずれか1項に記載の方法であって、前記遺伝子型は、ヒト第2染色体の短腕の領域に実質的に対応し、該領域が、マーカーD2S2352およびD2S1364に接している、方法。

【請求項26】 請求項22、23、または24のいずれか1項に記載の方

法であって、前記遺伝子型は、1 p 2 1 - q 1 3、1 q 2 5 - q 3 1、2 p 1 6、6 p 2 1 . 2 - c e n、6 p 2 1 . 1、6 q、6 q 1 1 - q 1 5、6 q 1 4 - q 1 6 . 2、6 q 2 5 - q 2 6、7 p 2 1 - p 1 5、7 q 3 1 . 3 - 3 2、n o t 8 q 2 4、1 1 p 1 2 - q 1 3、1 3 q 3 4、1 6 p 1 2 . 1、1 7 p、1 7 p 1 3 - p 1 2、1 7 q、1 8 q 2 1 . 1 - q 2 1 . 3、1 9 q 1 3 . 3、2 2 q 1 2 . 1 - q 1 3 . 2 および X p 1 1 . 4 からなる群より選択される染色体の領域に実質的に対応する、方法。

【請求項27】 前記被験体が哺乳動物である、請求項22、23、または24のいずれか1項に記載の方法。

【請求項28】 前記被験体がヒトである、請求項27に記載の方法。

【請求項29】 請求項22、23、または24のいずれか1項に記載の方法であって、前記動脈壁破裂障害が、大動脈瘤、末梢動脈瘤、内臓動脈瘤、および頭蓋内動脈瘤からなる群より選択される、方法。

【請求項30】 前記動脈壁破裂障害が解離性動脈瘤である、請求項22、23、または24のいずれか1項に記載の方法。

【請求項31】 前記大動脈瘤がAAAである、請求項29に記載の方法。

【請求項32】 前記大動脈瘤がTAAである、請求項29に記載の方法。

【請求項33】 前記黄斑変性がAMDである、請求項22、23、または24のいずれか1項に記載の方法。

【請求項34】 前記黄斑変性が円板状癍痕および脈絡膜の新生血管形成(DS/CNV)を含む、請求項22、23、または24のいずれか1項に記載の方法。

【請求項35】 動脈壁破裂障害を診断するためのキットであって、該キットは、

- (a) 黄斑変性を示す多型を有する染色体領域を増幅するためのプライマー；
- (b) DNA増幅を行うための試薬；および
- (c) 該増幅した核酸を分析するための試薬、

を含む、キット。

【請求項36】 被験体における動脈壁破裂障害を診断または動脈壁破裂障

害の発症に対する素因を検出するための方法であって、該方法は、黄斑変性を示す遺伝子産物に特異的な抗体を用いて、該被験体から得られたサンプルに対してイムノアッセイを行う工程を包含し、ここで、結合した抗体の存在を検出することにより、該被験体が黄斑変性を有するかまたは黄斑変性の発症に対する素因を有し、従って動脈壁破裂障害を有するかまたは動脈壁破裂障害の発症についての素因を有することが示される、方法。

【請求項37】 動脈壁破裂障害を診断するか、または動脈壁破裂障害の発症についての素因を検出するためのキットであって、該キットが、請求項36に記載のイムノアッセイを行うための試薬を含む、キット。

【請求項38】 被験体における動脈壁破裂障害の発症を処置または予防するための方法であって、該方法は、被験体に薬学的に有効な量の黄斑変性治療剤を投与する工程を包含する、方法。

【請求項39】 前記黄斑変性治療剤が抗炎症性薬剤である、請求項38に記載の方法。

【請求項40】 前記抗炎症性薬剤がTNF- α 、IL-1、GM-CSF、IL-4またはILのアンタゴニストである、請求項38に記載の方法。

【請求項41】 前記黄斑変性治療剤がIL-10、M-CSF、IL-6およびILである、請求項38に記載の方法。

【請求項42】 前記黄斑変性治療剤が1つ以上のDRAMの発現のインヒビターである、請求項38に記載の方法。

【請求項43】 請求項38に記載の方法であって、前記DRAMが、アミロイドAタンパク質、アミロイドP成分、アンチキモトリプシン、アポリポタンパク質E、 α 2ミクログロブリン、補体3、補体C5、補体C5b-9末端複合体、第X因子、フィブリノーゲン、免疫グロブリン(γ および μ)、プロトロンビン、トロンボスポンジンおよびビトロネクチンからなる群より選択される、方法。

【請求項44】 動脈壁破裂障害を処置または予防するために有用な薬学的組成物であって、該組成物が、有効量の黄斑変性治療剤および治療的に受容可能なキャリアを含有する、薬学的組成物。

【請求項45】 前記動脈壁破裂障害が大動脈瘤である、請求項38に記載の方法。

【請求項46】 前記大動脈瘤がAAAである、請求項45に記載の方法。

【請求項47】 前記大動脈瘤がTAAである、請求項45に記載の方法。

【請求項48】 前記黄斑変性がAMDである、請求項38に記載の方法。

【請求項49】 前記黄斑変性が円板状癬痕および脈絡膜の新生血管形成(DS/CNV)を含む、請求項38に記載の方法。

【請求項50】 被験体における動脈壁破裂障害を処置または予防するための薬剤を同定するか、またはこの薬剤の効力を決定するための方法であって、該方法は、

(1) 被験体に非毒性投薬量の薬剤を投与する工程；および

(2) ドルーゼ形成または新生血管形成が阻害されるかまたは消散されたか否かを決定する工程、
を包含する、方法。

【請求項51】 被験体における動脈壁破裂障害を処置または予防する薬剤を同定するための方法であって、該方法は、

(a) 黄斑変性の非ヒトモデルと薬剤とを接触させる工程；および

(b) 黄斑変性の1つ以上のマーカーをモニターする工程、
を包含し、ここで、該1つ以上のマーカーの非存在および消失が、動脈壁破裂障害の阻害の指標である、方法。

【請求項52】 前記動脈壁破裂障害が大動脈瘤である、請求項50または51のいずれか1項に記載の方法。

【請求項53】 前記大動脈瘤がAAAである、請求項52に記載の方法。

【請求項54】 前記大動脈瘤がTAAである、請求項52に記載の方法。

【請求項55】 前記黄斑変性がAMDである、請求項50または51のいずれか1項に記載の方法。

【請求項56】 前記黄斑変性が円板状癬痕および脈絡膜の新生血管形成(DS/CNV)を含む、請求項50または51のいずれか1項に記載の方法。

【請求項57】 前記マーカーが網膜色素上皮下(RPE下)空間における

ドルーゼの存在である、請求項50または51のいずれか1項に記載の方法。

【請求項58】 前記マーカが1つ以上のドルーゼ関連分子(DRAM)である、請求項50または51のいずれか1項に記載の方法。

【請求項59】 請求項58に記載の方法であって、前記DRAMが、アミロイドAタンパク質、アミロイドP成分、アンチキモトリプシン、アポリポタンパク質E、2ミクログロブリン、補体3、補体C5、補体C5b-9末端複合体、第X因子、フィブリノーゲン、免疫グロブリン(および)、プロトロンビン、トロンボスポンジンおよびビトロネクチンからなる群より選択される、方法。

【請求項60】 動脈壁破裂障害の動物モデルであって、該モデルは、黄斑変性を発症しているかまたは黄斑変性の発症についての素因がある動物を含み、ここで、該動物における黄斑変性の存在、黄斑変性の重篤度、または黄斑変性についての素因が、動脈壁破裂障害の存在、動脈壁破裂障害の重篤度、動脈壁破裂障害についての素因の指標である、動物モデル。

【請求項61】 前記動物がトランスジェニック動物である、請求項60に記載の動物モデル。

【請求項62】 前記動物が、黄斑変性を発症するように処理されている、請求項61に記載の動物モデル。

【請求項63】 動脈壁破裂障害についての動物モデルであって、該動物モデルがヒトAMD関連遺伝子の遺伝的改変ホモログを保有するトランスジェニック動物を包含する、動物モデル。

【請求項64】 請求項61に記載の動物モデルであって、前記ヒトAMD関連遺伝子が、1p21-q13、1q25-q31、6p21.2-cen、6q、6q14-q16.2、7p21-p15、7q31.3-32、8q24、11p12-q13、13q34、16p12.1、17p、17p13-p12、17q、18q21.1-q21.3、19q13.3、22q12.1-q13.2、およびXp11.4からなる群より選択されるヒト染色体遺伝子座内の遺伝子である、動物モデル。

【請求項65】 動脈壁破裂障害についての動物モデルであって、該動物モ

デルが、遺伝的改変ドルーゼ関連マーカー遺伝子を保有する、動物モデル。

【請求項66】 請求項65に記載の動物モデルであって、前記ドルーゼ関連マーカー遺伝子が、免疫グロブリン、アミロイドA（1アミロイドA）、アミロイドP成分、C5およびC59b末端複合体、HLA-DR、フィブリノーゲン、第X因子、およびプロトロンビン、補体3、補体5および補体9、補体反応性タンパク質（CRP）、免疫グロブリン および 軽鎖、第X因子、HLA-DR、アポリポタンパク質A、アポリポタンパク質E、アンチキモトリプシン、2ミクログロブリン、第X因子、フィブリノーゲン、プロトロンビン、トロンボスポンジン、エラスチン、コラーゲン、ビトロネクチン、ICAM-1、LFA1、LFA3、B7、IL-1、IL-6、IL-12、TNF-、GM-CSF、熱ショックタンパク質、コロニー刺激因子（GM-CSF、M-CSF）、TNF-、IL-10、HLA-DR、CD68、ビトロネクチン、アポリポタンパク質E、クラスタリン、S-100、死タンパク質、熱ショックタンパク質70、プロテアソーム、Cu/Znスーパーオキシドジスムターゼ、カテプシン、および死アダプタータンパク質RAIDD、Igμ、Ig、IgJ、Ig鎖、CD1a、CD4、CD14、CD68、CD83、CD86、CD45、PECAM、MMP14、ユビキチン、FGF、IL-1、IL-6、IL-12、TNF、およびGM-CSFからなる群より選択される、動物モデル。

【請求項67】 動脈壁破裂障害を診断するためのキットであって、該キットは、抗エラスチン抗体、および抗コラーゲン抗体、抗ケモカイン抗体、および抗ビトロネクチン抗体からなる群より選択される少なくとも2つの抗体を含有する、キット。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の分野)**

本発明は、動脈瘤疾患を含む動脈壁破裂障害についての診断、治療、および動物モデルに関する。

【0002】**(発明の背景)**

末梢動脈系の障害は、以下の2つの一般的機構によってその病理的效果を生じる：動脈内腔の閉塞または血管壁の破裂。動脈閉塞は、動脈硬化から最も一般的に生じるが、内腔障害の他の原因が同定され得、それには、炎症性状態、外部圧縮、塞栓、血栓または線維性筋性形成異常が挙げられる。動脈閉塞障害は、代表的に、動脈樹内の多数の部位に影響を与える。動脈壁の破裂は、動脈瘤、動脈壁解離 (d i s s e c t i o n) または明白な動脈破裂を生じる。動脈瘤形成は、アテローム動脈硬化に最も一般的に関連する。動脈瘤はまた、感染、嚢胞性中膜壊死、先天性異常または外傷から生じ得る。本明細書に記載される外傷には、非医原性および医原性のプロセスが含まれ得る。動脈壁解離が、動脈瘤の合併症または独立した事象として生じうる。既存の動脈瘤が存在しない動脈壁解離は、自然に生じ得るか、またはそれは、外傷から生じ得る。明白な動脈破裂は、動脈瘤が特定の重要な直径を超える進行性の拡張から生じ得る。動脈瘤が存在しない場合、動脈破裂の最も一般的な原因は、何らかの型の動脈外傷である。動脈壁破裂は、多数の部位に影響を与え得るか、または1つのみの部位に局在化し得る。

【0003】

動脈瘤障害または動脈瘤疾患は、これらの用語が本明細書で用いられるように、少なくとも1つの動脈のセグメントにおける動脈瘤の形成を生じるようなプロセスを包含する。動脈瘤は、動脈の恒久的に局在化する、通常の1.5倍の直径に増加した拡張であると理解される。正常な動脈直径の値は、年齢、性別および血圧とともに変動することが認識される。(Vermilion BD ら、
A review of one hundred forty-seven popliteal aneurysms with long-term f

ollow-up」、Surgery 90:1009、1981)。動脈瘤は、破裂、隣接する構造物への圧迫、漏れ、動脈瘤に罹患した動脈のセグメントから生じる血管の流れの閉塞、および動脈瘤の部位における血管内腔内の血栓の蓄積によって生じ、この血栓は、血管を突然に閉塞させ得るか、または遠位動脈樹へより小さな塞栓を送り得る。

【0004】

動脈瘤は、それらが生じる解剖学的部位に従って分類され得る。一般的な型の動脈瘤としては、大動脈瘤、末梢動脈瘤、内臓動脈瘤および頭蓋内動脈瘤が挙げられる。動脈瘤についての最も一般的な位置は、腎臓下位大動脈(infrarenal aorta)である。腎臓下位動脈の動脈瘤(腹部大動脈瘤または「AAA」とも呼ばれる)は、胸の動脈瘤よりも3~7倍頻繁に生じる。他の解剖学的位置における動脈瘤がAAAを伴う患者において頻繁に見出される。その位置は、一般的な動脈または内部腸骨動脈および大腿膝窩動脈系を含む(Goldstone J、「Aneurysms of the aorta and iliac arteries、」435-455頁、WS Moore、Vascular Surgery: A Comprehensive Review、WB Saunders、1998、この教示は、本明細書において参考として援用される)。いわゆる末梢動脈瘤は、鎖骨下動脈に対して遠方に向かいかつそれを含む上方四肢の動脈、大腿動脈に対して遠位に向かいかつそれを含む下方四肢の動脈、ならびに頭蓋外頸動脈の動脈を包含する。末梢動脈瘤は、大動脈瘤に比較するとまれである。破裂する傾向のあるAAAとは異なり、末梢動脈瘤は、血栓を起こすか、または動脈瘤を起こす傾向がある。(Flanigan D、「Aneurysms of the peripheral arteries」、pp.457-467 in WS Moore、Vascular Surgery: A Comprehensive Review、WB Saunders、1998、この教示は、本明細書において参考として援用される)。サイズが手術において必要な主要な決定因子であるAAAとは異なり、末梢動脈瘤は、同定され次第手術で矯正され得る。内臓動脈瘤は、腹部大動脈の主要な分岐を含む(Stanley JCら、「Splanchnic and

renal artery aneurysms」、468-481頁、WS Moore、Vascular Surgery: A Comprehensive Review、WB Saunders、1998、この教示は、本明細書において参考として援用される)。これらの希な型の動脈瘤は、内臓および腎動脈の血管から生じる。内臓動脈瘤の約4分の1が急性の緊急外科手術として現れ、高い死亡率を伴う。頭蓋内動脈瘤は、代表的に、起源が先天的であり、生存の間進化および拡張する(Hoff JTら、「Neurosurgery」、1877-1908頁、Schwartz、S.I.(編)、Principles of Surgery、第7版、McGraw-Hill、NY、1999、この教示は、本明細書において参考として援用される)。代表的には、それらは、動脈のウイリス輪の主要な血管の二機能性において見出される。頭蓋内動脈瘤を有する20%までの患者が複数の動脈瘤を有する。頭蓋内動脈瘤についての最も一般的な提示は、くも膜下出血であり、これは、重篤度の程度が種々であり、恒久的な神経欠損、昏睡、および死へと発展し得る(Easton JDら、「Cerebrovascular diseases」、2325-2348頁、Harrison's、この教示は、本明細書において参考として援用される)。

【0005】

顕著なことに、動脈瘤は、長期にわたり、無症状性そのまま残り得る。例えば、すべての動脈瘤の70~75%である腎臓下大動脈は、最初に発見されるときには無症状性である。最も一般的には、無関係の状態を診断するために行われる慣用的な理学的検診または放射線学的研究(例えば、上部消化管造影、バリウム浣腸、静脈腎盂X線像、腹部超音波、腹部CTスキャン、または腰仙棘X線造影(a series of lumbosacral spine Xrays)の間に発見される。解離していない胸腹大動脈の動脈瘤(TAAA)を有する43%の患者は、診断時点では無症状である(Hamilton Iら、「Thoracoabdominal aortic aneurysms」、417-433頁、WS Moore、Vascular Surgery: A Comprehensive Review、WB Saunders、1998、

その教示は、本明細書において参考として援用される)。動脈瘤が無症状である場合、それは、破裂するまで検出されないままであり得る。

【0006】

動脈瘤の特定の病因について、他の非血管的症状または徴候が、動脈瘤が存在し得るとの臨床医の推測を惹起し得る。真菌性動脈瘤と呼ばれる感染因子によって生じる動脈瘤について、熱病につづいて恒常的な発熱および白血球増加は、内科医に対して、真菌性動脈瘤の存在を警告し得る。無症状性動脈瘤を同定するためのスクリーニングは、医学的履歴および理学的検診以外には存在しない(Pleumeekers HJら、「Selecting subjects for ultrasonographic screening for aneurysms of the aortic aorta: four different strategies」、Int J Epidemiol、28(4):682-6 1999 Aug)。理学的検診はさらに、触診で接触可能なような領域に限定される。従って、多くの末梢動脈瘤およびいくつかの大動脈瘤が理学的検診によって同定され得るが、内臓および頭蓋内の動脈瘤は同定され得ない。

【0007】

特定の患者において、動脈瘤の第一の症状は、破裂である。例えば、AAAの存在は、破裂の症状を提示する患者の約25~33%においてのみ破裂の前に分かる。AAAの破裂は、死亡率が90%に迫るほどの破壊的な事象である。破裂した動脈瘤の修復は、同様に非常に高死亡率を伴う。例えば、病院に到達した破裂したAAAを伴う患者のうち、ほぼ半分のみが生存する。他の解剖学的位置における動脈瘤の破裂は、かなりの率の罹患率および死亡率を伴う。例えば、破裂するTAAAを有する患者において、主な患者は、病院外で死亡する。外科的分野において動脈の発症についての危険性にある無症状性患者を同定し、その結果、その患者が動脈瘤が破裂する前に不顕性の動脈瘤について評価され得る必要性が存在する。動脈瘤に対して適用可能な診断方法は、MRI、CTスキャン、血液造影、および超音波のような放射線学技術、ならびに経食道超音波心臓図検査のような解剖学的に標的化された技術を含む。しかし、これらの方法のいずれも

、大集団の無症状患者をスクリーニングするためには適用可能ではない。

【0008】

無症状動脈瘤が早期段階で同定される場合、手術が推奨され得る。しかし、特定の症例において、動脈瘤は、経時的に拡張についてモニタリングされ得、ここで、動脈瘤が特定の大きさに達する場合、手術が選択される。ほとんどの動脈瘤は、経時的に拡張しつづける。それらは、自然には収縮も退縮もしない。動脈瘤の拡張をモニタリングするための方法は、その早期診断を可能にするために既に記載された技術以外には存在しない。さらに、無症状動脈瘤が拡張してもなお、それは無症状のままであり得る。突然の拡張は、局所のおよび四方に広がる疼痛を含む、劇的な症状を伴う傾向があり、漸次的動脈瘤の拡張は、無症状のままであり得る。しかし、漸次的拡張性動脈瘤における症状の欠如は、誤解を招き得る。動脈瘤が拡張するにつれ、その動脈瘤はより破裂しやすくなることが理解される。動脈瘤の大きさと、破裂の確率との間の関係は、十分に確立されている。例えば、AAAと診断されたヒトの5年破裂率は、5cm直径動脈瘤について25%から、7cm直径よりおおきな動脈瘤について95%へと増加する(Szigalyi DEら、「Clinical fate of the patient with the asymptomatic abdominal aortic aneurysm and unfit surgical treatment」、Arch.Surg.104:600-606、1972)。しかし、より小さな直径の動脈瘤も確かに破裂する。検死研究は、4cm未満のAAAの10%が破裂し、そして5cm未満のAAAの23%が破裂することが示された(Darling RCら、「Autopsy study of unoperated aortic aneurysms」、Circ 56(補遺2):161-164、1977)。

【0009】

部分的には、動脈瘤の直径と破裂率との相関は、動脈壁の機構によって説明され得る。破裂は、動脈壁に対する接線方向のストレスが壁の張力強度を超えるとときに起こる。流体を充填した円柱管の壁内の接線方向のストレスは、圧力および半径に正比例し、そして壁の厚さに逆に比例すると理解されている。血管が拡張

して動脈瘤を形成するにつれ、その半径は増加し、そしてその壁厚は減少する。例えば、正常な大動脈は、0.2 cmの壁厚をともなう2 cmの直径を有し得るが、動脈瘤の大動脈は、6 cmの直径および0.06 cmの壁厚を有し得る。血圧が定常のままである場合、その直径は、3倍増加し、そして壁へのストレスは、12倍増加する。従って、動脈瘤がより大きくなると、その動脈瘤は破裂しやすくなる。このことを認識すると、手術を要する重要な直径に到達したときに動脈瘤の拡張を非侵襲的にかつ頻繁にモニタリングして同定し得ることが有用である。さらに、拡張プロセスには、構造的統合性における変化の指標および局所組織生検における変化の指標であるである動脈壁の変化が伴うことが理解される。従って、動脈壁を構成する組織の生化学または生理学におけるこれらの変化に関連する生物学的マーカーを同定することが所望される。ここで、これらのマーカーは、さらに、壁が動脈瘤を発症するかまたは既存の動脈瘤を拡張する傾向に関連する。

【0010】

現在における動脈瘤の処置は手術である。解剖学的位置に依存して、動脈瘤クリッピング (clipping)、動脈瘤切除、管内のステント挿入もしくはグラフト挿入、または血管バイパスが適応され得る。動脈瘤の位置およびその特徴に応じて、開放 (open) 技術が使用され得るか、または血管内技術が適切であり得る。その動脈瘤が解剖学的により広汎になるに従い、手術がより広汎に必要となる。拡張すると、動脈瘤は、動脈を含むように伸長し得、それが、主要な血管から分岐する。従って、広汎な動脈瘤の修復は、分岐血管の再構成を必要とし得、手順に対してさらなる複雑性を追加する。動脈瘤を同定することは、その大きさがより小さいときに有利であり、それゆえ、分岐血管についての妥協の確率が減少する。さらに、より小さな大きさの動脈瘤は、血管内修復により受け入れられやすくあり得、患者を開放性手術技術の外科的ストレスから開放する。さらに、特定の動脈瘤は、隣接する構造に影響を与え得る炎症性成分を実証し得る。5%~10%のAAAは、例えば、他の腹膜後構造を含むように腹膜後へと伸張し得る、この炎症性反応と関連する。これらの炎症性動脈瘤を、その炎症性プロセスがその領域における他の組織へ影響を与え、手術手段の困難性を増加する

前に、早期段階で同定することは、有利である。

【0011】

動脈壁破裂と同様に危険な1セットの障害をもって、手術が一般的に診断の際に推奨されることは理解可能である。早期段階でこれらの障害を同定する能力を欠くことは、破壊的な結果の確率がより遠くなる場合、そのような治療が利用可能であったとしても、臨床医が、これらの障害を保守的に処置すること、または医療管理に着手することを憚らせるようである。動脈瘤疾患についての医療的治療の開発の予備条件は、それらが小さく、それゆえおそらく破裂しない場合にこれらの異常を同定する能力であり得る。さらに、この動脈瘤の進行が非侵襲的にモニタリングされ得なかったことから、医療管理を選択する臨床医は容易かつ安全には、その処置が作用しているかどうかを判定し得なかった。動脈瘤疾患についての医療治療の開発のための第二の予備条件は動脈瘤の発症を経時的に追跡し、それゆえ処置に対する傷害の応答に応じて医療治療が調整または手術と置換され得るための非侵襲的な方法であり得る。動脈瘤障害の病理の理解においてかなりの進展がなされているが、当該分野において、動脈瘤障害および動脈壁破裂の早期診断および非侵襲的モニタリングを可能にする方法についての必要性が残存する。さらに、動脈壁破裂を示す動物モデルを作製することが所望される。ここで、動脈壁破裂障害は、ヒトにおいて生じるものと類似する全身性異常から生じる。そのような動物モデルは、全身性に指向されるか、または動脈瘤が存在する局所解剖学的領域以外のほかの領域に対して指向される、モニタリング方法または治療的介入の開発を容易にする。その疾患の早期段階で介入するため、またはその疾患の進行を停止または遅延させるためのさらなる治療の開発を可能にするために、動脈瘤と関連するマーカー（例えば、多型または「動脈瘤障害遺伝子」）の同定に対するさらなる必要性が残存する。

【0012】

（発明の要旨）

本発明は、被験体における動脈壁破壊障害（大動脈瘤、頭蓋内動脈瘤、腹大動脈瘤および胸大動脈瘤を含むがそれらに限定されない）の発症が加齢性黄斑変性の発症と相関するという発見に関する。従って、本発明は、動脈壁破裂障害また

は動脈壁破裂障害の発症に対する素因を診断するための新規の方法、被験体における動脈壁破裂障害の発症の処置または予防のための方法（その被験体に、薬学的有効量の黄斑変性治療剤を投与することによる）、ならびに試験化合物をスクリーニングして動脈壁破裂障害治療剤を同定するためのインビトロおよびインビボのアッセイを提供する。AMDに加えて黄斑変性の他の形態が動脈壁破裂障害の発症と相関しているようである。好ましい実施形態において、動脈の炎症、変性または自己免疫と関連する動脈瘤の形態は、AMDの発症と相関し得る。いずれの特定の理論にも限定されないが、動脈瘤は、アテローム動脈硬化または感染によって少なくとも部分的に生じ得る。あるいは、動脈瘤は、遺伝された結合組織障害によって少なくとも部分的に生じ得る。

【0013】

1つの局面において、本発明は、動脈壁破裂障害を診断または動脈壁破裂障害の発症に対する素因を判定するための方法を提供する。この方法は、眼における黄斑変性についての1つ以上のマーカーを検出することによる。ここで、これらのマーカーは、動脈壁破裂障害または動脈壁破裂障害を発症する素因についての指標である。表現形マーカーの例としては：RPEの死、免疫媒介事象、樹状細胞増殖、下位RPE空間での遊走および分化（例えば、CD88、CD1aおよびS100のような樹状細胞マーカーの存在またはレベルを検出することによる）、円板状瘢痕の存在、脈絡膜新生血管形成および/または黄斑における線維症の存在。好ましい実施形態において、そのマーカーは、円板状瘢痕および/または脈絡膜新生血管形成（DS/CNV）であり、これは、黄斑変性の侵襲性または新生血管形成性（湿潤）形態の特徴である。検出され得る種々の免疫媒介性事象は、自己抗体の検出、脈絡膜における白血球の蓄積の検出、腎臓小グリア細胞のHLA-DR免疫反応性の増加の検出、VI型コラーゲンの合成における増加の検出、および免疫関連分子のアップレギュレーションの検出を包含する。検出され得る自己抗体は、その範囲内に、ドルーゼ、RPE抗原または腎臓成分に対して指向される抗体が含まれる。別の局面において、黄斑における線維症は、エラスチン、エラスチンのフラグメント、コラーゲン、またはコラーゲンのフラグメントの存在およびレベルを決定することによって検出され得る。あるいは、黄斑に

おける線維症は、エラスチン、フィブリリン - 2、PI - 1、PI - 2、b - 1 インテグリン、MFAP - 1またはMFAP - 2の示差的発現によって検出される。

【0014】

遺伝子マーカーの例としては、ドルーゼ形成眼組織においてアップレギュレートまたはダウンレギュレートされる種々の遺伝子が挙げられる。例えば、死につつあるRPE細胞によって発現される遺伝子としては以下が挙げられる：HLA - DR、CD68、ビトロネクチン、アポリタンパク質E、クラステリンおよびS - 100、熱ショックタンパク質70、死 (death) タンパク質、プロテアソーム、Cu/Zn スーパーオキシドジスムターゼ、カテプシン、および死アダプタータンパク質 (RAIDD)。免疫媒介事象に關与するマーカーとしては以下が挙げられる：自己抗体 (例えば、ドルーゼ、RPEおよび/または網膜成分) に対して指向される)、白血球、樹状細胞、筋線維芽細胞、VI型コラーゲン。ドルーゼに關連する分子としては以下が挙げられる：イムノグロブリン、アミロイドA (1アミロイドA)、アミロイドP成分、C5およびC5b - 9終末風剛体、HLA - DR、フィブリノーゲン、第X因子、プロトロンビン、補体3、補体5、および補体9、補体反応性タンパク質 (CRP)、免疫グロブリン および 輕鎖、第X因子、HLA - DR、アポリタンパク質A、アポリタンパク質E、アンチキモトリプシン、2ミクログロブリン、第X因子、フィブリノーゲン、プロトロンビン、トロンボスポンジン、エラスチン、コラーゲンおよびビトロネクチン。ドルーゼ關連樹状細胞のマーカーとしては以下が挙げられる：CD1a、CD4、CD14、CD68、CD83、CD86、およびCD45、PECAM、MMP14、ユビキチン、およびFGF。重要な樹状細胞關連補助分子であって、T細胞認識に關与するものとしては、以下が挙げられる：ICAM - 1、LFA1、LFA3、およびB7、IL - 1、IL - 6、IL - 12、TNF - 、GM - CSFおよび熱ショックタンパク質。樹状細胞発現に關連するマーカーとしては、以下が挙げられる：コロニー刺激因子、TNF - 、およびIL - 1。樹状細胞増殖に關連するマーカーとしては、以下が挙げられる：GM - CSF、IL - 4、IL - 3、SCF、FLT - 3およびTNF

。樹状細胞分化に関連するマーカーとしては以下が挙げられる：IL - 10、M - CSF、IL - 6およびIL - 4。

【0015】

当業者には、これらのマーカーが、当該分野において公知の1つ以上の技術を用いて検出され得ることは容易に明らかである。これらには、以下が挙げられるがそれらに限定されない：蛍光眼底血管造影法（FFA）、眼底撮影法（FP）、網膜電位図（ERG）、電気眼球図（EOG）、視野、走査型レーザー検眼鏡検査（SLO）、視力測定、および暗順応測定。

【0016】

別の実施形態において、被験体から得たサンプルは、血液、尿、組織、DNAまたはRNAであり、そしてそのマーカーは、標準的なタンパク質または核酸の診断技術を用いてそこで検出される。

【0017】

別の実施形態において、本発明は、被験体において動脈壁破裂傷害を診断またはその素因を判定するための方法を提供する。この方法は、被験体から核酸を単離する工程およびその核酸を遺伝子型決定する工程を包含する。ここで、黄斑変性関連ハプロタイプの少なくとも1つの対立遺伝子が動脈壁破裂障害の危険性を増加することの予測因子である。別の実施形態において、本発明は、被験体において動脈壁破裂障害を診断するかまたはその素因を判定するための方法を提供する。この方法は、核酸を被験体から単離する工程、AMDについての多型マーカーに対応する染色体の領域を増幅するプライマーを用いてその核酸を増幅する工程、およびその増幅産物を分析する工程を包含する。ここで、黄斑変性に連鎖する対立遺伝子型の指標となる多型の存在は、大動脈瘤に連鎖する対立遺伝子型または動脈壁破裂障害の発症に対する素因についての指標である。別の実施形態において、本発明は、黄斑変性と診断された家族構成員を有する被験体において動脈壁破壊障害を診断するかまたはその素因を判定するための方法を提供する。この方法は、被験体からゲノム核酸を単離する工程、そのゲノムDNAにおける短い直列反復配列を増幅して遺伝子型を得る工程、その遺伝子型を、公知のDNA配列の遺伝子型と比較して、ヌクレオチド配列多型を検出する工程、およびその

被験体のゲノムDNAにおける多型の存在または非存在を判定する工程を包含する。ここで、黄斑変性に連鎖する対立遺伝子型の指標である多型の存在は、動脈壁破壊障害に連鎖する対立遺伝子型の指標または動脈壁破壊障害に発症に対する素因の指標である。好ましい実施形態において、マーカーD2S2352およびD2S1364と境界を接するヒト第2染色体の短アームの領域にその遺伝子型は実質的に対応する。更に好ましい実施形態において、その遺伝子型は、以下の染色体領域の1つ以上に実質的に対応する：1p21-q13、1q25-q31、2p16、6p21.2-cen、6p21.1、6q、6q11-q15、6q14-q16.2、6q25-q26、7p21-p15、7q31.3-32、not 8q24、11p12-q13、13q34、16p12.1、17p、17p13-p12、17q、18q21.1-q21.3、19q13.3、22q12.1-q13.2およびXp11.4（これらはすべて、黄斑変性に連鎖する多型または変異を有するとして、かつなお、染色体1~22またはXにある未同定の遺伝子座として同定されそして特徴付けられた。好ましい実施形態において、動脈壁破裂障害は、AAAまたはTAAであり、そして黄斑変性はAMDである。

【0018】

さらに別の実施形態において、本発明は、被験体において動脈壁破裂障害を診断するかまたはその素因を判定するための方法を提供する。この方法は、その被験体から得られたサンプルに対して黄斑変性についての指標である遺伝子産物に特異的な抗体を用いてイムノアッセイを行う工程を包含する。ここで、結合した抗体の存在の検出は、黄斑変性または黄斑変性を発症する素因をその被験体が有すること、そしてそれゆえ、動脈壁破裂障害または動脈壁破裂障害を発症することについての素因を有することを示す。1つの実施形態において、本発明は、上記イムノアッセイを実施するための試薬を含む、動脈壁破裂障害を診断するためのキットを提供する。別の実施形態において、動脈壁破裂障害を診断するためのキットは、黄斑変性の指標となる多型を有する染色体の領域を増幅するためのプライマー、DNA増幅を行うための試薬、および増幅された核酸を分析するための試薬を備える。

【0019】

別の局面において、本発明は、被験体において動脈壁破裂障害の発症を処置または予防するための方法を提供する。この方法は、薬学的有効量の黄斑変性治療剤を投与することによる。黄斑変性治療剤は、抗炎症剤であり得、好ましくは、TNF- α 、IL-1、GM-CSF、IL-4またはIL-13のアнтаゴニストであり得る。この治療剤はまた、IL-10、M-CSF、IL-6、IL-4またはそれらのアゴニストであり得る。別の実施形態において黄斑変性治療剤は、1つ以上のDRAMの発現の調節因子であり、例えば、アミロイドAタンパク質、アミロイドP成分、アンチキモトリプシン、アポリポタンパク質E、2ミクログロブリン、補体3、補体C5、補体C5b-9の末端複合体、第X因子、フィブリノーゲン、イムノグロブリン(および)、プロトロンビン、トロンボスポジン、またはビトロネクチンである。別の実施形態において、本発明は、動脈壁破裂障害を処置または予防するために有用な薬学的組成物を提供する。この薬学的組成物は、有効量の黄斑変性治療剤および治療的に受容可能なキャリアを含む。1つの実施形態において、動脈瘤破裂障害は、好ましくは、大動脈瘤、すなわちAAAまたはTAAであり、そして黄斑変性はAMD、好ましくは滲出性または新生血管形成(湿潤)形態であり、この形態は、円板状瘢痕および/または脈絡膜新生血管形成(DS/CNV)により特徴付けられる。

【0020】

別の局面において、本発明は、被験体において動脈瘤破裂障害を処置または予防するための薬剤を同定するか、またはその薬剤の効力を判定するための方法を提供する。この方法は、被験体に、非毒性投薬量で薬剤を投与すること、およびドレーゼ形成または新生血管形成が阻害または改善されたかどうかを判定することによる。別の実施形態において、本発明は、被験体において動脈瘤破裂障害を処置または予防するための薬剤を同定するための方法を提供する。この方法は、黄斑変性についての非ヒトモデルを、薬剤と接触させること、および黄斑変性の1つ以上のマーカーをモニタリングすることによる。ここで、1つ以上のそのマーカーの非存在または消失は、動脈瘤破裂障害の阻害の指標である。好ましくは、動脈壁破裂障害は、AAAまたはTAAであり、そして黄斑変性は、好ましく

はAMD、より好ましくは円板状癍痕および脈絡膜新生血管形成(DS/CNV)疾患型の黄斑変性である。黄斑変性を検出するために使用されるマーカーは、RPE下領域または1つ以上のDRAMにおけるドルーゼの存在であり得る。これは、例えば、アミロイドAタンパク質、アミロイドP成分、アンチキモトリプシン、アポリポタンパク質E、 α 2ミクログロブリン、補体3、補体C5、補体C5b-9の末端複合体、第X因子、フィブリノーゲン、イムノグロブリン(および)、プロトロンビン、トロンボスポジン、またはビトロネクチンである。

【0021】

別の局面において、本発明は、AMDを有するかまたはその発症の素因のある、動脈壁破裂障害についての動物モデルを提供する。ここで、その動物において、AMDについての存在、その重篤度、またはその素因は、動脈壁破裂障害についての存在、その重篤度またはその素因の指標である。1つの実施形態において、その動物は、トランスジェニック動物である。別の好ましい実施形態において、その動物は、薬剤によって処置され、その結果、その動物はAMDを発症する。

【0022】

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

【0023】

(発明の詳細な説明)

本発明は、特定の動脈壁破裂障害の指標が加齢性黄斑変性の発症と相関するという発見に関する。本明細書に詳細に記載される1つの実施形態において、本発明は、動脈瘤障害の発症が、加齢性黄斑変性の発症に相関するという発見に関する。本発明は、大動脈瘤障害を特に参照して記載されているが、これらの障害において関連づけられるそのような病理プロセスは、作用中、血管系内でより一般化された基本に基づいて存在すると理解される(Baxter BTら、「Abdominal aortic aneurysms are associated with altered matrix proteins of

nonaneurysmal aortic segments」、J Vasc Surg、19(5):792-802; 考察 803 (1994年5月)。動脈瘤障害についての他の位置は、関連分野における当業者にとって周知である。これらの位置のいくつかにおいて、大動脈瘤において検出されるものと類似する病理学的プロセスが同定されている。例えば、病理プロセスは、大動脈瘤に関連するものに類似する大脳血管系内の動脈瘤形成において同定されている (Gaetani Pら、「Metalloproteinases and intracranial vascular lesions」、Neuro l Res、21(4):385-90、1999年6月)。しかし、大動脈の解剖学的特徴(これは、コラーゲンおよびエラスチンのような構造エレメントのその変動する分布を伴う)は、この血管を特に例示するものとして研究するようにさせる。(Halloran BGら、「Localization of aortic diseases is associated with intrinsic differences in aor」、J Surg Res、59(1):17-22 (1995年7月)。従って、本発明は、大動脈を参照することによって例示されるが、本明細書において記載されるキットおよび方法は、体内の任意の動脈における動脈壁破裂障害の存在と関係し得ることが理解される。

【0024】

(4.1: 定義)

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

【0025】

用語「アゴニスト」とは、本明細書において使用される場合、遺伝子産物の産生または活性を増強またはアップレギュレート(例えば、増強または補充)する薬剤をいうことが意味される。アゴニストはまた、別の遺伝子産物、分子または細胞との遺伝子産物、分子または細胞との(例えば、遺伝子産物の、別の相補的もしくは異種の遺伝子産物との、または遺伝子産物とそのレセプターとの)相互作用を増加させる化合物であり得る。好ましいアゴニストは、遺伝子の上流領域

に対する転写因子の結合または活性化を増強または増加させ、それによってその遺伝子を活性化する化合物である。遺伝子発現を活性化（例えば、RNAまたはタンパク質の合成を増加させることによるか、あるいはRNAまたはタンパク質の代謝回転を減少させることによる）するかまたは遺伝子産物活性を活性化する任意の薬剤は、その薬剤がその遺伝子または遺伝子産物に直接作用するか間接的に作用する（例えば、遺伝子制御経路の上流で）かにかかわらず、アゴニストであり得る。アゴニストは、RNA、ペプチド、抗体および低分子あるいはそれらの組合せであり得る。

【0026】

句「AMD関連眼底（fundus）の知見」とは、AMDの指標となる異常な知見をいう。例えば、AMD関連眼底の知見は、末梢における多発性ドルーゼ、灰色黄斑、乳頭周囲萎縮、脈絡膜新脈管膜および/または円板状瘢痕あるいは地図状萎縮（GA）の存在を包含し得る。AMD関連眼底の知見は、眼科学分野において公知の従来の光学的方法によるか、または眼底に対して非破裂的である任意の他の方法によってインビボで検出される知見を包含し得る。

【0027】

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

【0028】

用語「アンタゴニスト」とは、本明細書において使用される場合、遺伝子産物の産生または活性をダウンレギュレート（例えば、抑制または阻害）する薬剤をいうことが意味される。そのようなアンタゴニストは、遺伝子産物、分子または細胞と、別の遺伝子産物、分子または細胞との間の相互作用を阻害または減少す

る薬剤であり得る。好ましいアンタゴニストは、遺伝子上流領域に対する転写因子の結合または活性化を阻害または減少し、そしてそれによってその遺伝子の活性化をブロックする化合物である。遺伝子発現または遺伝子産物活性を阻害する任意の薬剤は、その薬剤がその遺伝子または遺伝子産物に直接作用するか、または間接的（例えば、その遺伝子制御経路における上流）に作用するかどうかにかかわらず、アンタゴニストであり得る。アンタゴニストはまた、遺伝子の発現をダウンレギュレートするか、または存在する遺伝子産物の量を（例えば、RNAまたはタンパク質の合成を減少すること、またはRNAまたはタンパク質の代謝回転を増加させることによって）減少する化合物であり得る。アンタゴニストは、RNA、ペプチド、抗体および低分子、あるいはそれらの組合せであり得る。

【0029】

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

【0030】

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

【0031】

用語「樹状細胞」または「DC」とは、本明細書において使用される場合、その異常な樹状形態、その強力な抗原提示能力およびCD3、CD19、CD16、CD14のような系統特異的なマーカーの欠如によって特徴付けられる造血細胞をいう。ここで、そのマーカーは、T細胞、B細胞、NK細胞および単球から、それぞれ、それらを識別する。現在、樹状細胞発生について少なくとも2つの

個体発生経路が存在する：骨髄性に向けられた造血前駆体細胞に由来する経路、およびリンパ球に向けられた造血前駆体細胞に由来する経路。顆粒球および単球を生じる、骨髄性に向けられた前駆体はまた、皮膚のランゲルハンス細胞および二次リンパ組織における骨髄性関連樹状細胞へと分化し得る（樹状細胞についての多数の概説につき、Lotze、M.T.およびThomson、A.W.（編）（1999）「Dendritic Cells」、Academic Press、San Diego、CAを参照のこと。この教示は、本明細書において参考として援用される）。

【0032】

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

【0033】

用語「樹状細胞突起（process）」とは、樹状細胞の部分を用い、これは、樹状細胞の中心から離れる方向に向って突出または伸長する。

【0034】

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

【0035】

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

【0036】

用語「ドルーゼ（drusen）」とは、本明細書において使用される場合、

多数の表現型を包含する。そのすべてが、ブルー膜の内部コラーゲン層と、RPE 基板との間に発生する。堅いドルーゼは、均一な好酸性の材料から構成される小さく顕著な沈着であり、そして通常傾斜した境界伴わず、丸いかまたは半球状である。軟ドルーゼは、より大きく、通常均一ではなく、そして代表的には、内包および球状のプロファイルを含む。いくつかのドルーゼは、石灰化されてい得る。用語「広汎性 (diffuse) ドルーゼ」または「基底線状沈着 (basal linear deposit)」とは、ブルー膜の内部コラーゲン層と網膜色素上皮 (RPE) との間の層を形成する非晶性材料を記載するために使用される。この材料は、それが盛り上がっていないことを除いて組織的には軟ドルーゼであるようであり得る。

【0037】

用語「ドルーゼ関連マーカー」とは、ドルーゼ形成の発生と関連し、そして最終的にはドルーゼ関連眼疾患または眼障害の発生に關与する表現型または遺伝子型をいう。表現型マーカーの例としては以下が挙げられる：機能不全および/またはRPEの死、免疫媒介事象、樹状細胞増殖、遊走および分化、下位RPE空間へのDC突起の突出（例えば、CD68、CD1aおよびS100のような樹状細胞マーカーの存在またはレベルを検出することによる）、地理状萎縮または円板状癒痕の存在、脈絡膜新生血管形成および/または脈絡膜線維症の存在（特に黄斑における）。遺伝子型マーカーの例としては、以下が挙げられる：変異遺伝子および/または異なる遺伝子発現の異なるパターン（「ドルーゼ発生経路」）（これは、ドルーゼ生合成に關連する眼組織を形成するドルーゼにおいてアップレギュレートまたはダウンレギュレートされる遺伝子を含む）。例えば、機能不全および/または死につつあるRPE細胞によって発現される遺伝子としては、以下が挙げられる：HLA-DR、CD68、ビトロネクチン、アポリポタンパク質E、クラスタリンおよびS-100、熱ショックタンパク質70、死タンパク質、プロテアゾーム、Cu/Znスーパーオキシドジスムターゼ、カテプシン、および死アダプタータンパク質RAIDD。免疫媒介事象に關与するマーカーとしては以下が挙げられる：自己抗体（例えば、ドルーゼ、RPEおよび/または網膜成分）に対して指向される）、白血球、樹状細胞、筋線維芽細胞、VI

型コラーゲン、およびケモカインおよびサイトカインのメンバー。ドルーゼに関連する分子としては以下が挙げられる：イムノグロブリン、アミロイドA、アミロイドP成分、HLA-DR、フィブリノーゲン、第X因子、プロトロンビン、補体3、補体5、補体9、および補体5b-9、C反応性タンパク質(CRP)アポリタンパク質A、アポリタンパク質E、アンチキモトリプシン、2ミクログロブリン、トロンボスポジン、およびビトロネクチン自己抗体(例えば、ドルーゼ、RPEおよび/または網膜成分に対して指向された)、白血球およびVI型コラーゲン。ドルーゼに関連する分子としては以下が挙げられる：イムノグロブリン、アミロイドA(1アミロイドA)、アミロイドP成分、C5およびC5b-9末端複合体、HLA-DR、フィブリノーゲン、第X因子、およびプロトロンビン、補体3、補体5および補体9、補体反応性タンパク質(CRP)、イムノグロブリンの鎖および鎖、第X因子、HLA-DR、アポリタンパク質A、アポリタンパク質E、アンチキモトリプシン、2ミクログロブリン、第X因子、フィブリノーゲン、プロトロンビン、トロンボスポジン、エラスチン、コラーゲンおよびビトロネクチン。ドルーゼ関連樹状細胞のマーカースとしては以下が挙げられる：CD1a、CD4、CD14、CD68、CD83、CD86、およびCD45、PECAM、MMP14、ユビキチン、およびFGF。重要な樹状細胞関連補助分子であって、T細胞認識に関与するものとしては、以下が挙げられる：ICAM-1、LFA1、LFA3、およびB7、IL-1、IL-6、IL-12、TNF- α 、GM-CSFおよび熱ショックタンパク質。樹状細胞発現に関連するマーカースとしては、以下が挙げられる：コロニー刺激因子、TNF- α 、およびIL-1。樹状細胞増殖に関連するマーカースとしては、以下が挙げられる：GM-CSF、IL-4、IL-3、SCF、FLT-3およびTNF- α 。樹状細胞分化に関連するマーカースとしては以下が挙げられる：IL-10、M-CSF、IL-6およびIL-4。

【0038】

用語「ドルーゼ関連眼疾患」とは、本明細書において使用される場合、ドルーゼ形成が起こり、そしてドルーゼが黄斑変性を生じるかまたはそれに寄与する、任意の疾患をいう。黄斑変性、ドルーゼの蓄積は、物理的障壁を作製し、これが

脈絡毛細管板と網膜との間の通常の代謝および老廃物の拡散を妨害するようである。結果として、網膜およびRPEの健康を維持するために必要な酸素、グルコース、および他の栄養素もしくは調節性血清関連分子の拡散が阻害される。

【0039】

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

【0040】

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

【0041】

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

【0042】

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

【0043】

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

【0044】

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

【0045】

用語「マーカー」とは、本明細書において使用される場合、障害または疾患の特徴である任意の表現型または遺伝子系をいう。この表現形としては、物理的知見、生化学的成分、または障害または疾患においてアップレギュレートまたはダウンレギュレートされる任意の分子または遺伝子産物を挙げられ得、そして、それゆえ、測定される場合、レベルが測定される場合、障害または疾患の指標である。マーカーとして作用し得る遺伝子型としては、特定の障害または疾患と関連する任意の多型または変異が挙げられる。

【0046】

用語「調節」、「変更」、「調節する」または「変更する」とは、本明細書において互換的に使用されて、活性のアップレギュレート(すなわち、活性化または刺激(例えば、アゴナイズまたは増強))およびダウンレギュレート(すなわち、阻害または抑制(例えば、アンタゴナイズ、減少または阻害))の両方をいう。例えば、調節される活性は、遺伝子発現であり得るか、または樹状細胞の増殖(growth)、増殖(proliferation)、移動または分化であ

り得る。「調節」または「変更」は、プロセスのアップレギュレートまたはダウンレギュレートの両方を記載することが意図される。なぜなら、当業者に周知であるように、特定の刺激因子によって上方調節されるプロセスは、その刺激因子に対するアンタゴニストによって阻害され得るからである。逆に、特定の刺激因子によってダウンレギュレートされるプロセスは、その刺激因子に対するアンタゴニストによって阻害され得る。従って、例えば、誘導様式で、細胞応答を誘導し、細胞の挙動を調節または変更する薬剤を同定すると、その応答は、その薬剤のインヒビターによる阻害様式において（例えば、当該分野において十分に理解され、そして記載されるように抗体またはアンチセンスRNAによって）調節され得ることが本質的に理解される。

【0047】

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

【0048】

用語「物理的知見（physical finding）」とは、本明細書において使用される場合、保健看護提供者による患者の面接評価の間に明らかである、任意の徴候または症状をいう。次いで、物理的知見は、医療の履歴を受ける間に患者によって記載される症状（例えば、疼痛）を含み得る。物理的知見とは、患者の身体の観察、聴診、打診、または触診の間に同定される患者の解剖学的特徴のそれらの特徴をいい得る。物理的知見はまた、保健看護提供者によって直接操作される装置（例えば、内視鏡、聴診器、オトスコープ、および検視鏡）によって増幅される、観察、聴診、打診、または触診によって認識される患者の解剖学的特徴のそれらの局面をいい得る。他方、観察のためのより洗練された装置（例えば、細隙灯）は、この用語が本明細書において使用される場合、「物理的知見」を認識し得る。本発明の範囲内には、患者に直接会っている間、健康看護

提供者の観察能力を増幅することによって生成されるそれらの知見が入る。例えば、フルオレセインの投与および所定の波長で細隙灯を用いてその組織への効果を観察することにより、本明細書において使用される場合、物理的知見のセットの決定がもたらされる。この定義に一致する他の型の物理的知見は関連分野の当業者には容易に明らかである。大動脈瘤についての物理的知見は、例えば、拍動性腹部塊、圧痛腹部塊、背中の疼痛、末梢拍動または腹部の雑音の変更が挙げられ得る。

【0049】

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

【0050】

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

によって生成されるものを含むことが意味される。

【0051】

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

【0052】

「低分子(小分子)」とは、本明細書において使用される場合、約5kD未満の分子量、そしてより好ましくは約4kD未満の分子量を有する組成物をいう。低分子は、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣物、炭水化物、脂質(例えば、糖脂質および豚尾脂質)または他の有機物(炭素含有)または無機分子であり得る。多くの製薬企業が、化学物質および/または生物学的混合物(しばしば、真菌、細菌または藻類の抽出物)の広汎なライブラリーを有しており、これらは、本発明の任意のアッセイを用いてスクリーニングされて治療化合物が同定され得る。

【0053】

「治療剤(therapeutic)」とは、本明細書において使用される場合、ドルーゼ関連マーカーの生物学的活性のアゴニストまたはアンタゴニストをいう。好ましい治療剤は、RPE細胞死、炎症応答に關与する因子、線維芽細胞の増殖および移動に關与する因子を減少または阻害して、線維症および/または樹状細胞の増殖、移動またはドルーゼへの分化を生じる。他の好ましい治療剤は、大動脈疾患(例えば、AAA)を処置または予防するにおいていくらかの効力が示された薬剤を含み、これらには、以下が挙げられる：抗炎症剤(例えば、抗CD18抗体)、プロテアーゼインヒビター、エラストリシス性MMPのインヒ

ピター（例えば、ヒドロキサメートベースのRS312908、バチマスタット（batimastat））、抗生物質（例えば、ドキシサイクリン、テトラサイクリン）、プロスタグランジン合成のインヒビターおよび ブロッカー（例えば、プロプラノロール）。

【0054】

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

【0055】

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

【0056】

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

【0057】

「トランスジェニック動物」とは、その動物の1つ以上の細胞が人的介入（例えば、当該分野で周知のトランスジェニック技術）によって導入された異種核酸を含む、任意の動物、好ましくは非ヒト動物、鳥類または両生類をいう。核酸は、直接、または細胞の前駆体に導入することによるか、意図的な遺伝子操作（例えば、マイクロインジェクションによる）か、もしくは組換えウイルスによる感染によって間接的に、その細胞へと導入される。用語遺伝子操作は、古典的交配、またはインビトロ授精は包含せず、組換えDNA分子の導入に関する。この分子は、染色体内に組み込まれ得るか、または染色体外で複製するDNAであり得る。本明細書において記載される一般的なトランスジェニック動物において、導入遺伝子は、細胞が特定の正常遺伝子産物を発現させなくして、1つ以上のDRAMポリペプチドの組換え形態（例えば、アゴニスト形態またはアンタゴニスト形態のいずれか）、またはDRAMもしくは樹状細胞の生合成、蓄積もしくは再吸収を調節する分子を発現する。例えば、樹状細胞の挙動（例えば、細胞増殖（growth）、増殖（proliferation）、移動、分化または遺伝子発現）に変化をもたらすトランスジェニックノックアウトが作製され得る。例えば、Rel-B（トランスフォーミング増殖因子b1（TGF-b1）またはIkars遺伝子が破壊されているマウスは、種々の細胞系統からの樹状細胞を欠如している（Caux、Cら、1999を参照のこと）。しかし、例えば、FLPまたはCREのリコンビナーゼ依存性構築物として、組換えDCRMまたはDRAM遺伝子がサイレントであるトランスジェニック動物もまた、意図される。さらに、「トランスジェニック動物」はまた、遺伝子破壊が人的介入によって（組換え技術およびアンチセンス技術の両方を含む）生じるような組換え動物を包含する。

【0058】

用語「処置（する）」とは、本明細書において使用される場合、治癒および状態または疾患の少なくとも1つの症状を改善することを包含することが意図される。

【0059】

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

【0060】

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

【0061】

(4.2 黄斑変性および動脈壁破裂障害の病態生理学)

1つの実施形態において、本発明の方法およびキットは、AMDに罹患した患者と、動脈壁破裂障害（特にAAA）に罹患した患者との間の病態生理学的および

び生物学的な顕著な類似性が存在するという本明細書において開示された新規発見に依存する。これらの類似性のうちいくつかを以下にまとめる。

【0062】

【表12】

AAA特徴	AMD	データの支持
遺伝性	X	
加齢性	X	
エラスチン破壊および他のECM	X	univesity of iowaデータ
コラーゲンおよびエラスチンの新規合成	X	Univesity of iowaデータ
高血圧による増悪	?	
危険因子としての喫煙	X	
自己免疫の関与	?	Univesity of iowaデータ
大動脈新生血管形成	X	
動脈硬化との関連	X	
COPDとの潜在的関連	?	Univesity of iowaデータ
血管平滑筋細胞の欠失	?	Univesity of iowaデータ
樹状細胞の流入	X	Univesity of iowaデータ
慢性炎症(サブセット)	?	Univesity of iowaデータ
MMP2&MMP9、t-PA、uPA、PAI-1、C3、IgG、TNFX、IL1、IL6、IL8のアップレギュレート	X	
TIMP、GAG、PGのダウンレギュレート	?	
α -1アンチトリプシン欠損との関連	?	Univesity of iowaデータ

これらの関連のうち特定のものは、本明細書において援用される実施例においてより詳細に提示されるデータによって支持される。上記に特定しない他の関連は、関連分野の当業者には容易に明白である。黄斑変性および動脈壁破裂障害の疾患プロセスの以下に提示される説明は、当業者が、慣用的実験を超えることなく、本発明の範囲内に入るこれらの疾患プロセス間の他の関連を決定することを

可能にする。

【0063】

(4.2a:黄斑変性)

(4.2a(i)概説)

黄斑変性は、臨床用語であり、これは、ブルーフ膜、神経網膜および網膜色素沈着上皮(RPE)の異常に関連する中心視力の進行性の喪失によってすべてが特徴付けられる種々の疾患を記載するために使用される。これらの障害としては、老年患者(加齢性黄斑変性すなわちAMD)に影響を与える非常に一般的な状態、およびより希な、いくつかの症例において人生の最初の10年において検出され得る早期発症性ジストロフィーが挙げられる((Best F.Z、Augenheilkd.、13:199-212、1905;Sorsby、A.ら、Br J Ophthalmol.33.67-97、1949;Stargardt、K.、Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol.71:534-550、1909;Ferrell、R.E.ら、Am J Hum Genet.35:78-84、1983;Jacobson、D.M.、ら、Ophthalmology、96:885-895、1989;Small、K.W.ら Genomics 13:681-685、1992;Stone、E.M.ら、Nature Genet.1:246-250、1992;Forsman、K.ら、Clin Genet.42:156-159、1992;Kaplan、J.S.ら、Nature Genet.5:308-311、1993;Stone、E.M.ら、Arch Ophthalmol.112.763-772、1994;Zhang、K.ら、Arch Ophthalmol.112:759-764、1994;Evans、K.ら、Nature Genet.6:210-213、1994;Kremer、H.ら、Hum Mol Genet.3:299-302、1994;Kelsell、R.E.ら、Hum Mol Genet.4:1653-1656、1995;Nathans、J.ら、Science 245:831-838、1989;Wells、J.ら、Nature Genet.3:213-218、1993;Nichols、B.E.ら、

Nature Genet. 3:202-207、1993a; Weber、B. H. F. ら、Nature Genet. 8:352-355、1994)。黄斑変性疾患としては、例えば、加齢性黄斑変性、ノースカロライナ黄斑ジストロフィー、ソーズビー底形成異常、シュタルガルト病、パターンジストロフィー、ベスト病、マラチアレベンティニーズ (malattia leventinese)、ドインの蜂巢状脈絡膜症、優性ドルーゼおよび放射性ドルーゼ。

【0064】

加齢性黄斑変性すなわちAMDは、視野の中心部分における視力の進行性の減縮、色視の変化および異常な暗適応および感受性に関連する (Steinmetz ら、1993; Brown & Lovie-Kitchin、1983; Brown ら、1986; Sunness ら、1985; Sunness ら、1988; Sunness ら、1989; Eisner ら、1987; Massoff ら、1989; Chen ら、1992)。

【0065】

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

【0066】

多数の集団ベースの研究によって、異なる人種集団におけるAMDの率およびAMDの家族性集中の程度の調査に基づいて、AMDが遺伝性成分を有すること

が示されている (Hymanら、1983)。例えば、コーカサス人は、ヒスパニック起源の個人よりも危険性が高いようである (Cruickshanksら、1997)。さらに、バルバドスにおける黒人集団は、進行性AMDの発症率が、現地のコーカサス集団よりも低かった (Schachatら、1995)。双子および他の兄弟姉妹を含む研究によって、2つの個体がより近い関係にあると、その2つの個体は、AMDを発症する危険性が同じ程度であるようであることが実証された (Heibaら、1994; Kleinら、1994; MeyersおよびZacchary、1988; Meyers、1994; Meyersら、1995; Piguetら、1993; Seddonら、1997; Silvestriら、1994)。これらの知見によって、遺伝がAMDの発症の個人での危険性に顕著に寄与することが示唆されるが、原因遺伝子は、まだ同定されていない。最近の研究によって、光受容体ABC Rの縁 (rim) タンパク質における変異が米国のAMD症例を15%まで増加させることが示唆され (Allikmetsら、1997)、より最近のデータによって、これはそうでもないことが示された (De Lapazら、1998; Stoneら、1998)。従って、すべてのAMDについて原因となる遺伝子は同定されていない。

【0067】

他の黄斑障害 (代表的には、AMDよりも早い発症を伴う) が記載されている。これらには、ノースカロライナ黄斑ジストロフィー (Smallら、1993)、ソーズビー底ジストロフィー (Caponら、1989)、シュタルガルト病 (Parodi、1994)、パターンジストロフィー (MarmorおよびByers、1977)、ベスト病 (Stoneら、1992)、優性ドルーゼ (DeutmanおよびJansen、1970)、および放射状 (radial) ドルーゼ (「malattia leventinese」) (Heonら、1996) が含まれる。これらの遺伝性障害のいくつか (異なる染色体遺伝子座にマッピングされているか、またはその遺伝子が同定されているものを含む) は、ドルーゼ (または、下位RPEの空間において他の細胞外沈着) の存在によって特徴付けられている。この情報に基づいて、以下であるようである: (1) AMDは単一の遺伝性疾患ではないこと (なぜなら、異なる染色体遺伝子座を有

する異なる遺伝子疾患が形態上の差異を共有するからである) (Holzら、1995a; Manserghら、1995); および(2) ドルーゼが種々の異なる傷害によって誘導される生物学的経路の結果としてか、遺伝的にか、または他の方法で発症し得ること。AMDは、実際には、いくつかの疾患であり、その殆どは遺伝性であるが、環境的因子もその発症に何らかの役割を果たしている。

【0068】

多数の遺伝子座が黄斑変性に対する素因を示すとして報告されている: 1p21-q13、(劣性シュタルガルト病または黄色斑眼底について) (Allikimets、R.ら Science 277:1805-1807、1997; Anderson、K.L.ら、Am. J. Hum. Genet. 55:1477、1994; Crermers、F.P.M.ら、Hum. Mol. Genet. 7:355-362、1998; Gerber、S.ら、Am. J. Hum. Genet. 56:396-399、1995; Gerber、S.ら、Genomics 48:139-142、1998; Kaplan、J.ら、Nat. Genet. 5:308-311、1993; Kaplan、J.ら、Am. J. Hum. Genet. 55:190、1994; Martinez-Mir、A.ら、Genomics 40:142-146、1997; Nasonkin、I.ら、Hum. Genet. 102:21-26、1998; Stone、E.M.ら、Nat. Genet. 20:328-329、1998); 1q25-q31、(劣性加齢性黄斑変性について) (Klein、M.L.ら、Arch. Ophthalmol. 116:1082-1088、1998); 2p16、(優性放射性ドルーゼ、優性ドインの蜂巢状脈絡膜症またはMalattia Leventineseについて) (Edwards、A.O.ら、Am. J. Ophthalmol. 126:417-424、1998; Heon、E.ら、Arch. Ophthalmol. 114:193-198、1996; Heon、E.ら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37:1124、1996; Gregory、C.Y.ら、Hum. Mol. Genet. 7:1055-1059、1996); 6p21.2-cen、(優性黄斑変性、成人性卵黄様変性について) (Felbor、U.ら

Hum. Mutat. 10:301-309, 1997); 6p21.1 (優性錐体ジストロフィーについて) (Payne, A.M.ら Am. J Hum. Genet. 61:A290, 1997; Payne, A., M.ら, Hum. Mol Genet. 7:273-277, 1998; Sokol, I.ら, Mol. Cell. 2:129-133, 1998); 6q、(優性錐体杆体ジストロフィーについて) (Kelsell, R.E.ら Am. J Hum. Genet. 63:274-279, 1998); 6q11-q15、(優性黄斑変性、シュタルガルト様疾患について) (Griesinger, I.B.ら, Am. J Hum. Genet. 63:A30, 1998; Stone, E.M.ら, Arch. Ophthalmol. 112:765-772, 1994); 6q14-q16.2、(優性黄斑変性、ノースカロライナ型について) (Kelsell, R.E.ら, Hum. Mol. Genet. 4:653-656, 1995; Robb, M.F.ら, Am. J Ophthalmol. 125:502-508, 1998; Sauer, C.G.ら, J Med. Genet. 34:961-966, 1997; Small, K.W.ら, Genomics 13:681-685, 1992; Small, K.W.ら, Mol. Vis. 3:1, 1997); 6q25-q26、(優性網膜錐体ジストロフィー-1について) (Online Mendelian Inheritance in Man(TM). Center for Medical Genetics, Johns Hopkins University, and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/omim>(1998)); 7p21-p15、(優性嚢胞様黄斑変性について) (Inglehear, C.F.ら, Am. J Hum. Genet. 55:581-582, 1994; Kremer, H.ら, Hum. Mol Genet. 3:299-302, 1994); 7q31.3-32、(優性第三色盲タンパク質である青色錐体オプシンについて) (Fitzgibbon, J.ら, Hum. Genet. 93:79-80, 1994; Nathans, J.ら, Science 19

3:193-232、1986; Nathans、J. ̄、Ann. Rev. Genet. 26:403-424、1992; Nathans、J. ̄、Am. J. Hum. Genet. 53:987-1000、1993; Weitz、C. J. ̄、Am. J. Hum. Genet. 50:498-507、1992; Weitz、C. J. ̄、Am. J. Hum. Genet. 51:444-446、1992); not 8q24、(優性黄斑変性異型卵黄様変性について)(Daiger、S. P. ̄、「Degenerative Retinal Diseases」、LaVail ̄編. Plenum Press、1997; Ferrell、R. E. ̄、Am. J. Hum. Genet. 35:78-84、1983; Leach、R. J. ̄、Cytogenet. Cell Genet. 75:71-84、1996; Sohocki、M. M. ̄、Am. J. Hum. Genet. 61:239-241、1997); 11p12-q13 (優性黄斑変性、ベスト型(ベストロフィン(bestrophin))について)(Forsman、K. ̄、Clin. Genet. 42:156-159、1992; Graff、C. ̄、Genomics、24:425-434、1994; Petrukhin、K. ̄、Nat. Genet. 19:241-247、1998; Marquardt、A. ̄、Hum. Mol. Genet. 7:1517-1525、1998; Nichols、B. E. ̄、Am. J. Hum. Genet. 54:95-103、1994; Stone、E. M. ̄、Nat. Genet. 1:246-250、1992; Wadeilus、C. ̄、Am. J. Hum. Genet. 53:1718、1993; Weber、B. ̄、Am. J. Hum. Genet. 53:1099、1993; Weber、B. ̄、Am. J. Hum. Genet. 55:1182-1187、1994; Weber、B. H.、Genomics 20:267-274、1994; Zhaung、Z. ̄、Am. J. Hum. Genet. 53:1112、1993); 13q34、(優性黄斑変性、シュタルガルト型について)(Zhang、F. ̄、Arch. Ophthalmol. 112:759-764、1994); 16p12.1 (劣性バッテン病(セロイド脂褐素沈着症(ceroid-lipofuscinosis)、ニューロン性3)若年性

;タンパク質;バッテン病タンパク質について)(Batten Disease Consortium, Cell 82:949-957, 1995;Eiberg, H.ら、Clin.Genet.36:217-218, 1989;Gardiner, M.ら、Genomics 8:387-390, 1990;Mitchison, H.M.ら、Am.J Hum.Genet.57:312-315, 1995, Mitchison, H.M.ら、Am.J Hum.Genet.56:654-662, 1995;Mitchison, H.M.ら、Genomics 40:346-350, 1997;Munroe, P.B.ら、Am.J Hum.Genet.61:310-316, 1997;17p、(優性輪紋状脈絡膜ジストロフィーについて)(Lotery, A.J.ら、Ophthalmol.Vis.Sci.37:1124, 1996);17p13-p12、(優性錐体ジストロフィー、進行性について)(Balcuniene, J.ら、Genomics 30:281-286, 1995;Small, K.W.ら、Am.J Hum.Genet.57:A203, 1995;Small, K.W.ら、Am.J Ophthalmol.121:13-18, 1996);17q、(錐体杆体ジストロフィーについて)(Klystra, J.A.ら、Can.J Ophthalmol.28:79-80, 1993);18q21-q21.3(錐体杆体ジストロフィー、ドグルーシー(de Grouchy)症候群について)(Manhant, S.ら、Am.J Hum.Genet.57:A96, 1995;Warburg, M.ら、Am.J Med.Genet.39:288-293, 1991);19q13.3、(優性錐体杆体ジストロフィー;劣性、優性および「デノボ」レーバー先天性黒内障;優性RP;タンパク質:錐体杆体otx様光受容体ホメオボックス転写因子について)(Bellingham, J.ら、「Degenerative Retinal Diseases」、LaVailら編、Plenum Press, 1997;Evans, K.ら、Nat.Genet.6:210-213, 1994;Evans, K.ら、Arch.Ophthalmol.113:195-201, 1995;Freund, C.L.ら、Cell 91:543-553, 1997;Freund, C.L.ら、Nat

. Genet. 18:311-312、1998; Gregory、C.Y.ら、Am. J. Hum. Genet. 55:1061-1063、1994; Li、X.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:1876-1881、1998; Sohocki、M.M.ら、Am. J. Hum. Genet. 63:1307-1315、1998; Swain、P.K.ら、Neuron 19:1329-1336、1987; Swaroop、A.ら、Hum. Mol. Genet. In press、1999); 22q12.1-q13.2、(優性ソースビー眼底ジストロフィー、メタロプロテアーゼ-3の組織インヒビター(TIMP3)について)(Felbor、U.ら、Hum. Mol. Genet. 4:2415-2416、1995; Felbor、U.ら、Am. J. Hum. Genet. 60:57-62、1997; Jacobson、S.E.ら、Nat. Genet. 11:27-32、1995; Peters、A.ら、Retina 15:480-485、1995; Stouhr、H.ら、Genome Res. 5:483-487、1995; Weber、B.H.F.ら、Nat. Genet. 8:352-355、1994; Weber、B.H.F.ら、Nat. Genet. 7:158-161、1994; Wijesvriya、S.D.ら、Genome Res. 6:92-101、1996); およびXp11.4(X連鎖錐体ジストロフィーについて)(Bartley、J.ら、Cytogenet. Cell. Genet. 51:959、1989; Bergen、A.A.B.ら、Genomics 18:463-464、1993; Dash-Modi、A.ら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37:998、1996; Hong、H.-K.、Am. J. Hum. Genet. 55:1173-1181、1994; Meire、F.M.ら、Br. J. Ophthalmol. 78:103-108、1994; Seymour、A.B.ら、Am. J. Hum. Genet. 62:122-129、1998)) (これらの教示は、本明細書において参考として援用される)。さらに、ワールドワイドウェブサイト<http://WWW.SPH.UTH.TMC.EDU/RETNET/disease.htm> は、黄斑変性についておよび黄斑変性と関連し得るさらなる網膜変性に

ついでに遺傳的多型を列挙する。しかし、上記遺伝子または多型のいずれも、代表的な後期発症黄斑変性の有意な割合について原因であるとは見出されていない。

【0069】

AMDの2つの主な臨床的な発現が記載されている。これらの両方ともが、同じ患者において生じ得る（GreenおよびKey、1977）。これらは、乾燥した、または萎縮性の形態、および湿った、または滲出性の形態と呼ばれる（SarksおよびSarks、1989；ElmanおよびFine、1989；Kincaid、1992）。乾燥した形態においては、同時に生じる新生血管形成を伴わずにRPEおよび網膜が変性する。それが生じる萎縮の領域は、地図状萎縮と呼ばれる。萎縮性のAMDは、代表的には、その発症があまり急ではないので、滲出性の形態よりもあまり重篤ではないと考えられるが、その進行を停止させるかまたは遅らせることにおいて有効な処置は存在していない。あまり一般的ではないが、しかしより破壊的な、滲出性の形態においては、脈絡膜血管由来の新生血管の「膜」は、ブルーフ膜を侵襲し、漏出し、そしてしばしば、RPEおよび/または神経網膜の剥離を生じる（ElmanおよびFine、1989）。この事象は、短い期間にわたって生じ得、そして中心視の急激かつ永久的な喪失を導き得る。一方の眼が罹患すると、他方の眼が、最初の事象の5年以内に脈絡膜の新生血管膜を発達させるという高い程度の可能性が存在する（Macular Photocoagulation Study、1977）。新生血管のAMDの重要な臨床的な徴候として、灰色-緑色の新生血管膜、ドーム型のRPE剥離、および円板状瘢痕（線維芽細胞および網膜のグリア細胞の増殖によって生じる）が挙げられる。これらは、蛍光眼底血管造影法においてそれらの過剰な蛍光によって最も良好に可視化される（ElmanおよびFine、1989）。

【0070】

組織病理学的研究により、歳をとった個体およびAMDと臨床的に診断された個体の、RPE、脈絡膜、および光レセプターに関連する細胞外マトリックス中の有意なそして広範囲の異常が報告された（Sarks、1976；Sark

sら、1988; Bird, 1992a; van der Schaftら、1992; GreenおよびEnger、1993; Feeney - BurnsおよびEllersieck、1985; Young、1987; Kincaid、1992)。最も顕著な細胞外マトリックス(ECM)の異常は、ドルーゼ沈着であり、これは、RPE基板とブルーフ膜の内部の膠原性層との間に蓄積する(図1)。ドルーゼが、視力の喪失;色のコントラストの感受性における変化(Frennessonら、1995; Holzら、1995b; Midenaraら、1994; Stangosら、1995; Tolentinoら、1994)、黄斑の回復機能、中心視野の感受性、および時空的なコントラストの感受性(Midena、ら、1997)の前に視覚に影響を与えるようであることが、報告されている。

【0071】

ドルーゼはまた、RPEの単層の側方の伸長を生じ、そしてそのすぐの血管の供給、脈絡膜毛細血管からRPEの物理的な置換を生じる。この置換は、正常な代謝物を妨げ得、そして脈絡膜の毛細血管と網膜との間の排出物拡散を妨げ得る、物理的なバリアを作成する。排出物は、RPEの不近で濃縮され得るようであり、そして酸素、グルコース、および他の栄養素の分散、または網膜およびRPEの健康状態を維持するために必要とされる調節性の血清関連分子が阻害されるようである。ドルーゼが、杆状体および網膜錐体上に圧力をかけることによって(Rones、1937)、そして/または光レセプター細胞の整列を湾曲させることによって、光レセプター細胞の機能を混乱させることもまた、示唆されている(Kincaid、1992)。

【0072】

多数の研究が、黄斑ドルーゼの存在が、萎縮性および新生血管の両方のAMDの発達についての強力な危険因子であることを実証した(Gass、1973; Lovie - KitchinおよびBowman、1985; Lewisら、1986; Sarkas、1980; Sarkas、1982; Smallら、1976; Sarkasら、1985; Vinding、1990; Bresslerら、1994; Bresslerら、1990; Macular Photoco

agulation Study)。Pauleikhoffら(1990)は、ドルーゼの大きさ、数、密度、およびコンフルエンシーの程度が、AMDの危険性の重要な決定因子であることを実証した。両側にドルーゼを有する患者の新生血管の合併症を発症する危険性は、1年あたり3~4%と推定されている(Mimounら、1990)。Macular Photocoagulation Study Groupからの最近の報告は、5個以上のドルーゼを保有している眼における脈絡膜の新生血管形成を発症することについて2.1の、そして1つ以上の大きなドルーゼを保有している眼において1.5の、相対的な危険性を示す(Macular Photocoagulation Study、1997)。ドルーゼとAMDとの間での相関関係は、十分に有意であり、多くの研究者および医師が「初期AMD」(Midenら、1997; Tolentinoら、1994)または「初期加齢性黄斑症」(Birdら、1995)のように視覚の喪失がない場合に、黄斑中に軟らかいドルーゼが存在することについて言及している。黄斑ドルーゼに加えて、Lewisら(1986)は、黄斑外のドルーゼの程度もまた、AMDを発症する有意な危険因子であることを見出した。いくつかの臨床研究により、いくつかの症例においては、レーザー光凝固術(Sigelman、1991; Littleら、1997; Figueroaら、1994; FrennesonおよびNilsson、1996)の後で、ドルーゼが退行し、そしてその視力が改善することを示された。一方、予防的なレーザー処置は、いくらかの患者については有用であり得る(Littleら、1997)が、他の患者は、黄斑のレーザー処置に対して有害に反応するようである(Hyverら、1997)。さらに、光凝固術後には患者について長期間の利点があり得るが、これらは、この手順に関連してしばしば視覚の喪失には価値がない場合がある。

【0073】

ドルーゼの表現型を区別するために最も一般的に使用される専門用語は、堅いおよび軟らかいである(例えば、Eagle、1984; Lewisら、1986; YanoffおよびFine、1992; Newsomeら、1987; Minounら、1990; van der Schaftら、1992; Spr

aulおよびGrossniklaus, 1997を参照のこと)が、多数の(numerous)表現型が存在する(MillinsおよびHageman、Mol. Vis., 1999)。堅いドルーゼは、均質な好酸球性の物質を含む小さなはっきりとした沈着物である。組織学的には、これらは、球形または半球形であり、傾斜した広がりを有さない。軟らかいドルーゼはより多く、そして傾斜したはっきりとしない広がりを有する。堅いドルーゼとは異なり、軟らかいドルーゼは、通常は均質ではなく、そして代表的には、内包および球形のプロファイルを含む。多くの大きく/軟らかいドルーゼを有する眼は、ドルーゼを有さないかまたは少なく小さいドルーゼを有する眼よりも、AMDの合併症を発症する有意に高い危険性を有する。用語「散在性のドルーゼ」または「基底部分の直線状の沈着」は、ブルーフ膜の内部の膠原性の層とRPEとの間に層を形成するアモルファス材料を記載するために使用される。この材料は、それが固定されないことを除いて、軟らかいドルーゼに組織学的に類似しているように見え得る。

【0074】

ドルーゼ組成の本発明者らの知見(特に、それが表現型に関連する場合に)は、乏しい。WolterおよびFalls(1962)は、ドルーゼがオイルレッドOで染色されることを観察した。このことは、少なくともいくつかのドルーゼ中に中性脂質が存在することを示す。Pauleikhoffら(1992)は、種々の表現型のドルーゼがリン脂質または中性脂質のいずれかを含有することを示すための、脂質に基づく組織学的な染色アプローチを使用した。これらの「親水性」のドルーゼもまた、抗-フィブロネクチン抗体によって結合された。Pauleikhoffら(1992)は、リン脂質を含有しているが、中性脂質は含有していないドルーゼが抗-フィブロネクチン抗体反応性であると結論付けた。他の研究者らは、ドルーゼとのフィブロネクチンの会合の観察を再現することはできていない(van der Schaftら、1993; Mullinsら、1999)。これらのデータは、ドルーゼが疎水性または親水性のいずれかであること、および種々のドルーゼのクラスが、有意に異なる病因を示し得ること示唆する。このことは、単に形態学(すなわち、堅いおよび軟らかい)だけでは基づかない、ドルーゼの種々の構成クラスが存在することを示唆する。

【0075】

Farkasら(1971b)は、炭水化物および他の分子について、酵素での消化、有機的な抽出、および組織化学的な染色方法によってドルーゼ組成を分析した。彼らは、ドルーゼが、シアロムチン(O - グリコシ結合型オリゴサッカライドを有する糖タンパク質)、ならびにセレブロシドおよび/またはガングリオシドから構成されると結論付けた。

【0076】

Newsomeら(1987)は、フィブロネクチンに対する抗体で軟らかいドルーゼを標識すること、ならびにIgGおよびIgMに対する抗体で堅いおよび軟らかいドルーゼを標識することを記載した。さらに、アミロイド(Loefflerら、1995)および補体因子(C1q、C3c、C3d、およびC4)(van der Schaftら、1993)に対する抗体でのドルーゼの弱い標識、ならびにユビキチン(LoefflerおよびMangini、1997)およびTIMP-3(Farissら、1997)に対する抗体でのより強い標識が、報告されている。他のECM分子(I型、III型、IV型、およびV型コラーゲン、ラミニン、およびヘパラン硫酸プロテオグリカンを含む)に対する抗体もまた、「散在性の斑点状の、または表在性の層状」パターンのドルーゼの成分であるとして報告されている(Newsomeら、1987)。

【0077】

上記の免疫組織化学的研究の結果の間の差異は、おそらく、ドルーゼについての全体的な分類システムについての不一致、凍結された切片とは対照的に、脱水されたパラフィン包埋組織の使用(これは、潜在的に、いくつかのドルーゼ成分の抽出を生じる)、および同じタンパク質の異なるエピトープに対する抗体の使用に起因する。さらに、死後短期間で固定されたかまたは凍結された組織の使用は、偽陰性(死後の自己溶解および抗原性の喪失に起因する)および偽陽性(死後の分散および物理的なバリア欠失に起因する)を減少させる。

【0078】

ドルーゼの脂質、タンパク質、および炭水化物組成に加えて、いく人かの研究者らは、ドルーゼ中の形質膜および細胞オルガネラを同定した。Farkasら

(1971a)は、ドルーゼ中に多数の変性しつつあるオルガネラが存在することを記載している。これらは、リソソームであるようなものを含む。同様の物質がドルーゼの形成の前にブルーフ膜のRPE側に存在するという観察に基づいて、彼らは、ドルーゼの構成成分がRPEに由来することを示唆した。しかし、ドルーゼ中のリソソーム酵素活性は、実証されていない(Feeney - Burnsら、1987)。BurnsおよびFeeney - Burns(1980)は、小さいドルーゼ中の「細胞質性の破片」の存在を記載した。彼らは、これが、RPEに由来すると推測した。Feeney - BurnsおよびEllersieck(1985)は後に、ドルーゼのすぐ下のブルーフ膜中の少量の破片を記載し、そして脈絡膜がドルーゼの沈着の部位から破片を除くことができないことから、ドルーゼが生じ得ることを示唆した。ドルーゼは、多数のドルーゼに関連するマーカー(DRAM)を含む。これらとしては、アミロイドAタンパク質、アミロイドP成分、アンチキモトリプシン、アポリポタンパク質E、2ミクログロブリン、補体因子3、補体因子C5、補体因子C5b-9末端複合体、第X因子、フィブリノーゲン、イムノグロブリン(および)、プロトロンビン、トロンボスポンジン、またはビトロネクチンが挙げられる。

【0079】

ドルーゼの生合成の広範な理解が欠けている。ドルーゼの発生についての少なくとも12個の経路が、文献において示唆されている(Duke - ElderおよびDobree、1967; WolterおよびFalls、1962; Ishibashiraら、1986a)。これらは、ドルーゼがRPEまたは脈絡膜に由来するかどうかに基づいて2つの一般的なカテゴリーに入る。RPE細胞からのドルーゼの誘導に関連する理論は、以下の概念を含む：ドルーゼは、RPEまたは光レセプターに由来する異常な物質の分泌によって生じる(「沈着理論」 - Muller、1856; Ishibashiraら、1986; Young、1987);ドルーゼ中での変性しつつあるRPE細胞の形質転換(「形質転換理論」 - Donders、1854、Rones、1037; Fine、1981; E1 Babaら、1986)、またはこれらの経路のいくつかの組合せ。詳細には、いく人かの研究者らは、超微細構造のデータに基づいて、ドルーゼが

、おそらく、損傷したサイトゾルを除去するための機構として (Burns および Feeney Burns, 1980)、RPE がブルーフ膜中にその基本的な細胞質を放出する場合に形成されると結論付けた (Ishibashi ら、1986a)。しかし、このプロセスを実証する画像は、ごくわずかしき示されていない。他の研究者らは、ドルーゼが、異常なリソソーム酵素の活性に起因して、RPE の自己溶解によって形成されると仮定した (Farkas ら、1971a) が、より最近の酵素の組織化学的な研究は、ドルーゼ中のリソソーム酵素の存在を実証することはできなかった (Feeney - Burns ら、1987)。他の機構 (RPE の脂質の変性 (Fine, 1981) および血管の供給源からの誘導 (Friedman ら、1963) を含む) もまた、過程されている (Duke - Elder および Dobree, 1967 にまとめられている)。

【0080】

Duval ら (1985) は、ブルーフ膜を破片を伴わずに維持することにおける脈絡膜の血管周辺細胞の役割を示唆した。彼らは、脈絡膜由来の物質の蓄積または RPE によって蓄積された物質を除去することができないことのいずれかにより、血管周辺細胞の不全がドルーゼの形成を導くことを示唆した。

【0081】

Killingsworth ら (1990) は、マクロファージが、AMD の新生血管段階およびドルーゼの退行においてブルーフ膜の崩壊に関与していることを記載し、そしてドルーゼのコアに似た構造を示すことを記載する1つの電子顕微鏡写真を示す。Duval および Tso (1985) は、ブルーフ膜の領域中の脈絡膜のマクロファージが、レーザー光凝固術の後の、サルスの眼の中のドルーゼの除去に関与することを示した。Penfold および他の研究者ら (Penfold ら、1985; Penfold ら、1986; Oppenheim および Leonard, 1989) は、「新生血管の増殖の促進における (脈絡膜の) 白血球の関与についての状況証拠」を提供した。しかし、これらのデータは、形態学的な観察のみに限定された。これらの観察に基づいて、研究者らは、マクロファージが、ドルーゼの形成の新生血管形成段階に関与していることを示唆した。

【0082】

眼底で観察されるAMDに関連する変化は、種々のAMD表現型で変化し得る。少なくとも10個の異なるAMDの眼底のパターンが、University of Iowaで同定されている。これらは、「The University of Iowa AMD/Dursen Classification」と呼ばれ得る。特定の眼底のパターンは、特定の動脈壁破裂障害と相関し得る；例えば、特定のパターンは、AAAを生じる可能性を増大させること、または確立されたAAAにおいて拡大を生じる可能性を増大をさせることと相関するが、一方、他の眼底のパターンは、TAAAを生じる可能性を増大するか、またはTAAを解離させる可能性を増大することの指標であり得る。動脈壁破裂障害の種々の形態と同様に、異なる眼底のパターンは、種々の根底にある遺伝的なパターンと相関し得る。

【0083】

(4.2a(ii) ドルーゼの生体発生の実用的な仮説)

ドルーゼの生体発生の理論を単一にすることが、本明細書中で提唱されている。これは、本研究室および他の研究室で作成された、新たにおよび以前に公開されたデータの大部分を取りこむことを試みる。この理論は、多数のAMD遺伝子型が存在し得ることの認知を強調する。従って、提案された仮説のわずかにいくつかの局面が、任意の所定のAMDの遺伝子型に関与し得る。重要なことは、この理論が樹状細胞がドルーゼに関連することを詳細に記録する本研究室で生成された新規のデータに基づく。この観察は、最初に、ドルーゼの生体発生における細胞によって媒介されるプロセスの異なる役割についての可能性を訴える。従って、本発明者らは、ドルーゼの生体発生に関係している任意の実用的な仮説および眼の疾患に関連するドルーゼの病因に、樹状細胞についての役割を含めなければならないと考える。

【0084】

炎症性の病変内の樹状細胞の存在は、十分に認識されている。樹状細胞は、炎症の部位に受動的に移動するよりもむしろ、動員され、活性化され、そしてこれらの部位に移動しなければならないことは明らかである。樹状細胞は、代表的に

は、種々の走化性因子 (chemoattractant)、熱ショックタンパク質、DNAフラグメントなどによって、組織の損傷部位に動員される。脈絡膜の樹状細胞突起は、最も小さいドルーゼと会合し、そしてしばしば、RPE細胞の全体または一部と会合してRPE下空間において観察される。これは、ドルーゼ自体が検出可能である時間の前に、ブルーフ膜へとそれている。これらの観察に基づいて、脈絡膜の樹状細胞が局所的に損傷したおよび/または半致命的に損傷したRPE細胞によって活性化されそして動員される機構を、本明細書中で提唱する。この案は、樹状細胞および従って生来の免疫システムが微細な環境の組織損傷によって活性化され得ることを示す最近のデータと一致する。この状態においては、これらの細胞は、組織損傷の部位に対する接近を得るために、ブルーフ膜を通じる細胞性のプロセスを伸ばす。従って、この役割においては、脈絡膜の樹状細胞は局所的な細胞の損傷に応答する能力を有する歩哨レセプター (sentinel receptor) として作用し、そして最終的には、全体的な応答の克服を決定する免疫媒介プロセスの全体的な組込みを提供する。

【0085】

このモデルにおいては、損傷したRPE自体は(この機構が生じるかどうかにはかかわらず)、樹状細胞の動員および活性化を開始する可溶性のサイトカインまたは他の刺激因子の供給源として作用し得る。本明細書中で示されるデータは、年齢を適合させたコントロールと比較して、AMDを有するドナーに由来する眼中のRPE細胞死の加速を明らかに示した。他のシステムによる利用可能な情報、およびAMDの病因学に関係している以前の示唆に基づくと、RPE細胞の死は、いくつか挙げると、虚血、壊死、遺伝子媒介損傷、ブルーフ膜によって誘導される不全、光または全身的な因子(例えば、喫煙によって生じる化合物)による酸化性の損傷、リポフスチンの蓄積、または自己免疫の表現型を含む、いくつかの機構によって生じ得る。既存のデータに基づくと、RPE細胞の死は、ほぼおそらく、アポトーシスよりもむしろ壊死に起因する。なぜなら、アポトーシスによる細胞死を受けた細胞は樹状細胞を動員しないからである。実際、データは、ヒトのドナーの眼中のアポトーシス性のRPE細胞の死の非存在の有無を言わさぬ証拠を提供する。

【0086】

いくつかの公知の経路は、樹状細胞前駆体と損傷した組織との間で、レセプター-リガンド相互作用を開始し得る。これらとして、例えば、IL-1、IL-6、IL-12、TNF- α 、およびGM-CSFのようなサイトカイン、熱ショックタンパク質、細胞表面タンパク質の変化した発現、ならびにフリーラジカルの存在下でのDNAが挙げられる。ドルーゼを有するドナーに由来する眼中のRPE細胞による、HLA-DR、CD68、ビトロネクチン、S-100、クラスタリン(clusterin)、およびアポリポタンパク質Eのクローン性発現の新規の観察は、この点において特に有意であり得る。さらに、ドルーゼおよびAMDを発症しつつある眼の中のRPE/脈絡膜による種々の細胞死関連分子および免疫関連分子のアップレギュレーションが、ディファレンシャルディスプレイおよび遺伝子アレイ分析を使用して同定されている。さらに、RPE-網膜-脈絡膜の境界に高濃度で存在することが公知であるフリーラジカルが免疫刺激性であり得るという証拠が存在する。壊死性の細胞に由来する脈絡膜(リポフスチンの潜在的な成分)が特定の自己免疫疾患の発生において抗原として作用し得ることを示唆するデータもまた存在する。このことは、酸化ストレスおよび/またはリポフスチンがRPEの不全を導き得、そしてAMDの発症を導き得るといった一般的な主張を説明し得る(Mainster, M. A., Light and macular degeneration: a biophysical and clinical perspective. Eye, 1987. 1 (Pt 2): 304-10頁)。

【0087】

一旦、病変(ドルーゼとしても公知)に入ると、樹状細胞は、いくつかの数の機構(免疫複合体の形成、補体活性化、ならびに/または脈絡膜のT細胞、他の食作用性の細胞、およびマトリックスのタンパク質溶解のインサイチュでの活性化を含む)によって、AMDの慢性性に寄与する。ドルーゼ中の多数の免疫関連成分(イムノグロブリン、補体タンパク質、およびいくつかの急性期タンパク質を含む)の存在が、このような事象によって説明され得る。当業者は、一旦組織の損傷が修復されると、樹状細胞がダウンレギュレートされ、従って寛容性を回

復することを推測し得る。この型の自己制限制御は、代表的には、樹状細胞の代謝回転を通じて他のシステムにおいて達成される；リンパ節への新しい樹状細胞前駆体の流入およびリンパ節への成熟した樹状細胞の流入に付随する減少は、代表的には、寛容性に戻すように平衡を移動させるために十分である。他の場合においては、ナチュラルキラー細胞が、標的として成熟した樹状細胞を認識し、これによって抗原提示に対して負のフィードバック効果を提供してシステムを寛容性にする。しかし、AMDの場合においては、本発明者らは、慢性的な炎症、長年の間持続する状態を示唆する。この筋書きにおいては、RPE細胞の死の循環する事象が、長年の間に生じ得る。このことにより、システムを寛容性に戻すことは可能ではない。1つの例においては、これは、RPE遺伝子の変異の場合のように、遺伝的な再プログラムの結果として生じ得る。別の例においては、サブRPE領域に動員された樹状細胞によって開始される、RPE細胞による補体因子およびHLA-DRの発現の局所的な活性化（RPE下領域に動員された樹状細胞により開始される）が、クローンのRPE細胞の死を導き得、それによって慢性的な炎症の状態を維持する。他の状況は、確かに想定され得、そして試験されなければならない。この全体的なプロセスのネガティブな結果は、ブルー膜および周辺細胞外マトリックスが変性され得、脈管形成因子が生成され得、それによってRPE下および網膜下空間の日和見的な新生血管形成を生じることであり得る。とはいえ、樹状細胞によるマトリックス変性酵素の発現に関連する文献中にわずかな情報は存在する。しかし、ドルーゼコア中でのMT-1-MMPの発現は観察されておらず、このことは、DC媒介性のマトリックス崩壊の可能性のある機構を示唆する。

【0088】

樹状細胞が局所的な組織の損傷によって活性化され得るという考えもまた、組織の損傷の間には回復されない、網膜および/またはRPE抗原に対する自己免疫応答を開始し得る。RPEの破片/抗原の利用可能性および量は、ほぼおそらく、続いて起こるどの経路が関係しているかを決定する。このような自己免疫応答は、虚血または心臓に対する損傷の結果として報告されている。そして本発明者らは、最近、35kDaおよび53kDaの網膜およびRPEタンパク質に対

して指向された、AMDを有する個体の血清中の自己抗体を同定した。これは、異常な遅延型過敏応答の結果として生じ得、おそらく、少なくともいくらかのAMD患者中の血清自己抗体の存在を説明する。このプロセスの基礎は、RPE細胞の壊死によって寿命のより早い段階で準備されると考えられ、このことにより、おそらく予備実験において20年および30年の寿命において本発明者らが観察した、末梢RPE細胞の脱落の波の結果が説明される。

【0089】

本明細書中で示されるモデルにおいては、RPEの損傷事象の開始には、ドルーゼに関連する構成成分の持続的な沈着が続く。初期のDRAM-マトリックス複合体（例えば、免疫複合体）または他の局所的なリガンドは、さらなる自己凝集タンパク質および/または脂質の蓄積のための「核形成部位」として作用する。これらの構成成分は、血漿および/または局所的な細胞性の供給源のいずれかに由来し得る。多くのDRAMが循環している血漿タンパク質であるという知見に基づくと、いくらかのDRAMは、脈絡膜の血管を通過し、そしてRPEに隣接している細胞外空間に入るとことはもっともらしい。ここでは、これらは、老化中の眼におけるブルーフ膜と会合する1つ異常のリガンドに結合する。これらのリガンドは、基底膜成分、形質膜レセプター、RPEまたは脈絡膜細胞に由来する分泌産物、または細胞性の自己溶解の副生成物であり得る。本明細書中で報告されるように、多数のドルーゼ関連分子（アポリポタンパク質E、ビトロネクチン、フィブロネクチン、C反応性タンパク質、およびトランスサイレチンを含む）が、RPEおよび/または網膜によって合成されている。予測外であったが、これらのデータは、いくらかのDRAMが合成され得、そして局所的に分泌され得るという概念を支持する。局所的な細胞によるDRAM合成のアップレギュレーションおよびダウンレギュレーションが、ドルーゼの沈着および/またはAMDと相関するかどうかを決定することが残っている。これらの異常な沈着物の大きさが増大するにつれ、それらは、RPE単層に取って代わり、そしてドルーゼとして臨床的に認識される。

【0090】

このモデルはまた、細胞外マトリックスの合成、変性、および/または代謝回

転における不均衡を予測し得、それによって、脈絡膜の新生血管形成、いくつかの形態のAMDの特徴付け、細胞増殖、細胞分化、および介在性の線維症のような事象を導く。多くの器官においては、線維形成が、組織損傷の共通の合併症である。これは、上記の損傷の最初の部位には依存しない。存在している細胞による免疫細胞の動員、それらの活性化、および/または調節は、最終的には線維症を導く事象のカスケードにおける重要な工程を示す。最近の研究はまた、異なる機能的な線維芽細胞の表現型が、初期の線維症において中心的な役割（免疫細胞の動員を含む）を果たし得ることを示唆する。

【0091】

脈絡膜の線維症は、ドナーの眼のサブセットにおいて報告されている。脈絡膜の線維症と年齢との間に有意な相関関係が存在する。さらに、予備的なデータは、脈絡膜の線維症と、AMD、大動脈の動脈瘤、大動脈の狭窄、とおそらくCOPDの可能性との間に強力な相関関係が存在することを示唆する。これらの脈絡膜は、新しく合成されたコラーゲンおよびエラスチン原線維、ならびに糸状構造のコラーゲン、およびマイクロフィラメント（これは、通常は、ゆるくパッケージされた脈絡膜の間質を満たす）の大量の蓄積によって、微小構造的に特徴付けられる。主要なコラーゲン原線維は、平均 $0.211 \sim 0.253 \mu\text{m}$ の直径の強膜中の原線維コラーゲンと比較して、平均 $0.042 \sim 0.063 \mu\text{m}$ の直径である。さらに、これらのドナー中のコラーゲン原線維は、縦方向および横方向の切片中に伝統的ならせん状の形態を示す。らせん状のコラーゲンは、原線維の解離および切断されていないプロコラーゲン分子の取りこみによって生じる。このコラーゲンの表現型は、いくつかの遺伝性の結合組織の疾患（エールレス-ダンロー；PXE；皮膚破裂（dermatoparaxis））、ならびに他の状態（コラーゲン線維の（collageofibrotic）糸球体症、強皮症、アテローム性動脈硬化症、アミロイド、気腫、アテローム斑）において観察される。活性なエラスチン合成（拡張型RER、微小線維の嚢、および新たに合成されたタンパク質の形態学的な特徴を示すエラスチンを含む）の明らかな指標もまた、弱められた線維芽細胞のプロセッシングおよびコラーゲン原線維の間の散在の間に観察される。

【0092】

既知のデータと一致する事象の仮定の病因の因果的連鎖は、以下の通りである：
1) RPEの不全（例えば、遺伝した罹患しやすさおよび/または環境的な曝露によって促進される）；
2) RPE中の細胞内物質（正常な基質物質（例えば、酵素によって適切に分解されていない）対 異常な基質物質の蓄積）；
3) 細胞外物質の異常な蓄積（基底膜および基底の直線状の沈着）；
4) ブルー膜の組成における変化（例えば、増大した脂質の沈着およびタンパク質の架橋）；
5) 栄養に対するブルー膜の透過性における変更（例えば、ブルー膜を通過する水溶性の血漿成分の損なわれた分散）；
ならびに6) 代謝性の疾患に対するRPEの応答（すなわち、萎縮 対 CNVの増殖）。組織病理学および臨床的な研究は、脈絡膜の虚血の領域がしばしばAMD患者中のCNV付近に見られることを示す。減少した酸素の送達/代謝「ディストレス」に応答して、RPEは、基質を合成し得、それによってCNVの増殖を導き得る。おそらく、RPEの萎縮、続く脈絡毛細血管および光レセプターの萎縮は、細胞外の破片の過剰な蓄積の領域での、減少した栄養/増大しつつある代謝性の異常に応答する。AMDに関する未解決の問題として以下が挙げられる：
1) AMDが全身的な疾患の眼の発現であるかまたは純粋な眼の疾患であるか？；
2) 何がCNV対RPE-脈絡膜毛細血管-光レセプターの萎縮が生じるかどうかを決定するのか？；
ならびに3) 何が不活性な瘢痕中でCNVの変異を誘導するのか、そして何がほとんどのCNVの増殖を領域の中心に限定するか？

ドルーゼが種々の加齢性疾患に関連する異常な沈着物に共通する多数の分子の成分を共有するので、ドルーゼは、アミロイド沈着症、弾力線維症、膜性増殖性糸球体腎炎、および/またはアテローム性動脈硬化症の眼の発現を示し得る。種々の遺伝子および/または環境による影響によって調節されるが、全てのこれらの疾患は、炎症、凝固、および免疫システムの活性化を含む、生物学的な応答の同様のセットを誘発することによりなお区別することが可能な類似の病理学的な表現型を生じる。従って、本発明は、沈着またはプラークにおいて加齢性疾患を発現する、他の加齢性疾患と比較して、これらの類似性の有用な認識を提供する。

【0093】

(4.2b:動脈壁破裂障害)

動脈壁破裂障害は、腹部の大動脈に罹患し得、それによって異常な大動脈の動脈瘤(AAA)の形成を生じる。AAAは、大動脈壁中の動脈瘤の形成を必然的に伴う、大動脈壁破裂障害の形態である。これは、腹部に局在化される。従って、AAAは、大動脈壁破裂障害の形態である。これらの病変は、アメリカ、オーストラリア、およびヨーロッパを含む先進国において一般的になりつつある(MacSweeneyら、Brit J. Surg. 81:935-941、1994)。AAAの罹患率は、一般的な集団においては6%(2~9%)であり、主に、約65歳を超える個体が罹患している(Wilmink, A. B. および Quick, C. R., Brit. J. Sur., 85:152-162、1998)。65歳以上の集団の大きさが増大し続けているので、AAAおよび他の動脈壁の破壊的な疾患は、おそらく、近い将来、保険財源に対して大きな負担となる。

【0094】

大動脈壁破裂障害はまた、胸部の大動脈の動脈瘤を含む。これらの動脈瘤は、一般的には、横隔膜の下に伸びる成分を有するため、より正確には、胸腹大動脈の動脈瘤(TAAA)と呼ばれる。これらは、それらの解剖学的な程度に従って分類される(Crawford ESら、「Thoracoabdominal aortic aneurysms: preoperative and intraoperative factors determining immediate and long-term results of operations in 605 patients」、J. Vasc. Surg. 3:389-404、1986)。解離を伴わない胸部大動脈の動脈瘤は、多数の因子によって引き起こされる。これには、アテローム性動脈硬化症の医学的な変性性の疾患、先天的な障害(例えば、マルファン症候群およびエールレス-ダンロー症候群、真菌性の病変、および高安大動脈炎が含まれる。大動脈壁の破壊的な疾患はさらに、それらが動脈瘤の形成に関係するかどうかにはかわらず、大動脈の解離を含む。アテローム性動脈硬化症の内側の変性性の疾患(82%

)および解離(17%)は、全TAAAの95%を超える原因である(Panneton JMら、「Nondissecting thoracoabdominal aortic aneurysms: Part I」、Vasc. Surg. 9:503-514, 1995)。高血圧は、TAAA患者の両方のグループに共通して見られる。しかし、変性性の(アテローム性動脈硬化症の)動脈瘤を有する患者は、冠状動脈の疾患、慢性腎不全、脳血管の疾患、および末梢血管の疾患の、高い発症率を有する傾向にある。

【0095】

本発明のシステム、方法、およびキットが、全ての解剖学的な位置における動脈壁破裂障害に関することが本明細書中で理解されるが、本発明は、AAAまたはTAAA中で完了する大動脈壁破裂障害についての特定の参考文献とともに説明される。

【0096】

(4.2b(i) 動脈壁の解剖学的構造)

動脈は、それらの壁の解剖学的構造に基づいて3つの一般的なカテゴリーに分類される: 大きな弾力性のある動脈、中間の筋肉の動脈、および小さい動脈。全ての動脈が、3つの層(動脈内膜、中膜、および外膜)を保有している。中膜は、動脈内膜および外部の弾力性のある基底膜によって結合され、コラーゲン、エラスチン、およびプロテオグリカンのマトリックス中に埋まっている平滑筋細胞を含む。外膜は、外側の弾力性のある基底膜の外側にあり、ゆるい結合組織、線維芽細胞、毛細血管、白血球、および小さい神経線維から構成される。動脈壁は、脈管の脈管と呼ばれる血管のシステムによって育成される。

【0097】

身体の大きな弾力性のある動脈は、大動脈およびその主要な側枝を含む。中間の筋肉の動脈は、器官に分布している血管のほとんどを含む。これらの2つの動脈のクラスは、中膜中に存在する弾力性組織の量が主に異なる。大動脈壁中には、十分に定義された層板状ユニットが存在する。これは、一般に方向付けられ、そして伸長した平滑筋細胞およびそれらの周辺のマトリックスからなる。マトリックスは、コラーゲンの網様構造およびエラスチンの層を含む(Clark, J

.M.ら、「Transmural organization of the arterial media: the lamellar unit revisited」、Arteriosclerosis 5:19、1985)。
薄層ユニットは、大動脈壁の構造的および機能的なユニットを示す。層板状ユニットは、明確に定義されたエラスチンの層板とともに点状に存在する平滑筋細胞の層から構成される。トロポエラスチンのモノマーは、通常は、線維芽細胞および血管の平滑筋細胞(SMC)によって産生され、そしてフィブリリンおよび他のタンパク質の細線維網様構造に沈着し、そして成熟した弾性線維を形成するようにリジロキシダーゼによって架橋される。これは、集中的な薄層に並べられる。

【0098】

(4.2b(ii)AAAの遺伝学)

動脈瘤を発症する家族的な傾向は、AAAを有する患者の約15~20%において十分に報告されている。このことは、いく人かの患者におけるAAAに対する遺伝的な素因、一親等の血縁関係における陽性の家族病歴が、AAAを発症する有意な危険因子であることを示唆する(MacSweeneyら、Brit J. Surg. 81:935-941、1994)。家族におけるAAAの出現の最も可能性のある説明は、優性遺伝形質および低い浸透度を示す単一の遺伝子である(Verloes, A.ら、J. Vasc. Surg. 21:646-655、1995)。他の動脈瘤についての家族的な関連もまた、注目されている(Kojima M.ら、「Asymptomatic familial cerebral aneurysms」、Neurosurgery, 43(4):776-81、1998年10月)。家族的なクラスター化が、これらの患者のコホートにおけるHLA-DR B1対立遺伝子の同定と相関する、炎症性の動脈瘤について観察されている(Rasmussen TEら、「Genetic risk factors in inflammatory abdominal aneurysms: polymorphic residue 70 in the HLA-DR B1 gene as a key genetic element」、J Vaso Surg, 25(2):356

- 64、1997年2月)。遺伝的な因子は他の動脈瘤の症候群の発症に関連しており、1つの症例においては、フィブリンの遺伝子型、血圧、および動脈瘤の形成に関連している(Powell JT.ら、「Interaction between fibrillin genotype, blood pressure and the development of aneurysmal disease」、Ann NY Acad. Sci. 800(-HD-) : 198-207、1996年11月18日。

【0099】

AAAの根底にある遺伝的な成分を定義するための試みは、連鎖分析および候補の遺伝子のアプローチの両方を含む、種々のストラテジーを使用した。AAAについてのいくつかの候補の遺伝子(コラーゲン、1-アンチトリプシン、フィブリン(fibrillin)-2(Kuivaniemiら、Eur. J. Hum. Gen. 6:642-646、1999)、タンパク質分解酵素、メタロプロテアーゼの組織インヒビター(TIMP)、およびハプトグロビンが、AAAの家族性のクラスター化を説明するために研究されている。重大なことには、エラスチン遺伝子における多形性は、AAAを有する患者において実証されていない。フィブリン-1およびIII型プロコラーゲン中の遺伝子の変異は、少数の患者(例えば、それぞれ、マルファン症候群およびエールレス-ダンロー症候群)においては動脈瘤の発症の原因であることが見出されている。III型コラーゲンの鎖についての変異遺伝子は、50の家族のうち3家族において動脈瘤の疾患と同時に分離し、そしてIII型コラーゲン中の619位での一塩基変異が、1つの家族において記載されている(Kontusaari, S.ら、Ann. N. Y. Acad. Sci. 580:556-557, 1990)。大動脈の動脈瘤の約2%が、III型プロコラーゲン遺伝子中のgly136からargへの変異によって引き起こされると考えられる(Tromp, G.ら、J. Clin. Invest., 91:2539-2545)。1-アンチトリプシンについての欠損対立遺伝子は、47人の患者のうち5人において見出された。そしてTIMP(1)についてのヌクレオチド置換が、6人の患者のうち2人において見出された。COL3A1遺伝子中の変異は、いくつかの家族性の大動

脈の動脈瘤の病因に関与している (Kuivaniemi, H.ら、J. Clin. Invest. 88: 1441 - 1444、1991にまとめられている)。MZ - 1 - アンチトリプシン表現型は、AAAを有する個体において増大した頻度で見出されている (Cohen, J. R.ら、J. Surg. Res. 49: 319 - 321、1990)。別の研究は、AAAが、ハプトグロビンの2 - 1および1 - 1遺伝子型の表現型に関連し得ることを示唆した (Norrgard, O., Hum. Hered. 34: 166 - 169、1984)。まとめると、入手可能なデータは、AAAが多くの症例で遺伝され得るが、ほとんどのAAAの症例の原因である遺伝子は同定が依然として行われている。

【0100】

(4.2b(iii)他のAAAの危険因子)

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

- 95、1998年10月)。

【0101】

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

【0102】

持続的なタバコの喫煙とAAAとの間にもまた、約40年間のタイムラグを有して、強力な関係が存在する(MacSweeneyら、Brit J Surg. 81:935-941、1994)。いく人かの研究者らは、タール以外の煙の成分がこの疾患に寄与し得ることを示唆した(MacSweeneyら、前出)。例えば、血清コチニンの増大したレベルが1-アンチトリプシンの不活化に寄与し得ることが提案されている。これは、続いて、タンパク質溶解性の酵素による大動脈壁の崩壊を増強し得、それによって動脈瘤の拡張に寄与する。興味深いことに、肺気腫/COPDの発症率は、AAAを有する患者においては高く、このことは、これらの患者における1-アンチトリプシンの不活化がさらに、大動脈の内腔の維持に必要なエラスチンの産生を崩壊させることを示唆する(Nicholls SCら、「Rupture in small abdominal aortic aneurysms」、J. Vasc Surg, 28(5):884-8、1998年11月)。

【0103】

高血圧もまた、AAAについての有意な危険因子であると考えられる。これは、増大した罹患率および増大した破裂の危険性の両方に関連する。75mmHg未満の拡張期の圧力を有する<3cmの動脈瘤の破裂の危険性はわずかに2%であるが、5cmの動脈瘤および105mmHgより大きな拡張期の圧力については、破裂の危険性は100%まで増大し得る(Schwartz, S.I., 924に前出)。

【0104】

(4.2b(iv) AAAの病因)

AAAの病因は、エラスチンおよびコラーゲンの明らかな変更、慢性的な炎症、自己免疫に関連するプロセス、新生血管形成、ならびに血管の平滑筋細胞の減少を含む、種々の生物学的なプロセスの複雑な相互作用を含む(Thompson, R.W., *Current Opinion Cardiology* 11:504-518, 1996)。これらのプロセスは、長年にわたって作用し、そして最終的には、大動脈壁を弱くする(Cenacchi G.ら、「The morphology of elastin in non-specific and inflammatory abdominal aortic aneurysms. A comparative transmission, scanning and immunoelectronmicroscopy study」、*J Submicrosc Cytol Pathol*, 27(1):75-81, 1995年1月)。大動脈が弱くなることは、コラーゲンとエラスチンとの間での平衡の崩壊を含むことが明らかであるが、論証は、関連する機構およびそれらの相対的な重要性をを視野に入れている(Anidjar S.ら、「Experimental study of determinants of aneurysmal expansion of the abdomen」、*Ann Vasc Surg*, 9(2):127-36, 1994年3月)。

【0105】

定量的な分析は、エラスチンが正常な大動脈の中膜の乾燥重量の35%を含むが、動脈瘤を有する患者の大動脈の中膜のわずかに8%しか含まないことを示す(Campa, J.S. *Atherosclerosis* 65:13-21, 1987)。外膜中のエラスチンもまた、AAAに影響を与え得る(White J.V.ら、「Adventitial elastolysis is a primary event in aneurysm formation」、*J Vasc Surg*, 17(2):371-80; 考察380-1, 1993年2月)。大動脈壁のエラスチンにおける変更の生化学的な影響は、予想される

血液動態の影響を伴って、大動脈の罹患した領域の剛性を増大させることである (He CMら、「The composition and mechanical properties of abdominal aortic aneurysm」、J Vasc Surg, 20(1):6-13、1994年7月)。

【0106】

正常な血管組織においては、エラスチンは、平滑筋細胞によって産生され、そしておそらく、線維芽細胞によって産生される。エラスチンはコラーゲンと同様に、トロポエラスチン分子としてプロデューサー細胞から分泌され、これはエラスチン原線維を形成するように結合する。創傷の治癒に関連する特定の因子(例えば、TGF- β)は、エラスチンの細胞性の産生を増大し得る (Sauvage Mら、「Localization of elastin mRNA and TGF- β in rat aorta and caudal artery as a function of age」、Cell Tissue Res. 29:305-314、1998)。特定の他の因子(詳細には、TNFのような炎症性のサイトカイン)は、エラスチンの産生に有害な影響を与え得る (Kahari VMら、「TGF- β up-regulates elastin gene expression in human skin fibroblasts: evidence for post-transcriptional modulation」、Lab Invest 66:580-8、1992)。エラスチンの生成およびエラスチンの溶解は、理想的には定常状態のままである。

【0107】

動脈壁中でのエラスチンの崩壊とエラスチンの産生との間の関係に焦点をあてるアテローム性動脈硬化症のモデルが、提案されている (Robert Lら、「Elastin-elastase atherosclerosis revisited」、Atherosclerosis 140:281-295、1998)。このモデルに従うと、年齢に関連する血管壁の改変には、エラスチン溶解性の酵素のアップレギュレーションが含まれる。弾性組織中の脂質の進

行性の沈着、ならびにリポタンパク質または脂質の細胞または器官培養物への添加は、マトリックスの生合成を改変し、そしてエラスターゼの発現をアップレギュレートすることが示されている。さらに、血管の平滑筋細胞上に存在するエラスチンラミニンレセプターは、若い被験体においてNO依存性の血管拡張作用およびコレステロール合成のダウンレギュレーションを誘発することが示されている。これらは、年齢とともに減少するかまたは消滅する機能である (Varga Zら、「Age-dependent changes of K-elastin stimulated effector functions of human phagocytic cells: relevance for atherosclerosis」、Exp Gerontol 32:653-62、1997)。これらの知見はまた、アテローム性動脈硬化症のプラーク中に存在するTリンパ球に向けて伸びている。有意には、血管の損傷(例えば、バルーン血管形成術)の後、脈管内膜および中膜の平滑筋細胞の両方が増殖する (Strauss BHら、「Extracellular matrix remodeling after balloon angioplasty injury in a rabbit model of restenosis」、Circ Res 75:650-8、1994)。アテローム性動脈硬化症のプロセスに関連する血管の損傷においては、両方の細胞の型の同様の増殖が存在する。エラスチンの合成および平滑筋細胞の増殖は、動脈壁の損傷の修復の間にしっかりと調節されると考えられる (Aoyagi Mら、「Smooth muscle cell proliferation, elastin formation, and tropoelastin transcripts during the development of intimal thickening in rabbit carotid arteries after endothelial denudation」、Histochem Cell Biol 107:117、1997)。

【0108】

これがどの機構によって生じるかにはかわらず、大動脈壁中のエラスチン含有量の減少は、動脈瘤の形成における重要なエレメントである。理論に束縛され

るべきではないが、それにもかかわらず、本発明者らは、提案されている種々の機構を知る (Minion, DJ.ら、「Elastin is increased in abdominal aortic aneurysms」、J Surg Res, 57(4):443-6、1994年10月)。さらに、エラスチンの崩壊産物 (EDP) は、大動脈壁をさらに崩壊させる炎症性のプロセスに寄与し得る。例えば、EDP (例えば、ペプチド Val - Gly - Val - Ala - Pro - Gly) を注入したラットは、弱められた大動脈を生じ、そして樹状細胞およびマクロファージについて走化性である (Senior, R. M.ら、J. Cell Biol., 99:870-874, 1984)。

【0109】

多数の観察は、エラスチンの酵素による分解が、動脈瘤の疾患の発生において重要な役割を果たすことを示唆する。動脈瘤の壁中に見出される1つの型のエラスターゼは、ヒトのマクロファージに関連している (Curci JAら、「Expression and localization of macrophage elastase matrix metalloprotein abdominal aortic aneurysms、J. Clin. Invest., 102(11):1900-10、1998年12月1日」。実際、多数のタンパク質溶解性の酵素 (エラスターゼ、コラゲナーゼ、およびゼラチナーゼを含む) が、AAAを有する患者の大動脈の中膜中で増大した濃度で見出されている (Brophy, CMら、J Surg Research 50:653-657、1991; VineおよびPowell、Clinical Sci., 81:233-239、1991)。真菌性の動脈瘤においては、好中球に起源すると考えられるエラスターゼの増大が、動脈壁において確認されている (Buckmaster, MJら、「Source of elastin-degrading enzymes in mycotic aortic aneurysms: bacterial or inflammatory response?」、Cardiovasc Surg、71:16-26、1999年1月)。エラスチンを崩壊させる能力を有する酵素である、MMP 2、MMP 3、およびMMP 9が発現され、そしてAAAを有するヒトの大動脈

中で増大した量で産生される (Sakalihasan, N.ら、「Activated forms of MMP2 and MMP9 in abdominal aortic aneurysms」、J. Vasc. Surg., 24(1):127-33、1996年7月; Davis, V.ら、「Matrix metalloproteinase-2 production and its binding to the matrix are in abdominal aortic aneurysms」、Arterioscler Thromb Vasc Biol, 18(10):1625-33、1998年10月)。MMPの過剰発現と動脈瘤の形成との関係もまた、ラットのモデルにおいて観察されている (Allaire, E.ら、「Local overexpression of TIMP-1 prevents aortic aneurysm degeneration in a rat model」、J. Clin. Invest., 102(7):1413-20、1998年10月1日)。MMP-9を保有しているマクロファージもまた、一時的な動脈において同定されている。このことは、両方の状態において作用する病理学的なプロセスの間でいくらかの類似性が存在する可能性を生じる (Nikkarı, S.T.ら、「Macrophages contain 92-kd gelatinase (MMP-9) at the site of degenerated elastic lamina in temporal arteritis」、Am. J. Pathol., 149(5):1427-33、1996年11月)。

【0110】

最近の研究は、増大したエラスターゼ活性が、動脈瘤の形成に応答するよりも、第一の事象であるさらなる可能性が存在することを示唆した (Cohen, J.R.ら、Annals Vascular Surgery 4:570-574、1990)。エラスチン組成における変更が、胸部の動脈瘤の解剖において観察されている。これはおそらく、破裂のための剥離の傾向にこの機構を関連付ける (Cattell, M.A.ら、「Increased elastin content and decreased elastin concentr

ation may be predictive factors in dissecting aneurysms of human thoracic aorta」、Cardiovasc Res., 27(2):176-81、1993年2月)。プラスミン(これは、潜在性のMMPの活性化を通じて直接および間接的に細胞外マトリックスを崩壊させ得る)もまた、AAA組織中で増大される。TIMPの低下した活性は、AAAの根底にある遺伝的な根拠として示唆されているが、DNA配列決定は、この主張を支持する証拠を提供していない(Tamarina NAら、「Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in aneurysms of the aorta」、Surgery、122(2):264-71; 考察271-2、1997年8月; Elmore JRら、「Expression of matrix metalloproteinase and TIMPs in human abdominal aneurysms」、Ann Vasc Surg、12(3):221-8、1998年5月)。

【0111】

エラスチンの断片化を生じる因子が、AAAの病因において重要であり得るが、コラーゲンの合成および崩壊の平衡を調節する因子もまた、AAAの進行の速度を決定し得る(Halloran, B.G. および Baxter, B.T., Sem. Vasc. Surg. 8:85-92、1995)。初期の研究は、コラーゲンが、AAAを有する患者中の大動脈の中膜の乾燥重量の増大した割合を含有することを示唆したが、他の研究は、正常なヒトの腹部の大動脈壁およびAAAを有する患者の腹部の大動脈壁が、同様のコラーゲンの量、ならびに同様のコラーゲン型間の比を含むことを示唆した(Menashi, S., J. Vasc. Surg., 578-582、1987)。しかし、動脈瘤の壁中でのコラーゲンの可溶性およびEDTAによって誘導される剥離に対するその過敏さは、AAA中では明らかに減少する(Sobolewski, K.ら、Act. Biocim. Polonica, 42:301-308、1995)。さらに、コラーゲンの代謝回転は、例えば、AAA患者の血液中のIII型プロコラーゲン

のアミノ末端のプロペプチドの濃度、またはAAA患者の尿中のコラーゲンヒドロキシプロリンの濃度によって決定される場合に、AAA中で増大する。エラスチンのタンパク質溶解性の分解は、動脈瘤の拡張に最も特異的に関連するようであるが、コラーゲンの分解は最終的には、動脈瘤の破裂に必要とされることが、いく人かの研究者らによって考えられている (Dobrin , P . B . および Mrkvicka , R . 、 Cardiovascular Surgery , 2 : 484 - 488 、 1994) 。

【0112】

コラーゲンおよびエラスチンのレベルに加えて、AAA患者の腹部の大動脈中では、グリコサミノグリカンの量がわずかに減少され、コンドロイチン硫酸の割合が増大され、そして硫酸ヘパリンの割合が有意に減少される。さらに、ビッグリカン (biglycan) mRNAレベルにおける明らかな減少は、アテローム性動脈硬化症および再狭窄と比較して、AAAについて特有である。(Tamarinanaら、J. Surg. Research 74 : 76 - 80 、 1998)。腫瘍壊死因子、インターロイキン - 1、インターロイキン - 6、およびインターロイキン - 8もまた、コントロールと比較してAAA組織中で増大されることが示されている (Hirose , H . ら、 1997)。AAA中の炎症性のサイトカインの役割のさらなる議論が、次の節で提供される。

【0113】

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

【0114】

AAA組織は、有意に増大した亜硝酸イオンの濃度を有する。この濃度では、

インビトロで弾力性のある線維の崩壊が公知である。AAAに関連する新血管のネットの内皮細胞は、マトリックス崩壊効果を有する窒素酸化物を産生し得る。まだ確立されてはいないが、これは、AAA組織中の亜硝酸塩の供給源が内因性（例えば、内皮細胞）または外因性（例えば、タバコの煙）、あるいはそれらの両方であり得ることを提案する論理である。エラスチンに対する亜硝酸塩の有害な影響が、種々の臨床的な条件下で観察されている。これは、成熟前の皮膚の加齢および肺性の肺気腫、ならびにAAAが挙げられ、これらの全ての状態は、タバコの喫煙と関係することが公知である（Paik DCら、「The nitrite/elastin reaction: implications for in vivo degenerative effects」、Connect Tissue Res, 36(3):241-51, 1997）。気腫/COPD（これは、 α -アンチトリプシンの欠損に関連する）がAAAの病状再燃またはAAAの開始に関連するようであることは、興味深い。MZ-1-アンチトリプシン表現形は、1つの研究においてはAAAを有する個体中で増大した頻度で見出されているが、これは、より大きなシリーズにおいては確認されていない（Cohen, JR.ら、J Surg Research 49:319-321, 1990）。

【0115】

(4.2b(v) AAA中で免疫によって媒介されるプロセス)

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

【0116】

これらの種々の生物学的なプロセスの相互作用の顕著な例が、「炎症性の腹部の大動脈の動脈瘤」(IAAA)（大動脈壁から周辺組織へと伸びる、大量の炎

症性細胞の浸潤によって特徴付けられるAAA)の外科手術を受けた患者において見出される。(Grange, J. J.ら、Cardiovasc. Surg., 5: 256-265、1997)。AAAのこの発現は外科手術を受けたAAA患者の5~10%において見られる。この状況では、炎症性のプロセスは、大動脈の外膜から周辺の構造(特に、腹膜後腔)を含むよう外側に拡大する。この状況は、外膜中のアレルギー型のプロセスによって生じ、これは局在化された炎症および線維症を刺激する最終的な影響を有すると仮定されている(Dimarzoら、「Inflammatory aneurysm of the abdominal aorta. A prospective clinical study」、J Cardiovasc Surg(Torino)、40(3): 407-12、1999年6月)。大動脈の周辺の組織中でのコラーゲンの増大した沈着が、IAAAにおいて観察されており、これは、AAAにおける確立された関係、および慢性的な炎症と線維症の刺激との間での他の設定と一致する(Gargiulo M.ら、「Content and turnover of extracellular matrix protein in human "nonspecific" inflammatory abdominal aortic aneurysms」、Eur J Vasc Surg, 7(5): 546-53、1993年9月)。

【0117】

実際、AAAは多数の炎症性の疾患に関連する。これらには、Takayasu病(10~30%)および梅毒(66%)が含まれる(Pearce, W. H. およびKoch, A. E., Annals N.Y. Acad. Sci., 800: 175-185、1996を参照のこと)。AAAはまた、大動脈壁の特定の成分を標的化する自己免疫プロセスに関連し得る。さらなる研究は、アポトーシスおよび細胞の老化の証拠を提供する。特定の炎症性のプロセスを罹患している、血管(動脈炎と呼ばれる)は、動脈瘤の形成を生じ得る。巨大な細胞の動脈炎およびTakayasu病は、血管に影響を与える炎症性のプロセスであり、これらの両方が、剥離を伴い得る胸部および腹部の大動脈の動脈瘤の潜在的な発症の傾向を有する(Joyce, JW、「Uncommon arterio

pathies」、RB Rutherford編、Vascular Surgery、WB Saunders、1989、276-286頁)。両方の状態が、炎症性の単核細胞の浸潤および巨大な細胞を伴う局在化された動脈周囲炎によって特徴付けられる。これらは、動脈壁の弾性線維の破壊および断片化を伴う。両方の障害における動脈の炎症が開始し、そしてこれは、中膜中で最も顕著である。

【0118】

動脈炎の主な炎症性の障害中の動脈壁の崩壊の存在、および動脈壁の崩壊によって主に特徴付けられる障害中の炎症の存在は、炎症と血管壁に対する構造的な攻撃との間の相関関係に注目する。しかし、さらに、これらの状態と、異常な血管のパターンおよび血管周囲の線維症との間での関係が、観察されている。まとめると、動脈壁破裂障害において観察される変更のスペクトルは、加速されたが、効果のない、慢性的な損傷および慢性的な炎症に対する創傷治癒応答（これは、大動脈壁に対して主に局在化される）を反映するようである。

【0119】

(4.2b(vi))AAAおよび動脈壁破裂障害中の線維症のプロセス)

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

【0120】

線維芽細胞は、創傷の治癒に関与している主な間葉性の細胞である。損傷した領域中の未分化の間葉性の細胞は、マクロファージ生成物によって刺激された場合に、線維芽細胞への分化を誘導され得る。より最近のデータは、介在性の線維

芽細胞のサブクラスが、炎症性の細胞の直接的な動員、可溶性の媒介因子の放出、および/または線維芽細胞対免疫細胞の情報伝達の促進によって、免疫に関連するプロセスにおいて初期の役割を果たし得ることを示唆する。さらなる線維芽細胞は、走化性のサイトカインによって損傷した領域に対して付着させられる。PDGFは、例えば、線維芽細胞および平滑筋細胞の両方について走化性であることが、実証されている：(Seppa H.ら、「Platelet derived growth factor is a chemoattractant for fibroblasts」、J. Cell Biol. 92:584-588、1984; Grotendorst GRら、「Platelet derived growth factor is a chemoattractant for vascular smooth muscle cells」、J. Cell Physiol 112:261-266、1982)。創傷中の間葉性の細胞の集団はさらに、存在している細胞および新しく生じた細胞の両方の増殖によって増大される。間葉性の細胞の増殖は、PDGF、TNF、IL-1、リンホカイン、インスリン、およびIGFによって刺激され得る。線維芽細胞は、創傷中でのコラーゲンの産生を担う。コラーゲン分子が線維芽細胞中で合成された後、これは、プロコラーゲンの形態で細胞外空間に分泌される。プロコラーゲンは、コラーゲン分子の鎖の持続的ならせん状ではない伸張によって同定され得る。細胞外空間での酵素によるこの直線状の伸張またはレジストレーションペプチドの切断によってトポコラーゲンが生じ、これは、コラーゲン原線維に凝集し得る。分子間架橋が、別々のコラーゲン分子間で形成される。これは、原線維の成熟としての共有結合によって置き換えられる。凝集していないトポコラーゲン分子は生理食塩水中で可溶性であるが、強酸および高温が、成熟によって架橋されたコラーゲンを可溶化するために必要とされる。細胞外結合組織マトリックスは、コラーゲン以外の成分(プロテオグリカン、接着タンパク質(例えば、フィブロネクチン)、マイクロフィラメント、およびエラスチンを含む)を含有する。エラスチンは、代表的には、炎症、創傷の治癒、または損傷の応答の一部としては合成されないが、これは、いくつかの場合においては、これらの状況から合成され得る。

【0121】

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

【0122】

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

【0123】

組織の損傷に対する正常な応答は炎症であるので、アテローム性動脈硬化症の

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

【0124】

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

【0125】

損傷した血管壁への結合の後、白血球はその中に移動する。一旦血管の中の適所にくると、白血球（特に、活性化されたマクロファージ）は、次いで、IL-1、TNF、プロスタグランジン E_2 （ PGE_2 ）、bFGF、ならびに形質転換成長因子 および（TGF β 、TGF α ）を含むさらなる炎症媒介因子を放出する。これらの炎症媒介因子の全てが、損傷した領域に対してさらに炎症性の細胞を動員し、そして平滑筋のさらなる増殖および移動を調節する。単核細胞 - マ

クロファージによって作られた周知の増殖因子は、単核細胞に由来する増殖因子およびマクロファージに由来する増殖因子(MDGF)であり、これは、平滑筋細胞および線維芽細胞の増殖の刺激因子である。MDGFは、血小板に由来する増殖因子(PDGF)と類似であることが理解されている；実際、これらの2つの物質は同一であり得る。平滑筋細胞の増殖を刺激することによって、炎症は、筋芽脈間内皮(myointimal)の過形成の発症および進行に寄与し得る。

【0126】

炎症の上記の化学的な媒介因子によって血管壁に付着させられた白血球は、局所的な損傷を悪化させ得るそして治癒応答を延長し得る、血管壁に対して直接的な影響を有する物質を生じる。最初に、炎症のプロセスによって活性化された白血球は、コラーゲンおよび他の構造タンパク質を消化し得るリソソーム酵素を分泌する。血管壁中のこれらの酵素の放出は、その細胞外マトリックスの完全性に影響を与え得、SMC、および他の移動性の細胞が壁をより容易に通過することを可能にする。従って、これらのリソソームプロテアーゼの放出は、筋芽脈間内皮の過形成を導くプロセスを増強し得る。第2に、活性化された白血球は、それらの細胞膜に対するNADPH系の作用によってフリーラジカルを産生する。これらのフリーラジカルは、細胞性のエレメントを直接損傷し得、これによって局所的な損傷の拡大、または損傷 - 炎症 - 治癒のサイクルの長期化を導き得る。

【0127】

この理論に従うと、アテローム性動脈硬化症の開始は、主に、おそらく、機械的なストレスまたは化学的なストレスによる損傷の形成に起因する。この損傷に対して体が応答する方法は、次いで、損傷がアテローム性動脈硬化症の病変に悪化するか否か、およびどの程度迅速に悪化するかを規定する。内皮の損傷後に、一連の修復機構が開始されることが公知である。損傷から数分以内に、血小板およびフィブリンの層が、損傷した内皮を被って沈着する。数時間から数日以内に、炎症性の細胞は、損傷した領域に対する浸潤を開始する。損傷後の24時間以内に、血管の中膜中に局在化された血管の平滑筋細胞(SMC)が、DNA合成を開始する。数日後、これらの活性化された合成のSMCは、内部の弾力性のあ

る薄膜を通じて内腔の表面に対して移動する。新脈間内皮が、それらの持続的な複製および細胞外マトリックスのそれらの産生によって、これらの細胞によって形成される。脈間内皮の厚さにおける増大が、細胞性の増殖マトリックスの沈着を進行しながら生じる。血管の治癒のこれらのプロセスが過度に進行する場合には、病理学的な状態が生じる。平滑筋細胞および新脈間内皮の過増殖は、例えば、血管造影法の後の再狭窄の発症に関連する。

【0128】

上記の血管壁の損傷修復のサイクルが、内皮の損傷およびアテローム性動脈硬化症の発症に関して詳細に記載されているが、血管壁に対する他の損傷が、損傷の修復の匹敵するプロセスを誘発するようであることが理解される。例えば、血管壁の損傷の供給源は、血管壁中の免疫学的に活性化された細胞から、または炎症性のサイトカインから、または異常なタンパク質から、または遺伝子の変異もしくは異常性から生じ得る。他の組織は、同様の組織の損傷と修復の間の相互作用を明らかにし、これは、炎症と線維症のプロセスとの関係を含む。肺の状態（例えば、突発性の肺の線維症）においては、これらのプロセスの相関関係が顕著であり得、病理学的な結果としての組織の線維症を伴う。別の例としての全身的な硬化は、散在性の組織の線維症によって特徴付けられる多発性の全身性の障害である。ここでは、免疫学的な機構、血管の損傷、および線維芽細胞の活性化が、重要な事象である。腎臓の腸管の線維症は、同様に、損傷の修復の免疫によって媒介される成分および非免疫によって媒介される成分の組合せが顕著である。創傷の治癒における炎症と線維症との相互作用の他の例は、医学の分野の当業者に容易に明らかである。線維症の状態の処置のための可能性のある治療の標的として、損傷修復プロセス中の種々の因子に影響を与える試薬、（例えば、b1インテグリンに影響を与える試薬（ここでは、a1b1は、コラーゲン遺伝子の発現のダウンレギュレーションを誘導するシグナルを媒介すると理解され、そしてa2b1は、MMP-1の発現を媒介すると理解される））、線維芽細胞の増殖に影響を与える試薬、マクロファージの活性化および動員に影響を与える試薬、平滑筋細胞の分化および増殖に影響を与える試薬、TGF- および他のサイトキナーゼおよびケモキナーゼに影響を与える試薬、ならびに遺伝子発現、導入遺

伝子に影響を与える試薬などが挙げられる。代表的な治療標的として、CTGF、インターフェロン、リラキシン、TGF β 3、HGF、プロリルヒドロキシラーゼ、C-プロテイナーゼ、リジルオキシダーゼ、およびアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられるが、他の治療標的が、慣用的にすぎない実験を使用することなく関連分野の当業者によって同定される。

【0129】

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

【0130】

【表1】

表1

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

従って、炎症、損傷、治癒、および関連する生物学的な現象の間での観察された関係に基づくと、AAAの研究の1つの主要なスラストは、炎症性のプロセスに向けられ、そしてその動脈壁のマトリックスの再モデル化の調節に向けられる (Grange, J. J. ら、Cardio. Vasc. Surg. 5: 256 - 265、1997)。動脈瘤の大動脈の中膜内の炎症性の細胞の存在が、マトリックス崩壊性のプロテナーゼの産生を通じて、エラスチンおよびコラーゲンの崩壊において重要な役割を果たし得ることが、提案されている (Newman, K. M. ら、「Matrix metalloproteinases in abdominal aortic aneurysm: characterization, purification, and their possible sources」、Connect Tissue Res., 30 (4): 265 - 76、1994)。動脈瘤の大動脈の中膜中の炎症性の細胞の存

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

【0131】

他の研究者 (Coch, A. E.ら、Am. J. Pathol., 137: 1199 - 1213、1990) は、「炎症性のAAA」だけではなく非炎症性のAAAもまた、炎症により媒介される事象であることを示唆するデータを提供した。多数の観察が、AAAが大動脈壁の成分に対する自己免疫応答によって引き起こされ得るという主張を支持する。セロイド (「年齢色素」 (「大動脈の含有物」 (これは、AAA中の周辺組織に漏れる)) が、この状態を担う免疫原であり得ることが示唆されている (Coch, A. E.ら、AM. J. Pathol., 137: 1199 - 1213、1990; Beckman, E. N., AM. J. Clin. Pathol., 85: 21 - 24、1986; Ball, R. Y.ら、Arc. Pathol. Lab. Med., 111: 1134 - 1140、1987; Brophy, C. M.ら、Annals Vasc. Surg., 5

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

【0132】

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

【0133】

いくつかの免疫媒介性障害 (例えば、慢性関節リウマチおよび糸球体腎炎) において、イムノグロブリン沈降および補体活性化は組織の破壊に関連する。補体系は、走化性、マクロファージ活性化、および細胞死における役割を有する、炎

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

【0134】

多くの研究者が、最近、AAAから単離されたIgGが、分離されたAAA大動脈抽出物のウエスタンブロットにおいて40kDa~80kDaで移動する主要なタンパク質バンドに対して反応することを実証した(Tilson, MD, Biochem. Biophys. Research Communication, 213:40-43, 1995; Xia, Sら、Biochem. Biophys. Research Communication, 219:36-39, 1996; Gregory AKら、Arc Surg, 131:85-88, 1996)。40kDaの自己抗原のさらなる研究は、それが細線維関連の糖タンパク質(MAGP)に対して高いアミノ酸配列相同性を有することを示す。細線維は、弾性形成の間、トロポエラスチン沈降のための構築用骨格として作用するので、AAA中のエラスチンの酵素的分解は、細線維タンパク質関連の前

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

【0135】

種々の炎症性サイトカイン、化学誘引物質、ペプチド増殖因子、および免疫細胞が、動脈瘤組織において見出されており、疾患の病原論における炎症性媒介物または免疫細胞についての可能なモデルを示唆する。腫瘍壊死因子(TNF)、インターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン-6(IL-6)、およびインターロイキン-8(IL-8)は、コントロールと比較した場合、AAA組織において上昇される。(Hirose, H.ら、J. Vasc. Surg. 26:313-318, 1997)。IL-1Bは、AAAと関連していた。(Keen RR, ら、「Interleukin-1 beta induces differential gene expression in aortic smooth muscle」J Vasc Surg, 20(5):774-84; discussion 784-6 1994年11月)。ことによると、上昇したIL-1レベルまたはTNF- α レベルの結果、ICAM-1発現の有意な上昇もまたAAAにおいて実証され、これは大動脈壁への炎症性細胞の漸増を高め得る。(Davis, Cら、J. Vasc. Surg., 16:474-475A, 1992; Pearce, W.H., 179で前

出)。さらに、可溶性ICAMが、おそらく膜結合性ICAM-1の切断に起因して、AAA罹患組織の上清中で検出された。酸化されたLDLまたはエラスチンのフラグメントもまた、炎症性応答を開始し得る。

【0136】

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

【0137】

(4.2b(vii) AAAへの薬理的介入)

AAAの処置が外科的であることは、当該分野において十分に確立されている。現在、臨床的に用いられる薬理的介入は存在しない。潜在的な病態生理学的プロセスの認識は、AAAを安定化し、そしてAAAの拡大を妨げるように、AAAの破壊を妨げるように、または必要に応じて、AAAの退化をもたらすようにAAAを処置する際に有用であり得る治療について、推測がなされることを可能にした。動脈瘤関連遺伝子の同定は、AAAの発生または進行に関連したDNA、mRNA、またはタンパク質の操作を可能にし得る。(Grange JJ, ら、「Pathogenesis of abdominal aortic aneurysm: an update and look toward the future」Cardiovasc Surg, 5(3): 256-65 1997年6月)。あるいは、抗炎症薬またはプロテアーゼインヒビター

の臨床試験が保証される。さらに、動脈瘤または他の動脈壁破裂障害を誘導するか、または悪化させる試薬の同定は、臨床医にとって重要であり得、その結果、彼らは、問題の試薬が無関係の有益な治療効果を有し得る場合でさえ、このような障害の発生または進行の危険性がある患者におけるそれらの試薬の使用を避けることについての決定をし得る。さらに、試薬が動脈壁破裂障害を処置する際の効力を有することが確認される場合、これらの試薬は、AMDの治療にもまた適用可能である。

【0138】

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

【0139】

弾性溶解性MMP (特に、MMP9およびMMP2) が、増加した量でヒトAAAにおいて発現されかつ生成されるという発見は、これらの酵素がこの疾患における薬物療法のための理論上の標的として作用し得る可能性を導いた (Thompson, R. W. およびW. C. Parks Annals N.Y. Acad. Sci., 800:157-174, 1996)。実際、MMP活性の阻害は、AAAの動物モデルにおいて、インビボで、大動脈のエラスチン分解を抑

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

【0140】

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

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

【0141】

AAAの基礎科学のさらなる理解は、単核炎症性細胞に関連したプロテナーゼの操作ならびに関連した炎症性プロセスの操作を含む、さらなる治療的ストラテジーの開発を導くようである。(Thompson RW, 「Basic science of abdominal aortic aneurysms: emerging therapeutic strategies for an unresolved clinical problem」*Curr Opin Cardiol*, 11(5): 504-18 (1996年9月)。
AAAの血管生物学のさらなる理解もまた、治療的な意味を有する予想外の発見を生じ得る。例えば、MMP阻害性を示す特定の抗生物質(例えば、ドキシサイクリン)は、実験的動脈瘤の拡大に対する阻害剤としての研究である。(Boyle JR, 「Doxycycline inhibits elastin degradation and reduces metalloproteinase activity in a model of aneurysmal disease」*J Vasc Surg*, 27(2): 354-61 (1998年2月)。1つの研究において、非抗生物質テトラサイクリンおよび一般的抗生物質ドキシサイクリンは、用量依存性の動脈瘤抑制効果を有することが確認され、この効果は、MMPの炎症性応答または動脈壁生成のいずれかを

変えることなく、エラスチンの破壊の制限を生じた。(Curci JA,ら「Pharmacologic suppression of experimental abdominal aortic aneurysms: trial of doxycycline and four chemically modified tetracyclines」J Vasc Surg, 28(6):1082-93 1998年12月)。

【0142】

炎症の一般的な阻害は、AAAの拡大を制限することに対していくらかの効果
を有するようである。AMDへの、関連する有益な効果が存在し得る。例えば、
PEG2の、大動脈平滑筋の生存能力およびサイトカインの分泌に対する有害な
効果が当該分野において理解される。プロスタグランジン合成を阻害する薬物は
、動脈瘤の処置または予防において有用であり得る。(Walton LJ,ら
「Inhibition of prostaglandin E2 synthesis in abdominal aortic aneurysms:
implications for smooth muscle cell viability, inflammatory processes, and
the expansion of abdominal aortic aneurysms」Circulation, 100(1):48-54 19
99年7月6日)。ラットモデルにおいて、インドメタシンは、おそらくMMP
-9のマクロファージ発現を減少させることによって、動脈瘤の成長を阻害する
ことが示された。(Holmes DR,ら「Indomethacin prevents elastase-induced abdominal ao
rtic aneurysms in the rat」J Surg Res, 63(1):305-9 1996年6月)。動脈瘤の成長を弱めることにお
けるインドメタシンの役割は、PGE2およびMMP-9を減少させる、シクロ
オキシゲナーゼのcox2アイソフォームによって媒介されると考えられる。(
Miralles M,ら「Indomethacin inhibits expansion of experimental aortic aneu
rysms via inhibiting the cox2 isoform

m of cyclooxygenase」J Vasc Surg, 29 (5): 884 - 92; discussion 892 - 3 (1999年5月)。

【0143】

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

【0144】

(4.3 診断アッセイ)

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

【0145】

ドルーゼ関連マーカーは、1つ以上の眼科学的な手順(例えば、眼底蛍光血管

造影（FFA）、眼底検眼鏡検査または写真（FP）、網膜電位図（ERG）、電気眼球図（EOG）、視野、走査型レーザー検眼鏡検査（SLO）、視力測定、暗順応測定、または他の標準的な方法）によって検出され得る。

【0146】

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

【0147】

他のドルーゼ関連分子の病状は、眼における明瞭な眼底の出現の発生（例えば、円板状黄斑変性を伴う白色から黄色の眼底斑（ドルーゼから識別可能）または萎縮性黄斑変性に関連している黄色沈着物）を含む。これらのAMDに関連した眼底の所見としてはまた、地図状萎縮（GA、AMDの乾燥形態に特徴的である

) および円盤状癍痕および脈絡膜の新生血管形成 (D S / C N V、A M Dの湿潤形態に特徴的である) が挙げられる。他の例において、A M Dに関連した眼底の所見は、湿潤形態または乾燥形態を区別しない。

【 0 1 4 8 】

好ましい実施形態において、マーカーは、ドルーゼ沈降物に関連する分子マーカー (すなわち、ドルーゼ関連分子 (D R A M)) である。ドルーゼは、1つ以上のD R A M (例えば、アミロイドAタンパク質、アミロイドP成分、抗キモトリプシン、アポ脂質タンパク質E、b 2ミクログロブリン、補体3、補体C 5、補体C 5 b - 9末端複合体、X因子、フィブリノーゲン、免疫グロブリン (および)、プロトロンビン、トロンボスポンジン、ビトロネクチン) の存在を検出することによって検出され得る。別の実施形態において、ドルーゼ関連マーカーは、その産生がドルーゼ関連分子の病理学的プロセスにおいて変えられる分子である。例えば、ドルーゼに関連した1つの病理学的プロセスは、網膜の色素上皮 (R P E) における細胞死および/または機能不全である。多数の分子マーカーが、以下を含むこのような機能不全のR P E細胞と関連してきた : H I A - D R、C D 6 8、ビトロネクチン、アポ脂質タンパク質E、c l u s t e r i n、およびS - 1 0 0。H L A - D R発現は (免疫反応の早期に細胞によって頻繁に発現されるが)、特に免疫応答性細胞に固有である。A M Dに冒された眼の機能不全R P E細胞に関連した、さらに他の分子マーカーとしては、以下のような細胞死に関連した遺伝子産物が挙げられる : 細胞死誘導タンパク質 (d e a t h p r o t e i n)、熱ショックタンパク質7 0、プロテアソーム、C u / Z nスーパーオキシドジスムターゼ、カテプシン、および細胞死誘導アダプタンパク質R A I D D。さらに、ドルーゼの生合成は、種々の免疫媒介性の事象 (例えば、A M D患者の血清中での自己抗体の作製) によって容易にされる。これらの自己抗体は、ドルーゼ、R P E、および他の網膜の成分に対して指向される。従って、本発明は、このような自己抗体の存在および抗原特異性を当該分野で公知の方法によって検出するように設計された、診断アッセイ (標準的な免疫組織化学技術およびウェスタンブロット技術を含む) を提供する。I g μ鎖、I g 鎖、I g J鎖、およびI g 鎖を含む、さらに多数の免疫系関連分子は、ドルーゼの

形成と共に、RPE/脈絡膜においてアップレギュレートされる。従って、これらの免疫関連分子は、タンパク質に基づく診断アッセイ（例えば、抗体に基づく検出法）ならびに核酸を基にした診断アッセイ（例えば、ノーザン法およびRT-PCR法）について、別の標的を提供する。さらに他のドルーゼ関連分子マーカーは、ブルーフ膜を破り、そして球状の、小嚢が詰まった、ドルーゼの中心内の「核」として終止する、細胞のプロセスを有する脈絡膜細胞の部分母集団と共に見出されるマーカーである。これらの樹状細胞に関連した特異的なマーカー分子としては、以下：CD1a、CD4、CD14、CD68、CD83、CD86、およびCD45が挙げられる。ドルーゼ関連の樹状細胞核と関連しているようである他の分子マーカーとしては、以下：PECAM、MMP14、ユビキチン、およびFGFが挙げられる。本発明の別の局面において、ドルーゼ関連マーカーは、樹状細胞前駆体と損傷した組織との間のアクセプター-リガンド相互作用を介してドルーゼの発生を容易にする、サイトカインであり得る。このようなサイトカインとしては、以下：IL-1、IL-6、IL-12、TNF- およびGM-CSFが挙げられる。ドルーゼの発生に関連した他の分子としては、GM-CSF、熱ショックタンパク質、およびDNAフラグメントが挙げられる。

【0149】

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

【0150】

別の実施形態において、本発明は、被験体における動脈壁破裂障害を発生しや

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

【0151】

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

遺伝子、またはその変異形態の少なくとも一部分に特異的にハイブリダイズし得る、1つ以上の核酸プローブを含み得る。おそらく、このキットは、1つ以上のヌクレオチドの違いを有する、正常DRAM遺伝子とDRAM遺伝子との間を区別し得る、少なくとも1つのオリゴヌクレオチドプライマーを含む。

【0152】

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

【0153】

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

【0154】

DRAMポリペプチドまたは別のドルーゼ関連分子マーカーの抗原性調製を用いる動物の免疫化後に、特定の抗血清が得られ得、所望の場合、ポリクローナル抗体が血清から単離される。モノクローナル抗体を作製するために、免疫化された動物から抗体作製細胞（リンパ球）が収集され、そして不死化細胞（例えば、骨髄腫細胞）と共に標準的な体細胞融合手順によって融合され、ハイブリドーマ細胞を生じる。このような技術は当該分野において周知であり、そして例えば、

ハイブリドーマ技術、KohlerおよびMilstein(1975)、Nature 256:495-497、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術、Kozbarら(1983)、Immunol.Today 4:72、ならびにヒトモノクローナル抗体を作製するためのEBVハイブリドーマ技術を含む。Coleら(1985)、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R, Liss, Inc. 77-96頁。ハイブリドーマ細胞は、樹状細胞に特異的に反応性である抗体の作製、本発明のDRAMポリペプチド、およびこのようなハイブリドーマ細胞を含む培養物から単離されたモノクローナル抗体について、免疫化学的にスクリーニングされ得る。

【0155】

本明細書中で使用される場合、用語、抗体は、同様に被験体の樹状細胞、DRAMポリペプチドのうちの1つに特異的に反応性である、そのフラグメントを含むことが意図される。抗体は、従来の技術を使用して断片化され、そしてそのフラグメントは、抗体全体について上に記載したのと同じ様式で、有用性についてスクリーニングされ得る。例えば、 $F(ab)_2$ フラグメントは、抗体をペプシンで処理することによって生じ得る。生じた $F(ab)_2$ フラグメントは、ジスルフィド架橋を減少させるように処理され、Fabフラグメントを生成し得る。本発明の抗体は、樹状細胞、この抗体の少なくとも1つのCDR領域によって与えられるDRAMタンパク質に対する親和性を有する、二特異的(bispecific)な、単鎖の、ならびにキメラおよびヒト化の分子を含むことがさらに意図される。好ましい実施形態において、この抗体は、抗体に結合され、そして検出され得る標識をさらに含む(例えば、この標識は、放射性同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子であり得る)。

【0156】

さらに、抗DRAM抗体を使用して、例えば、DRAMタンパク質レベルを、個体において、例えば、検体が異常なDRAMタンパク質レベルに関連した疾患または状態を有するか否かを決定するために、またはこのような障害(動脈壁破裂障害に関連する)に罹患した個々に与えられた処置レジメンの、有効性の決定

を可能にするために、それぞれモニターし得る。DRAMポリペプチドのレベルは、体液（例えば、血液サンプル）中の細胞から測定され得る。DRAM組成物またはDRAMタンパク質のレベルにおける変化は、動脈壁破裂障害または黄斑変性のために提供される試薬の有効性を示す。

【0157】

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

【0158】

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

【0159】

(4.3.1 無細胞アッセイ)

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

【0160】

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

【0161】

分子間の相互作用はまた、表面プラズモン共鳴（SPR）（光学的な現象）を検出する、リアルタイムBIA（Biomolecular Interaction Analysis, Pharmacia Biosensor AB）を使用して同定され得る。検出は、生物特異的な（biospecific）界

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

【0162】

本発明の別の例示的なスクリーニングアッセイは、以下の工程を包含する：(a)(i)ドルーゼ関連マーカ-遺伝子ポリペプチド、(ii)ドルーゼ関連マーカ-遺伝子結合パートナー、および(iii)試験化合物を含む反応混合物を形成する工程；ならびに(b)ドルーゼ関連マーカ-遺伝子とドルーゼ関連マーカ-遺伝子結合タンパク質との相互作用を検出する工程。ドルーゼ関連マーカ-遺伝子ポリペプチドおよびドルーゼ関連マーカ-遺伝子結合パートナーは、組換え的に産生されて、供給源(例えば、血漿)から精製され得るか、または本明細書中に記載されるように化学的に合成され得る。試験化合物の非存在下における相互作用に対する、試験化合物の存在下のドルーゼ関連マーカ-遺伝子とドルーゼ関連マーカ-遺伝子結合タンパク質との相互作用における統計的に有意な変化(増強作用または阻害作用)は、ドルーゼ関連マーカ-遺伝子の試験化合物に対する生物活性の、潜在的なアゴニスト(模倣物もしくは増強因子)またはアンタゴニスト(インヒビター)を示す。このアッセイの化合物は、同時に接触され得る。あるいは、ドルーゼ関連マーカ-遺伝子タンパク質が、最初に、適切な長さの時間の間、試験化合物と接触され得、次いでドルーゼ関連マーカ-遺伝子タンパク質結合パートナーが反応混合物に添加される。化合物の有効性は、試験化合物の種々の濃度を使用して得られたデータから、用量応答曲線を生じさせることによって評価され得る。さらに、比較の基線を提供するために、コントロールアッセイが実施され得る。コントロールアッセイにおいて、単離され、そして精製

されたMFGFポリペプチドまたは結合パートナーは、ドルーゼ関連マーカ-遺伝子タンパク質結合パートナーまたはドルーゼ関連マーカ-遺伝子ポリペプチドを含む組成物に添加され、そして試験化合物の非存在下で、複合体の形成が定量化される。

【0163】

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

【0164】

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

意の未結合標識を除去し、そしてマトリックスを固定化し、放射標識を直接（例えば、シンチレーター内に置かれたビーズ）にか、または複合体の引き続き解離の後の上清中で判定する。あるいは、複合体は、マトリックスから解離され得、SDS-PAGEによって分離され、そしてビーズ画分中に見られるドルーゼ関連マーカ-遺伝子産物タンパク質または関連結合パートナーのレベルは、添付の実施例に記載されるような標準電気泳動技術を使用して、ゲルから計量された。

【0165】

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

伝的に融合され得、そして複合体中にトラップされるポリペプチドの量は、酵素の色素基質（例えば、3,3'-ジアミノベンジジン (benzadine) テラ塩酸塩または4-クロロ-1-ナフトール) を用いて評価され得る。同様に、ポリペプチドおよびグルタチオン-S-トランスフェラーゼを含む融合タンパク質を提供し得、そして複合体形成を、1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン (Habigら (1974) J Biol Chem 249:7130) を使用して、GST活性を検出することによって定量し得る。

【0166】

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

【0167】

無細胞系アッセイもまた、ドルーゼ関連マーカー遺伝子タンパク質と相互作用しドルーゼ関連マーカー遺伝子タンパク質の活性を調節する化合物を同定するために使用され得る。さらに、1つの実施形態において、ドルーゼ関連マーカー遺伝子産物タンパク質を、試験化合物と接触させ、そしてドルーゼ関連マーカー遺伝子の触媒活性をモニターする。1つの実施形態において、ドルーゼ関連マーカー遺伝子産物の標的分子への結合能を決定する。ドルーゼ関連マーカー遺伝子の標的分子との結合親和性を、当該分野において公知の方法に従って決定し得る。ドルーゼ関連マーカー遺伝子の酵素活性の決定を、Holmquistら (19

79) Anal. Biochem. 95: 540および米国特許第5,259,045号に記載の条件下で、基質フランアクリロイル(furanacryloyl)-L-フェニルアラニル-グリシル-グリシン(FAPGG)を用いて実施し得る。

【0168】

(4.3.2.細胞ベースのアッセイ)

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

【0169】

細胞ベースのアッセイもまた、ドルーゼ関連マーカ-遺伝子の発現を調節する化合物、ドルーゼ関連マーカ-遺伝子mRNAの翻訳を調節する化合物、またはドルーゼ関連マーカ-遺伝子mRNAもしくはタンパク質の安定性を調節する化合物を同定するために使用され得る。さらに、1つの実施形態において、ドルーゼ関連マーカ-遺伝子を産生し得る細胞(例えば、網膜上皮細胞)を試験化合物

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

【0170】

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

【0171】

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

【0172】

（4.4 動脈壁破裂障害およびAMD）

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

【0173】

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

くの観点において、ブルーフ膜における多くの年齢関連変化は、アテローム性動脈硬化症の間に血管壁において観察されるものに匹敵する (Bilato, 1996 # 680)。

【0174】

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

に関連する妨害は、色素上皮の乖離を生じ得 (Bird, 1992)、RPEの生理学に対する顕著な効果を有する。

【0175】

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

【0176】

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

【0177】

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

- 1) A A Aと血管新生A M Dとの間の強力な統計学的な相関 ($P < 0.0000$)
1) が、ヒトドナーの眼の大貯蔵所において記録されている。
- 2) 小さな臨床試験において、A A Aを有する8人の患者のうちの5人が、検眼
鏡で試験された場合、特徴的なA A A眼底表現型およびA M Dで診断された。
- 3) A A AおよびA M Dの両方について、過去5年間にわたるアイオワ大学にお
いて診られた患者の観察から、類似のA A A眼底表現型が明らかになる。
- 4) ドルーゼの綿密な組織化学的および生化学的分析は、ドルーゼおよび動脈疾
患のプラークが組成において類似していることを明らかにした。
- 5) 有意にも、ドルーゼと樹状細胞との間の新規の関連性が同定されている。
- 6) A M Dおよび種々の動脈壁破裂障害 (A A A、T A A、T A A A、急性解離
性動脈瘤、大動脈狭窄、アテローム性動脈硬化症) を有するか、または有さない
6時間齢から101歳の年齢までの151人のヒトドナーからの脈絡膜の超構造
的および免疫組織化学的な検査は、これらの状態に関連する新規な病理学を明ら
かにした。これらの個体のうちの30の脈絡膜間質は、新たに合成されたコラー
ゲン、エラスチン、エラスチン関連微小繊維、および他の明確な構造タンパク質
および原繊維で満たされている。予備的な免疫組織化学的分析に基づいて、この
状態に関連するコラーゲンは、大部分、I I I型およびV I型であるようであり
、代表的には、しばしば、特定の遺伝的および後天的疾患と関連する「らせん状
」または「擦り切れた」形状を示す。この以前に記載されていない現象は、「脈
絡膜線維症」と言われ、動脈壁破裂障害と共通の多くの病理学的特徴を共有する
。
- 7) 一連のコントロール (非疾患) および感作された (A M D / A A A、A M D
、A M D / 大動脈狭窄) ドナー由来のR P E 脈絡膜複合体のR T - P C R分析は
、2つのグループ間におけるアップレギュレートされた遺伝子およびダウンレギ
ュレートされた遺伝子の発現の明確なパターンを明らかにした。これらは、b 1
インテグリン、エラスチン、コラーゲンV I a 2、コラーゲンa 3、P I - I (

アンチトリプシン)、PI-2、ヒトメタロプロテイナーゼ(およびたぶんフィブリリン-2)の「アップレギュレーション」、およびBigH3の「ダウンレギュレーション」を包含する。コラーゲンIIIa1、コラーゲンIa2、コラーゲン6a1、フィブリリン-1、2、3、4、および5、HLA-DR、Igカッパ、ラミニンレセプター、またはラミニンC2の発現レベルにおける検出可能な差異は観察されなかった。RT-PCRの制限のために、さらなる実時間定量的RT-PCR研究が、2つのグループにおけるこれらの遺伝子の正確なレベルを評価するために行われている。

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

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

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

【0178】

(4.5 予想される医薬)

本発明はさらに、予想される医薬を特色とする。これは、少なくとも部分的には新規のAAA/AMD関連遺伝子の同定および遺伝子における変更および被験体におけるコードタンパク質の発現レベルおよび/または機能に影響する関連経路遺伝子の同定に基づく。例えば、本発明は、被験体から核酸を単離する工程および核酸を遺伝子型決定する工程を含む、被験体における動脈壁破裂障害の素因

を診断または決定する方法を提供し、ここで、黄斑変性関連ハプロタイプ由来の少なくとも1つの対立遺伝子は、動脈壁破裂障害の増加する危険性を予想する。別の実施形態において、本発明は、被験体から核酸を単離する工程、AMDに対する多型マーカーに対応する染色体領域を増幅するプライマーで核酸を増幅する工程、および増幅産物を分析する工程を含む、黄斑変性と診断された家族構成員を有する被験体における動脈壁破裂障害の素因を診断または決定する方法を提供し、ここで、黄斑変性に結合する対立遺伝子型の多型表示の存在は、動脈壁破裂障害に結合する対立遺伝子型の表示または発症する動脈壁破裂障害の素因の表示である。さらに別の実施形態において、本発明は、被験体から核酸を単離する工程、遺伝子型を得るためにゲノムDNA中の短い直列反復配列を増幅する工程、この遺伝子型を公知のDNA配列と比較してヌクレオチド配列多型を検出する工程、および被験体のゲノムDNA中に多型の存在または非存在を決定する工程を含む、黄斑変性と診断された家族構成員を有する被験体における動脈壁破裂障害の素因を診断または決定する方法を提供し、ここで、黄斑変性に結合する対立遺伝子型の多型表示の存在は、動脈壁破裂障害に結合する対立遺伝子型の表示または発症する動脈壁破裂障害の素因の表示である。好ましい実施形態において、遺伝子型決定は、マーカーD2S2352およびD2S1364に隣接するヒト染色体2の短腕の領域に実質的に対応する。

【0179】

さらに好ましい実施形態において、動脈壁破裂障害の遺伝子型決定を、黄斑変性の推定部位を示すために当該分野において周知の、以下の1つ以上の染色体領域の多型を検出することによって実施し得る：1p21~q13、劣性シュタルガルト病または黄色斑眼底について(Allikments, R.ら、Science 277:1805-1807, 1997; Anderson, K.L.ら、Am. J. Hum. Genet. 55:1477, 1994; Cremers, F.P.M.ら、Hum. Mol. Genet. 7:355-362, 1998; Gerber, S.ら、Am. J. Hum. Genet. 56:396-399, 1995; Gerber, S.ら、Genomics 48:139-142, 1998; Kaplan, J.ら、Nat. Genet. 5:308-3

11, 1993; Kaplan, J. 5、Am. J. Hum. Genet. 55 : 190, 1994; Martinez-Mir, A. 5、Genomics 40: 142 - 146, 1997; Nasonkin, I. 5、Hum. Genet. 102: 21 - 26, 1998; Stone, E. M. 5、Nat. Genet. 20: 328 - 329, 1998); 1q25~q31、劣性加齢性黄斑変性について (Klein, M. L. 5、Arch. Ophthalmol. 116: 1082 - 1088, 1988); 2p16、for 優勢放射状黄斑ドルーゼ、優勢Dooyne蜂巢状網膜変性またはMalattia Leventinese (Edwards, A. O. 5、Am. J. Ophthalmol. 126: 417 - 424, 1998; Heon, E. 5、Arch. Ophthalmol. 114: 193 - 198, 1996; Heon, E. 5、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37: 1124, 1996; Gregory, C. Y. 5、Hum. Mol. Genet. 7: 1055 - 1059, 1996); 6p21.2 - cen、優勢黄斑変性、成人卵黄 (vitelliform) について (Felbor, U. 5、Hum. Mutat. 10: 301 - 309, 1997); 6p21.1、優勢錐体ジストロフィーについて (Payne, A. M. 5、Am. J. Hum. Genet. 61: A290, 1997; Payne, A. M. 5、Hum. Mol. Genet. 7: 273 - 277, 1998; Sokol, I. 5、Mol. Cell. 2: 129 - 133, 1998); 6q、優勢錐体 - 杆体ジストロフィーについて (Kelsell, R. E. 5、Am. J. Hum. Genet. 63: 274 - 279, 1998); 6q11~q15、優勢黄斑変性、シュタルガルト様について (Griesinger, I. B. 5、Am. J. Hum. Genet. 63: A30, 1998; Stone, E. M. 5、Arch. Ophthalmol. 112: 765 - 772, 1994); 6q14 - q16.2、優勢黄斑変性、ノースカロライナ型について (Kelsell, R. E. 5、Hum. Mol. Genet. 4: 653 - 656, 1995; Robb, M. F. 5、Am. J. Ophthalmol. 125: 502 - 508, 1998; Sauer, C. G. 5、J. Med. Genet. 34: 961 - 966, 1997; Sm

all, K.W.ら、Genomics 13:681-685, 1992; Small, K.W.ら、Mol. Vis. 3:1, 1997); 6q25-q26、優勢網膜錐体ジストロフィー1について(Online Mendelian Inheritance in Man(TM). Center for Medical Genetics, Johns Hopkins University, and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/omim>(1998); 7p21~p15、優勢類嚢胞黄斑変性(Inglehearn, C.F.ら、Am. J. Hum. Genet. 55:581-582, 1994; Kremer, H.ら、Hum. Mol. Genet. 3:299-302, 1994); 7q31.3-32、優勢第三色盲について、タンパク質:青色錐体オプシン(blue cone opsin)(Fitzgibbon, J.ら、Hum. Genet. 93:79-80, 1994; Nathans, J.ら、Science 193:193-232, 1986; Nathans, J.ら、Ann. Rev. Genet. 26:403-424, 1992; Nathans, J.ら、Am. J. Hum. Genet. 53:987-1000, 1993; Weitz, C.J.ら、Am. J. Hum. Genet. 50:498-507, 1992; Weitz, C.J.ら、Am. J. Hum. Genet. 51:444-446, 1992); 8q24以外(not 8q24)、優勢黄斑変性、非定型卵黄(atypical vitelliform)について(Daiger, S.P.ら、'Degenerative Retinal Diseases', LaVailら編、Plenum Press, 1997; Ferrell, R.E.ら、Am. J. Hum. Genet. 35:78-84, 1983; Leach, R.J.ら、Cytogenet. Cell Genet. 75:71-84, 1996; Shohocki, M.M.ら、Am. J. Hum. Genet. 61:239-241, 1997); 11p12~q13、優勢黄斑変性、最良型について(bestrophin)(Forsman, K.ら、Clin. Genet. 42:1

56-159, 1992; Graff, C. ̄、Genomics, 24:425-434, 1994; Petrukhin, K. ̄、Nat. Genet. 19:241-247, 1998; Marquardt, A. ̄、Hum. Mol. Genet. 7:1517-1525, 1998; Nichols, B. E. ̄、Am. J. Hum. Genet. 54:95-103, 1994; Stone, E. M. ̄、Nat. Genet. 1:246-250, 1992; Wadellus, C. ̄、Am. J. Hum. Genet. 53:1718, 1993; Weber, B. ̄、Am. J. Hum. Genet. 53:1099, 1993; Weber, B. ̄、Am. J. Hum. Genet. 55:1182-1187, 1994; Weber, B. H. ̄、Genomics 20:267-274, 1994; Zhaung, Z. ̄、Am. J. Hum. Genet. 53:1112, 1993); 13q34、優勢黄斑変性、シュツガルト型について (Zhang, F. ̄、Arch. Ophthalmol. 112:759-764, 1994); 16p12.1、劣性Batten病について (セロイド-リポフシノーシス神経型3 (ceroid-lipofuscinosis, neuronal3))、幼弱; タンパク質: Batten病タンパク質 (Batten Disease Consortium, Cell 82:949-957, 1995; Eiberg, H. ̄、Clin. Genet. 36:217-218, 1989; Gardiner, M. ̄、Genomics 8:387-390, 1990; Mitchison, H. M. ̄、Am. J. Hum. Genet. 57:312-315, 1995, Mitchison, H. M. ̄、Am. J. Hum. Genet. 56:654-662, 1995; Mitchison, H. M. ̄、Genomics 40:346-350, 1997; Munroe, P. B. ̄、Am. J. Hum. Genet. 61:310-316, 1997; 17p、優勢輪紋状脈絡膜性 (areolar choroidal) ジストロフィーについて (Lotery, A. J. ̄、Ophthalmol. Vis. Sci. 37:1124, 1996); 17p13~p12、優勢錐体ジストロフィー、進行性について (Balciunienė, J. ̄、Genomics 30:281-286, 1995; Small

, K. W. 5、Am. J. Hum. Genet. 57:A203, 1995; Small, K. W. 5、Am. J. Ophthalmol. 121:13-18, 1996); 17q、錐体杆体ジストロフィーについて(Klystra, J. A. 5、Can. J. Ophthalmol. 28:79-80, 1993); 18q21.1~q21.3、錐体-杆体ジストロフィーについて、de Grouchy syndrome (Manhant, S. 5、Am. J. Hum. Genet. 57:A96, 1995; Warburg, M. 5、Am. J. Med. Genet. 39:288-293, 1991); 19q13.3、優勢錐体-杆体ジストロフィー; 劣性、優勢および「デノボ」先天性黒内障; 優勢RP; 錐体-杆体otx様光受容器ホメオボックス転写因子(Bellingham, J. 5、「Degenerative Retinal Diseases」、LaVail 5編、Plenum Press, 1997; Evans, K. 5、Nat. Genet. 6:210-213, 1994; Evans, K. 5、Arch. Ophthalmol. 113:195-201, 1995; Freund, C. L. 5、Cell 91:543-553, 1997; Freund, C. L. 5、Nat. Genet. 18:311-312, 1998; Gregory, C. Y. 5、Am. J. Hum. Genet. 55:1061-1063, 1994; Li, X. 5、Proc. Natl. Acad. Sci USA 95:1876-1881, 1998; Sohocki, M. M. 5、Am. J. Hum. Genet. 63:1307-1315, 1998; Swain, P. K. 5、Neuron 19:1329-1336, 1987; Swaroop, A. 5、Hum. Mol. Genet. 印刷中、1999); 22q12.1-q13.2、優勢ソースビー底(Sorsby's fundus)ジストロフィー(TIMP3)について(Felbor, U. 5、Hum. Mol. Genet. 4:2415-2416, 1995; Felbor, U. 5、Am. J. Hum. Genet. 60:57-62, 1997; Jacobson, S. E. 5、Nat. Genet. 11:27-32, 1995; Peters, A. 5、Retina 15:480-485, 1995; Stoehr, H. 5、Genome Res. 5:483-487, 1995; W

eber, B. H. F. ら、Nat. Genet. 8: 352 - 355, 1994; Weber, B. H. F. ら、Nat. Genet. 7: 158 - 161, 1994; Wijesvriya, S. D. ら、Genome Res. 6: 92 - 101, 1996); ならびに、Xp11.4、X関連(X-linked) 錐体ジストロフィーについて(Bartley, J. ら、Cytogenet. Cell. Genet. 51: 959, 1989; Bergen, A. A. B. ら、Genomics 18: 463 - 464, 1993; Dash-Modi, A. ら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37: 998, 1996; Hong, H. - K., Am. J. Hum. Genet. 55: 1173 - 1181, 1994; Meire, F. M. ら、Br. J. Ophthalmol. 78: 103 - 108, 1994; Seymour, A. B. ら、Am. J. Hum. Genet. 62: 122 - 129, 1998); これらの全ては、黄斑変性に結合する多型または変異を保有するとして同定かつ特徴付けられた; 上記の参考文献は、本明細書中に援用される。従って、当該分野における多型の存在および変異対立遺伝子の遺伝子配列の存在にもかかわらず、当該分野は、黄斑変性を引き起こすかまたは黄斑変性に関連する任意の特定の変異遺伝子についてのPCRを実施するための適切なプライマー対を設計するために有用なガイダンスを提供する。被験体における黄斑変性または黄斑変性の遺伝的素因を検出することによって、動脈壁破裂障害に対する被験体の遺伝的素因をまた、決定する。好ましい実施形態において、動脈壁破裂障害は、AAAまたはTAAAであり、そして黄斑変性は、DS/CNV型のAMDである。

【0180】

例えば、本明細書中に記載される診断アッセイを使用して得られる情報(単独または同一の疾患に関与する別の遺伝的欠陥の情報との結合)は、徴候を示す被験体(例えば、AMDについて徴候を示す被験体)は、特定の疾患または障害を引き起こすかまたは関与する遺伝的欠陥(例えば、AMD関連遺伝子またはドルーゼ関連マーカー遺伝子の発現を調節する遺伝子において)を有することを診断または確認するために有用である。あるいは、情報(単独または同一の疾患に関与する別の遺伝的欠陥の情報との結合)を、被験体における異常な活性またはタ

ンパク質レベルによって引き起こされるかまたは関与する疾患または状態が徴候を示さない被験体において発症しそうか否かを予想するために予知的に使用し得る。予知の情報に基づいて、個体における特定の疾患または状態の徴候を予防または延期するために有用なレジメン（例えば、食事もしくは運動）または治療プロトコルを、医者は推奨し得る。

【0181】

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

【0182】

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

【0183】

(4.7 トランスジェニック動物)

本発明は、種々の目的(例えば、AAAおよびAMDの共通の病因に關与する遺伝子座を同定するため、およびさらに、AMDおよびAAAの処置のための動物モデルを作製するため)で使用され得るトランスジェニック動物を、さらに提供する。

【0184】

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

スジェニック動物と交配され得、これによって、変異タンパク質のみを発現し、野生型標的遺伝子産物を発現しない、動物を生じる。

【0185】

トランスジェニック非ヒト動物およびノックアウト非ヒト動物を得る方法は、当該分野において周知である。ノックアウトマウスは、「ノックアウト」構築物を、ノックアウトされる遺伝子をコードするマウス胚幹細胞染色体中への、「ノックアウト」構築物の相同的組込みによって産生される。1つの実施形態において、動物ゲノムを改変するために相同組換えを使用する方法であるジーンターゲッティングを使用して、培養胚性幹細胞を変化させ得る。ES細胞中の目的の特定の遺伝子をターゲッティングすることによって、これらの変化を動物の生殖細胞系に導入して、キメラを産生し得る。ジーンターゲッティング手順は、標的遺伝子座と相同なセグメントを含み、そしてまた、ゲノム配列中に意図される配列改変（例えば、挿入、欠失、点変位）を含む、DNAターゲッティング構築物を、組織培養細胞中に導入することによって、達成される。次に、処理された細胞を、正確なターゲッティングについてスクリーニングして、適切にターゲッティングされた細胞を同定して単離する。

【0186】

実際に、胚性幹細胞におけるジーンターゲッティングは、1つ以上の標的ゲノム配列と相同組換えを行うように設計されたターゲッティング導入遺伝子構築物の使用を通じての、標的遺伝子機能の破壊の手段として、本発明によって意図されるスキームである。ターゲッティング構築物は、標的遺伝子のエレメントとの組換えの際に、陽性選択マーカが遺伝子のコード配列中に挿入（または置き換え）されるように、配置され得る。挿入された配列は、標的遺伝子を機能的に破壊するが、陽性選択の形質もまた、提供する。例示的なターゲッティング構築物が、以下により詳細に記載される。

【0187】

一般に、ノックアウト動物を産生するために使用される胚性幹細胞（ES細胞）は、産生されるノックアウト動物と同一の種である。従って、例えば、マウス胚性幹細胞が、ノックアウトマウスの産生のために使用される。

【0188】

胚性幹細胞は、例えば、Doetschmanら(1985) J. Embryol. Exp. Morphol. 87:27-45)に記載されるような当業者に周知の方法を使用して、産生および維持される。任意のES細胞株を使用し得るが、選択される株は、発生中の胚の生殖細胞系に組み込み、そしてその生殖細胞系の一部として、ノックアウト構築物の生殖細胞系への伝播を生じる細胞の能力について、代表的には選択される。従って、この能力を有すると考えられる任意のES細胞株が、本明細書における使用に適切である。ES細胞の産生のために代表的に使用される1つのマウス株は、129J株である。別のES細胞株は、マウス細胞株D3(American Type Culture Collection、カタログ番号CKL 1934)である。なお別の好ましいES細胞株は、WW6細胞株(Ioffeら(1995)PNAS 92:7357-7361)である。この細胞は、例えば、Robertson(Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson 編、IRL Press, Washington, D.C. [1987]); Bradleyら((1986)Current Topics in Dev. Biol. 20:357-371); およびHoganら(Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY [1986])によって記載されるような、当業者に周知の方法を使用して、ノックアウト構築物の挿入のために培養および調製される。

【0189】

ノックアウト構築物とは、幹細胞株に導入され、そして変異される目的の遺伝子の染色体遺伝子座におけるゲノムと組換えされる、独特の配置をされた核酸フラグメントをいう。従って、所定のノックアウト構築物は、破壊のための標的とされる所定の遺伝子に特異的である。それにもかかわらず、これら構築物中には、多くの共通の元素が存在し、そしてこれらの元素は、当該分野に

において周知である。典型的なノックアウト構築物は、変異されるべき遺伝子をコードするゲノム遺伝子座の5'末端および3'末端の両方から、約0.5 kb以上、約10.0 kb以下の複数の核酸フラグメントを含む。これら2つのフラグメントは、陽性選択マーカー（例えば、ネオマイシン耐性遺伝子（neo^R））をコードする核酸の介在フラグメントによって分断される。陽性選択マーカーをコードする核酸と連結したゲノム遺伝子座の最も5'末端由来の核酸、およびその陽性選択マーカーをコードする核酸と連結した目的のゲノム遺伝子座の最も3'末端由来の核酸からなる生じる核酸フラグメントは、ノックアウトされる目的の遺伝子のコード配列のほとんどが除かれている。生じる構築物は、この遺伝子座において染色体と相同組換えを起こす場合、ゲノム遺伝子座から、除かれたコード配列（そうでなければ構造遺伝子として公知）の損失を生じる。そのようなまれな相同組換え事象が生じる幹細胞を、陽性選択マーカーをコードする遺伝子の核酸の、ゲノム中への安定な組込み、および適切な薬剤（この例においては、ネオマイシン）の存在下での、このマーカー遺伝子を発現する細胞のその後の選択によって、選択し得る。

【0190】

この基本的な技術のバリエーションもまた存在し、そしてバリエーションは、当該分野において周知である。例えば、「ノックイン」構築物とは、陽性選択マーカーをコードする核酸と連結された5'ゲノム遺伝子座フラグメントをコードする核酸、およびその陽性選択マーカーをコードする核酸と連結した3'ゲノム遺伝子座フラグメントをコードする核酸の同一の基本的な配置をいうが、コード配列が除かれておらず、従って、使用される5'および3'ゲノムフラグメントは、陽性選択マーカー遺伝子をコードする核酸の導入によって破壊される前は、最初に連続的であるという点において、異なる。従って、この「ノックイン」型構築物は、変異される遺伝子のゲノム遺伝子座の限定された領域のみ（例えば、単一のエクソン）が、クローニングおよび遺伝子操作のために利用可能である場合、変異トランスジェニック動物の構築のために非常に有用である。あるいは、「ノックイン」構築物を、標的とされる遺伝子の単一の機能ドメインを特異的に除去するために使用して、コードされたペプチドの他のドメインの機能を保持し

ながら、1つの機能において欠損する標的された遺伝子のポリペプチドを発現するトランスジェニック動物を生じ得る。この型の「ノックイン」変異は、いわゆる「ドミナントネガティブ」変異の特徴を、頻繁に有する。なぜなら、ホモ多量体形成するタンパク質の場合は特に、その変異体が由来する野生型遺伝子のポリペプチド産物の作用を特異的にブロックし得る（あるいは、害し得る）からである。ノックイン技術のバリエーションにおいて、マーカー遺伝子は、目的のゲノム遺伝子座に組み込まれ、その結果、マーカー遺伝子の発現が、標的とされた遺伝子の転写調節エレメントの制御下に置かれる。マーカー遺伝子は、その活性が検出され得る酵素（例えば、ガラクトシダーゼ）をコードする遺伝子であり、酵素の基質が、適切な条件下で細胞に添加され得、そして酵素活性が分析され得る。当業者は、他のマーカーおよび所定の細胞においてその存在を検出する手段に精通している。すべてのそのようなマーカーは、本発明の教示の範囲内に含まれることが意図される。

【0191】

上述のように、上記の「ノックアウト」構築物および「ノックイン」構築物の相同組換えは、非常にまれであり、そして頻繁に、そのような構築物は、欠失のための標的とされた遺伝子に対して何らの影響も有さないゲノムのランダムな領域中に、非相同的に挿入され、そのような領域において、そうでなければ改変することが意図されなかった別の遺伝子を破壊するように組換えを起こす可能性があり得る。そのような非相同組換え事象を、いずれかの末端における陰性の選択マーカーによって隣接されるように上記のノックアウトおよびノックイン構築物を改変することによって、選択し得る（特に、チミジンキナーゼ遺伝子の2つの対立遺伝子改変体の使用を介して、すなわち、当該分野において周知の適切な組織培養培地（すなわち、例えば、5 - プロモデオキシウリジンのような薬物を含む培地）中で発現する細胞株中で、その遺伝子のポリペプチド産物について選択され得る）。従って、本発明のそのようなノックアウト構築物およびノックイン構築物の好ましい実施形態は、陽性選択マーカーの核酸と連結したゲノム遺伝子座の5'末端をコードする核酸と連結した陰性選択マーカーをコードする核酸、および陽性選択マーカーの核酸と連結し、次に陰性選択マーカーをコードする第

2の核酸と連結した同一のゲノム遺伝子座の3'末端をコードする核酸からなる。生じるノックアウト構築物とゲノムとの間の非相同組換えは、通常これら陰性選択マーカ-遺伝子の一方または両方の安定な挿入を生じ、従って、非相同組換えを受けた細胞は、適切な選択培地(例えば、5-プロモデオキシウリジンのような薬物を含有する培地)中での増殖についてスクリーニングされ得る。陽性選択マーカ-および陰性選択マーカ-についての同時の選択は、ノックアウト構築物が、変異が意図された遺伝子の遺伝子座で相同的に組換えられたクローンについての、莫大な富化を生じる。生じるノックアウト幹細胞株中での標的とされた遺伝子座での予測された染色体の改変の存在は、当業者に周知のサザンブロットィング分析技術の手段によって確認され得る。あるいは、PCRを使用し得る。

【0192】

細胞中に挿入されるべき各ノックアウト構築物は、第1に直鎖状形態でなければならない。従って、ノックアウト構築物がベクター中に挿入されている場合(下記のように)、ベクター配列内のみを切断し、そしてノックアウト構築物配列中を切断しないように選択された適切な制限エンドヌクレアーゼを用いてDNAを消化することによって、直鎖状化が達成される。

【0193】

挿入のために、ノックアウト構築物を、当業者に公知であるように、選択された挿入方法のための適切な条件下でES細胞に対して添加する。例えば、ES細胞がエレクトロポレーションされる場合、そのES細胞およびノックアウト構築物DNAは、エレクトロポレーションを使用して、そして使用のための製業者のガイドラインに従って、電気パルスに曝露される。エレクトロポレーションの後、ES細胞は、代表的には、適切なインキュベーション条件下で回収される。次に、その細胞を、上記のようにノックアウト構築物の存在についてスクリーニングする。ES細胞中に1つより多い構築物が挿入される場合、各ノックアウト構築物が、同時にか、または1回に1つ、導入され得る。

【0194】

適切な位置にノックアウト構築物を含有する適切なES細胞を、上記で概説した選択技術によって同定した後、その細胞を胚の中に挿入し得る。挿入は、当業

者に公知である種々の方法において達成され得るが、好ましい方法は、マイクロインジェクションによるものである。マイクロインジェクションのために、約10～30個の細胞がマイクロピペット中に収集され、そしてロックアウト構築物を含有する外来のES細胞を、発生中の胚中に組み込むことを可能にする適切な発生段階における胚中に注入する。例えば、形質転換されたES細胞を、未分化胚芽細胞中にマイクロインジェクションし得る。ES細胞の挿入のために使用される胚にとって適切な発生の段階は、非常に種に依存するが、マウスについては、約3.5日齢である。妊娠した雌の子宮を還流することによって、胚を得る。このことを達成するための適切な方法は、当業者に公知であり、そしてBradleyら(上記)に記載される。

【0195】

発生の適当な段階の任意の胚が、使用のために適切であるが、好ましい胚は、雌性である。マウスにおいて、好ましい胚はまた、ES細胞遺伝子によってコードされる外被色と異なる外被色をコードする遺伝子を有する。この方法において、モザイクの外被色(ES細胞が発生中の胚に取り込まれたことを示す)を探ることによって、ロックアウト構築物の存在について、子孫を容易にスクリーニングし得る。従って、例えば、ES細胞株が、白色の毛皮の遺伝子を保有する場合、選択された胚は、黒色または茶色の毛皮の遺伝子を保有する。

【0196】

ES細胞が胚中に導入された後、胚を、妊娠のための偽妊娠の代理母(foster mother)の子宮中に移植し得る。任意の代理母を使用し得るが、代理母は代表的には十分に繁殖および生殖する能力、ならびに子供のマウスを育てる能力について選択される。そのような代理母は、代表的には、同一種の精管切除された雄との交配によって調製される。偽妊娠の代理母の段階は、成功した移植のために重要であり、そしてその段階は種に依存する。マウスについて、この段階は、約2～3日齢の偽妊娠である。

【0197】

外被色選択ストラテジー(上記のように、そして添付の実施例のように)を使用した場合、代理母から生まれた子孫を、モザイクの外被色について、最初に入

クリーニングし得る。さらに、またはそのかわりに、子孫の尾の組織由来のDNAを、上記のようにサザンブロットおよび/またはPCRを使用して、ノックアウト構築物の存在についてスクリーニングし得る。次に、モザイクであるとして出現した子孫が、その生殖細胞系中にノックアウト構築物を保有すると考えられる場合、ホモ接合型ノックアウト動物を生成するために、その子孫を、お互いに交配し得る。ホモ接合型は、この交配の産物であるマウス由来のゲノムDNA、およびヘテロ接合型マウスおよび野生型マウスとして既知のマウス由来のゲノムDNAの等量を、サザンブロットングすることによって同定し得る。

【0198】

ノックアウト子孫の同定および特徴付けの他の手段が、利用可能である。例えば、ノザンブロットングを使用して、ノックアウトされた遺伝子またはマーカ-遺伝子のいずれか、あるいはその両方の遺伝子をコードする転写物の存在または非存在について、mRNAをプローブし得る。さらに、ウェスタンブロットを使用して、特定の標的タンパク質に対する抗体、またはマーカ-遺伝子産物に対する抗体を用いて、ウェスタンブロットをプローブすることによって、子孫の種々の組織（この遺伝子が発現している）において、ノックアウトされた標的遺伝子の発現レベルについて評価し得る。最後に、インサイチュ分析（例えば、細胞を固定化して、抗体で標識する）および/または子孫由来の種々の細胞のFACS（蛍光細胞分析分離装置）分析を、適切な抗体を用いて行い、ノックアウト構築物遺伝子産物の存在または非存在を探し得る。

【0199】

ノックアウトトランスジェニック動物または遺伝子破壊トランスジェニック動物を作製するさらに別の方法もまた、公知である。例えば、Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)を参照のこと。リコンビナーゼ依存性ノックアウトもまた、例えば、標的配列を挿入する相同組換えによって産生し、その結果、標的遺伝子不活化の組織特異的および/または時間的な制御が、リコンビナーゼ配列によって制御され得る（下記）。

【0200】

1つより多いノックアウト構築物および/または1つより多い導入遺伝子発現構築物を含む動物が、任意の種々の方法によって調製される。調製の好ましい様式は、一連の哺乳動物（各々が所望のトランスジェニック表現型の1つを含む）を産生することである。そのような動物は、一連の交配、戻し交配、および選択を通じてともに育てられ、最終的に全ての所望のノックアウト構築物および/または発現構築物を含む1つの動物を産生する（この動物は、ノックアウト構築物および/または導入遺伝子の存在以外は、野生型たと類遺伝子性（遺伝的に同一）である）。

【0201】

標的導入遺伝子は、タンパク質の野生型形態をコードし得るか、そのホモログ（アゴニストおよびアンタゴニストの両方を含む）、ならびにアンチセンス構築物をコードし得る。好ましい実施形態において、導入遺伝子の発現は、例えば、所望のパターンにおいて発現を制御するシス作用性配列を使用して、細胞、組織または発生段階の特定のサブセットに限定される。本発明において、標的タンパク質のそのようなモザイク発現は、系統分析の多くの形態のために必須であり得、そしてさらに、例えば、それ以外は正常な胚内部において、組織の小さな斑において発生を大きく変化させ得る標的発現の欠失の効果を評価する手段を提供する。この目的に向けて、組織特異的調節配列および条件的制御配列を使用して、特定の空間パターンにおいて導入遺伝子の発現を制御し得る。さらに、発現の時間的パターンを、例えば、条件的組換え系または原核生物転写調節配列によって、提供し得る。

【0202】

導入遺伝子の発現をインビボでの部位特異的遺伝子操作を介して可能にする遺伝子技術が、当業者にとって公知である。例えば、標的配列の遺伝子組換えを触媒するリコンビナーゼの調節された発現を可能にする遺伝子系が、利用可能である。本明細書において使用する場合、成句「標的配列」とは、リコンビナーゼによって遺伝子組換えされるヌクレオチド配列をいう。その標的配列は、リコンビナーゼ認識配列に隣接し、そして一般にリコンビナーゼ活性を発現する細胞にお

いて切り出されるか、または反転されるかのいずれかである。組換え事象を触媒するリコンビナーゼは、標的配列の組換えが対象となる標的タンパク質の1つの発現を活性化するか、または抑制するかのいずれかを生じるように設計され得る。例えば、組換え標的遺伝子の発現を妨げる標的配列（例えば、アンタゴニスト性のホモログまたはアンチセンス転写物をコードする配列）の切り出しは、その遺伝子の発現を活性化するように設計され得る。タンパク質の発現のこの妨害は、種々の機構によって生じ得る（例えば、プロモーターエレメントからの標的遺伝子の空間的分離、または内部の終止コドン）。さらに、遺伝子のコード配列がリコンビナーゼ認識配列と隣接する導入遺伝子を、作製し得、そして最初に、プロモーターに対して3' ~ 5'の配向において細胞内にトランスフェクションし得る。そのような場合において、標的配列の逆位は、コード配列の5'末端を、プロモーターエレメントについての配向に配置することによって、対象の遺伝子を再配向し、プロモーター駆動性転写活性化を可能にする。

【0203】

本発明のトランスジェニック動物は、全て、その複数の細胞内に、本発明の導入遺伝子を含み、この導入遺伝子は、細胞増殖、細胞死、および/または細胞分化の調節に関して、「宿主細胞」の表現型を変更する。本明細書に記載の1つ以上の導入遺伝子構築物を使用する本発明のトランスジェニック生物を産生することが可能であるので、外来遺伝物質を一般的に参照することによって、トランスジェニック生物の産生の一般的な記載を提供する。以下に記載する方法および材料を使用して、特定の導入遺伝子配列を生物に組み込むために、当業者は、この一般的な記載を適用し得る。

【0204】

例示的な実施形態において、バクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系のいずれか(Laksor(1992)PNAS 89:6232-6236;Orbanら(1992)PNAS 89:6861-6865)、またはSaccharomyces cerevisiaeのFLPリコンビナーゼ系(O'Gormanら(1991)Science 251:1351-1355;PCT国際公開WO92/15694)を使用して、インビボにお

いて、部位特異的遺伝子組換え系を産生し得る。Creリコンビナーゼは、loxP配列の間に位置する介在標的配列の部位特異的組換えを触媒する。loxP配列は、Creリコンビナーゼが結合する34塩基対ヌクレオチド反復配列であり、Creリコンビナーゼが媒介する遺伝子組換えに必要である。loxP配列の配向は、Creリコンビナーゼが存在する場合、介在標的配列が切り出されるか、または反転されるかを決定する(Abremskiら(1984)J.Biol.Chem.259:1509~1514);loxP配列が直列反復として配向する場合、標的配列の切り出しを触媒し、loxP配列が逆向反復として配向する場合、標的配列の反転を触媒する。

【0205】

従って、標的配列の遺伝子組換えは、Creリコンビナーゼの発現に依存する。調節性制御(例えば、組織特異的、発生段階特異的、外部から添加された因子による誘導性または抑制性)の対象であるリコンビナーゼの発現は、プロモーターエレメントによって調節され得る。この調節された制御は、リコンビナーゼ発現がプロモーター配列によって媒介された細胞のみにおいて、標的配列の遺伝子組換えを生じる。従って、組換え標的タンパク質の活性化発現は、リコンビナーゼ発現によって調節され得る。

【0206】

組換え標的タンパク質の発現を調節するcre/loxPリコンビナーゼ系の使用は、Creリコンビナーゼおよび対象タンパク質の両方をコードする導入遺伝子を含有するトランスジェニック動物の構築を必要とする。Creリコンビナーゼおよび組換え標的遺伝子の両方を含有する動物は、「二重」トランスジェニック動物の構築を通じて提供され得る。そのような動物を提供するための都合の良い方法は、各々導入遺伝子を含有する(例えば、標的遺伝子およびリコンビナーゼ遺伝子)2匹のトランスジェニック動物を交配することである。

【0207】

最初に、リコンビナーゼ媒介性の発現形式において標的遺伝子を含有するトランスジェニック動物を構築することに由来する1つの利点は、対象タンパク質(アゴニスト性であっても、アンタゴニスト性であっても)トランスジェニック動

物における発現の際に有害であり得る可能性から生じる。そのような場合において、対象となる導入遺伝子が全ての組織においてサイレントである創始者集団が、増殖および維持され得る。この創始者集団の個体は、例えば、1つ以上の組織において、および/または所望の時期的パターンにおいてリコンビナーゼを発現する動物と交配され得る。従って、例えば、アンタゴニスト性標的配列がサイレントである創始者集団の産生は、特定の組織、または特定の発生段階における標的に媒介される誘導の破壊が、例えば、致死性の表現型を生じる創始者由来の子孫の研究を可能にする。

【0208】

類似の条件的導入遺伝子が、標的導入遺伝子の発現を促進するために、原核生物タンパク質の同時発現を必要とする原核生物プロモーター配列を使用して、提供され得る。例示的プロモーターおよび対応するトランス活性化原核生物タンパク質が、米国特許第4,833,080号に提供される。

【0209】

さらに、条件的導入遺伝子の発現が、遺伝子治療様方法によって誘導され得る。ここで、トランス活性化タンパク質をコードする遺伝子(例えば、リコンビナーゼまたは原核生物タンパク質)が、組織に送達され、例えば、細胞型特異的様式において発現される。この方法によって、標的導入遺伝子が、トランス活性化因子の誘導によって「スイッチを入れる」まで、成体において、サイレントであり続け得る。

【0210】

例示的な実施形態において、本発明の「トランスジェニック非ヒト動物」は、導入遺伝子を非ヒト動物の生殖細胞系中に導入することによって産生される。種々の発生段階における胚性標的細胞を使用して、導入遺伝子を導入し得る。胚性標的細胞の発生の段階に応じて、異なる方法を使用する。本発明の実施のために使用される任意の動物の特定の系列を、一般的な良好な健康、良好な胚の収量、胚の良好な全核の可視性、および良好な生殖の適正さについて選択される。さらに、ハプロタイプは、有意な要素である。例えば、トランスジェニックマウスが産生される場合、C57BL/6またはFVB系列のような株がしばしば使用さ

れる (Jackson Laboratory , Bar Harbor , M E) 。好ましい株は、例えば、C57BL/6 or DBA/1のようなH - 2^b、H - 2^dまたはH - 2^qハプロタイプを有する株である。本発明の実施のために使用される系列は、それ自体がトランスジェニックであり得るか、および/またはノックアウトであり得る (すなわち、部分的または完全に抑制された1つ以上の遺伝子を有する動物より得られる) 。

【0211】

1つの実施形態において、導入遺伝子構築物が、単一の段階の胚中に導入される。接合体は、マイクロインジェクションのための最も良好な標的である。マウスにおいて、雌性全核は、1 ~ 2 p l のDNA溶液の再現性のある注入を可能にする、直径約20マイクロメートルのサイズに達する。遺伝子導入のための標的としての接合体の使用は、ほとんどの場合において、注入されたDNAが最初の卵割の前に宿主遺伝子中に組み込まれる点において、主要な利点を有する (Brinsterら (1985) PNAS 82 : 4438 - 4442) 。結果として、トランスジェニック動物の全ての細胞が、組み込まれた導入遺伝子を保有する。このことはまた、生殖細胞の50%が導入遺伝子を保有するので、一般に、創始者の子孫に対する導入遺伝子の効率的な伝達として反映される。

【0212】

通常、受精卵は、全核が現れるまで、適切な培地中でインキュベートされる。およそこの時に、導入遺伝子を含有するヌクレオチド配列が、以下に記載されるように、雌性または雄性の全核中に導入される。そのようなマウスのいくつかの種において、雄性全核が好ましい。卵核または接合体の雌性の全核によってプロセスされる前に接合体の雄性DNA相補物に対して、外来遺伝子物質を添加することが、最も好ましい。卵核または雌性全核が、おそらく雄性DNAのプロタミンをヒストンに置換し、雄性DNA相補物に影響する分子を放出し、それによって雌性および雄性DNAの相補物の組合せを促進し、二倍体接合体を形成すると考えられている。

【0213】

従って、外来性遺伝子物質が、雌性全核によって影響を受ける前に、DNAの

雄性相補物またはDNAの任意の他の相補物に添加されることが好ましい。例えば、外来性遺伝子物質を、雄性全核の形成後できるだけ早期に（雄性全核および雌性全核が十分に分離し、そして両方が、細胞膜の近傍に位置する時点）、初期の雄性全核に添加する。あるいは、外来性遺伝子物質を、脱凝縮（*d e c o n d e n s a t i o n*）を受けるように誘導された後に、精子の核に添加し得る。次に、外来遺伝物質を含有する精子を、卵に添加し得るか、または脱凝縮した精子を、添加された導入遺伝子を有する卵に、その後すぐに添加し得る。

【0214】

胚への導入遺伝子ヌクレオチド配列の導入は、当該分野において公知の任意の手段（例えば、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、またはリポフェクション）によって達成され得る。胚への導入遺伝子ヌクレオチド配列の導入後に、胚を、種々の時間、インビトロにおいてインキュベートし得るか、または代理母中に再移植し得るか、あるいはその両方であり得る。成熟までのインビトロでのインキュベーションは、本発明の範囲内である。1つの一般的な方法は、胚をインビトロにおいて1～7日間（種に依存する）インキュベートし、次に代理母中に再移植することである。

【0215】

本発明の目的のために、接合体は、本質的に、完全な生物体へ発生し得る二倍体細胞の形成である。一般に、接合体は、配偶子（単数または複数）由来の2つの一倍体の融合により（天然または人工的のいずれかで）形成された核を含む卵を含有する。従って、配偶子の核は、天然に適合性の（すなわち、機能性の生物体に分化および発生し得る生存可能な配偶子を生じる）核でなければならない。一般に、正倍数性の配偶子が好ましい。異数体の配偶子が得られるならば、いずれかの配偶子が得られる生物の正倍数性の数と比べて、染色体の数は、1つより多くは異なるべきではない。

【0216】

類似の生物学的考察に加えて、物理学的考察もまた、配偶子の核に添加され得る外来遺伝物質、または配偶子の核の一部を形成する遺伝物質の量（例えば、容量）を支配する。もし遺伝物質が取り除かれないならば、添加され得る外来遺伝

物質の量は、物理的破壊を伴わずに吸収される量に限定される。一般に、挿入される外来遺伝物質の容量は、約10ピコリットルを越えない。添加の物理的効果は、配偶子の生存可能性を物理的に破壊しない程度でなければならない。DNA配列の数および多様性の生物学的限界は、特定の配偶子および外来遺伝物質の機能に依存して変化し、そして当業者に容易に明らかである。なぜならば、生じる配偶子の遺伝物質（外来遺伝子を含む）は、配偶子の機能的生物体への分化および発生を開始し、そして維持することが生物学的に可能でなければならないからである。

【0217】

配偶子に添加される導入遺伝子構築物のコピー数は、添加される外来遺伝物質の総量に依存し、そして遺伝子形質転換を可能にする量である。理論的には、1コピーのみが必要とされる；しかし、一般に、1コピーが機能的であることを保証するために、多数コピー（例えば、導入遺伝子構築物の1,000~20,000コピー）が使用される。本発明に関して、外来DNA配列の表現型発現を促進するために、挿入される外来DNA配列の各々について1つより多い機能的コピーを有することが、しばしば有利である。

【0218】

細胞、核膜または存在する他の細胞構造もしくは遺伝子構造を破壊しない限り、外来遺伝物質を核遺伝物質中に添加することを可能にする任意の技術が使用され得る。外来遺伝物質は、好ましくは、マイクロインジェクションによって核遺伝物質中に挿入される。細胞および細胞構造のマイクロインジェクションは、公知であり、当該分野において使用される。

【0219】

再移植は、標準的な方法を使用して達成される。通常、代理宿主は、麻酔され、そして胚が卵管に挿入される。特定の宿主中に移植される胚の数は、種によって異なるが、その種が天然において生じる子孫の数に匹敵する。

【0220】

代理宿主のトランスジェニック子孫が、任意の適切な方法によって導入遺伝子の存在および/または発現についてスクリーニングされ得る。スクリーニングは

、しばしば、導入遺伝子の少なくとも一部に相補的なプローブを使用するサザンブロット分析またはノザンブロット分析によって達成される。導入遺伝子によってコードされるタンパク質に対する抗体を使用するウェスタンブロット分析が、導入遺伝子産物の存在をスクリーニングするための代替的な方法またはさらなる方法としてしようされ得る。代表的には、DNAは、尾部組織から調製され、そして導入遺伝子について、サザン分析またはPCRによって分析される。あるいは、任意の組織または細胞がこの分析のために使用され得るが、最も高レベルで導入遺伝子を発現すると考えられる組織または細胞を、サザン分析またはPCRを使用して、導入遺伝子の存在および発現について試験する。

【0221】

導入遺伝子の存在を評価するための代替的な方法、またはさらなる方法としては、適切な生化学的アッセイ（例えば、酵素アッセイおよび/もしくは免疫学的アッセイ）、特定のマーカーもしくは酵素活性についての組織学的染色、フローサイトメトリー分析などが挙げられるが、これらに限定されない。血液の分析もまた、血液中の導入遺伝子産物の存在の検出のため、および種々のタイプの血球および他の血液成分のレベルに対する導入遺伝子の影響を評価するために有用であり得る。

【0222】

トランスジェニック動物の子孫が、適切な相手とそのトランスジェニック動物を交配することによって、またはそのトランスジェニック動物から得られた卵および/または精子のインビトロ受精によって、得られ得る。相手との交配を行う場合、その相手は、トランスジェニックおよび/またはノックアウトであっても、そうでなくてもよい；その相手がトランスジェニックである場合、その相手は、同一または異なる導入遺伝子、あるいはその両方を含み得る。あるいは、その相手は、親系統であってもよい。インビトロ受精を行う場合、受精した胚を、代理宿主中に移植し得るか、またはインビトロでインキュベートするか、あるいはその両方であり得る。いずれかの方法を使用して、その子孫を、上記の方法または適切な他の方法を使用して、導入遺伝子の存在について評価し得る。

【0223】

本発明に従って産生されたトランスジェニック動物は、外来遺伝物質を含む。上記に列挙したように、特定の実施形態において、外来遺伝物質は、標的タンパク質（アゴニスト性またはアンタゴニスト性のいずれか）、アンチセンス転写物、あるいは標的の変異の産生を生じるDNA配列である。さらに、そのような実施形態において、その配列は、転写制御エレメント（例えば、プロモーター）に連結され、このプロモーターは、好ましくは、特定の細胞型における導入遺伝子産物の発現を可能にする。

【0224】

レトロウイルス感染もまた、非ヒト動物への導入遺伝子の導入のために使用し得る。発生中の非ヒト胚を、未分化胚芽細胞段階までインビトロにおいて培養し得る。この時間の間、卵割球が、レトロウイルス感染の標的となり得る（Janich, R. (1976) PNAS 73:1260~1264）。卵割球の効果的な感染は、酵素処理または透明帯の除去によって得られる（Manipulating the Mouse Embryo, Hogan編（Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1986））。導入遺伝子を導入するために使用されるウイルスベクター系は、代表的には、導入遺伝子を保有する複製欠損レトロウイルスである（Jahnerら（1985）PNAS 82: 6927-6931; Van der Puttenら（1985）PNAS 82: 6148-6152）。トランスフェクションは、卵割球を、ウイルス産生細胞の単層上で培養することによって、容易、かつ効率的に得られる（Van der Putten, 前出; Stewartら（1987）EMBO J. 6: 383-388）。あるいは、感染を、後期段階において実施し得る。ウイルスまたはウイルス産生細胞を、胞胚腔中に注入し得る（Jahnerら（1982）Nature 298: 623-628）。創始者のほとんどが、導入遺伝子についてモザイクである。なぜなら、取り込みは、トランスジェニック非ヒト動物を形成する細胞の一部にのみ生じるからである。さらに、この創始者は、ゲノム中の異なる位置において、導入遺伝子の種々のレトロウイルス挿入物を含み得る。これらは、一般に、子孫中で、分離する。さらに、妊娠中期の胚の子宮内レ

トロウイルス感染によって、生殖細胞系中に導入遺伝子を導入することもまた可能である（Jahnerら（1982）前出）。

【0225】

導入遺伝子導入のための第三の型の標的細胞は、胚幹細胞（ES）である。ES細胞は、インビトロで培養された移植前の胚から得られ、そして胚と融合される（Evansら（1981）Nature 292：154-156；Bradleyら（1984）Nature 309：255-258；Gosslerら（1986）PNAS 83：9065-9069；およびRobertsonら（1986）Nature 322：445-448）。導入遺伝子は、DNAトランスフェクションまたはレトロウイルスにより媒介される形質導入によって、ES細胞に効率的に導入され得る。このような形質転換したES細胞は、その後、非ヒト動物由来の胚盤胞と合わせられ得る。その後、ES細胞は胚をクローン化し、そして得られるキメラ動物の生殖細胞系に寄与する。概説については、Jaenisch, R.（1988）Science 240：1468-1474を参照のこと。

【0226】

（4.9治療薬）

別の局面において、本発明は、薬学的に有効量の黄斑変性治療薬を投与することによる、被験体における動脈壁破裂障害の発達を処置または予防するための方法を提供する。黄斑変性治療薬は、抗炎症薬剤であり得、好ましくは、TNF- α 、IL-1、GM-CSF、IL-4またはIL-13のアнтаゴニストであり得る。この治療薬はまた、IL-10、M-CSF、IL-6およびIL-4またはこれらのアゴニストであり得る。ドルーゼ形成またはDS/CNVの減少を補助する任意の治療薬が使用され得る。なぜならこれはまた、同時に起こる動脈壁破裂障害を処置し得るからである。好ましい実施形態において、この薬剤は、サイトカイン、ケモカインならびにそのアゴニストおよびアンタゴニストからなる群より選択される。有用な治療薬は、炎症を阻害する薬剤を含有する。

【0227】

別の実施形態において、黄斑変性治療薬は、1つ以上のDRAM（例えば、ア

ミロイドAタンパク質、アミロイドP成分、アンチキモトリプシン、アポリポタンパクE、b2ミクログロブリン、補体3、補体C5、補体C5b-9末端(terminal)複合体、第X因子、フィブリノーゲン、免疫グロブリン(および)、プロトロンビン、トロンボスポンジンまたはビトロネクチンのような)の発現のインヒビターである。別の実施形態において、本発明は、DRAMの産生を調節すること(例えば、これらの遺伝子発現または活性を阻害または拮抗すること)により、ドルーゼ関連疾患を処置するための方法を提供する。アミロイドPおよび₁-アンチキモトリプシン(セリンプロテアーゼのインヒビター)の、ドルーゼにおける蓄積は、RPEまたは脈絡膜細胞による攻撃の効果を相殺させるよう作用して、ドルーゼをタンパク質分解的に除去し得る。例えば、アミロイドPはまた、アテローム性動脈硬化症に関連する非アミロイド沈着(Niculescuら、1987)、ケラチン中間フィラメント凝集物(Hintnerら、1988)、および腎系球体症(Yangら、1992)において見出される。これは、弾性線維に関連し、そしてインビボでプロテアーゼインヒビターとして機能し得る(LiおよびMcAdam、1984; Vachinoら、1988)。これはまた、ブルーフ膜の通常の成分であり、ここでこれは、弾性板を酵素的分解に対して保護し得る(Kivelaら、1994)。従って、これらのタンパク質の生合成のダウンレギュレーションは、ドルーゼ形成を阻害するため、またはドルーゼの除去もしくは融解を容易にするために、重要である。ドルーゼの形成を阻害すること、またはドルーゼの除去もしくは融解を容易にすることは、以下のような多数のレジメンにより達成され得る:(1)1つ以上のDRAMについてRNA合成を阻害すること、(2)RNAターンオーバーの増強または1つ以上のDRAMの分解の増強、(3)1つ以上のDRAMについてのRNAのタンパク質への翻訳の阻害、(4)タンパク質プロセッシングの阻害または1つ以上のDRAMの移送の阻害;(5)ドルーゼ沈着を生じるDRAMの会合のために必要である、分子間結合および分子内結合に關与する、1つ以上の因子の特定のタンパク質結合部位をブロックすることによって、ドルーゼ形成を阻害すること;(6)タンパク質沈着の消化または動揺(例えば、酵素を使用);(7)インサイチュでのDRAMの標的化および破壊(例えば、酵素-抗体技

術を使用)。DRAMは、例えば、光反応性レーザー治療を使用して、または当該分野において周知のインサイチュでのタンパク質の標的化および破壊のための他の手段によって、標的化され得る。このような手段は、プロテアーゼまたは化学物質（これは、活性化されると、個々の成分を切断もしくは変性するか、または2つ以上の成分の相互作用を妨害する）のような反応性基に結合体化する抗体を含み得る。

【0228】

別の実施形態において、ドルーゼ関連疾患のための治療薬は、1つ以上のDRAMの発現を調節する因子を発現する遺伝子を変化させる薬剤を含有する。このような薬剤は、「アンタゴニスト」であり得、これは、直接的にまたは間接的にのいずれかで、DRAM生合成を阻害する。この薬剤は、例えば、DRAMの転写または翻訳を特異的に阻害し得る。あるいは、これは、天然に存在する治療薬剤の合成を増加させる遺伝子を、直接的または間接的にのいずれかでアップレギュレートするために好ましくあり得る。例えば、1つ以上のDRAMまたはサイトカインまたは免疫応答を改変する薬物を分解するタンパク分解酵素の増加した遺伝子発現が、所望され得る。

【0229】

従って、本発明はまた、ドルーゼ治療の効力または予防的処置、芯形成の非存在、治療または処置の効率の証拠を提供するドルーゼの消滅あるいはドルーゼコアの消滅をモニタリングするために、有用である。

【0230】

1つの局面において、本発明の治療剤は、アンチセンス治療に関する。本明細書中において使用される場合に、「アンチセンス」治療とは、1つ以上のDRAMをコードする細胞mRNAおよび/またはゲノムDNAと、細胞条件下で特異的にハイブリダイズ（例えば、結合）して、そのタンパク質の発現を阻害する（例えば、転写および/または翻訳を阻害することによる）、オリゴヌクレオチド分子またはその誘導体の、投与またはインサイチュでの生成をいう。この結合は、従来の塩基対相補性、または例えば、DNA二重鎖に結合する場合には、その二重螺旋の深い方の溝における特異的相互作用によるものであり得る。一般に、

「アンチセンス」治療とは、当該分野において一般的に使用される範囲の技術をいい、そしてオリゴヌクレオチド配列への特異的結合に依存する、任意の治療を含む。

【0231】

本発明のアンチセンス構築物は、例えば、細胞中で転写される場合に、DRAMタンパク質をコードする細胞mRNAの少なくとも独特の部分に相補的であるRNAを産生する、発現プラスミドとして送達され得る。あるいは、アンチセンス構築物は、エキソビボで生成され、そして細胞に導入される場合に、DRAM遺伝子のmRNAおよび/またはゲノム配列とのハイブリダイズによる発現の阻害を引き起こす、オリゴヌクレオチドプローブであり得る。このようなオリゴヌクレオチドプローブは、好ましくは、内因性ヌクレアーゼ（例えば、エキソヌクレアーゼおよび/またはエンドヌクレアーゼ）に対して抵抗性の修飾オリゴヌクレオチドであり、従ってインビボで安定である。アンチセンスオリゴヌクレオチドとしての使用のための例示的な核酸分子は、DNAのホスホロアミデートアナログ、ホスホチオエートアナログおよびメチルホスホネートアナログである（米国特許第5,176,996号、同第5,264,564号、および同第5,256,775号もまた参照のこと）。アンチセンス治療において有用であるオリゴマーを構築するためのアプローチは、当該分野において周知である。アンチセンスDNAに関して、翻訳開始部位（例えば、目的のドルーゼ関連成分ヌクレオチド配列の-10と+10との間の領域）由来のオリゴデオキシリボヌクレオチドが、好ましい。アンチセンスアプローチは、DRAM mRNA、またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストに相補的である、オリゴヌクレオチド（DNAまたはRNAのいずれか）の設計を包含する。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、目的のmRNA転写物に結合し、そして翻訳を防止するか、または転写物の分解を促進する。絶対的な相補性は、好ましいが、必要ではない。従って、二本鎖アンチセンス核酸の場合には、二重鎖DNAの一本鎖が試験され得るか、または三重鎖形成がアッセイされ得る。ハイブリダイズする能力は、相補性の程度およびアンチセンス核酸の長さの両方に依存する。一般に、ハイブリダイズする核酸が長いほど、RNAとミスマッチするより多くの塩基を含み得、そして依然

として、安定な二重鎖（場合によっては三重鎖）を形成し得る。当業者は、標準的な手順を使用してハイブリダイズした複合体の融点を決定することによって、ミスマッチの許容度を確かめ得る。

【0232】

アンチセンスまたはリボザイムを調製および使用する、他の特徴、ストラテジーおよび方法は、米国出願番号09/183,972に見出され、その教示は、本明細書中に参考として援用される。

【0233】

別の実施形態において、本発明は、動脈壁破裂障害を処置または予防するために有用である、薬学的組成物を提供し、この組成物は、有効量の黄斑変性治療薬および治療的に受容可能なキャリアを含有する。このようなキャリアおよび薬学的調製物を調製するための方法は、米国出願番号09/183,972に見出され、これは、本明細書中に参考として援用される。

【0234】

別の局面において、本発明は、薬剤を被験体に非毒性の投薬量で投与すること、およびドルーゼ形成または新生血管形成が阻害されるかまたは消散されたか否かを決定することによって、被験体における動脈壁破裂障害を処置または予防するための薬剤を、同定するか、またはその薬剤の効力を決定するための方法を提供する。別の実施形態において、本発明は、黄斑変性に関する非ヒトモデルを薬剤に接触させること、および黄斑変性の1つ以上のマーカーをモニタリングすることによって、被験体における動脈壁破裂障害を処置または予防するための薬剤を同定するための方法を提供し、ここで、このマーカーの1つ以上の非存在または消失は、動脈壁破裂障害の阻害の指標である。上記のように、このマーカーは、タンパク質または核酸を検出するための、当該分野において公知の多数の方法のいずれかによって、モニタリングされ得る。黄斑変性を検出するために使用されるマーカーは、RPEの下の空間中のドルーゼの存在、または1つ以上のDRAM（例えば、アミロイドAタンパク質、アミロイドP成分、アンチキモトリプシン、アポリポタンパクE、b2ミクログロブリン、補体3、補体C5、補体C5b-9末端複合体、第X因子、フィブリノーゲン、免疫グロブリン（および

)、プロトンピン、トロンボスポンジンおよびビトロネクチン)であり得る。

【0235】

なお別の局面において、本発明は、AAAを診断するため、またはAAAを処置し、さらにAMDをも処置することに関する薬物を試験するために使用される、AAAのための動物モデルを提供する。AMDのための動物モデルは、小さなAAAの臨床的進行(または後退)を調節するための治療を提供する。実施例4は、AMDのためのサルモデルを提供し、従って、AAAのために動物モデルを提供する。実施例5は、AMDのためのラットモデルを提供し、従ってAAAのための動物モデルを提供する。好ましくは、黄斑を有する任意の動物が、動物モデルを作製するために使用され得る。

【0236】

本発明の実施は、他に示さない限り、細胞生物学、細胞培養、遺伝学、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学の従来の技術を利用し、これらは、当該分野の技術の範囲内である。このような技術は、文献に記載される。例えば、Molecular Cloning A Laboratory Manual、第2版、Sambrook、FritschおよびManiatis(編)(Cold Spring Harbor Laboratory Press:1989);DNA Cloning、第I巻および第II巻(D.N.Glover編、1985);Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait編、1984);Mullisら、米国特許第4,683,195号;Nucleic Acid Hybridization(B.D.HamesおよびS.J.Higgins編、1984);Transcription And Translation(B.D.HamesおよびS.J.Higgins編、1984);Culture Of Animal Cells(R.I.Freshney、Alan R.Liss, Inc.、1987);Immobilized Cells And Enzymes(IRL Press、1986);B.Perbal、A Practical Guide To Molecular Cl

oning (1984); 論文, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J.H. MillerおよびM.P. Calos編、1987、Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology、第154巻および第155巻(Wuら編)、Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (MayerおよびWalker編、Academic Press、London、1987); Handbook Of Experimental Immunology、第I~IV巻(D.M. WeirおよびC.C. Blackwell編、1986); Manipulating the Mouse Embryo、(Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.、1986); Rossner, B., Fundamentals of Biostatistics、Duxbury Press、Belmont、CA、370-377、199; Lewin, B.編、Genes VI、Oxford University Press、UK、1998を参照のこと。

【0237】

(例証)

(実施例1: 腹部の大動脈瘤/AMD関連: 1998年データベース)

2000対を超えるヒトドナー眼(1日齢~106歳までの範囲)(これらは死後平均3.2時間以内に処理された)からなるヒトの収納場所を使用して、これらの眼をAMDについて分析した。病歴および眼の履歴、家族質問表、ならびに血液および血清もまた、大部分のドナーから入手し、AAAおよびAMDの存在を決定した。全ての眼を、網膜の専門家による肉眼での試験に供し、そして当該分野において公知の、光学顕微鏡(4%パラホルムアルデヒド)および電子顕微鏡(2.0%ホルムアルデヒドおよび2.5%グルタルアルデヒド)、免疫組織化学、種々の生化学的分析および分子生物学的分析のために処理した。従って、DNA、RNA、固定組織および凍結組織が、収納場所内の全ての眼に関して

入手可能であった。さらに、RPE細胞株を、AMDありおよびAMDなしの全ての年齢および人種の選択したドナーから樹立し、そして凍結した。収集物中の約18%の眼が、AMDの顕著な兆候（円板状癍痕、黄斑の下の新生血管膜（submacular neovascular membrane）、異常な色素沈着、および/または地図状萎縮）および/または臨床的に文書で証明されたAMDの履歴を示す。他の眼の疾患および全身性疾患（緑内障、糖尿病、他の網膜および黄斑の変性、アルツハイマー病、パーキンソン病、ならびに種々の発生異常を含む）もまた、収納場所において示される。ドナーの眼の収納場所は、AMDの病因に関与する特定の生物学的プロセス、遺伝子型 - 表現型相関、ならびにAMDおよび他の黄斑のジストロフィーの病因に関連する「候補」分子および遺伝子の研究のために有用である。

【0238】

1998年の収納場所からの眼が、例として役立つ。このデータベースは、ドナーの医学的記録が最も包括的であったので、選択した。1998年に得た207の全ドナー（「1998年データベース」）のうちの、33がAMDを有し（全体の15.9%）、そして12のドナーがAAAを有した（全体の5.8%）。33のAMDドナーのうちの4が地図状萎縮（GA、これは、AMDの乾燥形態の特徴である）を有し（全体の1.9%）、11が円板状の癍痕および脈絡膜の新生血管形成（DS/CNV、これは、AMDの湿潤形態の特徴である）を有し（全体の5.3%）、そして残りの18が、診断によって湿潤形態または乾燥形態を区別されなかったAMDを有した（全体の8.7%）（表2）。

【0239】

全ドナー207のうちの12のドナーが、AAAを有した。これらの12のAAAドナーのうちの8はまた、AMDを有した（AAAドナーの66.7%）。AMDを有する8のドナーのうちの6は、DS/CNV形態を有し（AAAドナーのうちの50%）、そして2は、GA形態を有した（16.7%）。（表2）。表3および4は、この研究の分析を示し、そしてAAAおよびAMDの予測および観察した発生および同時発生を提供する。これは、これら2つの疾患が、全集団に関して予測されるより10倍大きな頻度であることを証明する：

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

207の全ドナー

AMDを有した33のドナー =

4 地図状萎縮(GA)

11 円板状の瘢痕および脈絡膜の新生血管形成(DS/CNV)

18 その他/未知

AAAを有した12のドナー:

8 AMD (=6DS/CNVおよび2GA)

AMDを有する1998年データベースの%: 15.9%

DS/CNVを有する1998年データベースの%: 5.3%

AAAを有する1998年データベースの%: 5.8%

AMDを有するAAAドナーの%: 66.7%

DS/CNVを有するAAAドナーの%: 50%

【0240】

【表3】

表3: AAA および/または AMD の有病率

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

a) 臨床的に診断されたAMDを有するドナーについて、AAAもまた有する機会は何か?

収納場所全体における AAA : 12/207 (5.8%)

AMDを有さないドナーにおける AAA : 4/174 (2.3%)

AMDを有するドナーにおける AAA : 8/33 (24%)

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

b) DS/CNVを有するAMDドナーについて、AAAもまた有する機会は何か?

収納場所全体における AAA : 12/207 (5.8%)

DS/CNVを有さないドナーにおける AAA : 6/196 (3.1%)

DS/CNVを有するドナーにおける AAA : 6/11 (54.5%)

【0241】

【表4】

表4： 観察および予測されたAMD、CNV/DS および AAA

	<u>Obs. AMD+</u>	<u>Exp. AMD+</u>	<u>Obs. AMD-</u>	<u>Exp. AMD-</u>
AAA+	8	1.91 ^a	4	10.09 ^c
	<u>Obs. AAA+</u>	<u>Exp. AAA+</u>	<u>Obs. AAA-</u>	<u>Exp. AAA-</u>
AMD+8		1.91 ^a	25	31.09 ^d
	<u>Obs. DS/CNV+</u>	<u>Exp. DS/CNV+</u>	<u>Obs. DS/CNV-</u>	<u>Exp. DS/CNV-</u>
AAA+	6	0.64 ^b	6	11.36 ^e

ここで : Obs.=観察した ; Exp.=予測した ;

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

(結果)

表4は、DS/CNVとAAAとの同時発生が、207のヒトドナーの上記集団から予測されるより9.4倍高いことを実証する。AMDとAAAとの同時発生は、207のヒトドナーの眼の上記集団から予測されるより4.2倍高い。2つの変数の同時発生の統計学的分析は、フィッシャーの直接確率検定(Rosner, B., Fundamentals of Biostatistics, Duxbury Press, Belmont, CA, 370-377, 1995)により決定された。AAAとDS/CNVとの同時発生の、フィッシャーの直接確率検定について、 $p < 0.00001$ であった。これは、統計学的に有

意なAMDの発生数とAAAの発生数との相関であり、これらの疾患が病因または同じ遺伝子座を共有することを示唆する。

【0242】

(実施例2： 胸大動脈瘤におけるAMDの発生)

実施例1に従って得た207のヒトドナーのうちの、8のドナーの眼が、胸大動脈瘤(TAA)を有し、これらの全てが、AMDに関連する底部の知見を有した。1のTAAドナーはまた、DS/CNVを伴うAAAを有した。

【0243】

(実施例3： AMDに関連する病理)

本明細書中に表5として添付されるデータベースにおいて同定される医学的状態を記載するデータベースが提供される。ドナーの眼から構成されるヒトの収納箇所を、実施例1に指定するパラメータに従って、収集した。病歴および眼の履歴、家族質問表、ならびに血液および血清もまた、大部分のドナーから入手し、AAAおよびAMDの存在を決定した。全ての眼を、網膜の専門家による肉眼での試験に共し、そして当該分野において公知の、光学顕微鏡(4%パラホルムアルデヒド)および電子顕微鏡(2.0%ホルムアルデヒドおよび2.5%グルタルアルデヒド)、免疫組織化学、種々の生化学的分析および分子生物学的分析のために処理した。従って、DNA、RNA、固定組織および凍結組織が、収納場所内の全ての眼に関して入手可能であった。さらに、RPE細胞株を、AMDありおよびAMDなしの全ての年齢および人種の選択したドナーから樹立し、そして凍結した。眼を、直接的試験(円板状の瘢痕、黄斑の下の新生血管膜、異常な色素沈着、および/または地図状萎縮)によって、あるいは臨床的に文書で証明された状態の履歴を得ることによって、AMDの存在に関して分析した。他の眼の疾患および全身性疾患(緑内障、糖尿病、他の網膜および黄斑の変性、アルツハイマー病、パーキンソン病、ならびに種々の発生異常を含む)もまた、収納場所において示される。ドナーの眼の収納場所は、AMDの病因に關与する特定の生物学的プロセス、遺伝子型-表現型相関、ならびにAMDおよび他の黄斑のジストロフィーの病因に關連する「候補」分子および遺伝子の研究のために有用である。

【0244】

(実施例4：AAAのサルモデル)

好ましい動物モデルは、サルのような、黄斑を有する動物である。例えば、カニクイザルを、当該分野において周知の方法に従って、麻酔した。脈絡膜循環をブロックし、そして360°の角膜周囲切開を作製し、そして牽引縫合系を使用して、鼻上で可能な限り遠くに目を回転させ、球の後部へのアクセスを得た。鈍角の(blunt)カニューレを使用して、脈絡膜を強膜の縁部から分離し、そして60単位のプロテアーゼを含まないコンドロイチナーゼABC(American Cyanimide)を含む100μlの滅菌の平衡化塩溶液(BSS)を、脈絡膜の支質中に注射した。強膜切開を、7-0vicryl縫合系を用いて閉鎖した。倒像眼底検査は、出血または色素脱失が存在しない正常な脈絡膜および網膜を実証した。結膜を、7-0vicryl縫合系を用いて閉鎖し、そして3mgのセレスチン(celestine)を結膜下に注射した。この動物を、検眼鏡(ophthalmoscope)を用いて非侵襲的にモニタリングし、新生血管形成を含む底部変化を7日間モニタリングした。

【0245】

【表5】

表 5

DONOR	AAA	AMD	AO 狭窄症	緑内障	死亡原因	病歴
004-97	X				肺炎	CVA, MI, GI 出血, CHF, COPD
19-97	X				1-呼吸不全 2-COPD	腹部動脈瘤
26-97			X		1-心停止 2-Pup. TAA	RF-AVR
31-97			X		1-CPA 2-CHD	先天性心臓弁欠陥
34-97		X			CHF	CHF, COPD
38-97		X			MSF	HTN, CHF
39-97		X			1/RJA 2-COPD	RF, COPD
43-97		X?			末期 COPD	CHF; 肺交
60-97	TAA				破裂性胸部動脈瘤	前全身性 CA
62-97		X?			COPD	COPD, 中等度痴呆, 咳引
87-97	X				ICB	CHF, CAD, HTN, 心臓病
96-97			X		MI	CHF, IDDM, RNF
100-97		X			MI	CPA
102-97				X	ICB	TIA's, seizure 病
109-97		X		X	CHF	?
110-97		X?			?	?
111-97		X		X	GVA	HTN, CAD
113-97		X			恐らく MI	CPA
125-97		X			心筋症, 敗血症	CHF, 心筋症, 糸球体腎炎
132-97		X			GI 出血	HTN, GI 出血, 四肢関節痛
117-97	X				CPA	COPD, 痴呆
136-97		X			MI	?
145-97		X?			心停止	IDDM, 糖尿 病
150-97		X?			敗血症, 肺炎	?
152-97		X?			肺動脈線維症	前立腺 HTN, 肺 HTN, 間質性肺炎
161-97		X?			MI	CHF, 脚の腫脹
164-97		X F			CHF, HM	?
160-97			X F/D		ICB	HTN, 7Lツパハマー
162-97		X			COPD	CHF, COPD, MI
172-97	X				MI	AAA 修復
173-97				X	破裂性 AAA	a-flb, 甲状腺機能低下症
174-97	X	X		X	破裂性 AAA	CAD, 末梢血管炎
181-97			X		前骨髄球白血病	FABM3, CVA, ARDS, HTN
182-97		X F			MI	HTN, CHF, 重症糖尿 病
189-97	X?	X			CHF, 癌作	CHF, CAD, HTN, 心臓病

表 5 (つがき)

DONOR	AAA	AMD	AD狭窄症	緑内障	死土原因	病歴
191-97	X	F			1-強皮症 2-肺線維症	?
192-97	X			前立腺 CA	MI	MI
193-97	X	F/D				心臓病
001-98			X	敗血症, 腸腸CA		COPD, 腎 CA
002-98	X	X	X	子宮 CA		肺系症を伴うCHF
005-98	X	X	X	CAD		大動脈弁機能不全, HTN, CHF
007-98		X		肺 CA		MI, 狭心症, CAD, HTN
010-98	X		X	肺 CA		HTN, COPD, CHF
011-98		X		肺系症		CHF, CAD, COPD, a-fib
16-98		X		CHF		?
22-98		X		肺系症		?
25-98		X	F	CVA		IDDM, HTN, CAD, 腎炎, 発作
27-98	X?			呼吸不全, 肺線維症		HTN, 慢性 a-fib, TIA, CAD, CABG, 大動脈バypass
30-98	X?	X		心不全		?
35-98	X	X		呼吸停止		気管支拡張, HTN
38-98				MI		?
40-98	X			CVA		MI, CVA を伴う薄弱
44-98		X		CHF		CAD, CABG, COPD, CHF, 心臓症
46-98	X	X		敗血症性 Shwartz		CVA, CHF, IDDM, 胸部 CA
51-98	X	X		1-呼吸不全 2-肺炎		CHF, HTN, 気腫
52-98	X	F		RF		IDDM, a-fib, 甲状腺機能低下症
55-98	X	X		肺 CA		肺炎, 糖尿病
58-98	X	X	X	腸腸CA		HTN
59-98	X	X		吸引性肺炎		MI, ASHD
61-98	X	X		MI		肺炎, 甲状腺機能低下症
63-98	X	X		壊疽性腸腸閉塞		?
66-98			X	腸腸閉塞		CVA, HTN, 糖尿病
67-98		X	X	1-呼吸不全 2-肺炎		HTN, 低酸素血症, a-fib, 心房性頻拍
68-98	X	X	X	CVA, CHF		先天性心臓病, HTN
70-98	X	F/D	X	MI, CHF		MI, CABG を伴う慢性 CAD, CABG, CHF, IDDM, 肺 HTN
72-98	X	X		破裂性 AAA		HTN, 気腫
77-98	X	X		動脈解離		HTN, COPD, 肺 HTN
83-98	X	F		GI 出血, 敗血症		?
85-98	X	X		CHF		発作, HTN
90-98	X	X	X	MI		CAD, HTN, 僧帽弁逆流症
94-98	X	X		RF		HTN, IDDM, PVD, 乾癩

表 5 (つづき)

DONOR	AAA	AMD	AO 狭窄症	緑内障	死亡原因	病歴
95-98			X		CVA	ASHD,CVA, 変形性関節症
99-98				X	肺 CA	a-fib,CAD,CHF,IDD,MI
105-98		X			肺 CA	COPD,HTN,a-fib,肺炎
107-98		X F			肺炎	COPD,肺 CA,RF,吐血
116-98		X			CHF	CHF,COPD,肺塞栓症
117-98		X ?			胸部 CA	HTN
136-98		X			MI	前立腺 CA
137-98		X			肺炎	HTN,MI
139-98		X			恐らく MI	?
141-98				X ?	発作,CVA	発作,IDD,MI,a-fib,HTN,CVA,頸動脈stent,血管形成
142-98				X	CVA	発作,多発性 CVA
148-98		X F			肺 CA	ロバトミ-発作,PVD,HTN,DVT
149-98		X			CAD	CAD,COPD,MI,腎不全,憩室症
150-98		X			白血病	HTN,結腸CA,骨 CA
151-98		X F			1-敗血症性ショック 2-白血病	白血病
153-98		X			1-敗血症性ショック 2-リンパ腫	DM,ASCVD,CVA,a-fib,CHF,RF
157-98		X F/D			心臓病	HTN,心臓病
159-98	X	X ?			橋出血	HTN,CABG,気腫,心臓病,AVR,上行 AAA
160-98				X	肺塞栓症	COPD
161-98		X			1-敗血症 2-CHF	HTN,PVD,CHF,RNF,慢性 a-fib
166-98				X	MSF	発作
168-98		X F/D			RF,敗血症	ARF,HTN,肺炎
169-98				X	重篤な貧血	?
175-98	X	X			1-肺炎 2-呼吸性不全	PVD,SOB,CAD,COPD,GI出血,慢性貧血
182-98		X			1-COPD 2-CAD	COPD,CAD,s/p下壁心筋
185-98		X F/D		X F	1-肺炎 2-腎 CA	HTN,心臓病,呼吸不全
186-98	X F/D	X			MI	MI,CAD,CABG
194-98	X	X			1-COPD 2-PVD	IDD,MI,COPD,GRF
196-98		X			RF	結腸ポリープ,MI,HTN,糖尿病,アテローム性動脈硬化症
197-98		X F			RNF	白血病,肺炎
207-98	X				破裂性 AAA	MI,RF
216-98				X	1-MI 2-GI出血	HTN,MI,ASHD,COPD
226-98		X ?			肺 CA	乾物を作う肺CA
233-98				X	穿孔性潰瘍	HTN,糖尿病,非特異的在大腸炎
238-98	X				1-MI 2-腎臓梗塞	MI,発作
239-98	TAA				CHF	a-fib,HTN,胸大動脈瘤,変形性関節炎

表 5 (つぎ)

DONOR	AAA	AMD	AO 狭窄症	緑内障	死亡原因	病歴
256-98	X				CABGの後、CVAの合併症	HTN, COPD, 2X 肺炎症, 動脈硬化
278-98	X				AAA	CAV (尿管1.5倍), 心筋虚血
280-98		X ?		X	?	IDDM, HTN, PVD, 腎不全
284-98		X	X		重篤な COPD	CHF, 乳がん, 大動脈弁閉鎖
006-99				X	CHF, MI, 糖尿病	IDDM, CHF, 心筋梗
010-99	X	X ?		X ?	CHF	MI, COPD, HTN, 高血圧
16-99	TAA				1-呼吸不全, 2-末期 COPD	COPD, CHF, 上行大動脈瘤
21-99	X				肺炎	HTN, COPD
24-99			X ?		腸胃大動脈	HTN, CAD, PVD, RF, CHF, MI
27-99		X ?			AML	HTN, 白血病
30-99	X F				?	HTN
31-99	X				AAA 修復の失敗	HTN, ASHD, CAB
32-99	X			X	AAA の破裂	COPD
33-99		X			MI	低カリウム血症
39-99	X				AAA の破裂	HTN, CHF, COPD, II型 IDDM
40-99		X			CVA	初期 AMD/CMA, PVD, IDDM, CHF, HTN
43-99				X	1-敗血症, 2-狼瘡	CVA, 低血糖症
44-99		X		X	慢性先天性肝障害	非優長性 AMD
46-99				X	産血性腸	CHF, HTN, COPD, DVT
59-99		X			リンパ腫	HTN
60-99		X		X	不全取締	?
70-99		X ?			CVA	CABG, I
75-99		X			1-敗血症, 2-前立腺がん	前立腺がん, 非優長性 AMD
79-99		X F/D			敗血症, 腎臓の血栓	HTN, MI, CAD
80-99		X F			MSF	?
81-99				X ?	?	前立腺がん, MI
85-99		X ?			前がん(軽微な伴う)	ASCVD, MI, I
81-99		X F/D			前がん(軽微な伴う)	白血病, CAD, IHD
98-99		X			末期 COPD	COPD, HTN, 軽微な CHF, CAD
99-99	X	X			リンパ性白血病	AAA 破裂, HTN, 軽微な AMD
101-99			X		?	L 頸動脈狭窄症, COPD, AODM
113-99	X	X F			1-呼吸不全, 2-COPD	COPD, HTN, 前立腺 MI (anterior MI)
114-99		X			尿作 (CVA)	HTN, CHF, COPD
130-99		X			COPD	HTN, CHF, COPD
133-99	X			X	1-MSF, 2-AAA	CAD, PVD, COPD
138-99	X F/D				CAB 後の出血	COPD, CAD, CHF ?

次いで、動物を過剰用量のバルビツレートで安楽死させ（「永眠 (sleep away)」）、そして当該分野で公知の方法に従って組織学的観察のために眼を調製した。ブルー膜の明確な破壊が実験的に眼において観察され、このことは

、酵素がブルーフ膜に達することを実証した。

【0246】

上記の実施例を改変して、0.05~0.50ml BSS中の1~100U/mlのエラスターゼを注入し得た。あるいは、上記の方法を改変して、緩効性(slow release)ペレット(このような緩効性ペレット技術は当該分野で周知である)の形態での酵素の挿入の代わりに、酵素の注入で置換し得る。あるいは、手術せずに大動脈をエラスターゼまたはコンドロイチナーゼで灌流し得、そして動物を上記のようにモニターし得る。

【0247】

(実施例5:AAAについてのラットモデル)

Anidjar/Dorbinラットを、膵臓エラスターゼでの腹大動脈の注入により作製する。(Anidjar, S.ら, Circulation, 82:973-981, 1990, この技術は、本明細書中に参考として援用され、以下に簡潔に記載される)。簡単には、雄Wisterラットの腹大動脈の1cmのセグメントを分離し、そして灌流する。動物を6%ペントバルビタールナトリウムで麻酔し(0.1ml/100g体重)、そしてPE10ポリエチレンカテーテルを、その先端が腎臓下部腹大動脈に達するまで双眼手術用顕微鏡下で大動脈に挿入する。大静脈を側腹切開により大動脈から分離させ、側副動脈を結紮し、そしてカテーテル先端の位置を確認する。腹大動脈を左腎静脈のレベルでクランプし、そして1cm下でカテーテルの周りを結紮する。次いで、腹大動脈のこの分離したセグメントを、2mlの適切な試験溶液(速度、1ml/時間)(例えば、2mlの通常生理食塩水中に15ユニットの膵臓エラスターゼ(I型; 1ユニット= pH 8.8、37℃で20分間に1mgのエラスチンを加水分解する), Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)で、管腔から培地を通して外膜まで灌流する。コントロールラットには、2mlの生理食塩水単独を灌流した。灌流の最後に、大動脈のクランプをはずし、結紮およびカテーテルをはずし、大動脈を結紮し、大動脈の透過性を確認する。創傷を閉じ、そしてラットをケージに戻し、そしてAMDの存在(例えば、ドルーゼ、円板状癍痕または脈絡膜の新生血管形成)およびAAAについてモニターした

。

【0248】

あるいは、このラットを、他のプロテアーゼ（例えば、コラゲナーゼ、パパイシ、トリプシン、キモトリプシン、コンドロイチナーゼ、プラスミン、プラスミノゲンアクチベーターまたは「エラスターゼ活性」（すなわち、性中架橋エラスチンを可溶化し得る）を有する任意の他のプロテアーゼ）またはエラスチン分解性プロテアーゼ（例えば、マクロファージもしくは好中球由来のプロテアーゼ）で灌流し得る。チオグリコレート（thioglycollate）または他の炎症性刺激物質での灌流はまた、大動脈における炎症性応答を誘導し、それによってAAAまたはAMD影響を悪化させる。

【0249】

あるいは、Anidjar/Dobrinラットを、大動脈を弱らせ、そして樹状細胞およびマクロファージに対して化学走化性であることを示すエラスチン分解産物（EDP）を注入し得る。例えば、ペプチドVal-Gly-Val-Ala-Pro-Glyを大動脈に注入し、そして大動脈の拡張をモニターし得る。（Senior, R.M.ら, J. Cell Biol., 99:870-874, 1984）。このラットを用いて、損傷した大動脈（例えば、EDPによって引き起こされた）への免疫細胞の浸潤を阻害する薬剤（例えば、CD18、汎白血球（pan-leukocyte）抗原に対する抗体）の効果（解離に寄与するマクロファージの移動をブロックする）をモニターし得る（Ricci, M.A.ら, J. Vasc. Surg., 23:301-307, 1996）。

。

【0250】

Anidjar/Dobrinラットをまた、本明細書中上記のAAAの病理に関与すると考えられる自己抗体AAP-40、IgGに対する40kDaタンパク質または任意の他の薬剤を注入し得る。

【0251】

（実施例5：AAAについてのラットモデル）

Anidjar/Dorbinnラットを、膵臓エラスターゼでの腹大動脈の注

入により作製する。(Anidjar, S.ら, Circulation, 82 : 973 - 981, 1990, この技術は、本明細書中に参考として援用され、以下に簡潔に記載される)。簡単には、雄Wisterラットの腹大動脈の1cmのセグメントを分離し、そして灌流する。動物を6%ペントバルビタールナトリウムで麻酔し(0.1ml/100g体重)、そしてPE10ポリエチレンカテーテルを、その先端が腎臓下部腹大動脈に達するまで双眼手術用顕微鏡下で大動脈に挿入する。大静脈を側腹切開により大動脈から解離させ、側副動脈を結紮し、そしてカテーテル先端の位置を確認する。腹大動脈を左腎静脈のレベルでクランプし、そして1cm下でカテーテルの周りを結紮する。次いで、腹大動脈のこの分離したセグメントを、2mlの適切な試験溶液(速度、1ml/時間)(例えば、2mlの通常生理食塩水中に15ユニットの膵臓エラスターゼ(I型; 1ユニット = pH 8.8、37 で20分間に1mgのエラスチンを加水分解する), Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)で、管腔から培地を通して外膜まで灌流する。コントロールラットには、2mlの生理食塩水単独を灌流した。灌流の最後に、大動脈のクランプをはずし、結紮およびカテーテルをはずし、大動脈を結紮し、大動脈の透過性を確認する。創傷を閉じ、そしてラットをケージに戻し、そしてAMDの存在(例えば、ドルーゼ、円板状瘢痕または脈絡膜の新生血管形成)およびAAAについてモニターした。

【0252】

あるいは、このラットを、他のプロテアーゼ(例えば、コラゲナーゼ、パパイニン、トリプシン、キモトリプシン、コンドロイチナーゼ、プラスミン、プラスミノゲンアクチベーターまたは「エラスターゼ活性」(すなわち、性中架橋エラスチンを可溶化し得る)を有する任意の他のプロテアーゼ)またはエラスチン分解性プロテアーゼ(例えば、マクロファージもしくは好中球由来のプロテアーゼ)で灌流し得る。チオグリコレート(thioglycolate)または他の炎症性刺激物質での灌流はまた、大動脈における炎症性応答を誘導し、それによってAAAまたはAMD影響を悪化させる。

【0253】

あるいは、Anidjar/Dobrinラットを、大動脈を弱らせ、そして樹状細胞およびマクロファージに対して化学走化性であることを示すエラスチン分解産物(EDP)を注入し得る。例えば、ペプチドVal-Gly-Val-Ala-Pro-Glyを大動脈に注入し、そして大動脈の拡張をモニターし得る。(Senior, R.M.ら, J. Cell Biol., 99:870-874, 1984)。このラットを用いて、損傷した大動脈(例えば、EDPによって引き起こされた)への免疫細胞の浸潤を阻害する薬剤(例えば、CD18、汎白血球(pan-leukocyte)抗原に対する抗体)の効果(解離に寄与するマクロファージの移動をブロックする)をモニターし得る(Ricci, M.A.ら, J. Vasc. Surg., 23:301-307, 1996)。

【0254】

(実施例6:加齢と関連したドルーゼおよび加齢性黄斑変性はアテローム硬化症、弾力線維症、アミロイドーシス、および膜性増殖性糸球体腎炎(dense deposit disease)に共通するタンパク質を含む)

この研究室での最近の研究により、ビトロネクチンがドルーゼの主要な成分であることが明らかになった。ビトロネクチンはまた、種々の疾患と関連した異常な沈着物の成分であるので、ヒトドナーの眼由来のドルーゼを、他の細胞外の疾患沈着物に対する構成的類似性について試験した。この実験に用いたヒトドナーの63個の眼は、死亡してから4時間以内にThe University of Iowa Lions Eye Bank(Iowa City, IA)から得た;ドナーの年齢は45歳から96歳の範囲にわたった。ドルーゼを堅いまたは柔らかいに分類した。少なくとも5名のドナーからの組織を、使用した各抗体でアッセイし、そのうち少なくとも2名のドナーは、AMDの臨床記録があり、そして各ドルーゼ表現型を少なくとも2名のドナーにおいて試験した。ヒトドナー組織の使用についての施設内監査委員会の承認を、The University of Iowaのヒト被験体委員会(Human Subjects Committee)から得た。29の異なるタンパク質またはタンパク質複合体に対する34の抗体を堅いドルーゼ表現型および柔らかいドルーゼ表現型を用

いて免疫活性について試験した。これらの分析により、ドルーゼの分子組成の部分的プロフィールが提供される（以下の表Aを参照のこと）。血清アミロイドP成分、アポリタンパク質E、免疫グロブリン軽鎖、第X因子、および補体タンパク質（C5およびC5b-9複合体）は、全てのドルーゼ表現型において同定された。多くのこれらの分子をコードする転写物はまた、網膜、網膜色素上皮および/または脈絡膜により合成されることを見出した（以下の表Bを参照のこと）。ドルーゼと他の疾患沈着物との間の構成的類似性は、AMDと動脈壁破裂障害（アテローム硬化症を含む）との間の相関に照らして有意であり得る（以下の表Cを参照のこと）。これらのデータは、類似する経路がAMDと他の動脈壁破裂障害の病理に関与してい得ることを示唆する。

【0255】

【表A】

表 A: ドル-ゼの免疫反応性

抗原	供給元	濃度	数	ドル-ゼ
フィブリン	Accurate	1:50	5	-
アミロイド A	Dako	1:50	8	+/-; 胞
アミロイド B	Dako	1:10	7	-
アミロイド前駆タンパク質	Boehringer Mannheim	1:20	5	-
アミロイド P 成分	Dako	1:50	6	++
	Calbiochem	1:50	5	++
α1-3γ4キモトリプシン	Dako	1:50	6	+/- (var.)
	Calbiochem	1:50	5	+/- (var.)
α1-3γ4トリプシン	ICN	1:50	5	-; 稀に +
アポリポタンパク質 A1	Calbiochem	1:50	6	-
アポリポタンパク質 B	Chemicon	1:20	6	-
	Dako	1:50	5	-; 稀に +/-
アポリポタンパク質 E	Calbiochem	1:50	9	+
心産性トリウム利尿因子	Chemicon	1:50	5	-
C-反応性タンパク質	Dako	1:50	5	-; 稀に +/- (var.)
カルシトニン	Dako	1:50	5	-
補体 C1q	Calbiochem	1:50	5	-
補体 C3	Dako	1:50	5	-; 稀に + (var.)
補体 C5	Dako	1:50	5	++
補体 C5b-9	Dako	1:50	5	++
シスタチン C	Accurate	1:50	5	-; (var.)
第 X 因子	Dako	1:50	9	+
フィブリーゲン	Dako	1:50	5	-; 稀に +/- (var.)
ゲルリリン	Chemicon	1:50	5	-
HLA-DR	Accurate	1:25	10	+
	Dako	1:200	10	+
免疫グロブリン K	Boehringer Mannheim	1:50	8	-; 稀に +/-
免疫グロブリン λ	Dako	1:50- 1:2000	9	+/-; 稀に +
β2 ミクログロブリン	Boehringer Mannheim	1:50	5	-; 稀に +/-
プロトロンビン	Dako	1:50	5	+(胞)
Tau	Dako	1:50	5	-
トランスサイレチン	Boehringer Mannheim	1:50	9	+/- (var.)
ユビキチン	Chemicon	1:50	5	-
	StressGen	1:100	5	-; 稀に +/-

略語: ++ = 非常に強い(不安性の)標識; + = 大部分のドナーで強い標識; +/- = 弱い標識; - = 検出された標識なし; (var.) = ドナー間またはドル-ゼ間で変動あり; 胞 = ドル-ゼ内の球状輪郭の標識

【0256】

【表B】

表 B: 網膜, RPE/脈絡膜 および肝臓 での RT-PCR 結果

遺伝子名	プライマー-配列	Ret	R/Ch	RPE	Gen	肝臓
3'UTR	SN 5' GTCGAGATGCACACAAGAGTG 3' AS 5' TCCTTCAGTTTACTGGAGATCG 3'	+	+	+	-	+
3'UTR P	SN 5' GCCAGGAATATGAACAAGCCG 3' AS 5' CAAATCCCCAATCTCTCCAC 3'	-	-	-	.*	+
3'UTR B	SN 5' TGAACACCAACTTCTCCACG 3' AS 5' GGCGACCTCAGTAATTTCTTG 3'	+	+	-	-	+
3'UTR E	SN 5' GGTCGCTTTTGGGATTACC 3' AS 5' CTCCAGTTCCGATTGTAGGC 3'	+	+	+	-	+
補体 3	SN 5' GTTCAAGTCAGAAAAGGGGC 3' AS 5' GTGTCITGGTGAAGTGGATCTG 3'	+	+	+	-	+
補体 5	SN 5' ATGGTATGTGGACGATCAAGGC 3' AS 5' TATTGCTCGGTAACCTTCCCTG 3'	+	+	+	-	+
補体 9	SN 5' AATGAGCCCCTGGAGTGAATG 3' AS 5' ATGTCAGAGTGTTCCATCCCG 3'	+	+	-	-	+
第X因子	SN 5' GAGCGAGTTCTACATCCTAACG 3' AS 5' CACGAAGTAGGTGTCCITGAAG 3'	+	+	-	-	+
7αブリンゲン	SN 5' AGACTGGAAC TACAAATGCC 3' AS 5' AGATTCAGAGTGCCATTGTCC 3'	-	+	-	-	+
Ig K	SN 5' ACGTTTGATTCCASYTTGGTCCC 3' AS 5' GAMATYSWGATGACICAGTCTCC 3'	-	+	-	-	+
Ig λ	SN 5' ACCTARACGGTSASCTKGGTCCC 3' AS 5' TCYIMTGWGCTGACTCAGSMCC 3'	+	+	-	-	+
アトロニン	SN 5' GGGCTGGATGAGGACTCAG 3' AS 5' AAGGCAACAGGCTTCTTCAG 3'	-	-	-	-	+

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

【 0 2 5 7 】

【表C】

表 C: 細胞外疾患沈着物の組成比較

	VN	アミロイド P	アポ E	補体	入り組んだ エラスチン	PGs	脂質	カルシウム
ドルーゼ ^a	+	+	+	+	?	-	+	+
弾力線維症	+	+	?	+	+	?	- *	? †
アミロイド ^b	+	+	+	+	+	+	-	+
膜性増殖 性糸球体 腎炎	+	+	?	+	?	+	+	?
樹状アーク	+	+	+	+(C5b-9)	+		+	+

* スタン親和性は、光線性弾力線維症とセモに記載された。

† 弾力線維のカルシウム沈着は、弾力線維仮性黄毛腫で生じる

(実施例7: 免疫媒介性プロセスに関与する樹状細胞およびタンパク質は、ドルーゼと関連し、そしてドルーゼ生体発生 (biogenesis) において中心的役割を果たす)

ドルーゼは、加齢性黄斑変性 (AMD) の発生に対するかなりの危険因子である。しかし、それらの起源については比較的ほとんど分かっていない。本発明者らは、最近、ドルーゼ内の異なる多糖類から構成される中心ドメイン (centralized domain) の存在を記載した (J Histochem Cytochem 47; 1533-9, 1999)。電子顕微鏡分析により、脈絡膜の細胞から誘導された細胞プロセスは、ブルーフ膜を破り、そしてドルーゼ内の球状コアで終わることを明らかにした。

【0258】

脈絡膜細胞のコアの終末が生じる脈絡膜細胞の免疫表現型を決定し、そしてそれらのドルーゼ生体発生に対する潜在的関係を評価するために研究を行った。この研究に用いたヒトドナーの眼を、死後4時間以内にThe University of Iowa Lions Eye Bank (Iowa City, IA) から得た。ヒトドナー組織の使用についての施設内監査委員会の承認を、The University of Iowaのヒト被験体委員会 (Human Subjects Committee) から得た。後極、または鋸状縁と

斑との間にまたがる後極のウェッジを、30名のドナーから処理し、OCTに包埋し、液体窒素中で急速凍結し、そして-80で保存した。組織を低温槽で6~8µmの厚さの切片にした。共焦点レーザー走査型顕微鏡および免疫組織化学を用いて、ヒトドナー眼におけるドルーゼ関連コアを試験した。切片の免疫標識を、種々の細胞集団(内皮細胞、リンパ球、顆粒球、単球/マクロファージおよび樹状細胞を含む)に対する抗体の一群を用いて行った。

【0259】

抗CD45抗体は、より小さなドルーゼにおけるPNA結合コアと同時に位置決めする。ドルーゼコアおよびそれらが誘導された細胞は、CD45、CD1a、CD83、CD86、およびHLA-DR抗体と強く反応性である。定量的研究により、ドルーゼ関連コアが、ドルーゼの約40%に存在することが示される。ドルーゼコアは、より小さなドルーゼにおいてより顕著であるようであり、そしてまたさらなるドルセノイド(drusenoid)付着成長により取り囲まれなかったブルーフ膜内に推定ドルーゼ前駆体である孤立性コアとして検出される。

【0260】

超微細構造分析と組み合わせた場合、免疫表現型決定データにより、ドルーゼコアが脈絡膜の樹状細胞から誘導されるという強力な証拠が提供される。より小さなドルーゼおよび推定ドルーゼ前駆体における樹状細胞誘導コアの同定は、全てのドルーゼ表現型に存在するHLA-DR、免疫グロブリン軽鎖、ビトロネクチン、および終末補体複合体の存在を示す本発明者らの以前の研究と組み合わせると、樹状細胞の役割ならびにドルーゼ生体発生および初期AMDにおける免疫媒介プロセスを示唆する。

【0261】

(実施例8:「脈絡膜線維症」の形態学的特徴付け)

ヒトドナーの眼--AMDおよび/または動脈壁破裂障害(AAA、TAA、大動脈狭窄症およびアテローム硬化症)の臨床記載ありおよびなし、かつ明らかなドルーゼ形態あり--を、透過型電子顕微鏡観察および免疫組織化学的観察を同時に行うために使用した。この研究で用いられた眼は、Mid America

Transplant Services (St. Louis, MO)、the Iowa Lions Eye Bank (Iowa City, IA)、the Heartland Eye Bank (Columbia, MO) および the Virginia Eye Bank (Norfolk, VA) から得た2000対を超えるヒトドナーの眼(0歳齢~102歳齢の間)の集まり(repository)から選択し、そして死後4時間以内に処理した。全ての眼の肉眼的病変特徴、ならびに対応する眼の病歴、眼底写真および血管造影図(利用可能な場合)を網膜外科医が読みとった。ドナーの約18%が何らかの形態の臨床的に診断されたAMDを有しており;これらは、斑状色素変化、黄斑ドルーゼ、地図状萎縮症(geographic atrophy)、脈絡膜新生血管形成、および/または円板状瘢痕を含む。AMDの臨床記録があるおよびなしの眼をこの研究に用いた。

【0262】

これらのドナーのうち151名からのRPE-脈絡膜-強膜複合体を走査型電子顕微鏡検査のために処理した。死後4時間以内に、組織を最低24時間の間、1/2強度のKarnovskyの固定液中で固定し、そして100mM カコジル酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)に移し、脱水し、包埋し、切片にし、そして顕微鏡写真を撮影した。

【0263】

電子顕微鏡のために処理した同じ眼からの組織を、光学組織学的(Elastachrome染色;H&E)および免疫組織化学的研究のために処理した。抗ビトロネクチン抗体をTelios(San Diego, CA)から;コラーゲンI型、III型、V型およびVI型をChemicon and Southern Biotechから;エラスチンをElastin Productsから;フィブリリン-1をChemiconから;ならびにフィブリン(finlin)3および4をRupert Timplから得た。ヒトドナーRPE-脈絡膜の選択した標本を、0.1M カコジル酸ナトリウム緩衝液中の4%(パラ)ホルムアルデヒドに浸漬することにより固定し、そしてレーザー走査型共焦点顕微鏡用に処理した。画像を取り込み、そしてNikon赤外線顕微鏡を装

備したBioRad 1024レーザー走査型共焦点顕微鏡を用いて示した。

【0264】

これらの個体のうち30名の脈絡膜支質を、電子顕微鏡で観察されるように新たに合成したコラーゲン、エラスチン、エラスチン関連微小フィラメント、ならびに他の明らかな構造タンパク質および原線維で満たした。予備免疫組織化学分析に基づいて、この状態と関連するコラーゲンは、主に、III型およびIV型であるようであり、そして特定の遺伝性疾患および後天性疾患としばしば関連する、代表的には「らせん状」または「擦り切れた (frayed)」形態を示す。この以前には記載されていない現象(「脈絡膜線維症」といわれる)は動脈壁破裂障害において共通な多くの形態学的特徴を共有する。

【0265】

【表7】

TEM 脈絡膜線維症データベース表1

ドナー#	年齢	性別	死亡原因	過去の病歴	眼の病変	脈絡膜線維症 少/中/多 (脈絡膜中)	検眼中	検査法 EM/RB	AMD, AAA
84-97	6h	WM	染色体異常		AM	1-			
					AI-1	1c/e		EM	
					AI-2	1c/e			
124-98	21y	WM	自殺, GSW-head	喫煙者	BM	1c		EM	
					BI-2	1c			
140-98	25y	CF	血液検査 時限検査	腎結石 非喫煙者	AM	1c/e			
163-98	25y	WM	自殺, GSW	非喫煙者	AI-2	1c			
183-97	32y	WF	脳腫瘍	精神疾患 精神薬連用	AI-1	2c/e		EM	
					BI-1	?	2c/e	EM	
125-97	49y	WM	心筋症	CHF, 系統性腎炎	AM	?		EM	
					AI-1	1c		EM	
64-98	44y	WM	交通事故 vehicle acc.	非喫煙者, 眼: 1d	BM	1c		EM	
					AM	?		EM	
152-98	48y	WM	急性重症肺炎 肺炎(伴う)	非喫煙者	BM	2c/e			
93-98	55y	WM	MI	CAD, CAAG-88, EIC	BI-2	2c/e		EM	
					BI-2	7		EM	
112-98	55y	WM	MI, JLV不全	Tabac/cannab smok	BI-2	1		EM	
					BI-2	1		EM	
147-98	52y	WM	MI	腎不全 (透析) 糖尿病(糖尿病性網膜症) 腰疼(年々)喫煙者	BI-2	2-3c/e			
					AM	0		EM	
165-98	57y	WM	JAVM	喫煙者	AI-2	2		EM	
					AI-3	1c/e		EM	
					AI-2	2c/e		EM	
					BI-3	1c/e			
204-98	58y	WM	肺, HTN	肺がん, IDDM, PVD	BI-2	2c/e	2c/e		
					AI-3	1c		EM	
					BI-3	1c/e		EM	
#5-98	63y	CF	子宮がん(根治術)	喫煙者 HTN, AO弁機能不全	AI-1	3c/e			
					AI-2	1e	1c		
					BI-1	2c/e	3c/e	EM	
					BI-2	1c		EM	
94-98	65y	WF	腎不全	ASHD, PVD, CVA, JAVM	BI-2	1c/e		EM	AMD
					BI-2	1c/e			
39-98	67y	CM	MI	以前に喫煙者	BI-2	1c/e		EM	
					AI-2	2+c/e		EM	
56-98	64y	WM	脳内出血	喫煙者	BI-2	?		EM	
					BI-2	2c/e	2c		
71-98	68y	WM	敗血症 急性性髄膜炎	以前に喫煙者 COPD, CHF, 腎不全	BI-3	2c/e			
73-98	63y	WM	脳室内出血	喫煙者 HTN, 喫煙者	AT-3	2c/e		EM	
42-98	72y	WM	MI	心筋症 糖尿病AMD	HTAM	1c/e		EM	AMD/NVM
					AI-2	1c		EM	
59-98	70y	WM	肺引性肺炎	非喫煙者 不整脈	NAM	1c		EM	AMD

TEM脈絡膜線維症データベース表1 (ツグキ)

55-98	WM	83 Y	眼がん、数血症	糖尿病、COPD、喫煙	BT-2	3 c/e	EM	AMD
85-98	WM	86 Y	眼がん、数血症、心不全	HTN	AM	2 c/e	EM	AMD
60-97	WF	87 Y	TAA、網膜剥離	血管新生がん	AI-1 AI-1 AI-2 BI-1 BI-2	3 c/e 3 c/e 3 c/e 3 c/e 3 c/e	EM EM R R	AAA
117-97	WM	81 Y	CPA	AAA、糖尿病	COAM	3 c/e	EM	AAA
#9-98	WF	80 Y	数血症	HTN、肺炎	EM	2 c/e	EM	
14-98	WF	82 Y	MI	示知りかた	BI-2	2 c/e	EM	
21-98	WM	87 Y	眼内数血症	非喫煙者	BI-2	3 c/e	EM	
28-98	WM	81 Y	力弱、数血症		BI-2	?	EM	
38-98	WM	82 Y	MI	眼内症、喫煙者	AI-2	?	EM	緑内障
239-98	WF	83 Y	CHF	HTN、乳がん、AMD	AM	?	EM	AAA、TAA
278-98	WF	80 Y	Dissedl. AA	TAA、喫煙者	BI-2	3 c/e	EM	
100-97	WM	82 Y	MI	CVA、MI、喫煙者	BI-2	3 c/e	EM	TAA
48-98	WF	83 Y	数血症性(30%)	示知りかた、AMD	AI	2 c/e	EM	AMD
51-98	WF	83 Y	耳鳴、心不全	CVA、CHF、IDD、HTN、HOH、CH7	AM	3 c/e	EM	AMD
58-98	WF	84 Y	結膜がん	HTN、AMD、POAG	AM	3 c/e	EM	AMD、POAG
68-98	WF	81 Y	CVA/CHF	非喫煙者、大動脈硬化症、弁膜症、心臓病、HTN	BI-2 EM	2 c/e 2 c/e	EM EM	
100-98	WF	90 Y	頭部内出血	AMD、白内障	AT-3	?	EM	
107-97	WF	101 Y		非喫煙者、示知りかた	BT-3 AT-a	2 c/e 2+ c/e	EM EM	
161-98	WM	78 Y	数血症、CHF	HTN、PVD、CHF、心不全、AMD-GA	BI-1 BI-2 AI-1 AI-1	?	EM EM EM EM	AMD-GA
27-98	WM	77 Y	呼吸不全、肺がん	以上口喫煙者、肺がん、糖尿病、HTN、TIA、CAD、大動脈硬化症、心臓病、示知りかた、非喫煙者	EM	3 c/e		眼内線維症
152-97	WM	57 Y		肺がん、NIDDM	BI-2	3 c/e		
256-98	WM	77 Y	CARG/CVA 1枚	肺がん、数血症、AMD	BI-2	2 c/e		AMD、眼内線維症
				HTN、COPD、肺がん、示知りかた、大動脈硬化症、心臓病、非喫煙者	BI-2	3 c/e		AAA、網膜剥離
				以上口喫煙者	EM	?		

TEM 脈絡膜線維症シタハリス表1 (續三)

27-98	77 WM	中眼線維症 呼吸不全	大動脈 AHA, HTNAI-2 TIA, CAD, 呼吸不全	27 c/e	2 e		
38-97	94 WF	呼吸不全	AMD, HTN, 出血 心不全	3 c/e	3 c/e		AMD
24-98	81 WM	MICHF	非喫煙者	3 c/e	2 c/e		
91-98	81 WM	肺病, 眼出血 肺力少	DM, PVD, CCBT3 HTN, 非喫煙者	?	?		EM
94-98	65 WF	呼吸不全	AMD, ASHO, PUD, BM 非喫煙者	?	?		EM
114-98	76 WF	CHF	慢性冠動脈病 CAD, smp MI, HTN, CHF 腎不全	?	?		EM
159-98	71 WM	肺出血	非喫煙者 AAA, AMD, 動脈, AI-2 手術	?			EM
180-99	82 CM	肺病	HTN, CABG 非喫煙者 多眼器	?			EM
			不全, 心臓腫瘍 CHF, 急性腎不全 動脈硬化 下行胸大動脈 非喫煙者				
31-99	69 WF	不全 AAA	心臓性動脈硬化, BM 糖尿病, 全身性紅斑 大動脈 HTN, 慢性 動脈硬化, 80, 肺動脈閉塞, 肺動脈腫大	?			EM

【0266】

【表8】

STEM細胞膜線維症アータハース表2

トナ	年齢 (性別)	発症原因	過去の病歴	眼の病変	脈管病変 (線維症)	検査法	EM/RF/AMD/AA
1-92	71 WM	小腸血腫		BM		1	
10-92	53 M	MI		BTb		2	
20-92	63 CM	急性腎不全		BM		1	
28-92	61 CF	呼吸器病	肺病、高血圧	AM		2	
44-92	79 WM	肺腫瘍	呼吸器病、自血球減少	ATb		2	
45-92	48 BM	心臓-肺疾患、Tb MT		AM		1	
49-92	18 BM	貧血、GSW Ig		ATb		2	
58-92	17 WM	MVAに於ける		AM		1	
81-92	80 BF	尿管癌	CPA、肺腫瘍	BM	?		
89-92	38 BF	大腸癌		AM		1	
91-92	54 WM	大腸下出血		BM		2	
93-92	62 WF	心臓病		AM		1	
94-92	72 WF	大腸出血		BTb		2	
96-92	71 WM	心臓血管病変		AM		2	
97-92	59 WF	急性CHF		AM		2	
98-92	22 WM	腎臓病		AM		1	
99-92	69 WF	呼吸不全	肺病	ATb		1	
100-92	36 WF	肺病、呼吸不全	呼吸器病、HT	AM		2	
101-92	58 WF	心臓病		BM		2	
102-92	65 WM	心臓病		AM		1	
104-92	53 WF	呼吸器病		AM		2	
109-92	22 WM	急性CHF		BM		1	
110-92	30 BM	GSW	呼吸器病、TB	AM		2	
111-92	62 WM	肺病		ATb		1	
113-92	42 WF	呼吸器病		BM		2	
114-92	58 WM	呼吸器病		AM		1	
115-92	13 WM	呼吸器病		AM		1	
116-92	78 WF	呼吸器病		AM		1	

TEI 脈絡膜線維症予-9ハス表2 (続五)

156-92	36 WM	動脈硬化 + 腎臓病 / MVA	眼精症	AM	2	
		硬膜下出血				
158-92	68 WF	眼精症	HTN	AM	1+	
162-92	45 WM	眼精症		AM		
163-92	52 WF	硬膜下出血	HTN, 片頭痛, CHF, ATa	AM	?	2
			心臓病			
166-92	98 WF	CHF	眼精症	ATB		2
168-92	60 WM	全脱臼, CIA	眼精症	AM		2
169-92	59 WF	CHF + 硬膜下出血	HTN	AM		2
				ATD		
171-92	38 WM	PE		AM	?	1
175-92	55 BM	眼精症		ATC		1
176-92	66 WF	眼精症		BM		2
		内服薬		AM		2
179-92	37 WF	PE	EIO 心臓病	AM		2
			HTN			
180-92	62 BM	眼精症		BM	?	
181-92	85 WF	?	TIA	BM		2
182-92	47 WM	眼精症		AM	1+	
183-92	72 WM	MI	GI 出血	ATB		2
185-92	96 WM	CHF + 腎臓病		BM		1
				BTa		3
				BTb		3
				BTC		2
				BTd		2
				BTe		2
				BI		2
186-92	68 WF	CVA		AM	1+	
				ATb		1
187-92	79 WM	眼精症		AM		2
		腎臓病		ATb		2
188-92	14 WM	腎臓病		AM	1+	
		腎臓病				
189-92	64 WM	腎臓病	CVD, 糖尿病	AM	1+	
192-92	86 WF	心臓病		BM		2
193-92	68 BF	眼精症		AM		2
				ATb		2
194-92	78 WM	心臓病	CHF	AM		1
		腎臓病	腎臓病	ATb		1
195-92	75 WM	心臓病	腎臓病	CV-AM		1

TEM脈絡膜線維症のデータベース表2 (続)

198-92	82 WM	知形理心症の疑い CV 異常 心臓 - ICD 停止	BM			2			
199-92	60 WM	がん	AM			1			
200-92	53 WM	腎臓機能不全 HTN, CHFを伴う 心臓	BM			1			

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

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

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

【0267】

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

【0268】

実施例9

表D: AMDおよび動脈壁破裂障害における遺伝子発現

【0269】

【表D】

分子	線維症におけるコントロールに対する発現
BIG H3	減少
b1-インテグリン	増加
コラーゲン 3 a1	変化なし
コラーゲン 1a1	変化なし
コラーゲン 1a2	変化なし
コラーゲン 6 a1	変化なし
コラーゲン 6 a2	増加
コラーゲン 6 a3	増加
エラスチン	増加
エミリン (Emilin)	"
フィリピン1	変化なし
フィリピン2	変化なし
フィリピン3	変化なし
フィリピン4	変化なし
フィリピン5	変化なし
FBN-1	?
FBN-2	?
フィコリン (Ficolin)	?
HLA-DR b	変化なし
HME	増加
IgK	変化なし
ラミンレセプター	変化なし
Lam C1	?
Lam C2	変化なし
Lam C3	?
LO2	変化なし
LO4	変化なし
LTBP-1	?
LTBP-3	?
LTBP-4	減少
MFAP-1	減少
MFAP-2	減少
MFAP-3	変化なし
MFAP-4	変化なし
MMP-2	変化なし
MMP-7	?
MMP-9	?
MMP-12	変化なし
PI-1	減少
PI-2	減少
PI-3	?
PLOD2	変化なし

(表D の続き)

PM5	変化なし
RPE-65	変化なし
TIMP-1	変化なし
TIMP-2	変化なし
TIMP-3	変化なし
グロネクチン (Vitronectin)	増加 ?

(実施例10: AMD / 動脈壁破裂疾患に関連する自己抗体:)

ドルーゼ発生を含むAMDおよび動脈壁破裂障害の病因における自己抗体の役

割と取り組むために、本発明者らは、AMDおよびAAAを有するドナーの血清中に存在し得る抗ドルーゼ/ブルーフ膜/RPE自己抗体の同定のため、エンリッチされたドルーゼ調製物を用いて一連の予備的実験を行った。

【0270】

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

【0271】

上記と同じ8人のドナー由来の血清をスクリーニングした。1人のAMDドナー由来の血清(#90-98)は、RPE(DR+およびDR-の両方)およびRPE/脈絡膜調製物において約35kDaの1つのバンドをポジティブに標識した。約60kDaの第2のバンドはDR+タンパク質抽出物においてのみ弱く標識された。AAAドナー由来の血清(#189-97)は約53kDaのタンパク質と反応した。このバンドは3つのタンパク質抽出物の全てで標識された。この血清試料がDR+試料においてのみ標識する約64kDaの1つのバンドがあった。

【0272】

AMD/AAAを有するドナーにおける血清抗ドルーゼ/RPE自己抗体の存在は、これらの障害における共通の免疫仲介プロセスに対する役割の可能性を示唆している。

【0273】

(実施例11:AMDおよび動脈壁破裂障害における差次的遺伝子発現分析:
)

選択されたAMDおよびAAA表現型と年齢を適合させたコントロールとの4

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

【0274】

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

【0275】

【表9】

遺伝子多型分析 クラスタリング

7-1	Pos	Pat	7-0/A	Int	7-0/B	Int	7-07	比率	Int. Diff	7-0-ID	Cluster	GB Acc	ユニオン	FL
1	107	2	1176.28	5634.56	23105.59	4.96	4658.28	128473	Cluster	R11336	Hs. 137763			
1	115	8	56.97	1797.19	17400.51	9.999	1740.22	382701	Cluster	AA069532	Hs. 5729			
1	120	4	1822.77	6556.43	17026.8	3.587	4733.66	52489	Cluster	H24274	Hs. 111	HT2447		
1	121	1	212.69	2005.38	16902.68	9.428	1792.69	24032	Cluster	H78285	Hs. 90863			
6	116	4	163.58	1598.01	14013.13	9.769	1434.43	209303	Cluster	H63366	Hs. 114004			
4	120	5	157.71	1546.53	13619.05	8.806	1388.83	245873	Cluster	N72922	Hs. 22341			
3	123	7	302.16	2050.34	11862.4	8.786	1748.18	60374	Cluster	I39572	Hs. 760	HT125		
4	114	3	103.78	1272.09	11681.88	8.999	1168.3	154571	Cluster	R54764	Hs. 28204			
6	109	4	175.41	1486.99	11150.73	8.489	1313.58	204705	Cluster	H57226	Hs. 75641	HT1045		
2	101	5	854.08	3398.24	10129.68	3.98	2545.15	230370	Cluster	H79530	Hs. 16	HT1675		
2	101	7	502.82	2403.48	9085.11	4.78	1900.66	325821	Cluster	AA037110	Hs. 75970			
2	110	5	1363.71	4238.44	8934.73	3.108	2874.73	223293	Cluster	H66270	Hs. 75219	HT1234		
4	117	7	1222	3863.27	8890.6	3.243	2741.26	346854	Cluster	W78125	Hs. 47584			
6	112	4	687.51	2740.32	8509.41	4.105	2072.8	209281	Cluster	H65578	Hs. 114188			
1	106	5	384.91	1928.92	7737.58	5.011	1544.01	211857	Cluster	H68430	Hs. 109450			
1	103	6	691.74	2668.3	7624.31	3.857	1976.66	271256	Cluster	N44682	Hs. 44613			
5	123	5	82.28	812.89	7217.65	9.879	730.61	255777	Cluster	N27758	Hs. 43993			
6	108	4	673.92	2548.31	7087.75	3.781	1874.4	209276	Cluster	H63352	Hs. 38194			
1	118	2	781.1	2789.36	7045.66	3.528	1988.25	27689	Cluster	R13106	Hs. 139029			
5	119	4	645.56	2436.57	6789.91	3.774	1781.01	198896	Cluster	H83192	Hs. 62402			
6	121	5	466.27	2015.03	6693.1	4.322	1548.78	260214	Cluster	N45406	Hs. 141460			
2	116	5	591.78	2252.83	6323.28	3.807	1661.04	223625	Cluster	H46505				
2	101	6	435.12	1888.04	6304.44	4.339	1452.92	273917	Cluster	N46505				
1	117	1	2724.39	5641.93	6041.94	2.071	2917.54	22140	Cluster	T64807	Hs. 100132	HT2245		
1	112	3	160.84	1061.74	5955.53	6.609	901.09	69840	Cluster	T48696	Hs. 110286			
1	102	5	963.71	2920.39	5929.48	3.03	1856.68	213484	Cluster	H71668				
2	111	5	1565.45	3881.45	5742.45	2.478	2316.01	222246	Cluster	H86008				
6	106	2	1004.89	2937.73	5650.48	2.923	1832.63	135085	Cluster	R33918	Hs. 72824			
3	120	2	312.73	1485.68	6572.18	4.751	1172.83	36189	Cluster	R21373	Hs. 76335			
5	116	4	787.46	2520.84	5548.92	3.201	1733.38	203557	Cluster	H56112				
4	105	1	883.66	2597.03	5036.47	2.939	1713.37	118792	Cluster	I92527	Hs. 111916			
1	119	8	1077.33	2922.77	6006.66	2.713	1845.45	380535	Cluster	AA053898	Hs. 114818			
1	106	3	502.37	1851.41	4971.72	3.685	1549.05	137710	Cluster	R37989				
6	108	6	764.48	2326.29	4846.36	3.083	1571.81	306146	Cluster	W20101				
4	115	7	1283.96	3206.94	4803.01	2.498	1922.88	344774	Cluster	W74705	Hs. 1550	HT3851		
1	124	1	378.8	1543.61	4746.58	4.075	1164.81	22897	Cluster	I75253	Hs. 12333			
6	109	4	1389.32	3321.23	4734.26	2.425	1951.9	208059	Cluster	H62639	Hs. 103424			
8	124	6	1311.86	3223.23	4696.21	2.457	1811.37	306759	Cluster	W23985	Hs. 31840			
6	117	4	577.51	1855.77	4867.48	3.387	1378.25	204656	Cluster	H57192	Hs. 141602			
1	111	8	182.5	1011.75	4597.17	5.544	829.25	380878	Cluster	AA057398				
6	112	2	326.85	1394.27	4575.27	4.281	1068.62	135107	Cluster	R33933	Hs. 106200			
2	122	4	1090.95	2828.91	4498.36	2.591	1735.97	176883	Cluster	H45241	Hs. 108124			
1	117	5	492.25	1751	4477.6	3.557	1258.75	222032	Cluster	H85307	Hs. 78150	HT3629		
1	117	8	182.25	981.11	4398.7	5.438	808.86	380987	Cluster	AA057468				
6	120	5	215.73	1044.01	4008.33	4.838	828.28	263814	Cluster	N28595	Hs. 75428	HT3218		
1	115	8	477.77	1632.59	3948.08	3.417	1154.81	380988	Cluster	AA057467	Hs. 47068			
1	123	6	432.87	1530.32	3879.81	3.535	1087.45	267778	Cluster	N84196				

Cluster = 7259

遺伝子多型分析 行-カベ-ス |

5m08	7	1148.27	2754.46	3652.93	2.399	1605.19	562188	Cluster AA21593	Hs. 82129	HT3659
1h24	8	787.53	2147.48	3708.42	2.727	1359.96	382487	Cluster AA069746	Hs. 84244	HT383
6i15	2	373.91	1371.78	3660.87	3.669	987.87	130980	Cluster R23027	Hs. 138216	
6h13	2	395.69	1415.11	3645.8	3.576	1019.42	133702	Cluster R28577		
2f01	2	230.88	1035.87	3515.96	4.491	805.2	28229	Cluster R13333	Hs. 21305	
6i22	6	535.45	1665.93	3517.31	3.111	1130.49	308412	Cluster W20275		
6i10	2	1079.98	2551.97	3478.28	2.363	1471.99	132237	Cluster R25219	Hs. 23817	
3i20	7	654.63	1843.77	3343.46	1.628	2054.21	114073	Cluster T79540	Hs. 111782	HT1389
2i19	2	599.82	1742.2	3318.07	2.905	1142.38	28468	Cluster R13379	Hs. 64135	
1i24	3	136.08	741.65	3299.14	5.449	605.45	19990	Cluster R64675	Hs. 24187	
5i23	6	331.56	1216.26	3258.06	3.674	896.7	297963	Cluster N88325	Hs. 137909	
4i18	2	1264.65	2795.78	3195.13	2.172	1470.93	37482	Cluster R33062		
1i23	4	189.47	675.74	3193.53	4.647	687.28	50141	Cluster H17788	Hs. 31056	
4i23	2	371.59	1288.77	3181	3.488	917.18	37109	Cluster R34443		
2i13	4	653.3	2132.38	3134.63	2.47	1269.07	174684	Cluster H40849		
8i22	1	977.26	2289.58	3111.47	2.353	1322.3	128181	Cluster R09793	Hs. 27931	
2i07	5	583.08	1667.72	3102.44	2.86	1084.86	230998	Cluster R86181	Hs. 138512	
3im23	4	835.38	2074.03	3075.28	2.483	1236.66	179805	Cluster H50920		
6i11	4	538.18	1583.6	3067.65	2.937	1044.43	52618	Cluster H29394		
2i20	4	184.88	848.95	3048.52	4.592	684.08	172473	Cluster N28101	Hs. 75503	HT3684
6i02	2	1234.95	2837.47	2995.38	2.138	1402.63	133002	Cluster R24476		
1i01	1	752.32	1920.24	2981.04	2.662	1167.92	21917	Cluster T66051		
2i12	3	419.6	1345.01	2966.42	3.205	825.42	142682	Cluster R71643	Hs. 141964	
1i01	6	731.53	1882	2859.8	2.579	1150.47	271252	Cluster N34571	Hs. 41863	
6i10	5	496.23	1483.88	2853.47	2.99	987.86	262754	Cluster N28295	Hs. 141435	
2i01	1	117.94	651.38	2846.02	5.523	533.42	110759	Cluster T83266	Hs. 100090	
4i20	7	94.4	574.28	2819.33	6.083	479.88	530260	Cluster AA11987		
5i02	1	1426.28	2874.44	2818.56	2.019	1448.17		Cluster #NAME?		
2i05	1	365.5	1230.09	2809.82	3.366	864.69	110893	Cluster T82878	Hs. 13756	
1i05	8	151.81	744.28	2804.96	4.903	592.48	380914	Cluster AA057495	Hs. 76224	HT3350
1i14	6	465.37	1417.51	2800.22	3.048	952.14	270035	Cluster N40806	Hs. 141444	
6i05	1	467.94	1417.75	2877.74	3.03	949.81	125638	Cluster R07461		
5i02	6	1029.9	2307.86	2863.74	2.241	1277.98	295400	Cluster W04464	Hs. 138522	
6i10	4	482.43	1436.72	2837.01	2.976	963.28	209204	Cluster H62020		
6i16	6	336.18	1159.02	2835.78	3.446	822.84	302070	Cluster W17034	Hs. 363	
2i11	5	1752.63	3263.61	2813.62	1.882	1510.98	222409	Cluster H86181	Hs. 141367	
6i03	7	2338.16	3983.14	2808.07	1.705	1846.97	626748	Cluster AA218447	Hs. 99808	HT115
1i03	2	422.22	1318.61	2788.02	3.118	854.39	128413	Cluster R11257		
2i09	2	1458.78	2857.58	2769.28	1.968	1408.78	28857	Cluster R14238		
1i14	3	387.9	1244.45	2747.88	3.208	856.54	137744	Cluster R68503	Hs. 138231	
6i21	3	549.28	1532.33	2742.42	2.79	883.05	47817	Cluster H11685		
1i03	4	364.21	1192.63	2712.67	3.275	828.42	49981	Cluster H29383		
4i23	3	242.97	834.18	2657.46	3.945	691.19	163354	Cluster R47887	Hs. 71388	
4i17	1	398.91	1246.36	2647.64	3.124	847.43	118302	Cluster T98236		
1i19	5	581.88	1532.3	2646.57	2.727	970.44	211202	Cluster H57887	Hs. 36554	HT889
1i06	5	448.71	1335.34	2638.61	2.978	866.62	220478	Cluster H87319	Hs. 1432	
6i19	5	1624.7	3030.57	2622.38	1.865	1405.87	259278	Cluster N41802		

Cluster = 77x9-

遺伝子ポリ分析
子-タ-ス1

1	23	8	537.38	1484.57	2616.8	2.763	947.2	361024	Cluster	AA054639	Hs. 36558
2	h04	4	1134.32	2370.98	2584.88	2.09	1236.65	177300	Cluster	H40720	Hs. 31775
4	109	7	286.02	1013.81	2579.65	3.545	727.79	511972	Cluster	AA102358	
1	a12	4	778.27	1845.08	2529.15	2.371	1066.81	20075	Cluster	H17348	Hs. 117688

Cluster = 0779-

素因子アレイ分析
データベース1

1	Scars	韓国 N2b4IR/Alu反復エレメントに類似(ESTs)
2	Scars	日本人 N2b5HB6S/L1反復エレメントに類似(ESTs)
4	Scarfams	大腸 #937204
1	Scars	初見 INR/Alu反復エレメントに類似(ESTs, Aluサブファミリー-SB2-E1と高度に類似)

【0276】

【表10】

遺伝子アレイ分析データベース

2	12045	2089.01	861.17	2978.43	2.426	1227.84	2324.61	1959009	なし	Source: 未知
3	3224	1354.87	2455.97	3.119	847.72	193170	837323	816077	なし	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
3	287	2301.34	1157.21	2908.85	2.182	1341.52	244528	1047464	10705	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
3	2071	1332.38	450.33	2888.81	3.181	811.25	112471	181895	1183	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
3	8124	840.88	190.33	2873.71	4.477	850.33	286331	197184	なし	Source: 未知
1	4098	7219	363.31	2848.71	3.337	831.09	306903	10228304	20943	Source: 未知
5	12336	748.1	184.8	2841.26	4.813	850.3	281664	1022194	なし	Source: 未知
3	2074	1148.1	333.2	2784.28	3.436	812.9	179922	1051007	88655	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
2	18186	918.08	278.55	2780.31	4.039	688.51	275942	1093669	86378	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
1	12001	1064.85	297.27	2748.33	3.581	787.38	24608	180490	13512	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
3	81258	4874.26	2550.22	2731.54	1.584	1724.05	286950	1084251	48742	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
5	1162	983.41	264.12	2678.26	3.723	719.3	37720	103435	なし	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
3	9183	4801.61	2818.63	2658.27	1.578	1684.52	148425	1112267	118489	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
1	2087	764.02	171.17	2648.33	4.464	582.86	310422	1011182	109819	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
3	1171	1418.32	208.41	2635.1	4.101	840.1	114411	178159	78558	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
3	13146	1370.01	478.86	2615.2	2.828	891.35	278269	1084918	118719	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
2	10144	823.26	201.36	2610.24	4.094	622.89	172851	102448	91748	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
2	2272	833.26	784.71	2610.26	3.246	2311.62	262231	813408	なし	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
1	19437	887.37	222.03	2533.81	3.815	847.28	208013	1027484	18399	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
8	1788	3378.44	3151.84	2500.24	1.448	1728.38	22478	174542	なし	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
2	17156	1348.08	478.61	2493.62	2.831	872.88	274378	1049006	33750	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
6	10088	1230.4	419.22	2380.86	2.935	811.19	302889	1008490	78152	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
1	10058	559.62	108.62	2377.84	5.249	433	289866	1005763	77208	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
3	2081	4618.76	3053.64	2367.33	1.813	1565.13	114928	1092734	なし	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
3	2081	976.21	112.59	2363.34	5.109	462.82	115547	179234	なし	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
3	1185	1148.21	390.65	2226.84	2.938	757.56	234826	104818	138587	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
3	1077	788.87	197.47	2224.76	3.884	871.4	324213	1047502	78847	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
4	1131	7404.01	5698.52	2214.28	1.256	1704.49	118431	101420	18804	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
5	1124	2689.82	1813.31	2089.15	1.777	1175.72	199841	1096571	93433	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
3	1064	676.23	122.91	2075.13	4.839	447.51	160235	108533	なし	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
3	4187	1400.28	568.43	2049.1	2.483	831.83	324847	1045482	30925	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
2	1078	1040.38	354.13	2016.18	2.938	686.27	274408	1049817	93814	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
6	10243	9144.85	757.06	1978.98	1.217	1627.58	47171	110763	21444	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
3	1175	738.48	201.02	1874.48	3.874	537.46	261837	109724	81988	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
3	2086	1988.84	1008.36	1883.7	1.982	890.38	273451	1045672	31	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
5	1034	3316.63	2163.51	1837.07	1.577	1233.12	251158	1099377	10148	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
2	1183	2060.16	1022.05	1814.2	1.857	878.12	223922	1086650	33887	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
2	1022	2028.18	1044.89	1809.35	1.541	894.84	31548	1020842	23078	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
1	1037	1821.81	892.59	1802.59	2.25	848.51	32723	1065913	78317	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
5	1037	366.83	59.86	1800.67	8.127	308.86	531514	10474032	83848	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
6	1246	1861.35	155.24	1800.14	4.018	4618.18	273374	105540	138892	GenBank: U01001 (Homo sapiens)
6	1246	1861.35	778.4	1878.94	2.132	1871.86	308594	1021382	なし	GenBank: U01001 (Homo sapiens)

(実施例12: 加齢による黄斑およびAMDにおけるエラスチン分布の分析:)

本発明者らは、ウサギポリクローナル抗大動脈エラスチン抗体とブルー膜の弾性層との反応性を若年 (< 5歳)、中年 (20 - 40歳)、およびAMD (> 50歳)の少人数の一連のドナーで試験した。この研究に使用した63人のヒトドナーの眼は、The University of Iowa Lions Eye Bank (Iowa City, IA) から死後4時間以内に入手した。ヒトドナー組織の使用に対する Institutional Review

Board委員会の承認は The University of Iowaの Human Subjects Committeeから得た。後極、または鋸状縁と黄斑との間をつなぐ後極のウェッジを100mMカコジル酸ナトリウム中の4% (パラ)ホルムアルデヒド (pH7.4) で固定した。固定から2-4時間後、眼を100mMカコジル酸ナトリウムに移し、そしてアクリルアミド中ですすぎ (3×10分)、浸透させ、包埋した。これらの組織を次にOCT中に包埋し、液体窒素中で急激に冷凍し、そして-80 で保存した。固定しなかった後極、またはそのウェッジをアクリルアミド浸透または包埋せずに、OCT中に直接包埋した。固定および未固定の組織の両方をクリオスタット上で厚さ6-8?mの薄片に切った。ドルーゼの存在およびタイプを、ヘマトキシリン/エオシン、過ヨウ素酸、シッフ試薬、およびスダンブラックB (70%エタノール中1%) で染色した隣接の切片上で記録した。

【0278】

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

【0279】

(実施例13: AMDにおける血清自己抗体の帰属)

この副次的目的を行う理論的根拠は、樹状細胞が局所組織創傷によって活性化され得るという仮説、およびこれが組織損傷または慢性炎症の間、被覆されていない網膜および/またはRPE抗原に対する自己免疫反応の開始をもたらす得るという仮説に基づく。この事象は異常な遅延型過敏症反応の結果として生じ得、AMD患者のうちの一部において以前に観察された血清自己抗体を説明している

。それ自体、この目的はAMDおよび眼のドレーゼの患者がドレーゼなしのコントロールと比べたときに特異的自己抗体のレベルが増大しているかどうかを決定することに関する。AMD表現型とドレーゼの状態と疾患の「病期」との潜在的な関係に対して得に注意が払われる。慢性炎症の自己抗体またはメディエーターの同定はAMDの同定のための診断アッセイの開発のための手段として役立つ。

【0280】

研究の設計：視力測定、立体黄斑写真、および周辺写真を研究の開始時とその後6ヶ月おきに行う。血液および血清を被験者が実験に入るときと、その後6-12ヶ月ごとに採取する。DNAを各血液試料の一部から将来の遺伝学的研究のために調製する。血清自己抗体および免疫複合体の存在を標準的なプロトコルを用いて決定する。さらに、血清をAMD有りおよび無しのドナー由来の組織切片と反応させ、次いでヒト免疫グロブリンに対して吸着した二次抗体と反応させる。AMDおよび非AMDドナー由来の網膜/RPE/脈絡膜のウェスタンブロットもまた血清試料と共にインキュベートして、自己抗体が反応する特異的バンドを同定する。

【0281】

さらに、以下のタンパク質、自己抗体応答、慢性炎症および/または急性期応答のさらなるインジケーターのレベルを臨床的診断的実験室でアッセイする。これらは、ベンス-ジョーンズタンパク質、血清アミロイドA、M成分(component)、C反応性タンパク質、マンナン結合タンパク質、血清アミロイドA、C3a、C5a、他の補体タンパク質、凝集タンパク質、フィブリノーゲン、ビトロネクチン、CD25、インターロイキン1、インターロイキン6、およびアポリポタンパク質Eを包含する。血清タンパク質電気泳動、リンパ球幼化、沈降速度、および自発的、全血、白血球数もまた測定される。

【0282】

以下のタンパク質（他の加齢関連状態および/またはMPGNで多く観察される）に対する抗体の存在もまた決定される：IV型コラーゲン、糸球体基底膜、好中球、細胞質(c-ANCA、p-ANCA)、C3コンバーターゼ(C3腎炎

因子)、アルファ - 1 アンチトリプシンレベル (MPGN 中で減少)、4 対立遺伝子、アポリポタンパク質 E、GFAP、ANA、血清老化細胞抗原、S - 100、2 型プラスミノゲン活性化因子、- 1 - アンチキモトリプシン、SP - 40, 40、内皮細胞、壁細胞、ミトコンドリア、Jo - 1、島細胞、内耳抗原、表皮剥離 Bullosa Acquista、筋内膜 IgA、癌抗原 15 - 3、リン脂質、ニューロン核、カルジオリピン、およびガングリオシド。

表6 免疫仲介プロセスについての血清学的試験

(自己免疫および慢性炎症)

(細胞:)

全血細胞数、ヘモグラムおよび示差

CBC、ヘモグラム

(免疫グロブリン:)

免疫グロブリン A、G、M、D、E 定量

IgG サブクラス定量

/ 軽鎖 - 定量および比率

(種々のタンパク質:)

血清タンパク質電気泳動

補体、全ての古典的および代替

成分: C3、C4、C5 定量的

ベンス - ジョーンズタンパク質

M 成分

C 反応性タンパク質

血清アミロイド A

凝集タンパク質

フィブリノーゲン (および/または ESR)

エラスターゼインヒビター

エラスチンおよびコラーゲンペプチドフラグメント

血清 - 2 - ミログロブリン

血清カロチン (carotene)

クレアチンキナーゼ

リウマチ因子

C反応性タンパク質

(免疫担当細胞：)

リンパ球免疫表現型決定 (immunophenotyping) および絶対CD4細胞数。

抗OKT3、IgG抗体。

CD34幹細胞数。

CD3細胞数。

CD4細胞数。

リンパ球マイトジェンおよび抗原プロフィールスクリーニング (LPA)

リンパ球抗体スクリーニング???

NK細胞。

TおよびB細胞マーカー。(どちらをスクリーニングするか?)

CD4 / CD8 - 絶対数および比率

HLA表現型、クラスIおよびIIの両方。HLA B - 27。

(サイトカイン：)

インターロイキン

線維芽細胞増殖因子

血管作用性腸ペプチド (VIP)

(自己抗体：)

抗核抗体 (ANA)

抗好中球細胞質抗体 (ANCA)

二本鎖DNA抗体

抗リボ核タンパク質抗体

Sc1 - 70抗体

SM抗体

SS - A抗体 (抗RO) およびSS - B (抗LA) 抗体

抗ニューロン核抗体

抗ニューロン核抗体（プルキニエ細胞）

J o - 1 抗体

新生物随伴抗体 A

抗カルジオリピン抗体

抗糸球体基底膜抗体

ミトコンドリア抗体

抗ガングリオシドアッセイ

抗ストレプトリジン O スクリーニング

抗スルファチド抗体

抗チロ細胞性 (t y r o c e l l u l a r) 抗体

内耳抗原に対する抗体

水疱性 (b u l l o s) 類天疱瘡抗体

P M - 1 抗体

副腎皮質抗体

肝腎ミクロソーム抗体

ミトコンドリア抗体

上皮小体抗体

壁細胞抗体

天疱瘡抗体

平滑筋抗体および横紋筋抗体

島細胞抗体

狼蒼抗凝固薬

（抗ウイルスおよび抗細菌抗体：）

C M V 抗体

グループ B 連鎖球菌抗原

B、E、C、A 型肝炎抗体

ヘリコバクターピロリ抗体

C M V、E B ウイルス、単純ヘルペス、麻疹、マイコプラズマ、風疹、水痘 - 帯状疱疹に対する抗体

(その他：)

癌抗原125

癌抗原15-3

癌胎児性(carcinoembryonic)抗原

小線維軸索プロフィール

CNS血清学バッテリー

感覚運動ニューロパシープロフィール

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 00/04583
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) MEDLINE, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VINGERLING, J.R. ET AL.: "Age-related macular degeneration and smoking. The Rotterdam study" ARCH PHTHALMOL, vol. 114, no. 10, October 1996 (1996-10), pages 1193-1196, XP000861808 abstract	1-21,36, 37,44, 50-60,67
X	SACKS J G ET AL: "The pathogenesis of optic nerve drusen. A hypothesis." ARCHIVES OF OPHTHALMOLOGY, (1977 MAR) 95 (3) 425-8, XP000911974 abstract	1-21,36, 37,44, 50-60,67

	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
30 August 2000		18/09/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hoekstra, S

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 00/04583

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE MEDLINE 'OnLine! September 1998 (1998-09) CHAIINE, G. ET AL.: "Case control study of the risk factors for age related macular degeneration. France-DMLA Study group" retrieved from STN Database accession no. 1999109465 XP002145344 abstract</p>	1-21, 36, 37, 44, 50-60, 67
X	<p>& CHAIINE, G. ET AL.: "Case control study of the risk factors for age related macular degeneration. France-DMLA Study group" BR J OPHTHALMOL, vol. 82, no. 9, September 1998 (1998-09), pages 996-1002, the whole document</p>	1-21, 36, 37, 44, 50-60, 67
X	<p>CUNNINGHAM R D ET AL: "Aneurysm of the ophthalmic artery with drusen of the optic nerve head." AMERICAN JOURNAL OF OPHTHALMOLOGY, (1971 OCT) 72 (4) 743-5. , XP000911948 abstract</p>	1-21, 36, 37, 44, 50-60, 67
X	<p>WO 97 40849 A (SCHERING CORP) 6 November 1997 (1997-11-06) claims</p>	41
X	<p>WO 94 01123 A (APPLIED RESEARCH SYSTEMS ;MESTRIES JEAN CLAUDE (FR); HERODIN FRANC) 20 January 1994 (1994-01-20) page 4, line 13; claim 1</p>	41

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA 210

Continuation of Box I.1

Claims 38-43 and 45-49 are directed to a method of treatment of the human/animal body, a complete search has not been carried out based on the alleged effects of the "arterial wall disruptive disorder therapeutic" due to lack of technical features as a basis for a meaningful search over the whole of the claimed scope.

With respect to claim 41 a search has been performed for the use of IL-10, M-CSF and IL-6 in the preparation of a medicament for arterial wall disruptive disorder.

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 38-40, 42, 43 and 45-49

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

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-21, 36, 37, 44, 50-60 and 67 in part; 22-35, 61-66 in toto

Present claims 1-21, 36, 37, 44, 50-60 and 67 relate to an extremely large number of possible methods, kits, screening processes or animal models. In fact, the claims contain so many options, that a lack of clarity (and/or conciseness) within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear (and/or concise), namely the subject-matter of claims 1-21, 36, 37, 44, 50-60 and 67 insofar as characterised by technical features which would, insofar as rendered plausible by the description, contribute to a solution to the problem of providing a diagnostic method for arterial wall disruptive disorders. There appears to be no support in the sense of Article 6 and Article 5 PCT for the notion that any of the proposed specified biochemical markers of e.g. claim 10 are indeed solutions to the posed problem.

Moreover, the claims cover all methods having the feature of a arterial wall disruptive disorder which in itself is defined by the result to be achieved of being an arterial wall disruptive disorder without leading the skilled man to a technically supported choice of efficacious markers amongst all conceivable biochemical and histological associations with the observed phenomena. In fact the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT only for macular degeneration in the eye as a suitable marker. In the present case, the claims so lack support, and the

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). because of the attempt to define the method by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

The subject-matter for which protection is sought in claims 22-35, 61-66 would be characterized by the technical nature of the (genomic) nucleic acid or the technical nature of a gene rendering an animal transgenic. As this nucleic acid, or this gene is not defined in terms of technical features like sequence ID's or other specific scientific designations a meaningful search for these claims cannot be carried out either in view of a lack of clarity (Article 6 and Rule 6.3(a) PCT) and a lack of support for the whole of the scope of the claims (Article 5 PCT and Article 6 third sentence).

The same holds true mutatis mutandis for claims 38, 39, 42, 48 and 44-49 which fail to identify the technical nature of the "macular degeneration therapeutic".

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/04583

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9740849 A	06-11-1997	AU 2740597 A	19-11-1997
		BR 9709752 A	10-08-1999
		CA 2253313 A	06-11-1997
		EP 0906117 A	07-04-1999
		JP 2000509073 T	18-07-2000
WO 9401123 A	20-01-1994	AU 674864 B	16-01-1997
		AU 4566493 A	31-01-1994
		CA 2139353 A	20-01-1994
		CN 1084409 A	30-03-1994
		EP 0651648 A	10-05-1995
		IL 106272 A	26-01-1999
		JP 8502028 T	05-03-1996
		MX 9304075 A	29-04-1994
		US 5925344 A	20-07-1999
		ZA 9304920 A	09-02-1994

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト [*] (参考)
A 6 1 P 27/00		A 6 1 P 29/00	
29/00		G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 N 15/09	Z N A	33/50	Z
G 0 1 N 33/15		33/53	S
33/50		C 1 2 N 15/00	Z N A A
33/53		A 6 1 K 37/02	
(31)優先権主張番号	6 0 / 1 2 3 , 0 5 2		
(32)優先日	平成11年3月5日(1999.3.5)		
(33)優先権主張国	米国(US)		
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
Fターム(参考)	2G045 AA25 BA14 BB22 BB46 CB01 FA16 FB03 4B024 AA01 AA11 CA01 CA09 GA18 HA14 HA19 4B063 QA01 QA12 QA18 QA19 QQ02 QQ42 QQ79 QQ95 QR38 QR56 QR59 QR77 QR82 QS03 QS25 QS28 QS34 QS36 QS39 QS40 QX01 QX02 QX10 4C084 AA02 AA17 BA01 BA08 BA23 BA44 CA17 CA53 CA56 CA59 DA12 DA13 DA16 DA18 DA19 DA25 DA46 MA66 NA14 ZA332 ZA442 ZB112		

专利名称(译)	用于动脉壁破裂障碍的诊断剂和治疗剂		
公开(公告)号	JP2003506016A	公开(公告)日	2003-02-18
申请号	JP2001508612	申请日	2000-02-22
[标]申请(专利权)人(译)	爱荷华州研究基金会的盐湖城大学		
申请(专利权)人(译)	爱荷华州研究基金会的盐湖城大学		
[标]发明人	ハーグマン グレゴリー エス		
发明人	ハーグマン, グレゴリー エス.		
IPC分类号	A01K67/027 A61K38/00 A61K45/00 A61P9/14 A61P27/00 A61P27/02 A61P29/00 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/564 G01N33/68		
CPC分类号	A61P9/14 A61P27/00 A61P27/02 A61P29/00 C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N33/6893 G01N2333/78 G01N2800/164 G01N2800/329		
FI分类号	C12Q1/68.A A01K67/027 A61K45/00 A61P9/14 A61P27/00 A61P29/00 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.S C12N15/00.ZNA.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/BA14 2G045/BB22 2G045/BB46 2G045/CB01 2G045/FA16 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/GA18 4B024/HA14 4B024/HA19 4B063/QA01 4B063/QA12 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QQ95 4B063/QR38 4B063/QR56 4B063/QR59 4B063/QR77 4B063/QR82 4B063/QS03 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QS40 4B063/QX01 4B063/QX02 4B063/QX10 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA23 4C084/BA44 4C084/CA17 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/CA59 4C084/DA12 4C084/DA13 4C084/DA16 4C084/DA18 4C084/DA19 4C084/DA25 4C084/DA46 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA332 4C084/ZA442 4C084/ZB112		
优先权	60/120822 1999-02-19 US 60/120668 1999-02-19 US 60/123052 1999-03-05 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明基于以下发现：动脉壁破裂疾病的发病率与年龄相关性黄斑变性（AMD），动脉壁破裂疾病的诊断剂，治疗剂和年龄相关性之间的高度相关性。提供了药物筛选测定。在一实施方案中，动脉壁破裂疾病是主动脉瘤。通常，本发明的方法是诊断或易于使受试者的动脉壁破裂障碍破裂的方法，其包含一种或多种用于眼中黄斑变性的基因型或表型标记。被检测到。在此，标志物是动脉壁破裂障碍的指标或动脉壁破裂障碍的发生倾向的指标。

AAA特徴	AMD	データの支持
遺伝性	X	
加齢性	X	
エラスチン破壊および他のECM	X	university of Iowaデータ
コラーゲンおよびエラスチンの新規合成	X	Univesity of Iowaデータ
高血圧による増悪	?	
危険因子としての喫煙	X	
自己免疫の関与	?	Univesity of Iowaデータ
大動脈新生血管形成	X	
動脈硬化との関連	X	
COPDとの潜在的関連	?	Univesity of Iowaデータ
血管平滑筋細胞の欠失	?	Univesity of Iowaデータ
樹状細胞の流入	X	Univesity of Iowaデータ
慢性炎症(サブセット)	?	Univesity of Iowaデータ
MMP2&MMP9、t-PA、uPA、PAI-1、C3、IgG、TNFX、IL1、IL6、IL8のアップレギュレート	X	
TIMP、GAG、PGのダウンレギュレート	?	
α-1アンチトリプシン欠損との関連	?	Univesity of Iowaデータ