

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-509423
(P2005-509423A)

(43) 公表日 平成17年4月14日(2005.4.14)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	Z N A A 4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09	G O 1 N 33/53	D 4 B O 6 3
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	M
G O 1 N 37/00	G O 1 N 37/00	1 O 2
	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 54 頁)

(21) 出願番号	特願2003-544222 (P2003-544222)	(71) 出願人	501484828 ユニバーシティ オブ ウェールズ カレッジ オブ メディシン イギリス国, カーディフ シーエフ4 4 エックスエヌ, ヒース パーク
(86) (22) 出願日	平成14年11月12日 (2002.11.12)	(74) 代理人	100067541 弁理士 岸田 正行
(85) 翻訳文提出日	平成16年5月11日 (2004.5.11)	(74) 代理人	100087398 弁理士 水野 勝文
(86) 国際出願番号	PCT/GB2002/005103	(74) 代理人	100103506 弁理士 高野 弘晋
(87) 国際公開番号	W02003/042408	(74) 代理人	100104628 弁理士 水本 敦也
(87) 国際公開日	平成15年5月22日 (2003.5.22)	(74) 代理人	100105072 弁理士 小川 英宣
(31) 優先権主張番号	0127213.7		
(32) 優先日	平成13年11月12日 (2001.11.12)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト成長ホルモン変異の検出方法、変異ならびに用途

(57) 【要約】

本発明は自然発生する成長ホルモンの突然変異、こうした突然変異を検出するための方法及び成長ホルモン異常について患者をスクリーニングするうえでの当該突然変異の用途、またはこうした異常の治療に適した変異体タンパク質を製造するための方法に関する。本発明の一側面においては、個人におけるGH機能不全の指標として有効に機能するGH1の変異を検出するための検出方法が開示される。この方法は、(a) ヒトGH1遺伝子のヌクレオチド配列を含む試験試料を個人から得る工程と、(b) 前記試験試料から得られた配列を、ヒトGH1遺伝子の配列であることが知られている標準配列と比較する工程であって、試験配列と標準配列との間の差異がGH1機能不全の指標として有効に機能する変異体の存在(以下「GH1の変異体」)を示す工程とを含む方法であり、前記試験試料は、当該技術分野で知られる標準的方法によって診断される不十分な胎児身長速度として定義される、子宮内発育遅延(IUGR);及び/または、当該技術分野で知られる標準的方法によって診断される、不十分な(小さい)胎児身体サイズ(体重及び/または体長)として定義される、妊娠期間に比して小さく産まれること(SGA)の一方または両方を示す個人から得られることを特徴とする方法である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

個人における GH 機能不全の指標として有効な GH 1 の変異を検出するための検出方法であって、

(a) 個人からヒト GH 1 遺伝子のヌクレオチド配列を含む試験試料を得る工程と、

(b) 前記試験試料から得られた配列をヒト GH 1 遺伝子の配列であることが分かっている標準配列 (図 6、配列番号 __) と比較する工程とを含み、試験試料の配列と標準配列との相違によって、GH 機能不全の指標として有効な変異 (以下、「GH 1 の変異体」と称する) の存在が示される検出方法において、

試験試料が以下の性質の一方もしくは両方を示す個人から得られるものであること特徴とする方法：すなわち、当該技術分野における常法によって診断される不十分な胎児身長速度として定義される子宮内発育遅延 (I U G R)、及び / または、当該技術分野における常法によって診断される妊娠期間に比して不十分な (小さな) 胎児身体サイズ (体重及び / または体長) として定義される、妊娠期間に比して小さいこと (S G A)。

10

【請求項 2】

I U G R を判定するための方法は、子宮内評価または「出生時」評価であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

I U G R 判定では、前記個人の妊娠期間の異なる時点で 2 回の超音波測定を行うことによる 2 回直接子宮内成長評価法を行うことを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の方法。

20

【請求項 4】

I U G R 判定及び / または S G A (体長) は、出生時に評価され、任意の子供の妊娠期間における標準体長 / 身長チャートに関連付けられる前記個人の体長に基づくことを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

S G A を判定する方法は、出生時に評価され、任意の子供の妊娠期間における標準体重チャートに関連付けられる前記個人の体重に基づくことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記試験試料は出生時の妊娠期間に比して - 2 S D を下回る出生体重及び / または出生体長を有する個人から得られることを特徴とする請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 7】

前記試験試料は I U G R 及び / または S G A の他に下記の基準の 1 以上を満たす個人から得られることを特徴とする請求項 1 乃至 6 のいずれかに記載の検出方法、すなわち、

(i) 標準身長チャート (T a n n e r e t a l A r c h D i s C h i l d 4 5 7 5 5 - 7 6 2 (1 9 7 0)) 上にプロットした場合に両親の身長に基づく推定目標成人身長を逸脱する個人の成人身長を予測する所定の発育パターン (複数の身長測定値によって与えられる。 (B r o o k C D G (E d) C l i n i c a l P a e d i a t r i c E n d o c r i n o l o g y 3 r d E d , C h a p t e r 9 , p 1 4 1 (1 9 9 5 , B l a c k w e l l S c i e n c e))) として定義される成長不全、及び / または、

40

(i i) その年齢に比して 2 5 パーセント未満の身長速度、及び / または、

(i i i) 実年齢と比較した場合に少なくとも 2 年のタナー - ホワイトハウススケールに基づいた骨年齢の遅延 (ただし 5 歳以下の子供または思春期の発育の臨床所見の見られた子供を除く)、及び / または、

(i v) I U G R または S G A を引き起こす他の疾患が見られないか、上記基準 (i) ~ (i i i) に含まれること、及び / または

(v) G H 分泌試験が適性に行われるうえで十分な臨床上の注意を喚起するに足る臨床的表現型。

【請求項 8】

50

前記 (i)、(i i)、(i v) 及び (v) が前記個人に関してそれぞれ満たされていることを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

骨年齢遅延が実年齢と比較した場合に 2 ~ 4 年の範囲であることを特徴とする請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記個人は標準成長ホルモン機能試験において正常な結果を示すことを特徴とする請求項 1 乃至 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

前記試験試料は、標準的手法によって患者のリンパ球、頬粘膜のスメア、血液試料または毛髪から抽出されたゲノム DNA を含むことを特徴とする請求項 1 乃至 10 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 12】

検出方法は、個人の GH 1 遺伝子の配列を決定するための任意の配列決定方法を含むことを特徴とする請求項 1 乃至 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

検出方法は、

(c) (i) GH 1 遺伝子に固有のフラグメントであってその配列が GH 1 クラスターの残りの 4 個のパラログス (GH 1 とは異なる) な遺伝子で見られないフラグメントである GH 1 遺伝子特異的フラグメントと、(i i) GH クラスター中の残りの 4 個のパラログス (GH 1 とは異なる) 遺伝子中のホモログスなフランキング領域に結合することのできない 1 以上の GH 1 遺伝子特異的プライマーとを使用して個人の GH 1 遺伝子の PCR 増幅を行うことを含む、請求項 1 乃至 12 のいずれかに記載の検出方法。

20

【請求項 14】

前記 GH 1 遺伝子特異的プライマーは、GH 1 F (5 ' G G G A G C C C C A G C A A T G C 3 ' ; - 6 1 5 ~ - 5 9 9) 及び GH 1 R (5 ' T G T A G G A A G T C T G G G G T G C 3 ' ; + 2 5 9 8 ~ + 2 6 1 6) から選択されることを特徴とする請求項 1 乃至 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

検出方法は、個人の GH 1 遺伝子の全体を PCR 増幅し、該個人の GH 1 遺伝子の重複構成フラグメントの nested PCR を行うことを特徴とする請求項 1 乃至 14 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 16】

検出方法では、GH 1 遺伝子の遺伝子座調節領域にまたがったゲノム DNA の全体またはフラグメントの PCR 増幅を行うことを特徴とする請求項 1 乃至 15 に記載の方法。

【請求項 17】

検出方法では、D H P L C による個人の GH 1 遺伝子の全体またはフラグメントの突然変異スクリーニングを行うことを特徴とする請求項 1 乃至 16 のいずれかの記載の方法。

【請求項 18】

C T C C G C G T T C A G G T T G G C (G H D 1 F) ;
 A G G T G A G C T G T C C A C A G G (G H D 1 R) ;
 C T T C C A G G G A C C A G G A G C (G H D 2 R) ;
 C A T G T A A G C C A A G T A T T T G G C C (G H D 3 F) ;
 G G A G A A G G C A T C C A C T C A C G G (G H D 4 R) ;
 T C A G A G T C T A T T C C G A C A C C C (G H D 5 F) ;
 C G T A G T T C T T G A G T A G T G C G T C A T C G (G H D 6 R) ;
 T T C A A G C A G A C C T A C A G C A A G T T C G (G H D 7 F) ;
 G T G C C C C A A G C C T T T C C C (L C R 1 5 : 1 1 5 9 - 1 1 7 7) ;
 T G T C A G A T G T T C A G T T C A T G G (L C R 1 3 : 1 3 9 1 - 1 4 1 2) ;
 C C T C A A G C T G A C C T C A G G (L C R 2 5 : 1 3 4 6 - 1 3 6 3) ;

40

50

G A T C T T G G C C T A G G C C T C G (L C R 2 3 : 1 5 8 4 - 1 6 0 2) ;
 L C R 5 A (5 ' C C A A G T A C C T C A G A T G C A A G G 3 ') ;
 L C R 3 . 0 (5 ' C C T T A G A T C T T G G C C T A G G C C 3 ') ;
 L C R 5 . 0 (5 ' C C T G T C A C C T G A G G A T G G G 3 ') ;
 L C R 3 . 1 (5 ' T G T G T T G C C T G G A C C C T G 3 ') ;
 L C R 3 . 2 (5 ' C A G G A G G C C T C A C A A G C C 3 ') ;
 L C R 3 . 3 (5 ' A T G C A T C A G G G C A A T C G C 3 ')

G H 1 G 5 (5 ' G G T A C C A T G G C T A C A G G T A A G C G C C 3 ') ;
 G H 1 G 3 (5 ' C T C G A G C T A G A A G C C A C A G C T G C C C 3 ') ;
 B G H 3 (5 ' T A G A A G G C A C A G T C G A G G 3 ') ;

10

G H 1 R 5 (5 ' A T G G C T A C A G G C T C C C G G 3 ') ; 及び

G H 1 R 3 (5 ' C T A G A A G C C A C A G C T G C C C 3 ') から選択される1以上のプライマーを使用することを更に含む請求項1乃至17のいずれかに記載の検出方法。

【請求項19】

機能不全GHを有することが疑われる患者をスクリーニングするためのスクリーニング方法であって、

(a) ヒトGH1遺伝子のヌクレオチド配列またはこれによりコードされるポリペプチドを含む試験試料を前記患者から得る工程と、

(b) 前記試験試料から得られた配列の所定領域を、所定の配列の対応する領域と比較する工程とを含む方法において、

20

前記所定の配列は、請求項1乃至18のいずれかに記載の方法に基づいて検出可能なGH1の変異体またはこれによってコードされるポリペプチドから選択されることを特徴とする方法。

【請求項20】

前記所定の配列は、野性型配列と比較した場合に少なくとも1個の変異を含む変異体GH1遺伝子の所定領域に対応した核酸配列を有するオリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求項19に記載のスクリーニング方法。

【請求項21】

(a) 個人から第1の試験試料を得ることと、

(b) 前記第1の試験試料中のGH1遺伝子またはこれによりコードされるポリペプチドまたはそのフラグメントを、以下の特徴の一方または両方：すなわち、当該技術分野で知られる標準的方法によって診断される不十分な胎児身長速度として定義される、子宮内発育遅延(IUGR)；及び/または、当該技術分野で知られる標準的方法によって診断される、不十分な(小さい)胎児身体サイズ(体重及び/または体長)として定義される、妊娠期間に比して小さく産まれること(SGA)、を示す個人に由来する第2の試験試料から得ることが可能なGH1変異体の対応する遺伝子またはこれによりコードされるポリペプチドまたはそのフラグメントと比較することを含む請求項19または20に記載のスクリーニング方法。

30

【請求項22】

前記試験試料は、ゲノムDNAを含むことを特徴とする請求項19乃至21のいずれかに記載のスクリーニング方法。

40

【請求項23】

前記比較工程は、GH1遺伝子の適当な領域を決定する工程を含み、及び/または、DNAチップ技術を使用することを特徴とし、DNAチップ技術とは、チップが小型の並列分析素子であって、これを用いて標識試料DNAのハイブリダイゼーションにより複数の既知の突然変異について又はすべての可能な突然変異について同時にスクリーニングを行うものである請求項20乃至22のいずれかに記載のスクリーニング方法。

【請求項24】

前記比較工程は、質量分析、マイクロアレイ分析及びピロシーケンシングなどのタンパク質の配列決定法、及び/または、ELISAなどの抗体に基づく検出法によって前記ポ

50

リペプチドの同定を行うことを含む請求項 20 乃至 22 のいずれかに記載のスクリーニング方法。

【請求項 25】

GH1 の変異体マーカーまたは GH 変異体の存在を示すか又は相関のある 1 以上の「代用マーカー」を用いることを特徴とする請求項 18 乃至 24 のいずれかに記載のスクリーニング方法。

【請求項 26】

前記「代用マーカー」は、個人におけるその存在、非存在、または量が測定可能であって GH 変異体または GH1 の変異体の存在に関連付けられるような、(a) 任意の生体分子（これらに限定されないが、ヌクレオチド、GH 変異体または GH1 の変異体に対して特異的な抗体を含むタンパク質、糖、及び脂質）、(b) 化合物（これらに限定されないが、薬剤ならびにその代謝産物）、及び/または、(c) 物理的特性、であるかまたはこれらを含むものであることを特徴とする請求項 25 に記載のスクリーニング方法またはキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は自然に発生する成長ホルモンの突然変異、こうした突然変異を検出するための方法及び成長ホルモン異常について患者をスクリーニングするうえでの当該突然変異の用途、またはこうした異常の治療に適した変異体タンパク質を製造するための方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

ヒトの身長が遺伝性の因子によって支配されているということは 100 年以上前から知られていた。家族性低身長は通常劣性であるその遺伝様式とともに 1912 年には既に認識されていたが、こうした家系が科学文献で正しく取り上げられるようになるまでには更に四半世紀を要した。劣性遺伝する低身長症では一般に成長ホルモン (GH) の単独欠損をともなうとの認識が得られたのはようやく 1966 年になってからのことである。

【0003】

GH 欠損症にともなう低身長は、新生児で 1/4000 ~ 1/10000 の発生率で発生すると推定されている。これらの症例の多くは散発性かつ突発性であるが、5 ~ 30% が低身長の第 1 度近親者を有し、この病態に遺伝的病因が存在することと符合する。GH 欠損症に遺伝的病因が存在することは、家族性低身長の分子遺伝学的分析と、罹患者の脳下垂体で発現する成長ホルモン (GH1) 遺伝子で突然変異性損傷が早期に見られることから確認される。家族性低身長は他の多くの遺伝子 (例、POU1F1、PROP1 及び GHRHR) の突然変異によっても発生し、これらの異なる病型を区別することが重要である。

【0004】

成長ホルモン (GH) は様々な作用によって骨及び軟部組織の生後の成長を促進する多機能ホルモンであるが、GH の直接、間接的な作用の相対的寄与度に関しては議論がなされている。GH の直接的な作用は各種の組織や臓器で証明されており、多くのタイプの細胞において GH 受容体の存在が示されている一方で、GH の効果の大半は GH 依存型インスリン様成長因子 I (IGF-I) の作用によって媒介されることを示す多くのデータが存在する。IGF-1 は多くの組織、主として肝臓で産生され、その受容体を介して作用して、骨、軟骨、及び骨格筋など多くの組織の増殖や成熟を促進する。GH は組織の成長を促進する以外にも、乳腺刺激作用、糖尿病誘発作用、脂肪分解作用、タンパク質同化作用、ナトリウム及び水の貯留など、他の様々な生物学的作用を示すことが示されている。

【0005】

正常な成長を維持するには幼児期を通じて適量の GH が必要とされる。GH 欠損症の新生児では通常体長と体重は正常であるが、一部において矮小陰茎または空腹時低血糖症が

10

20

30

40

50

見られ、生後成長率は低くかつ直線状である。こうした場合、生後成長率は年齢とともに徐々に低下する。遺伝性成長ホルモン単独欠損症 (IGHD) の新生児では骨成熟は通常遅延しており、身長伸びも遅滞している。躯幹部の肥満、実年齢よりも若く見える顔貌、及び第2生歯の遅滞がしばしば見られる。低身長症の成人では早老で見られるものと同様の皮膚の変化を生ずる場合もある。

【0006】

家族性IGHDでは特徴的な遺伝様式を有する複数の異なる疾患が見られる。GH1遺伝子座の欠陥にともなって見られるこれらのIGHDの型を、これまでに検出されている異なるタイプの原因遺伝子損傷とともに第1表に示した。

【0007】

【表1】

第1表：GH1遺伝子の関与する遺伝性疾患の分類

疾患	遺伝様式	原因となる遺伝子損傷のタイプ	GHタンパク質	不全症の状態
IGHD IA	常染色体劣性	大規模欠失、微小欠失、ナンセンス突然変異	無	重篤な低身長。GH処理により抗GH抗体がしばしば産生され、GHに対する応答が低下。
IGHD IB	常染色体劣性	スプライス部位突然変異	不全	低身長。患者は通常外因性GHに高い応答を示す。
IGHD II	常染色体優性	スプライス部位及びイントロン突然変異、ミスセンス突然変異	不全	低身長。患者は通常外因性GHに高い応答を示す。

【0008】

これらの損傷を特徴付けることによって、これらのIGHDの型間での、臨床上の重篤度、遺伝様式、及び外部から投与されたGHに対する抗体産生能の差異に対する説明を与えるうえの一助となると思われる。多くの症例は散発的であり、脳浮腫、染色体異常、ヒスチオサイトーシス、感染症、放射線被曝、中隔視神経異形成、外傷または、視床下部若しくは脳下垂体の腫瘍を含む脳の傷害や欠陥から発生すると考えられる。磁気共鳴イメージングによる検査によってIGHDの患者の約12%で視床下部または脳下垂体の異常が検出された。

【0009】

低身長、「身長速度」すなわち成長速度の遅延、及び骨成熟の遅延は、GH欠損症ではすべてが見られるが、これらの中でこの疾患に特有のものではなく、他の全身性疾患によってもこうした症状が見られる場合がある。本明細書の全体を通じて「身長速度」及び成長速度はいずれも、例えばセンチメートル/年として測定されるような、被験者または患者の身長の変化の速度を意味するものとして解釈されるべきである。

【0010】

GH欠損症を証明するための刺激試験では、L-ドーパ、インスリン誘導低血糖、アルギニン、インスリン-アルギニン、クロニジン、グルカゴン、またはプロプラノロールを用いる。不適当なGHピーク応答(通常7~10ng/mLよりも少ない)は試験毎に異なる。随伴するLH、FSH、TSH、及びACTHの欠損症についても試験を行って脳

10

20

30

40

50

下垂体の機能不全の程度を判定し、最適な治療を計画するべきである。

【0011】

組換え体由来のGHは全世界で利用されており、皮下注射によって投与する。最適な成績を得るためにはIGHDの子供で通常は診断が確定次第、代償療法を開始する。組換えGHの初期用量は体重や体表面積に基づいたものであるが、正確な使用量及び投与頻度は異なるプロトコル間で異なり得る。用量は思春期における最大量にまで体重の増加とともに増加させる。その後、GH治療を一時的に中断し、その間に患者のGH分泌能力を再評価する。GH欠損症であることが確認された患者には成人期に外因性のGHを低用量で投与する。

【0012】

GHで治療される状態としては、(i) GHが有効であることが証明されているもの、(ii) GHの使用が報告されてはいるが、標準的な慣例としては受け容れられていない種々の他の状態が含まれる。GH治療が有効であることが証明されている疾患としては、単独かまたは複合下垂体ホルモン欠損症(CPHD)をともなったGH欠損症、及びターナー症候群が挙げられる。最初の2つの疾患を有する患者のGH代償療法に対する臨床的応答は、(i) GH欠損症の重篤度及び成長に対するその悪影響、治療開始時の年齢、出生体重、現在の体重、及びGHの用量、ならびに(ii) 甲状腺ホルモン欠損症などの関連欠損症の治療に対する認識及び応答、ならびに(iii) 抗GH抗体の産生によって治療が困難となるか否か、に応じて異なる。ターナー症候群の患者に対する治療成績は、患者の低身長、重篤度、患者の染色体組、及び治療開始時の年齢に応じて異なる。

【0013】

GHの使用が報告されている更なる疾患としては、軟骨形成不全症などの特定の骨格形成異常、プラダー-ウィリ症候群、外因性ステロイドの副作用としてあるいはリウマチ性関節炎などの慢性炎症疾患にともなう成長抑制、慢性腎不全、極度突発性低身長、ラッセル-シルバー症候群、及び子宮内発育遅延が挙げられる。

【0014】

分子遺伝学的レベルでの家族性IGHDのキャラクタリゼーションは、幾つかの理由から重要である。関与する遺伝子座が同定されることによって、成長遅延の重篤度ばかりではなく、より重要な点として、現在利用可能な各種の治療レジメンが適当であるか否かが示されるであろう。更に、原因となる遺伝子損傷を検出することにより、その病態の遺伝学的病因が確認される。原因となる遺伝子損傷の検出は、(i) 成長遅延の重篤度、及び(ii) GH治療後の抗GH抗体形成の確率を予測するうえで診断上の価値も有する。一部の例では、こうした病理学的損傷の知識がこの疾患の特徴的な遺伝様式を説明するうえでの一助となることから、GH欠損症の家族のカウンセリングに不可欠である。最後に、GH分子が機能不全(機能喪失ではなく)であるIGHDの原因である突然変異損傷のキャラクタリゼーションによって、GHの構造及び機能の新たな知見が得られる可能性がある。

【0015】

細胞レベルでは、1個のGH分子が2個のGH受容体分子(GHR)に結合してこれらを二量化させる。この2個のGH結合GHR分子の二量化は、チロシンキナーゼJAK2が関与するシグナルトランスダクションに必要であると考えられている。GHの多様な作用は、異なる細胞質ドメインを有するか異なる組織で異なるリン酸化部位を有する1種類のGHR分子によって媒介されていると提唱されている。これらの異なる細胞質ドメインは、JAK2によって活性化されると異なるリン酸化経路を辿り、その内の1つは成長効果を、他の経路は異なる代謝効果を奏する。

【0016】

GHは下垂体前葉の成長ホルモン分泌細胞から分泌される22kDaのタンパク質である。X線結晶解析によれば、GHは上-上-下-下という配置で配された互いに平行な2対の α -ヘリックスからなるコア構造を有する。この構造は2個の分子内ジスルフィド結合(Cys53-Cys165及びCys182-Cys189)によって安定化されて

10

20

30

40

50

いる。2個の成長ホルモン受容体(GHR)分子がGH分子上の2つの構造的に異なる部位に結合する。これはGHRが最初に部位1に、次いで部位2に結合することによって順次進行するプロセスである。GHRのGHへの結合によってGHR分子の二量化が促進される。

【0017】

GH分子のスキャニング突然変異誘発法による研究により、GHとその受容体間の結合相互作用の実態が明らかとなったのと同時に、部位特異的突然変異誘発法を用いて特定の残基の機能が調べられた。すなわち、Gly120(ヒトGHの第3番目のヘリックスに存在)のArgによる置換によってGHRは部位2に結合できなくなり、GHRの二量化が阻害される。同様にヒトGHタンパク質の残基Phe44はプロラクチン受容体への結合に重要である。最後に、残基Asp115、Gly119、Ala122、及びLeu123はマウスGH分子の成長促進能にとって重要であることが示されている。

10

【0018】

二量化したGHRと細胞内のチロシントランスポスチンキナーゼJAK2との相互作用によって、下流のシグナルトランスダクション分子のチロシンのリン酸化、マイトジェン活性化タンパク質(MAP)キナーゼの刺激、及びシグナルトランスデューサーや翻訳の活性化因子(STATタンパク質)の誘導が生じる。このように、GHは多くの異なるシグナリング経路を通じて複数の遺伝子の発現に影響を与えることができるのである。

【0019】

GH1遺伝子の発現によって複数の異なるGHが生ずる(図5にGH1の参照配列を示した)。GH1転写産物の9%においてエクソン2が、エクソン3に45bpだけ入り込んだ別のアクセプタープライス部位にスプライシングされ、これにより32番目~46番目のアミノ酸残基が欠失して、正常な22kDaのタンパク質の代わりに20kDaのアイソフォームを生じる。この20kDaのアイソフォームは、成長及び分化を刺激することが可能であるようである。別のアクセプタープライス部位の選択の決定に関与している因子は、未だにキャラクタライズされていないが複雑な性質のものであることは明らかである。エクソン3によってコードされるコドン32~71の欠失によって生じる17.5kDaのアイソフォームも下垂体腫瘍組織から微量だけ検出されている。エクソン3及び4またはエクソン2、3、4のいずれかを欠くスプライシング産物が下垂体組織で報告されているが、これらは不活性なタンパク質産物をコードしているようである。GHのグリコシル化された24kDaの変異体も知られている。22kDaの主アイソフォームのアミノ酸配列が図6に示されているが、この配列はGH1遺伝子のコード領域のヌクレオチド配列及び26個のアミノ酸からなるリーダーペプチドを含んだタンパク質のアミノ酸配列を示している。横に記した数字はアミノ酸残基の番号を示す。アミノ酸配列を挟み込んだ太字の縦向き矢印の数字は、エクソンの境界を特定している。終止コドンはアスタリスクで示している。

20

30

【0020】

下垂体成長ホルモン(GH1)をコードした遺伝子は、染色体17q23の5個の関連遺伝子のクラスター内に位置している(図1)。この66.5kbのクラスターは現在ではその配列の全体が決定されている(Chen et al. *Genomics* 4:479-497 (1989)及び図5を参照)。この成長ホルモン遺伝子クラスター内に存在する他の遺伝子座は、2個の絨毛性体乳腺発育ホルモン遺伝子(CSH1及びCSH2)、絨毛性体乳腺発育ホルモン偽遺伝子(CSHP1)、及び成長ホルモン遺伝子(GH2)である。これらの遺伝子は長さ6~13kbの遺伝子間領域で隔てられており、同じ転写方向を有し、胎盤で発現し、下流の組織特異的エンハンサーの支配下にある。GH2遺伝子座は13個のアミノ酸残基においてGH1由来成長ホルモンと異なるタンパク質をコードしている。5個の遺伝子はすべて非常に似通った構造を有し、5個のエクソンが短いイントロンによって同じ位置で分断されている(図2)。イントロンの長さはGH1の場合では長さ260bp、209bp、92bp、及び253bpである。

40

【0021】

50

G H 1 遺伝子のエクソン 1 は、60 b p の 5' 末端側非翻訳配列 (ただし別の転写開始部位が - 54 の位置に存在する)、コドン - 26 ~ - 24、及び 26 個のアミノ酸からなるリーダー配列の開始点に当るコドン - 23 の最初のヌクレオチドを含んでいる。エクソン 2 はリーダーペプチドの残り、成熟 G H の最初の 31 個のアミノ酸をコードしている。エクソン 3 ~ 5 はそれぞれアミノ酸 32 ~ 71、72 ~ 126、及び 127 ~ 191 をコードしている。エクソン 5 はまたポリアデニル化部位に最も特徴的な 112 b p の 3' 末端側非翻訳配列をコードしている。G H 1 のポリアデニル化部位の 3' 末端側 100 b p の位置には A l u 反復配列エレメントが存在している。これら 5 個の関連遺伝子は 5' 末端側のフランキング領域及びコーディング領域において高い相同性を有するが、3' 末端側のフランキング領域において異なっている。

10

【0022】

G H 1 と G H 2 遺伝子は、その m R N A のスプライシングのパターンにおいて異なっている。上述したように、G H 1 の転写産物の 9% においてエクソン 2 はエクソン 3 に 45 b p だけ入り込んだ別のアクセプタープライス部位にスプライシングされ、正常な 22 k D a のタンパク質の代わりに 20 k D a のアイソフォームを生じる。G H 2 遺伝子ではこのような別のスプライシングは見られない。G H 1 のエクソン 3 によってコードされる 40 個のアミノ酸を欠いた 17.5 k D a の第 3 の変異体も報告されている。

【0023】

C S H 1 と C S H 2 遺伝子座は、同じ配列のタンパク質をコードし、G H 1 配列に対して D N A レベルで 93% の相同性を有する。C S H 遺伝子の配列との比較によれば、C S H P 1 偽遺伝子は、その「エクソン」内に 25 個のヌクレオチド置換を含み、イントロン 2 のドナープライス部位の絶対的 + 1 の位置にその発現を部分的に不活性化する G A の変化を含んでいる。

20

【0024】

多くの 2 対立遺伝子型制限酵素断片長多型 (R F L P) が G H 遺伝子領域内で報告されている。これらの内、5 つのもの (2 箇所の B g l I I、2 箇所の M s p I、及び 1 箇所の H i n c I) が白人及び黒人で見られるのに対して、1 個の B a m H I 多型が更に主として黒人に見られる。これらの多型間の相関には強い不均衡が見られ、この遺伝子クラスターが比較的最近進化を遂げたことと一致する。H i n c I I と B a m H I 多型は G H 1 遺伝子の直ぐ 5' 側で見られる。- 75 のヌクレオチドの位置での A / G 二多型に帰因する R s a I 多型が G H 1 プロモーター領域で見られるのに対して、比較的高頻度の S p h 1 多型は完全にキャラクタライズされていない。G H 1 遺伝子の約 19 k b 3' 側に極めて情報量に富んだ (83% ヘテロ) 可変数の反復多型が見つまっている。この多型の 18 個の異なるアレルを P C R 用にフォーマット化することでフラグメントのサイズ別 (201 ~ 253 b p) に区別することができる。

30

【0025】

最後に、G H 1 遺伝子プロモーター / 5' 側非翻訳領域は、570 b p の長さの範囲内に 17 種の変異体ヌクレオチドという極めて高レベルの配列多型を有することが示された (第 2 表 A)。

【0026】

40

【表 2】

第 2 表 A

ヒトGH1遺伝子プロモーター/5'側非翻訳領域の公知の多型

(Giordano *et al*/Human Genetics 100 249-255 (1997)及び Wagner *et al*/Eur. J. Endocrinol. 137 474-481)(図3)

ヌクレオチドの位置	多型(別のヌクレオチド)
-476	G/A
-364	G/T
-339	ΔG
-308	T/G
-301	T/G
-278	T/G
-272 to -276	CCAGA/SMRRR
-168	T/C
-75	A/G
-57	G/T
-31	ΔG
-6	G/A
-1	T/A/C
+3	G/C
+16	A/G
+26	A/C
+59	T/G

10

20

30

【0027】

-1、+3、+59の位置の多型が、GH1遺伝子プロモーターのこの領域によってコードされていると思われるGHDTAタンパク質のアミノ酸置換を招くことが予想される(下記参照)。一部の配列変異は、GH1遺伝子が他の胎盤発現遺伝子と異なっている位置と同じ位置に見られた。このことはこの機構が遺伝子転換である可能性を示すものであり、胎盤発現遺伝子が転換される配列の供与源として機能していることを示すものである。

40

【0028】

GH不全症を有する思春期前の低身長の子供を用いた研究において、長谷川等[*J. Clin. Endocrinol Metab* 85 1290-1295 (2000)]は、GH1遺伝子上の3つの多型[IVS4C T1101(下記第7表A及び7Bにも報告されている)、T/G-278、及びT/G-57]とGH分泌及び身長の高さとの関連を報告している。

【0029】

50

最初のGH1遺伝子欠失が報告されて以来、各種のより細かな損傷が報告されてきた。こうした損傷が特異なタイプのGH欠損症と関連していた場合もあり、GHの構造と機能の新たな知見を得る手段として潜在的に重要である。

【0030】

成長ホルモンをコードする遺伝子(GH1)はクローン化されたヒト遺伝子としては最初のもの1つであり、遺伝性の成長ホルモン欠損症の原因となる大規模遺伝子欠失(6.7kbのタイプ)の最初のもがサザンブロット法によって間もなく検出された。GH1遺伝子が関与する大規模欠失はそのすべてが、GHがまったく産生されないことを特徴とする重篤な(IA型)欠損症を引き起こす。GH1遺伝子のキャラクタライズされている欠失の約70%は長さ6.7kbのものであるが、残りの大部分は7.6kbまたは7.0kbのものである(第2表B-GH欠損症及び低身長を引き起こすGH1遺伝子またはGH1遺伝子の隣接部分の関与する大規模欠失)。

10

【0031】

【表 3】

第 2 表 B *GH1* 遺伝子または *GH1* 遺伝子の隣接部分の大規模欠失

欠失サイズ (kb)	関与する遺伝子座	コメント	処理後抗体が存在するか?
6.7	<i>GH1</i>	スイス人家系	有
6.7	<i>GH1</i>	日本人家系	有
6.7	<i>GH1</i>	スペイン人を先祖にもつアルゼンチン人家系、ホモ	有
6.7	<i>GH1</i>	オーストリア人家系	有
6.7	<i>GH1</i>	ブラジル人家系	有
6.7	<i>GH1</i>	低身長及び肺繊維症の患者	有
6.7	<i>GH1</i>	各種	無
7.6	<i>GH1</i>	イラク、イエメン、及びイラン人家系	無
7.6	<i>GH1</i>	イタリア人家系、ホモ、近親婚	有
7.6	<i>GH1</i>	イタリア及びトルコ人家系	有
7.6	<i>GH1</i>	スペイン人家系	無
7.6	<i>GH1</i>	各種	有
7.0	<i>GH1</i>	カナダ人家系	有
7.0	<i>GH1</i>	メキシコ人家系	有
7.0	<i>GH1</i>	中国人家系、ホモ	無 (GH処置を行わず)
45	<i>GH1</i> , <i>CSHP1</i> , <i>CSH1</i> , <i>GH2</i>	トルコ人家系、ホモ、近親婚	有
45	<i>GH1</i> , <i>CSHP1</i> , <i>CSH1</i> , <i>GH2</i>	イタリア人家系、ホモ	有
45	<i>GH1</i> , <i>CSHP1</i> , <i>CSH1</i> , <i>GH2</i>	イタリア人家系、ホモ、近親婚	有
45	<i>GH1</i> , <i>CSHP1</i> , <i>CSH1</i> , <i>GH2</i>	「アジア人」家系	無

10

20

30

40

50

【 0 0 3 2 】

【 表 4 】

(第 2 表 B 続葉)

?	<i>CSH1, GH2,</i> <i>CSH2</i>	イタリア人家系、ヘテロ	無
?	<i>CSH1, GH2,</i> <i>CSH2</i>	オランダ人家系、異なる欠失について複合ヘテロ	無
2 倍	(i) <i>GH1</i> (6.7kb) (ii) <i>CSH1,</i> <i>GH2, CSH2</i> (~32kb)	フランス人 (ロマニー) を先祖にもつ。ホモ、近親婚	有

10

20

【 0 0 3 3 】

更に、より低頻度で生ずる欠失の例もいくつか報告されている。近年、突然変異のスクリーニングツールとしてサザンブロットから離れて PCR に基づいた手法へと移行する様々な試みがなされてきた。GH1 遺伝子がホモである場合、その欠失は、GH1 遺伝子及びフランキンク領域の PCR 増幅の後、得られた PCR 産物を制限酵素で消化することによって比較的容易に検出することが可能である。この手法はリスクをとまなう妊娠において GH1 遺伝子についてホモ接合を排除するために有効に用いられてきたが、野性型遺伝子についてのホモ接合を、特定の遺伝子の欠失についてのヘテロ接合性から区別することは困難であった。更にこの手法では GH1 遺伝子のみが除去される比較的短い 6.7、7.0 及び 7.6 kb の欠失以外の欠失の検出も不可能であった。

30

【 0 0 3 4 】

GH1 遺伝子を直接フランキンクし、コントロール DNA 試料から 790 bp のフラグメントを生成する PCR プライマーが設計されている。このフラグメントが生成されない場合には GH1 遺伝子が欠失していると考えられるが、PCR 増幅用の内部コントロールとして「非特異的 PCR フラグメント」を使用しているためにこの方法の信頼性にはいささか疑義があるといわざるを得ない。

【 0 0 3 5 】

大規模欠失とならんで、GH1 遺伝子の微小欠失についても 3 例報告されている。これらの患者のうち、2 名は 6.7 kb の GH1 遺伝子欠失についてもヘテロであった (第 3 表)。

40

【 0 0 3 6 】

【表 5】

第 3 表：GH欠損及び低身長を引き起こすGH1遺伝子内の微小欠失

欠損症のタイプ	欠失 (小文字は欠失した塩基を示す。^は直ぐ下流の番号付けされたコドンの位置を示す。)	コドン (番号は-26の翻訳開始コドンATGに対して割り振った)。	処理後抗体は存在したか?
IA	GCCTG^CTCTGcCTGCCCTGGC	-11	有
II	CCCCAGGCGGggatgggggagacctgtaGTCA GAGCCC	イントロン 3 (+28~+45 まで欠失)。	無
IA	TCTGT^TTCTCagAGTCTATTCC	54	無

10

20

【0037】

GH1 遺伝子のコード領域内からは 7 例の異なる一塩基対置換が報告されたのみであった(第 4 表)。

【0038】

【表 6】

第 4 表：GH欠損症及び低身長を引き起こすGH1コード領域内の一塩基対置換

欠損症のタイプ	ヌクレオチド置換	アミノ酸置換	コドン (番号は-26の翻訳開始コドンATGに対して割り振った)	処理後抗体は存在したか?
IA	ACA→GCA	Thr→Ala	-24	無
IA	TGG→TAG	Trp→Term	-7	無
IA	GAG→TAG	Glu→Term	-4	有
II	CGC→TGC	Arg→Cys	77	無
?	CCC→CTC	Pro→Leu	89	無
?	GAC→GGC	Asp→Gly	112	無
?	CGC→CAC	Arg→His	183	無

30

40

【0039】

これらの一塩基対置換のうち 2 例はシグナルペプチドのアミノ酸残基 Trp - 7 と Glu - 4 を停止コドンに変換するナンセンス突然変異である。これらの突然変異は、遺伝子欠失ではない IA 型欠損症を引き起こすことが知られている唯一の GH1 遺伝子損傷である。これらの損傷はシグナルペプチド内で翻訳の停止を予測するものであるため、機能性

50

G H 分子の生成と相容れない。他の 5 例の一塩基対置換（巨人症の治療と関連して欧州特許出願公開第 7 9 0 3 0 5 号明細書に開示される、コドン 7 7 での R C を含む）は機能不全の成長ホルモン分子が生成するミスセンス突然変異である。このような自然発生突然変異は、基本的に臨床的表現型、すなわち問題となる患者の身長に直接関連付けられる場合があることから、人工的に誘発させた突然変異と比較して得られる情報量ははるかに大きいといえる。

【 0 0 4 0 】

病理学的に重要と考えられるプロモーター領域の一塩基対置換は、I G H D I A 型を有する 3 人の中国人患者と 2 人のコントロールにおいて G H 1 遺伝子のプロモーター領域の配列を決定する（転写開始部位に対して - 6 0 ~ + 7 0 の間）ことによって初めに調べられた。幾つかの相違が認められたが、これらは通常想定される多型であり、更にキャラクタライズすることはしなかった。上記に述べたように、G H 1 遺伝子のプロモーター領域は 5 7 0 b p の長さの範囲内に 1 7 種の変異体ヌクレオチドという極めて高レベルの配列多型を有することが示されている（図 3）。しかしながら、これらの配列変異体はコントロールと比較して患者の体内で過剰発現しているわけではないようである。

10

【 0 0 4 1 】

G H 1 プロモーターの変異について更に個別に調べ、全体で 2 2 種の変異体多型部位が検出され、そのうちの大部分は一塩基対置換であった。これらのうち、1 7 種は A T G 開始コドンの 5 ' 側 5 5 0 b p の領域で見られ、3 種は A T G の 5 ' 側 - 1 0 7 5 の位置付近で見られ、2 種類がイントロン 1 (I V S 1) 内のそれぞれ位置 7 6 及び 2 1 9 で見られた [W a g n e r e t a l , E u r J E n d o c r i n o l 1 3 7 4 7 4 - 8 1 (1 9 9 7)]。これらの変異体は 4 種を除いてすべてがコントロールでも見られたがこれら 4 種の変異体が成長ホルモン欠損症の原因とは考えられなかった。これらの変異体部位の内、1 つのみが転写因子結合部位に相同な配列内で見られた。すなわち、潜在的（証明されていない）N F - 1 結合部位内の - 3 3 3 の位置における C C A G A と G A G A G 配列が交互に存在する部分である。

20

【 0 0 4 2 】

したがってこれまでのところ、G H 1 遺伝子プロモーター内で病理学的に重要な突然変異は報告されていない。

【 0 0 4 3 】

m R N A のスプライシングに影響する G H 1 遺伝子内の一塩基対置換についても開示されている。それらの大半は G H 欠損症の比較的稀な優性型に関連したものである（第 5 表）。

30

【 0 0 4 4 】

【表 7】

第 5 表：mRNA のスプライシングに影響して GH 欠損症及び低身長を引き起こす一塩基対置換

欠損症のタイプ	ヌクレオチド置換/位置	スプライス部位	民族地理学的起源/ホモかヘテロか
II	G→A, +1	IVS3 ドナー	スウェーデン、北アメリカ、北欧、南アフリカ、チリ/ヘテロ
II	G→C, +1	IVS3 ドナー	トルコ人/ヘテロ
II	T→C, +2	IVS3 ドナー	ロシア人/ヘテロ
II	G→A, +5	IVS3 ドナー	チリ人/ヘテロ
II	G→C, +5	IVS3 ドナー	日本人/ヘテロ
II	T→C, +6	IVS3 ドナー	トルコ人/ヘテロ アジア人/ヘテロ
II	G→A, +28	IVS3 ドナー	?/ヘテロ
IB	G→C, +1	IVS4 ドナー	サウジアラビア人/ホモ
IB	G→T, +1	IVS4 ドナー	サウジアラビア人/ホモ
IB	G→C, +5	IVS4 ドナー	ベドウィン/ヘテロ

10

20

【0045】

トランスフェクトした細胞の mRNA *in vitro* での発現解析によってイントロン 4 のドナー スプライス部位におけるトランスポージョンは、エクソン 4 内の潜在的スプライス部位を活性化することが示された。このスプライス部位はエクソン 4 のドナー スプライス部位の 5' 側 73 bp の位置に存在する。したがってエクソン 4 によってコードされるアミノ酸 103 ~ 126 を欠いた異常スプライシング産物が生成することが予想され、リーディングフレームがシフトすることによって、通常は翻訳されない GH 1 遺伝子の 3' 側の非コード領域が読まれることによる 29 個を含む、94 個の新たなアミノ酸が取り込まれることになる。

30

【0046】

エクソン 4 及び 5 によってコードされる GH タンパク質のこの領域は GH タンパク質の分泌小胞への正確なターゲティングにとって重要であると考えられることから、こうした異常タンパク質は正常に分泌されないものと予想された。ところが IB 型の GH 欠損症の患者では外因性の GH に対して抗体の産生は認められなかった。したがってこの免疫寛容の回避は、異常タンパク質の少なくとも一部は分泌されて血液循環中に部分的に安定して存在しうることを示唆していると考えられる。IVS3 内の 7 つの既知のスプライシング突然変異 (第 5 表) が GH 欠損症の家系で常染色体優性遺伝する II 型の欠損状態にもなって見られる。

40

【0047】

GH 1 の短縮型突然変異またはホモ接合性遺伝子欠失を有する GH 欠損症患者では、GH 治療に際して抗 GH 抗体を産生するリスクが非常に高い。対照的に、スプライス部位内のミスセンス突然変異または一塩基対置換を有する患者でアロ抗体が産生されたという報告は本発明者等の知る限りでは存在しない。

50

【0048】

これまでのところ突然変異体の遺伝子型と臨床的表現型との間には他の相関関係はなんら報告されていない。文献に見られる必要なデータは乏しいものであり、また質も非常にまちまちであるが、本発明者等は大規模遺伝子欠失を有する患者が、臨床上かつ表現型上の続発症においてスプライス部位突然変異を有する患者と異なっているか否かを評価する手段として、おおまかなメタ分析を行った。GH1欠失を有する患者の身長が平均で7.3SDだけ年齢調整平均(n=29)よりも低かったのに対して、GH1スプライシング突然変異を有する患者では平均値(n=17)よりも平均で5.4SD低かった。欠失患者では骨年齢の遅延は大きく、成長速度もより低かったものの、こうした所見は確信によるバイアスの影響を受けやすいので極めて解釈が難しい。

10

【0049】

以上に述べてきた家族性GH欠損症は、多くの場合、常染色体劣性形質として遺伝するため、受け継がれた欠損状態の一部の例では、家族のサイズが小さいことにより認識されなかったものがある可能性が高い。同様に、GH1遺伝子のde novo突然変異によるGH欠損症の症例は散発性として分類されている可能性があり、その場合疾患の遺伝学的説明は考慮も探求もなされなかったであろう。最後に、欠損症の状態を定義するうえで用いられる基準によっては、GH欠損症の表現型及び遺伝子型の全体像が臨床上の注意をまったく喚起することがなかったということもありうる。こうした理由から、現在用いられているGH欠損症の罹患率の推定値は不正確であり、集団内での真の罹患率を大きく過小評価している可能性がある。

20

【0050】

多くの研究者によって支持されているIGHDの定義とは、(a)上述したように身長が-4.5SDよりも低いことによってしばしば定義される重篤な成長遅延、(b)刺激/誘発に対するGH応答の低下(4ng/mlよりも低い血清GH濃度)、及び(c)成長遅延となる他の要因がないこと、を組み合わせたものである。このようなGH欠損症の構成要因の正式な定義が厳密に守られてきたことと、研究用の患者の選別にあたってこれらの基準、特に基準(b)が比較的広く受け容れられてきた[Shalet SM et al. *Endocrine Rev* 19 203-223 (1998)]のために、これまでに記載されてきたGH1突然変異のスペクトルは完全とはほど遠いものであるばかりか、より広範な突然変異のスペクトルを反映しないものになっていると考えられる。したがって、SDスコアがそれほど重篤でなかったり、GHレベルがより低い(例、遺伝子のコード領域内のミスセンス突然変異またはプロモーターの突然変異)GH欠損状態を引き起こす突然変異は臨床上の注意をより喚起しにくかったであろう。実際、このことはこれまでにGH1遺伝子でミスセンス突然変異が5例しか報告されていないことをある程度説明していると考えられる。ミスセンス突然変異の報告例が5例に過ぎないということは、分子レベルでほぼ20年にわたって研究されてきた比較的一般的な疾患としては実際に類のないことである(The Human Gene Mutation Database; Krawczak et al, *Hum Mutation* 15, 45-51 (2000))。

30

【0051】

GHが完全に欠失している場合には容易に認識可能である重篤な臨床上の表現型が見られ、こうした表現型については詳しく研究されている。患者の表現型がそれほど重篤ではなく、患者の選別基準が実際に特定されているような研究報告では、患者の特定策において、成長不全の診断指標として患者の年齢に対する平均身長からの患者の身長の偏差が一般に用いられてきた。

40

【0052】

上記に述べたような基準(a)及び(b)を用いた患者の選別法は、重度のIGHD関連成長不全の患者を定義するものである。本発明者等は、研究用の患者の選別に用いられる基準を緩和することによって成長不全の原因がGH欠損症のスペクトルの異なる部分に帰因する患者をも包含することが可能であり、これにより新たな原因突然変異損傷の群が

50

定義されうると提唱してきた。これらの新たな損傷の中には、正常な免疫学的応答性を示すが生物学的活性はほとんどあるいはまったく示さない、安定しているがその機能は不全であるGH分子を生成するものが含まれる。ラジオイムノアッセイ試験の結果に基づいた場合、機能不全のGH分子は誤って正常な分子とみなされてきた可能性があるのである。仮にこうした機能不全の変異体が一般的であるとすると、ラジオイムノアッセイに基づいたGH「機能試験」に我々が現在依存していることでGH欠損症が過小診断されていることになる。更に、このことは真の機能性診断アッセイの開発が急務であることを実証するものである。

【0053】

アルバートソン・ウィクランド等 (Albertsson-Wiklund et al (Horm Res 49(2) 7-13 (1998)) は妊娠期間に比して小さく産まれた(SGA)子供の出生後の発育パターン及び最終身長を特徴付け、SGAで出生した別群の子供の青春前においてホルモンの状態を評価する研究を行った。彼等の研究によると、SGAの子供の大半で出生後最初の2年間で成長が追いつき、GH結合タンパク質のレベルは先に「正常な」子供について報告されている範囲内の値を示した。これに対し、IGF-1、IGFBP-3、及びレプチンのレベルは大幅に低下した。この研究ではSGAを機能不全GH変異体の同定または存在と関連付けることは行っていない。

【0054】

本発明者等は、既存の基準には、対象となる患者もしくは個人が関連の測定を行ううえで少なくとも幼年期に達していなければならないという難点があるものと考えている。現段階では、出生時もしくは出生以前に可能な測定に基づいた基準は存在していないのが実情である。更に本発明者等は、身長速度は絶対身長測定と比較してより高感度の成長不全の指標であると考えている。子宮内で測定される胎児の身長速度(他の変量は正常であるものとして、必要に応じて、より後期の発生段階での身長速度、及び/または成長不全、及び/または低身長、及び/または身長速度の低下、及び/または骨年齢の遅延、とともに)によって、GHをまったく有さない古典的なIGHD患者の表現型と比較して軽度の表現型を有するが、身長測定値のみに基づいて選別される患者と比較してGH1遺伝子の損傷を有する可能性が高い一群の患者の特定が可能となったのである。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0055】

すなわち本発明は、個人におけるGH機能不全の指標として有効なGH1の変異を検出するための検出方法であって、

(a) 個人からヒトGH1遺伝子のヌクレオチド配列を含む試験試料を得る工程と、

(b) 前記試験試料から得られた配列をヒトGH1遺伝子の配列であることが分かっている標準配列と比較する工程とを含み、試験試料の配列と標準配列との相違によって、GH機能不全の指標として有効な変異(以下、「GH1の変異体」と称する)の存在が示される検出方法において、当該技術分野における常法によって診断される不十分な胎児身長速度として定義される子宮内発育遅延(IUGR)を示すこと、及び/または、当該技術分野における常法によって診断される妊娠期間に比して不十分な(小さな)胎児身体サイズ(体重及び/または体長)として定義される、妊娠期間に比して小さいこと(SGA)の一方もしくは両方の性質を示す個人から前記試験試料は得られることを特徴とする検出方法を提供する。

【0056】

例えばIUGRの判定法として受け容れられている方法は、ダン(Dunn, Acta Paediatr Scand 319 [Suppl] 7-16 (1985))及びデ・ジガー(de Zegher et al in J Clin Endocrinol Metab 82:2021-2026 (1997))によって述べられている。IUGRは子宮内評価または「出生時」評価により定義することが可能である。妊娠

期間は子宮内でのあるいは出生時の発育状態の評価に常に関係していることから、胎児あるいは赤ちゃんの発育が妊娠期間に比して遅れているか否かの判定に極めて重要である。子宮内評価法としては、赤ちゃんの妊娠期間中の異なる時点で超音波測定を2回行うことによる2回直接子宮内発育評価法で行うことが可能である。

【0057】

IUGRを判定するための別の方法では、出生時における体長の評価を行う。これはSGA(体長)の判定にも適当な方法であり、任意の子供に対して妊娠期間での基準となる体長/身長チャートに関連付けて行う。したがって測定値が一般集団のデータに関連付けられることから、こうした判定を行ううえで両親の身長を知る必要がない。測定された体長が標準値から少なくとも2×標準偏差分だけ異なる場合、その個人はIUGRであるか、SGAであると考えられる。SGAでは、同様の判定を体重に関して行うことも可能である。ここでもやはり、集団の基準値を2SD以上下回る場合にはその個人はSDAとみなされる。こうしたSDA法は当業者にも周知のものであって、アッシャー(Usher et al., J Pediatr 74: 901-910 (1969))等、ニクラソン(Niklasson et al., Acta Paediatr Scand 80: 756-762 (1991))等、及びランケ(Ranke et al., Horm Res 48 [Suppl 1]: 72-4 (1997))等によって述べられている。

10

【0058】

専門家の中には特に体長の測定値に関してIUGRとSGAを互換可能に用いるものもいる。一方の状態を他方の状態の指標として用いることも可能である。例えば体重に基づいたSGAは、妊娠期間に比して低体重である(SGA)ことがIUGRであることの指標となることから重要である。しかしながらこれら2つの状態は常に同時に生ずるわけではない。ある個人がIUGRであればSGAであるが、SGAが体重で評価されていて(かつ個人がこの基準を満たし)なおかつIUGRが体長で評価されて(かつ個人がこの基準を満たさない)いる場合にはIUGRでなくともSGAであり得る。

20

【0059】

本発明は更に本発明の上記の方法にしたがって検出されるかあるいは検出可能なGH1の変異体を提供するものである。

【0060】

本発明は更に、GH1の変異体によってコードされるアミノ酸配列を有するタンパク質などのGH1の変異体(以下、「GH変異体」)の転写産物を提供するものである。ただし、この場合のGH1の変異体は本発明の上記の方法にしたがって検出されるかあるいは検出可能なものである。

30

【0061】

(本発明のコンテキストでは、「患者」、及び「個人」なる用語は相互に互換可能に用いられている。)

【0062】

本発明の好ましい一検出方法では、前記の試験試料は、上記のIUGR及び/またはSGAの他に1以上の更なる基準を示す個人から得られる。すなわち、

40

(i) 所定の発育パターン(複数の身長測定値によって与えられる。(Brook CDG (Ed) Clinical Paediatric Endocrinology 3rd Ed, Chapter 9, p141 (1995, Blackwell Science))として定義される成長不全(この発育パターンは、標準身長チャート(Tanner et al Arch Dis Child 45: 755-762 (1970))上にプロットした場合に両親の身長に基づくその個人の推定目標成人身長の範囲を逸脱する個人の成人身長を予測するものである。)、及び/または、

(ii) その年齢に比して25パーセント未満の身長速度、及び/または、

(iii) 実年齢と比較した場合に少なくとも2年のタナー-ホワイトハウススケールに基づいた骨年齢の遅延(ただし5歳以下の子供または思春期の発育の臨床所見の見られ

50

た子供を除く)、及び/または、

(i v) I U G R または S G A を引き起こす他の疾患が見られないか、上記基準 (i) ~ (i i i) に含まれること、及び/または

(v) 試験の種類、試験結果、又は実際子供が試験に参加したか否かに関わりなく、G H 分泌試験が適性に行われるうえで十分な臨床上の注意を喚起するに足る臨床的表現型、である。

【 0 0 6 3 】

基準 (i v) 及び (v) は、「観察された成長不全を説明する G H 軸欠陥の可能性以外に特定可能な病理がない」こととしてまとめられる。重要な基準として、子供の評価を行う医師が G H 分泌試験が適性に行われるよう子供の発育パターンに関して十分に注意を払うべきであった点がある。選択された子供は示した。

10

【 0 0 6 4 】

好ましくは、基準 (i) ~ (v) は、特定の個人/患者に関して (i)、(i i)、(i i i)、(i v) ならびに (v) がそれぞれ満たされなければならないため、累積的に用いられることが好ましい。しかしながら、5歳以下の子供ならびに思春期の発育期にある子供の場合では、こうした段階での骨成長における差が説明されるように骨年齢遅延の基準を改変する必要がある。したがって基準 (i)、(i i)、(i v) ならびに (v) が満たされることがより好ましい。

【 0 0 6 5 】

基準 (i) ~ (i v) に関しては、下記に詳述するような、容易に利用可能かつ当該技術分野において記載されている周知の方法ならびにパラメータにしたがって各基準の評価を行うことが可能である。

20

【 0 0 6 6 】

基準 (i) の参照用として有用なものに、Tanner and Whitehouse Arch Dis Child 51 170 - 179 (1976) がある。患者の目標成人身長範囲は、両親身長中央値 (M P H) として算出される。M P H は性別に依存し、10 ~ 90 パーセントイルの範囲である。

【 0 0 6 7 】

男子の場合の M P H = (父親の身長 + (母親の身長 + 13)) / 2 ± 6 ~ 8 c m (通常は 7 . 5 c m)、及び

30

女子の場合の M P H = ((父親の身長 - 13) + 母親の身長) / 2 ± 6 ~ 8 c m (通常は 6 c m)

【 0 0 6 8 】

これらは、ヒト成長に関する分野で用いられる標準的な試験及び測定値であり、他の許容される任意の計算方法を用いて成長不全を判定することも可能であるが、目標身長範囲の限界値の予測に用いられる公式に関するブルックの記載 (前出、1996) ならびに標準身長チャートに関するタナーの記載 (前出、1970) に基づいた上記の方法が本発明では好ましい。

【 0 0 6 9 】

したがってこれは G H 機能不全の患者の特定において従来用いられてきたものとは実質的に異なる基準であり、両親の身長に基づいて患者の (将来的な) 成人身長の予測を行うものである。

40

【 0 0 7 0 】

(i i) タナー J . M .、ホワイトハウス R . H . による Atlas of Children's Growth (1982 , London : Academic Press) ならびにパトラー等による Ann Hum Biol 17 177 - 198 (1990) は、その患者の身長速度が患者の年齢では 25 パーセントイル未満にあるかという上記の基準の判定を可能にする統計のソースである。

【 0 0 7 1 】

(i i i) 骨年齢遅延の年数を評価するタナー - ホワイトハウススケールは、タナー

50

J. M.、ホワイトハウス R. H.、キャメロン N等により Assessment of Skeletal Maturity and Prediction of Adult Height (1983, London: Academic Press) に述べられている。本発明の方法では、個人は好ましくは約3.5~4年の骨年齢遅延を示す(実年齢と比較して)。個人における骨年齢遅延の評価は、1回以上評価が行われる場合や個人が若いほど変動のレベルが大きく、例えば、2歳児の複数回の評価を行う場合には骨年齢の変動は±6ヶ月であるが、3歳児では変動は±4ヶ月である、といった具合である。

【0072】

(iv) 低身長はGH機能不全以外の状態の副次効果である可能性もあることから、こうした疾患を有する患者からの試験試料は本発明の方法から除外する。その患者がGH機能不全と同様の症状を呈する他の疾患を有さないことはベースライン調査によって判定する。したがって「ベースライン調査」には、特に甲状腺機能低下症；偽副甲状腺機能低下症；小児脂肪便症などの栄養障害；腎及び肝疾患；貧血などの血液学的疾患；及び、ターナー症候群などの染色体疾患が成長不全の原因ではないことを確認するための核型を除外する試験が含まれる。患者は更に、例えば先天性心疾患などの心疾患、リウマチ性関節炎や炎症性腸疾患などの慢性自己免疫疾患、重篤な喘息や嚢胞性繊維症などの慢性呼吸器疾患、及び軟骨形成不全などの骨障害など、成長不全の他の原因を除外する目的で詳細な臨床試験を受けていてもよい。上記に特定した物理的疾患ばかりではなく、小児期の成長不全の別のよく知られた原因である心理社会的遮断を除外する目的で完全な既往歴を得て医学的検査を補ってもよい。

【0073】

必要に応じて(v)。患者に1以上の成長ホルモン機能試験が行われていてもよい。「成長ホルモン機能試験」なる用語は、特にインスリン誘発低血糖試験(IST)のような、上述の刺激試験などの成長ホルモン分泌の試験のことである。

【0074】

GH機能試験は通常、身長が低く、内分泌科への2回以上の来院にわたって臨床的評価が行われるとともに身長のモニタリングが行われ、他の検出可能な成長不全の原因がなく、したがってインスリンの静脈内投与による血糖値の大幅な低下といった適当な刺激の後には脳下垂体から成長ホルモンを分泌する能力について評価を行うことが妥当であると考えられる患者に対して行われる。本発明の方法では個人の成長ホルモン機能試験の結果は正常であることが好ましい。

【0075】

したがって本発明に基づく検出方法では、測定値は出生前または出生時の基準に依存もしくは関係するのに対して、従来のは出生後の個人の成長に関する生後のイベントならびに個人の身長とその両親の身長との関係に注目したものである。GHは胚の成長に一定の役割を果たすがそれは小さなものであると広く考えられている(Gluckman et al in J Pediatr 121:920-3(1992))。更に、生後最初の2~3年の急速だが急激に減速する成長率(成長の幼児期の要素)は、栄養学的に定まるところが大きいようである。GHの分泌に大きく左右されるのは成長の次のフェーズである小児期の要素である(Clinical Paediatric Endocrinology, Third Edition, Edited by Charles G.D Brook chapter 6, page 85-106)。したがって本発明はIUGR及び/またはSGAのような出生前または出生時の基準がGH1の状態に関連付けられることを期せずして発見したものである。

【0076】

GH1の突然変異のスペクトルの幅が大きくなることによって分子遺伝学のチームにおける遺伝性GH欠損症の再定義は避けられない。更に新たなタイプの低身長が認識されることによって疾病単位としてのGH欠損症の再分類が必要となる。このことは、成長ホルモンによる治療が有効と考えられる低身長の個人のスクリーニング及び同定にとって重

要な意味を有することは明らかであろう。

【0077】

本発明の検出方法で患者から得られる試験試料は、頬粘膜のスメア、血液試料や毛髪など標準的手法によって患者のリンパ細胞から抽出したゲノムDNAを含むことが好ましい。この後、これらに限定されるものではないがゲルまたはキャピラリー電気泳動質量分析やピロシーケンシングなどの遺伝子配列決定または多型検出用の任意の適当な方法によってGH1遺伝子分析を行う。これは好ましくは以下の工程にしたがって行う。

【0078】

1(a) . GH1遺伝子の全体(プロモーター、コード領域の5個のエクソン、イントロン、及び非翻訳領域)を含む3.2kbのフラグメントの増幅、好ましくはPCR増幅の後、GH1遺伝子に特異的であるように設計されたプライマーを用いて、重複した、より小さな構成フラグメントのnested PCRを行う。6種の既知のプライマーを使用する場合と同様、パラロガスで緊密にリンクし、高い相同性を有するGH2、CSH1及びCSH2遺伝子、ならびにCSHP1偽遺伝子が不用意にPCR増幅されることによって起こるクロスコンタミネーションを防止するうえで新規なGH1特異的遺伝子の設計が重要であることが示された。したがって本発明の方法では、GH1遺伝子に特異的なフラグメントと1以上のGH1遺伝子に特異的なプライマーを用いて、個人すなわち機能不全のGHを有することが疑われる任意の個人のGH1遺伝子をPCR増幅する。GH1遺伝子に特異的なフラグメントとは、その配列がGHクラスターの他の4つのパラロガス(GH1ではない)な遺伝子に見られないGH1遺伝子に固有のフラグメントであり、1以上のGH1遺伝子に特異的なプライマーとは、GHクラスターの他の4つのパラロガス(GH1ではない)な遺伝子の相同なフランキング領域に結合できないものである。好ましくは増幅されたGH1遺伝子全体;及び/又は

1(b) . 患者のGH1遺伝子の約15kb上流に位置する遺伝子座調節領域(超高感度部位I及びII)にまたがるゲノムDNAの全体またはフラグメントの増幅、好ましくはPCR増幅(Jones et al Mol Cell Biol 15 7010 - 21 (1995))。遺伝子座調節領域(LCR)はGH1転写のレベル及び時間に影響するエンハンサー領域である。LCRはGH1遺伝子の5'側14kbに位置し、GH1遺伝子クラスターの遺伝子の調和した発現を制御している。新規なオリゴヌクレオチドプライマーを使用して特定の患者(実施例5)の2個の重複するフラグメント(254bp及び258bp)にPCR増幅を行ったところ、全ての患者で1.9kbのLCRフラグメントが増幅された(実施例5A)。

【0079】

2 . 必要に応じて、トランスゲノミック社のWAVE(商標)システムを使用した変性高速液体クロマトグラフィ(DHPLC)によって全GH1遺伝子またはそのフラグメントについて突然変異スクリーニングを行うことが好ましい(O'Donovan et al Genomics 52 44 - 49 (1998))。このスクリーニング法は、極めて高速、安価、高感度、かつ再現性が高いことから選択され、少なくとも本発明者等の研究では95%よりも高い検出効率を示した。DHPLCによって検出される「バンドシフト」は、潜在的なDNA配列の変異体を表していると考えられる(そうでない場合、3.2kbのGH1遺伝子を含むPCRフラグメントをDHPLC工程を行わずに直接DNA配列決定してもよい)。;及び

3 . DNA配列決定によるこうした変異体のキャラクタリゼーション(自動化あるいはマニュアルの方法による)、及び必要に応じて好ましくは、

4 . GH1遺伝子損傷の位置に合わせた方法を用いたこうした遺伝子損傷の機能的キャラクタリゼーション、及び示唆される機能不全のメカニズム。

【0080】

したがって本発明は更に、上記に述べたGH1の分析で使用するための新規なGH1特異的プライマーを提供するものである。このプライマーとしては、前記DHPLC工程での使用に適したプライマー(更なる詳細については実施例3、第6表を参照) :

CTC CGC GTT CAG GTT GGC (GHD1F);
 AGG TGA GCT GTC CAC AGG (GHD1R);
 CTT CCA GGG ACC AGG AGC (GHD2R);
 CAT GTA AGC CAA GTA TTT GGC C (GHD3F);
 GGA GAA GGC ATC CAC TCA CGG (GHD4R);
 TCA GAG TCT ATT CCG ACA CCC (GHD5F);
 CGT AGT TCT TGA GTA GTG CGT CAT CG (GHD6R); 及び

TTC AAG CAG ACC TAC AGC AAG TTC G (GHD7F);

及び前記LCR工程での使用に適したプライマー(すべて5' 3')、実施例5及び5 Aを更に参照:

GTGCCCAAGCCTTTCCC (LCR15: 1159-1177);

TGTCAGATGTTTCAGTTCATGG (LCR13: 1391-1412);

CCTCAAGCTGACCTCAGG (LCR25: 1346-1363); 及び
 GATCTTGGCCTAGGCCTCG (LCR23: 1584-1602); なら
 びに

LCR 5A (5' CCAAGTACCTCAGATGCAAGG 3'); 及び

LCR 3.0 (5' CCTTAGATCTTGGCCTAGGCC 3'); ならび

LCR 5.0 (5' CCTGTCACCTGAGGATGGG 3');

LCR 3.1 (5' TGTGTTGCCTGGACCCTG 3');

LCR 3.2 (5' CAGGAGGCCTCACAAAGCC 3'); 及び

LCR 3.3 (5' ATGCATCAGGGCAATCGC 3') が1.9kbの
 フラグメントの配列決定に適している。

【0081】

GH1遺伝子の全体のPCR増幅に使用するための他のプライマーとしては次のものが
 含まれる:

GH1G5 (5'GGTACCATGGCTACAGGTAAGCGCC 3');

GH1G3 (5'CTCGAGCTAGAAAGCCACAGCTGCC 3');

BGH3 (5'TAGAAGGCACAGTCGAGG 3');

GH1R5 (5'ATGGCTACAGGCTCCCGG 3'); 及び

GH1R3 (5'CTAGAAGCCACAGCTGCC 3')。

【0082】

本発明の検出方法ならびにこれにより同定可能もしくは検出可能なGH1の変異体は次
 の更なる利点を有する。

【0083】

1. 新たな損傷の特定及びキャラクタリゼーションによるGH1遺伝子突然変異の既知
 のスペクトルの拡張、

2. 低身長の原因におけるGH1遺伝子突然変異の役割の評価、

3. 新たなGH1遺伝子損傷の遺伝様式の特定、

4. 突然変異体の遺伝子型と臨床上的表現型との間の関係の解明、

である。これはGH欠損症の早期検出ならびに適当な臨床管理を行ううえで不可欠である
 と考えられる。

【0084】

5. GH分子の構造及び機能に対するGH1突然変異の影響の評価。これは、低身長の
 臨床上的スペクトルの穏和な側に臨床上的表現型を有する子供の評価において特に重要で
 ある。この患者群では、免疫学的に活性であるためにGH機能試験では正常範囲となる機
 能不全GHが産生されている可能性がある。

【0085】

6. 遺伝性GH欠損症の高速DNA診断試験の開発。

【0086】

7. 現在、GH欠損症は集団で過小診断、過小評価されているという本発明者等の仮定の評価。

【0087】

したがって更なる自然発生GH1損傷のキャラクタリゼーションはGHの構造、機能、及び発現の研究にとって極めて重要となる。新規なコード配列変異体の研究によって、GHの機能のみばかりか、GHとその受容体(GHR)との間の相互作用、及びGHRによって媒介されるシグナルトランスダクションプロセスの理解が深まるはずである。得られる知見は新世代の治療薬の合理的な設計に関連性を有するものである可能性がある。同様にプロモーター領域の自然発生GH1損傷の研究によってGH1の遺伝子発現の調節に対する新たな知見が与えられるはずである。したがって広範なスペクトルの突然変異性損傷によって、遺伝性のGH欠損症における突然変異体の遺伝子型と臨床上の表現型との間の関係に対する我々の理解は必ずや深まるものと考えられる。家族性GH欠損症の早期検出及び適切な臨床管理を行ううえでこれらの研究が不可欠であることは明らかである。

10

【0088】

したがって本発明は更にGH1の変異体を提供するものである。この変異体はGH1とは異なるであって、本発明の方法によって検出可能であるが、従来用いられてきた方法では検出できない。本発明のこうしたGH1変異体には、実施例6、特に下記第7表Bでキャラクタライズされるものが含まれる。

20

【0089】

上記に示したようにGH分泌を評価するための現在の試験には多くの異なるものが存在するが、現時点で利用可能な試験で理想的なものはどれひとつとしてない。ヒトGHの分泌はパルス型であり、GHパルスの振幅及び振動数は極めて変動しやすい(対象となる個人の睡眠、運動、ストレスや思春期段階などの多くの内的、外的因子によって影響される)ことから、精度の高い情報を与える試験では、専用の研究棟で患者を厳密に監視する必要がある。したがってこうした試験は時間がかかり、高価であって、患者とその家族に大きなストレス及び苦痛を強いる。インスリン誘発低血糖試験(IST)は特に注目に値する。この試験は上述のように多くの医師によってGH分泌を評価する目的で使用されているが、試験を実施するうえでの必要条件として患者で誘導される低血糖に対する必要な処置による死亡例が発生している。したがってISTなどの試験を行う決定が、低身長の子供の評価において所定の地位を与えられる以前に慎重に考慮されることは極めて重要である。したがって低身長の患者のスクリーニングに用いるためのDNA試験の開発は現在利用されている他の試験と比較して多くの利点を有する。

30

【0090】

そこで本発明は機能不全GHを有することが疑われる患者をスクリーニングするためのスクリーニング方法を提供するものである。本スクリーニング方法は、

(a) 患者からヒトGH1遺伝子のヌクレオチド配列又はこれによってコードされるポリペプチド配列を含む試験試料を得る工程と、

40

(b) 前記試験試料より得られた配列の所定の領域を、所定の配列の対応する領域と比較する工程とを含むスクリーニング方法において、前記所定の配列は本発明の上記の方法にしたがって検出されるGH1の変異体またはこれによってコードされるポリペプチドから選択されることを特徴とする方法である。

【0091】

より詳細には本発明のスクリーニング方法は、前記所定の配列が変異体GH1遺伝子の所定領域に対応する所定の核酸配列を有するオリゴヌクレオチドであることを特徴とする。この領域は、野性型配列の対応する領域と比較した場合、少なくとも1つの変異を有するものである。

50

【0092】

特に好ましいのは、前記の変異が、後述の実施例6及び第7表で特定されるもののいずれかのように、本発明の検出方法によって検出可能なものである場合である。

【0093】

好ましくは、前記試験試料は従来の方法で抽出可能なゲノムDNAである。

【0094】

したがって本発明は更に、GH機能不全を判定するためのスクリーニング方法であって

(a) GH機能不全が疑われる個人から第1の試験試料を得ることと、

(b) 以下の特徴、すなわち、当該技術分野で知られる標準的方法によって診断される不十分な胎児身長速度として定義される、子宮内発育遅延(IUGR)、及び/または、当該技術分野で知られる標準的方法によって診断される、不十分な(小さい)胎児身体サイズ(体重及び/または体長)として定義される、妊娠期間に比して小さく産まれること(SGA)、の一方または両方を示すとともに、更に場合に応じて、

(i) 所定の発育パターン(複数の身長測定値によって与えられる。(Brook CDG (Ed) Clinical Paediatric Endocrinology 3rd Ed, Chapter 9, p141 (1995, Blackwell Science))として定義される成長不全(この発育パターンは、標準身長チャート(Tanner et al Arch Dis Child 45 755-762 (1970))上にプロットした場合に両親の身長に基づくその個人の推定目標成人身長を逸脱する個人の成人身長を予測するものである。))、及び/または、

(ii) その年齢で25パーセントイル未満の身長速度、及び/または、

(iii) 実年齢と比較した場合に少なくとも2年のタナー-ホワイトハウススケールに基づいた骨年齢の遅延(ただし5歳以下の子供または思春期の発育の臨床所見の見られた子供を除く)、及び/または、

(iv) IUGRまたはSGAを引き起こす他の疾患が見られないか、上記基準(i)~(iii)に含まれること、及び/または

(v) 試験の種類、試験結果、又は実際子供が試験に参加したか否かと関わりなく、GH分泌試験が適性に行われるうえで十分な臨床上の注意を喚起する臨床的表現型、の内の1以上を示す個人に由来する第2の試験試料から得られるGH1変異体の対応する遺伝子、これによりコードされるポリペプチド、またはそのフラグメントと、前記第1の試験試料中のGH1遺伝子またはこれによりコードされるポリペプチド、またはこれから得られるフラグメント(例、cDNA)とを比較することを含む、GH機能不全を判定するためのスクリーニング方法を提供するものである。

【0095】

本発明はGHの機能不全が疑われる患者をスクリーニングするためのスクリーニング方法であって、

(a) 患者からヒトGH1遺伝子のヌクレオチド配列を含む試験試料を採取する工程と

(b) 前記試験試料から得た前記配列の所定領域を、所定の配列の対応する領域と比較する工程とを含み、前記所定配列は本発明の検出方法によって同定されるかもしくは同定可能なGH1変異体から選択されることを特徴とする方法を提供するものである。

【0096】

前記所定の配列は変異体GH1遺伝子の所定領域に対応した核酸配列を有するオリゴヌクレオチドであることが好ましい。この領域は野性型配列の対応する領域と比較した場合に少なくとも1つの変異を有する。

【0097】

本発明のスクリーニング方法において第1の試験試料又は試験試料はゲノムDNAを含むことが好ましい。

【0098】

本発明のスクリーニング方法において前記比較工程は、特に検出/比較を行う変異体の数が比較的少ない場合、例えばGH1遺伝子の適当な領域の配列を決定するなど、従来の方法にしたがって行うことが可能である。比較的多数の変異体が用いられる場合にはDNAチップ技術を利用することができる。こうした技術では例えばチップは小型の並列分析素子であり、これを用いて複数の既知の突然変異について又はすべての可能な突然変異についてスクリーニングを行う。スクリーニングは固体支持体に固定された突然変異特異的オリゴヌクレオチドプローブのマイクロアレイに標識した試料DNA(患者から得たcDNAまたはゲノムDNA)をハイブリダイズさせることによって行われる[Southern, Trends Genet 12 110-115 (1996)]。

【0099】

現在用いられている試験と比較した場合の本発明に基づくDNAスクリーニング方法の利点として以下が挙げられる。

【0100】

1. 患者にとって個人病院で行うことのできる程度の血液検査を一回行うだけでよい。現在用いられている試験の多くと同様、入院、長期にわたる医師による監視、及び多数回の血液採取を必要としない。したがって発生するコスト、専門家の拘束時間、及び試験を受ける各患者の苦痛が軽減される。

【0101】

2. 患者の機能性GH欠損症の早期診断が可能である。本DNAスクリーニングは容易に行うことができることから医師が患者の管理上、こうした診断結果をより早期に検討することが可能となる。現時点ではGH分泌に関する試験に内在する問題のため、医師は子供にISTを行う前に、長期、時に数年にわたって外来専用の個人病院で子供を評価することを行っている。こうしたGH欠損症の遺伝学的病因の早期診断によってGHによる早期治療が可能となり、月単位、更により表現型の重篤度が低い患者では年単位で患者の治療を適切に行うことが可能となる。

【0102】

3. GH機能不全についてより多くの患者を試験することができる。本DNA試験は容易に行えることから、患者の内分泌科での初診時に医師は全低身長患者の初期評価の一部としてこれを行うことが可能である。これによって、重篤な成長障害を引き起こすGH1遺伝子の損傷を有する患者や、より穏和な損傷(例、コーディング領域のミスセンス突然変異)を有する患者が検出される可能性が高くなる。これらの患者は、臨床上/表現型上の障害がISTで検出されるほど重篤ではなかったために臨床的に見落とされていた可能性があるが、こうした患者でもGHによる治療が有効である可能性がある。

【0103】

4. 生涯にわたってGHによる治療を要する患者の早期特定が可能である。GH分泌についての初期試験または再試験を行うことなく、また進行度を評価するためのGH未投与期間(「無治療試験」)をおくことなく、こうした患者を適切に特定、治療することが可能である。

【0104】

5. GH機能不全を有する家族を容易かつ早期に特定することが可能である。ある患者で成長障害を引き起こす遺伝子損傷が見つかった場合、患者の他の家族を同じ遺伝子損傷について評価し、GHによる治療が有効であるかを検討することは比較的容易である。

【0105】

6. 診断精度が向上する。GH分泌についての試験は、同じ研究機関内や異なる研究機関間でアッセイの結果の再現性に関して変動が大きいことで悪評高い。本DNAスクリーニングによればこの問題は過去のものとなろう。更にGH分泌試験の結果は、例えば患者が更に甲状腺機能低下症を併発していたり、遅発思春期である場合など特定の状況では解釈が非常に困難である。本DNAスクリーニングによってこうした疑いがなくなり、GHによる治療が有効と考えられる患者で治療開始の遅れが防止される。

【0106】

10

20

30

40

50

そこで本発明は更に本発明のスクリーニング方法を行ううえで使用するのに適したキットを提供するものである。本キットには：

(a) 変異体GH1遺伝子の所定領域に対応した核酸配列を有するオリゴヌクレオチドであって、対応する野性型配列からの本発明に基づく変異を前記領域が少なくとも1つ有するようなオリゴヌクレオチド、

(b) (a)で特定された領域内の野性型配列に対応する核酸配列を有するオリゴヌクレオチド、及び必要に応じて、

(c) 患者のDNAの所望の領域を増幅するためのPCRを行うのに適した1以上の試薬を含む。

10

【0107】

こうした試薬としては、例えばGH1遺伝子の特定のエクソンに対応したPCRプライマー、及び/または本明細書中で述べたようなプライマー、特に上記に述べたような新規なプライマー、及び/またはTaqDNAポリメラーゼなどのPCRで使用する他の試薬が含まれる。

【0108】

好ましくは本キットのオリゴヌクレオチドは、前記変異体配列については例えば20塩基対など20~25塩基対の範囲であり、前記野性型については変異が1塩基対の置換である場合には20、また変異が5塩基対の欠失である場合には25塩基対からなる。いずれの場合も本発明のオリゴヌクレオチドは、選択された領域に固有となるように、かつ、ゲノムのどこかで重複しないものとなるように選択されることが必要である。

20

【0109】

明らかなことであるが、15~20以上など、複数の変異についてスクリーニングすることが望ましい状況では、ヌクレオチド40種以上からなるキットが必要となる。したがってDNAチップ技術を利用した別のスクリーニング方法では本発明は更に、固体支持体に固定された、上記キットの構成要素(a)として定義された複数種のオリゴヌクレオチドを提供するものである。

【0110】

ナノテクノロジー分野で開発が進められているシグナル増幅法(Q-Dotsなど)などの他のヌクレオチド検出法を利用することも可能である。また1分子検出法を利用することも可能である(STMなど)。その場合、本発明に基づくキットにはこうした別法で使用される1以上の試薬が含まれる。

30

【0111】

また、本発明に基づくスクリーニング方法及びこれに対応したキットは、タンパク質/アミノ酸配列(例、GH1の変異体またはGH変異体に対して特異的な抗体)などのGH1の変異体若しくはGH変異体の存在を示すか又は相関のある1以上の所謂「代用マーカー」に基づいたものであってもよい。こうした「代用マーカー」は、

(a) 任意の生体分子(ヌクレオチド、タンパク質、糖類、脂質など、ただしこれに限定されない)；

(b) 化合物(薬物、その代謝産物、及び他の化合物など、ただしこれに限定されない)；かつ/または

40

(c) 所定の物理的特性、を備え、患者の体内におけるその存在、非存在、又は量が測定可能であってGH変異体またはGH1の変異体の存在を示すかその存在と相関しているものを使用することができる。

【0112】

更に、本発明に基づく好適な別のスクリーニング方法では、従来のタンパク質配列決定法(質量分析法、マイクロアレイ分析、ピロシーケンシングなど)、及び/または抗体に基づいた検出法(例、ELISA)、及び1以上のこうしたタンパク質配列決定法を行うことによって同定可能なGH変異体(本発明の方法によって検出されるGH1の変異体によってコードされるものなどのhGHの変異体を含むタンパク質/ペプチド配列)を含

50

む試験試料を得てもよい。

【0113】

こうした別例では本発明に基づくキットはこうした別法で用いられる1以上の試薬を含んでいてもよい。

【0114】

本発明の方法によって検出可能なGH1変異体には、GH機能不全のスクリーニング試験で用いるスタンダードとしての用途以外にも更なる用途が考えられる。例えば、変異がGH1遺伝子のプロモーター領域にあるもの以外の変異体を使用して、脳下垂体性巨人症や末端肥大症の場合のようにGH産生が過剰刺激されている患者を治療することができる。

【0115】

本発明は更に、

(a) 2個の終止突然変異を有する1以上のGH変異体又はGH1の変異体の用途であって、成長ホルモンをまったく産生せず、かつ従来の診断法によって古典的GHDとして分類される患者の特定における用途、

(b) 成長ホルモン受容体またはその結合タンパク質へのGHの結合を改変するGH変異体またはGH1の変異体であって、該改変によって変異体GHが結合タンパク質に結合することによる下垂体からの輸送が低減または阻害されて未結合タンパク質が組織受容体に到達する間に破壊されるようなGH変異体又はGH1の変異体、

(c) 下垂体でのGHタンパク質の亜鉛二量体貯蔵型の生成を阻害するGH変異体又はGH1の変異体、

(d) GH変異体又はGH1の変異体によって発現されるタンパク質であって、GH受容体に対して拮抗性を有するタンパク質であるとともにその受容体結合定数は変異体タンパク質の効果及び阻害作用に打ち勝つ(変異体タンパク質は受容体への結合で野性型と競合する)ために患者を治療するうえで必要な外因性GHの量(用量)を決定するようなタンパク質、

(e) 治療、診断、又は検出方法のための本発明に基づくGH変異体又はGH1の変異体の用途、

(f) 疾患に対する個人の感受性を判定するための本発明に基づくGH変異体又はGH1の変異体の用途、

(g) 糖尿病、肥満、感染症、癌、又は心臓疾患に対する感受性を判定するための本発明に基づくGH変異体又はGH1の変異体の用途、

(h) 結合欠陥及び/又は下垂体貯蔵欠陥を判定するための本発明に基づくGH変異体又はGH1の変異体の用途、

(i) 末端肥大症における拮抗剤治療の診断用量を決定するための本発明に基づくGH変異体又はGH1の変異体の用途、

(j) 医療措置における本発明に基づくGH変異体又はGH1の変異体の用途、

(k) 遺伝子療法における本発明に基づくGH1の変異体の用途、

(l) 病態に関連した1以上の多型を判定するための本発明に基づくGH変異体又はGH1の変異体の用途、

(m) 医薬組成物、診断用組成物若しくはキット、または検出キットを調製するための本発明に基づくGH変異体又はGH1の変異体の用途、

(n) 変異体GH1遺伝子の所定領域に対応した核酸配列を有する長さ約20ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドであって、前記領域は対応する野性型配列と比較した場合に少なくとも1つの変異を有し、該変異は1以上の本発明に基づく変異を含むようなオリゴヌクレオチド、

(o) (n)のオリゴヌクレオチドの相補体を含むオリゴヌクレオチド、

(p) 前記変異に対応するヌクレオチドが該分子の3'末端に位置する(n)のオリゴヌクレオチド、

(q) 変異体GH1遺伝子にはハイブリダイズするが野性型GH1遺伝子にはハイブリ

10

20

30

40

50

ダイズしない一本鎖DNAプローブであって、該変異体GH1遺伝子は本発明に基づくものから選択されるようなDNAプローブ、

(r) 固体支持体に固定された核酸分子のアレイであって、(q)に記載の一本鎖DNAプローブを有するアレイ、

(s) GH機能不全が疑われる患者をスクリーニングするためのスクリーニング方法であって、

(i) 患者からヒトGH1遺伝子のヌクレオチド配列を含む試験試料を得る工程と、

(ii) (n)に記載の変異体GH1遺伝子の所定領域に対応する前記患者からのヒトGH1遺伝子の所定領域の配列を比較する工程と、を含むスクリーニング方法、

(t) 前記比較工程は前記所定配列とのハイブリダイズを行うことを含む(s)に記載の方法、 10

(u) 前記比較工程はヒトGH1をコードした核酸の少なくとも一部を増幅することを含む(s)に記載の方法、

(v) 前記比較工程は、本明細書中に述べられるものの中から選択される1以上のオリゴヌクレオチドによってヒトGH1をコードした核酸の少なくとも一部を増幅することを含む(s)に記載の方法、

(w) 本明細書中に述べられるものの中から選択される増幅オリゴヌクレオチド、

(x) 本明細書中に述べられるような患者のGH1遺伝子の1以上の変異(野性型に対する置換、挿入、または欠失など)、特に上記(n)~(q)の1以上に記載の変異の種類を決定するために必要な構成要素を含む診断キットで、特に多型部位を有するこうした 20
遺伝子のセグメントの増幅に使用されるオリゴヌクレオチドを含む診断キット、

(y) 参照hGH配列からの本明細書中に述べられるような変異を示すアミノ酸位置を有する1以上のエピトープに対する抗体群から選択される抗体であって、そのアミノ酸の位置で前記変異体と野性型アミノ酸を区別することが可能な抗体、及び

(z) (y)に記載の抗体を含む診断キットを提供するものである。

【0116】

本発明は更に、本発明のGH変異体、特に本発明の検出方法によって検出可能な本明細書中に述べられるような変異体を薬学的に許容されるその担体とともに含む組成物を提供する。 30

【0117】

本発明を以下に実施例によって説明する。

【0118】

実施例1 - 患者の選別

患者のソース

カーディフのウェールズ大学医学部、地域小児科成長、内分泌、糖尿病サービスからの紹介、ならびに他の同様の英国内のセンター(ニューポート、バーミンガム、ブリストル、レクサム、リバプール、ストック・オン・トレント、ポーツマス、及びサウサンプトン)の協力により低身長症の子供を同定した。家族歴、家系図、成長パラメータの記録、及び以前に行われた内分泌に関する調査を含む完全な病歴を得た。指標となる例、両親、兄弟について可能な限り正確な成長学を記録した。指標例及び適当な近縁者から分子遺伝学的分析のための血液サンプルを採取した。更なる家族をジョン A. フィリップ三世教授(米国テネシー州ナッシュビル在住)、モハマド マグニー博士(イタリア パビア在住)、ならびにタマス ニーダーランド博士(ハンガリー ジェール在住)から紹介いただいた。現在までに69例のGH欠損症家系からサンプルを得た。 40

【0119】

使用基準

第5表B中のすべての患者についてSGAを基準として使用した。SGAは出生体重及び/または出生体長が出生時の妊娠期間に比して-2SD未満であることによって定義される。行頭に「IUGR」と示された行で「Y」とある患者は上記に定義したような子宮 50

内発育遅延も呈した患者である。

【0120】

行頭に「CF」と示された行で「Y」とある患者は更に以下の基準を満たす患者である。

【0121】

(i) 本発明に基づく基準(i)に関して上記に定義したような標的身長範囲率(%)の下限を下回る成長。

【0122】

(ii) 25パーセントイル未満の身長速度。

【0123】

(iii) 実年齢と比較した場合に少なくとも2年、例として患者18の場合では3.5~4年の骨年齢の遅延。ただし5歳以下の子供または思春期の発育の臨床所見の見られた子供を除く。

【0124】

(iv) 他のすべての調査項目が正常値であること。すなわち、IUGRまたはSGAを引き起こすことが知られている他の疾患を有さないか、上記(i)~(iii)の基準に包含される場合。

【0125】

(v) 成長ホルモン分泌試験の結果が正常値であること。

【0126】

(vi) 試験の種類、試験結果、又は実際子供が試験に参加したか否かと関わりなく、GH分泌試験が適性に行われるうえで十分な臨床上の注意を喚起する臨床的表現型。

【0127】

第5表B中、GH FT: ピークは、1以上の標準成長ホルモン機能試験における活性の単位(IU/L)を示す。「ランダム」とは、ランダムに測定されたGH測定値を示す。NDは無試験を示す。身長のパーセントイルは、後掲の第7表Bに示したデータとともに、50パーセントイルを大幅に下回る身長を有することが不可欠な選択基準とはならないことを証明するために示したものである。本発明者等は身長がさほど低くない患者においても生ずるGH/GH1の変異を見出した。

【0128】

10

20

30

【表 8】

第 5 表 B : 研究対象患者及び使用した基準の結果

患者番号	IUGR	CF	身長のパーク ンタイトル	成長速度 のパーク ンタイトル(i i)	骨年 齢 遅 延 (年) (iii)	GHFT:ピーク(v)
7		Y	<かつ3ハ°-セン タイトルに平行	25	3	90で111.3
10		Y	3ハ°-セン タイトル	<25	2	38.7
12		Y	0.4	<25	0.5	実施せず
18		Y	<3	25	4	18
34		Y	<0.4	<25	1.33で 0.33	10ラングム
35		Y		<25		
53		Y	<0.4	<25	2	27.2
57		Y	0.4	<25	2.7で 1.21	2.5で27.3
62		Y	<0.4	<25		1.33で27
71		Y	0.4	<25		1.3
72a		Y				
78	Y		<0.4	<25		
79	Y	Y	<0.4	<25		
80			<0.4	<25		
82		Y	<0.4	<25		
83	Y	Y	<0.4	<25		ラングムで正常

10

20

30

【0129】

実施例 2 - GH1 特異的フラグメントのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による増幅

83名の無関係な患者で3.2kbのGH1特異的フラグメントのPCR増幅を行った。ゲノムDNAは標準的手法によって患者のリンパ球から抽出した。

【0130】

Expand (商標名) ハイフィデリティシステム (ロシュ) を使用して、ヒトGH1 遺伝子を含んだ3.2kbの単一のゲノムDNAフラグメントをPCR増幅するため、GH1 特異的配列に対応したオリゴヌクレオチドプライマーとして、GH1F (5' GGGAGCCCCAGCAATGC3'; -615~-599) 及びGH1R (5' TGTAGGAAGTCTGGGGTGC3'; +2598~+2616) を設計した。

40

【0131】

各反応で2本の別個の肉薄の0.65ml PCRチューブを用いた。第1のチューブには、500ナノグラム (ng) ずつの各プライマー (GH1F及びGH1R)、各200µMのdATP、dTTP、dCTP及びdGTP、及び200ngの患者のゲノムDNAに滅菌水を加えて最終容量を25µlとした。第2のチューブには、5µlの10×反応バッファに滅菌水を加えて最終容量を24.25µlとした。両チューブを5分間氷冷した。この時間の後、0.75µlのExpand (商標名) ポリメラーゼミックスを第2のチューブに加え、内容物を混合して第1のチューブに移した。このチューブを30

50

秒遠心して、反応混合物に30 µlのライトミネラルオイル(シグマ)を重層した。次いでこの反応混合物を95 に設定した480または9700プログラマブルサーマルサイクラー(パーキンエルマー)に入れた。

【0132】

次いで反応混合物を以下の条件で増幅した。95 で2分間の後、95 で30秒、58 で30秒、68 で2分間を30サイクル。最後の20サイクルでは、68 での伸長反応を各サイクルで5秒間延長して行った。この後、68 で7分間更にインキュベートして、反応溶液を4 に冷却してから更なる分析を行った。各反応溶液のセット毎にブランク(ネガティブコントロール)を設けた。このブランク反応液はゲノムDNA以外のすべてが含まれるものを使用し、これを使用してコンタミネートされた試薬がないことを確認した。

10

【0133】

10分の1量(5 µl)を1.5%アガロースゲルで分析してnested PCRを行う前にPCR増幅がうまく行われたかを評価した。首尾よくPCR増幅が行われた試料は100分の1に希釈してからnested PCRで使用した。

【0134】

実施例3 - nested PCR

実施例2で得られたフラグメントでnested PCRを行ってそれぞれについてGH1遺伝子の全体をカバーする7個の重複したサブフラグメントを生成した。更に3人の患者を除いてすべての患者でLCR(遺伝子座調節領域)をPCR増幅した(実施例5を参照)。

20

【0135】

Taq Gold DNAポリメラーゼ(パーキンエルマー)を使用して最初の3.2 kb PCR産物の7個の重複サブフラグメントをPCR増幅した。これらの反応で使用したオリゴヌクレオチドを、GH1遺伝子参照配列から決定した配列位置とともに第6表に示した。

【0136】

希釈したロング(3.2 kb)PCR産物の1 µl量を肉薄の0.2 ml PCRチューブまたは96穴マイクロタイタープレートのウェルの1個に入れた。これに5 µl 10×反応バッファ、500 ngの適当なプライマー対(例、GH1DF及びGH1DR)、dATP、dTTP、dCTP及びdGTPを200 µMの最終濃度にまで加え、滅菌水を加えて容量を49.8 µlとし、0.2 µlのTaq Goldポリメラーゼを加えた。

30

【0137】

このチューブまたはマイクロタイタープレートをPrimus 96サーマルサイクラー(MWGバイオテック)に入れ、次の条件でサイクル反応を行った。95 で12分の後、95 で30秒、58 で30秒、72 で2分を32サイクル。この後、72 で10分間更にインキュベートし、反応溶液を4 に冷却してから更なる分析を行った。

【0138】

得られた反応混合物の10分の1量(5 µl)を0.8%アガロースゲルで分析して、WAVE(商標名)DNAフラグメント分析システム(トランスゲノミック社、イギリス国チェシアクルー所在)で変性高压液体クロマトグラフィ(DHPLC)を行うのに先立って反応が首尾よく行われたことを確認した。ヘテロ二本鎖の形成を促進するため、PCR産物を95 で5分間変性した後、50 で45分かけて徐々に再アニーリングを行った。得られた産物をDNAsepカラム(トランスゲノミック社)にかけ、0.1 Mの酢酸トリエチルアミンバッファ(TEAA pH7.0)中、0.9 ml/分の一定流速で2%/分のアセトニトリル(BDHメルク)の線形濃度勾配で溶出した。濃度勾配の開始点ならびに停止点は、PCR産物のサイズにしたがって調節した。分析に要した時間は、カラムの再生及び平衡化に要した時間を含めて増幅試料毎に6.5~8.5分であった。各試料はDHPLC Meltソフトウェア(<http://insertion.stanford.edu/melt.h>)

40

50

tml) を使用して求め、第 6 表に示した融解温度 (T M) にて分析を行った。溶出した D N A フラグメントは U V - C 検出器 (トランスゲノミック社) によって検出した。

【 0 1 3 9 】

【 表 9 】

第 6 表 DHPLC 分析及び DNA 配列決定で使用したオリゴヌクレオチドプライマー

フラグメント	プライマー	配列(5'→3')	位置	DHPLCによる融解温度
1	GH1DF	CTCCGCGTTCAGGTTGGC	-309 ~ -292	60°C
	GH1DR	CTTGGGATCCTTGAGCTGG	-8 ~ +11	
2	GH2DF	GGGCAACAGTGGGAGAGAAG	-59 ~ -40	63°C
	GH2DR	CCTCCAGGGACCAGGAGC	+222 ~ +239	
3	GH3DF	CATGTAAGCCCAGTATTTGGCC	+189 ~ +210	62°C
	GH3DR	CTGAGCTCCTTAGTCTCCTCCTCT	+563 ~ +586	
4	GH4DF	GACTTTCCTCCGCTGGGAAA	+541 ~ +560	62°C
	GH4DR	GGAGAAGGCATCCACTCACGG	+821 ~ +841	
5	GH5DF	TCAGAGTCTATTCCGACACCC	+772 ~ +792	62°C
	GH5DR	GTGTTTCTCTAACACAGCTCTC	+1127 ~ +1148	
6	GH6DF	TCCCAATCCTGGAGCCCCACTGA	+1099 ~ +1122	62°C
	GH6DR	CGTAGTTCTTGAGTAGTGCATC G	+1410 ~ +1435	
7	GH7DF	TTCAAGCAGACCTACAGCAAGTTCG	+1369 ~ +1393	57°C 及び 62°C
	GH7DR	CTTGGTTCCCGAATAGACCCCG	+1731 ~ +1752	

【 0 1 4 0 】

実施例 4 - GH 1 特異的ロング PCR フラグメントの DNA 配列決定とクローニング
クローニング

DHPLC 分析によって潜在的な DNA 配列の変化を含む DNA フラグメントの同定が可能となった。どのアレルが潜在的な配列変化を有するかを決定するため、GH 1 - 特異的なロング (3 . 2 k b) PCR フラグメントを PCR プラスミドクローニングベクター p G E M - T (プロメガ) にクローニングした。クローニングは、1 × 反応バッファ及び 1 μ l (3 単位) の T 4 DNA リガーゼの存在下で 5 0 n g の GH 1 - 特異的なロング PCR フラグメントを 1 0 n g の p G E M - T に最終容量が 1 0 μ l となるように加えて行った。この反応溶液を 1 0 で 1 6 時間インキュベートした。この反応混合物の全体を 1 . 5 m l のチューブに入れて氷冷した。5 0 μ l のコンピテントな DH 5 細胞 (ライフ・テクノロジーズ) を加えてチューブを氷上に 3 0 分静置した。次いで混合物に 3 7 で

10

20

30

40

50

20秒間ヒートショックを行い、再び2分間氷冷した。この後、0.95mlのYT×2培地(水1リットル当たり、16gトリプトン、10g酵母抽出物、5gNaCl)を加え、反応混合物を震盪しながら37℃で1時間インキュベートした。次いで混合物を50μg/mlのアンプシリン、IPTG及びX-galを含有する予め暖めたアガープレート上にプレーティングし、37℃で16時間インキュベートして個別のコロニーを成長させた。

【0141】

各プレートから8個の白色のコロニーを選び、第2のグリッドプレートに移植した。各細菌コロニーの少量を、プライマーとしてGH1DFとGH1DR(実施例3、第6表参照)を用い、上記の条件でPCR増幅して、GH1-特異的なロングPCRフラグメントが首尾よくクローニングされたことを確認した。

10

【0142】

GH1-特異的なロングPCRフラグメントを有するクローンを2mlのYT×2培地中で培養し、キアゲン・spin miniprepキットを製造者の指示にしたがって使用してこの細菌からプラスミドDNAを抽出した。このようにして抽出したDNAは、260nmにて光学濃度を測定し、0.8%アガロースゲル上で電気泳動して、クローンのサイズが適正であることを確認した。これらのクローンの内の4つについて配列決定を行った。

【0143】

自動化DNA配列決定

Primus 96 (MWG)または9700(パーキンエルマー)PCRサーマルサイクラー上、0.2mlチューブまたは96穴マイクロタイタープレート中でBigDye配列決定キット(パーキンエルマー)を使用してGH1特異的なロングPCRフラグメントを含むクローンの配列決定を行った。配列決定に使用したオリゴヌクレオチドプライマーは次のとおり。

20

GH1S1(5'GTGGTCAGTGTTGGAACTGC3':-556~-537);

GH3DF(5'CATGTAAGCCAAAGTATTTGGCC3':+189~+210);

30

GH4DF(5'GACTTTCCCCCGCTGTAATAAG3':+541~+560);及び

GH6DF(5'TCCCCAATCCTGGAGCCCCACTGA3':+1099~+1122)

【0144】

1μgのクローン化DNAを3.2pmolの適当なプライマー及び4μlのBigDye配列決定混合物を用いて20μlの最終容量で配列決定した。次いでこのチューブまたはマイクロタイタープレートをサーマルサイクラーに入れ、次の条件でサイクル反応を行った。96℃で2分の後、96℃で30秒、50℃で15秒、60℃で4分を30サイクル。この後反応溶液を4℃に冷却してから精製を行った。

40

【0145】

反応が完了した配列決定用反応溶液に80μlの75%イソプロパノールを加えて精製を行った。反応溶液を混合し、室温で30分放置した。次いで反応溶液を室温にて14000rpmで20分遠心した。上清を除き、沈殿物に250μlの75%イソプロパノールを加えた。この試料を混合し、室温にて14000rpmで5分遠心した。上清を除き、ペレットを75℃で2分乾燥した。

【0146】

この後、試料をABI Prism 377又は3100DNAシーケンサーで分析した。

【0147】

50

実施例 5 - 成長ホルモンの遺伝子座調節領域の分析

ヒト GH1 遺伝子の約 14.5 kb 上流の DNA 領域は GH1 遺伝子の転写の組織特異的及び発生上の調節に関与していることが知られている (Jin et al Mol Endocrinol 13:1249-1266 (1999))。これは遺伝子座調節領域 (LCR) として知られ、その DNA 配列を GenBank (アクセッション番号: AF010280) より入手した。ヌクレオチドの番号付けは GH LCR 参照配列 (図 4) に基づいて行った。

【0148】

1192 番目の多型部位を太字かつ下線にて示した。この領域の一部を PCR 及び DHP LC によって分析した。

【0149】

この利用可能な DNA 配列に基づいて設計された新規なオリゴヌクレオチドプライマーの使用によって、約 400 bp にまたがった 2 個の重複する PCR フラグメントが生成した。すなわち、

フラグメント 1 のプライマーは、LCR15 (5' GTGCCCCCAAGCCTTTCC C3' : 1159 - 1177) 及び LCR13 (5' TGT CAGATGTT CAGTT CATGG3' : 1391 - 1412) であり、

フラグメント 2 のプライマーは、LCR25 (5' CCTCAAGCTGACCTCAG G3' : 1346 - 1363) 及び LCR23 (5' GATCTTG G CCTAGGCC TCG3' : 1584 - 1602) である。

【0150】

TaqGold ポリメラーゼを用いて PCR を行った。1 µl の患者のゲノム DNA を肉薄の 0.2 ml PCR チューブまたは 96 穴マイクロタイタープレートのウェルの 1 つに入れた。これに、5 µl の 10 × 反応バッファ、500 ng の適当なプライマー対 (例、GH1DF 及び GH1DR)、dATP、dTTP、dCTP 及び dGDP を最終濃度が 200 µM となるように加え、49.8 µl の容量にまで滅菌水を加えた後、0.2 µl の TaqGold ポリメラーゼを加えた。次いでこのチューブまたはマイクロタイタープレートを Primus 96 サーマルサイクラー (MWG バイオテック) に入れ、次の条件でサイクル反応を行った。95 °C で 12 分の後、95 °C で 30 秒、58 °C で 30 秒、72 °C で 2 分を 32 サイクル。その後 72 °C で 10 分更にインキュベートして反応溶液を 4 °C に冷却してから更なる分析を行った。

【0151】

得られた反応混合物の 10 分の 1 量 (5 µl) を 1.5% アガロースゲルで分析して、変性高圧液体クロマトグラフィ (DHP LC) を行うのに先立って反応がうまくいったことを確認した。実施例 3 で述べたようにして融解温度 61 °C で DHP LC による分析を行った。

【0152】

実施例 5A - 成長ホルモン遺伝子座調節領域の更なる分析

40 人のコントロール群と遺伝性 GH 欠損症の患者 40 人から得た 600 ng の DNA を用い、下記の新規プライマー:

LCR 5A (5' CCAAGTACCTCAGATGCAAGG3'); 及び

LCR 3.0 (5' CCTTAGATCTTG G CCTAGGCC3' ; 図 4 参照)、

5 mM の各 dNTP、及びロシュ・ハイフィデリティ DNA ポリメラーゼを用いて 1.9 kb の LCR フラグメントの PCR 増幅を行った。反応条件は、98 °C × 2 分、94 °C × 15 秒、58 °C × 30 秒、72 °C × 1 分 × 10 サイクル、58 °C × 30 秒、72 °C × 1 分 + 各連続サイクルにつき 5 秒 × 20 サイクル。PCR 反応産物は 2% アガロースゲル上で分離して LCR フラグメントに相当するバンドをメスで切りだした。アガロースをゲル抽出によって除去し、配列を決定するために DNA を溶出した。この 1.9 kb の LCR フラグメントを下記の新規なプライマーを用いて ABI 3100 自動シーケンサーで配列決定した。

10

20

30

40

50

LCR5.0 (5' CCTGTCACCTGAGGATGGG3');

LCR3.1 (5' TGTGTTGCCTGGACCCCTG3');

LCR3.2 (5' CAGGAGGCCTCACAAAGCC3');

及びLCR3.3 (5' ATGCATCAGGGCAATCGC3')を用いて該当領域をカバーした。

【0153】

実施例5B - ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイによるGH1プロモーターハプロタイプ及び潜在的プロモーター突然変異のキャラクタリゼーション

QuickChange (商標) 部位特異的突然変異誘発キットを使用して特定配列の変異体をpGL3-GH1コンストラクトに組み込んだ。この方法では、それぞれが所望の突然変異を有する2個の相補的オリゴヌクレオチドプライマーを野性型コンストラクトの対向する鎖にアニールする。次いでこのプライマーをハイフィデリティーPfuDNAポリメラーゼで伸長すると、特定の突然変異の効率は高く、ランダムな突然変異のレベルは低くなる。最後に、damによりメチル化した親DNAを、メチル化または半メチル化されたDNAに特異的な制限酵素であるDpnIで消化して突然変異を有するプラスミドを選択する。

【0154】

ラットGH3及びヒトHeLa細胞へのDNAの導入には、簡易性及び効率性から、リボソーム媒介トランスフェクション法を選択した。GH3細胞の一時的トランスフェクションにはTfx (商標) - 50を試薬として使用した。これには合成カチオン性脂質分子である(N,N,N',N'-テトラメチル-N,N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2,3-ジ(オレイルオキシ)-1,4-ブタンジアンモニウムアイオダイド)及びL-ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)からなる混合物が含まれる。これらの脂質は水で水和されると多層小胞を形成し、これが核酸と結合して細胞内への核酸の移行を促進する。細胞は96穴プレートフォーマットを用いてプレATINGした。コンフルエンスに達した細胞を培養フラスコから取出し、新鮮な培地で希釈したところ、細胞密度は、ウェル当たり160%コンフルエンスと計算された。希釈した細胞の200µl量を各ウェルに分注し、湿らせた紙片の入った箱の存在下でプレートを一晚37でインキュベートした。これにより細胞は翌日のトランスフェクトの時点で約80%のコンフルエンスに達していた。

【0155】

トランスフェクション混合物は、無血清培地、DNA(pGL3-GH1及びpRL-CMV)及びTfx (商標) - 50試薬を含んだものである。0.25µgのpGL3コンストラクト、2ngのpRL-CMV、及び0.5µlのTfx (商標) - 50試薬(これによりTfx (商標) - 50試薬の必要なDNAに対する比は3:1と最適な値となる)を含んだ全体量がウェル当たり90µlとなるように調製した。最初に培地とDNAを混合してからTfx (商標) - 50試薬を混合した。この溶液を直ちにボルテックスにかけ、室温で20分インキュベートした。15分経った段階で培養したウェルをインキュベーターから取り出して増殖培地を除去した。Tfx (商標) - 50試薬/DNAの混合物を手早くボルテックスにかけてから各ウェルに90µlずつを加えた。プレートを1時間再びインキュベーター内に置いてから、200µlの予め暖めた(37)完全培地を各ウェルに加えた。この細胞を更に24時間再びインキュベーター内に置き、レポーターアッセイ用に溶解した。HeLa細胞のトランスフェクションはGH3細胞と基本的に同様であった。異なる点としては、Tfx (商標) - 50の代わりにTfx (商標) - 20を使用し、1ngのpRL-CMVを同時トランスフェクトし、細胞密度がウェル当たり60%のコンフルエンスとなるように細胞を計算した点である。

【0156】

培養し、トランスフェクトした細胞を37のインキュベーターから取出し、増殖培地を除去してから50µlのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を加えた。このプレートを静かに揺動した後、リン酸溶液を除去した。20µlのpassively lysis bu

f f e rを細胞単層が完全に覆われるように各培養ウェルに加えた。このプレートを回転テーブル上に置いて室温で30分放置した後、-70 で保存した。その後プレートを融解し、6000rpmで20秒間スピンした。マイクロプレート照度計を2秒間の予備測定の後、各レポーターアッセイにつき10秒の測定時間となるようにプログラムした。50 μ lのルシフェラーゼアッセイ試薬II（デュアルルシフェラーゼアッセイシステム（英国プロメガより販売））を第1のウェルに直接注入してホタルルシフェラーゼ活性を測定、記録した。次いで50 μ lのStop & Glo（商標）試薬を注入してRenillaルシフェラーゼ活性を記録した。この手順を各細胞溶解物について繰り返した。

【0157】

実施例5C - GH変異体のシグナルトランスダクション活性のアッセイ

本発明者等のバイオアッセイで研究対象とするGH変異体のターゲットとしてHK293細胞のクローンを選択した。これはこの細胞ではGH受容体の発現レベルが上昇していることによる。アッセイに先立ち、細胞を24時間にわたって24穴プレート（ウェル当たり細胞100,000個）中に置き、STAT5応答性ルシフェラーゼレポーター遺伝子コンストラクト及び構成的に発現する-Galプラスミド（CMVプロモーター）で同時トランスフェクトしてトランスフェクション効率を補正した。一晩のトランスフェクションの後、細胞を洗い、既知の標準濃度範囲に希釈した変異体及び野性型GHと6時間インキュベートした。この間にGH受容体が活性化されればSTAT5が活性化されルシフェラーゼが発現する。したがってこのアッセイではルシフェラーゼの発現が、GH受容体の活性化の程度、ひいては細胞に作用したGHの生物学的活性の程度の目安となる。6時間のインキュベーション時間の後、細胞を溶解して標準的方法（Ross R J M e t a lのM o l e c E n d o c r i n 11 265-73（1997）の方法にしたがうアッセイ；キットは英国プロメガ社より供給されたもの。）を用いてプレート読み取り用照度計でルシフェラーゼを測定した。

【0158】

実施例6 - GH1遺伝子突然変異及び多型

これまでに本発明に基づく選択に用いた特性により、後述の異なるタイプの証拠に基づけば低身長の原因に関係すると考えられるGH1遺伝子の3つの異なる新規な変異体（「突然変異」-表7B）のキャラクタリゼーションならびに同定がなされた。これらの新規な損傷は、プロモーター領域の1個のミスセンス突然変異と2個の異なる突然変異からなる。

【0159】

表7Bにおいて、ヌクレオチドの番号付けは図5に示したGH1参照配列に基づいている。図5では、ヒトGH1のコード配列の5個のエクソンを大文字で示してある。また、翻訳開始（ATG）及び終止コドン（TAG）は下線で示してある。ポリ（アデニル化）シグナルは太字及び下線で示してある。3'UTR境界は+1642の位置であり、+1は転写開始部位である。本文中で述べられる突然変異損傷、多型、及びオリゴヌクレオチドプライマーのすべての番号（遺伝子座調節領域を除く。図4参照）は、GH1参照配列と関連付けることができる。

【0160】

10

20

30

40

【表 10】

第 7 表 B-1 成長ホルモン欠損症: GH1 遺伝子突然変異及び多型

患者 ^a	プロモーター-ハープロタイプ ^b												突然変異 ^{b, c, d}	参考	多型 ^{b, c, d}	
	-168 (T/C)	-75 (A/G)	-57 (G/T)	-31 (ΔG)	-6 (G/A)	-1 (T/A/C)	+3 (G/C)	+16 (A/G)	+26 (A/C)	+59 (T/G)						
7 (9)	T	A	G	G	G	T	G	G	A	A	T		ND		ND	
7 (10)	T	A	G	-	A	A	G	A	A	A	T		ND		IVS4 C → T 1243 3' UTR G → A 1607	
10 (1)	T	G	G	G	G	A	G	A	A	A	T		Lys41Arg (AAG → AGG:731)	未発表	IVS4 T → A 1169	
10 (6)	T	A	T	G	A	A	G	A	A	A	T		ND		IVS4 T → A 1169	
12 (2)	T	A	G	G	G	A	G	A	A	A	T		ND			
12 (4)	T	A	G	G	G	A	G	A	A	A	T		G → A -48	未発表	IVS4 C → T 1101 IVS4 T → A 1169	
18 (1)	T	A	G	G	A	A	G	A	A	A	G		ND		IVS1 C → T 188	
18 (2)	T	A	G	G	A	A	G	A	A	A	T		ND		IVS1 A → G 124	
34 (3)	C	A	G	G	A	A	G	A	A	A	T		ND		IVS1 A → T 128	
34 (4)	T	A	G	G	G	A	G	A	A	A	T		ND		IVS4 T → A 1169	
35 (6)	T	A	G	G	G	A	G	A	A	A	T		ND		IVS4 T → A 1169	
35 (8)	T	G	G	G	G	A	G	A	A	A	T		ND		IVS4 T → A 1169	
53 (1)	T	A	G	G	A	A	G	A	A	A	T		Ser71Phe (tcc → ttc: 821)	未発表	IVS4 T → A 1169	
57 (1)	T	A	G	-	G	A	G	A	A	A	T		-60 G → A	未発表	IVS4 T → A 1169	
57 (2)	T	A	G	G	G	A	G	A	A	A	T		ND		IVS4 T → A 1169	
62 (1)	T	A	G	G	G	A	G	A	A	A	T		ND		IVS4 T → A 1169	
62 (2)	C	A	G	G	G	A	G	A	A	A	T		Gln91Leu (CAG → CTG: 973)		IVS4 T → A 1169	

(第 7 表 B 続葉有り)

10

20

30

40

50

【 0 1 6 1 】

【表 1 1】

(第 7 表 B 続葉)

患者 ^a	-168 (T/C)	-75 (A/G)	-57 (G/T)	-31 (ΔG)	-6 (G/A)	-1 (T/A/C)	+3 (G/C)	+16 (A/G)	+26 (A/C)	+59 (T/G)		
71.1	T	A	G	G	G	A	G	A	A	T	G → A -48	IVS4 C → T 1101 IVS4 T → A 1169
71.2	T	A	G	-	A	A	G	A	A	T	ND	ND
72A.1	T	A	T	G	A	A	G	A	A	T	ND	ND
72A.2	T	A	G	-	A	A	G	A	A	T	ND	ND
78.1	T	A	G	G	G	A	G	A	A	T	ND	IVS4 T → A 1169
78.2	T	A	G	G	G	T	G	A	A	T	ND	ND
79.1	T	A	G	G	G	T	G	A	A	T	ND	ND
79.2	T	G	G	G	G	A	G	A	A	G	Thr-24Ala (ACA → GCA: 69)	Miyata et al. ^e (1997) IVS4 T → A 1169
80.1	T	G	G	G	G	A	G	A	A	T	ND	IVS4 T → A 1169
80.2	C	A	G	G	G	T	G	A	A	T	ND	IVS4 T → A 1169
82.1	T	A	G	G	G	A	G	A	A	T	ND	ND
82.2	T	A	G	G	G	T	G	A	A	T	ND	IVS4 T → A 1169
83.1	T	A	G	G	G	A	G	A	A	T	G → A -48	IVS4 C → T 1101 IVS4 T → A 1169
83.2	T	A	G	G	G	A	G	A	A	T	ND	ND

凡例

I V S : 介在配列 (イントロン)

ND : 突然変異も多型も検出されず

UTR : 非翻訳領域

^a 患者 (クローン番号)^b スクレオチド番号は GH 1 参照配列に基づく。- 3 1 では別のアレルには G が存在するかまたは存在しない。^c アミノ酸残基の番号及び置換 (ヌクレオチド置換及び番号は GH 1 参照配列に基づく)。^d I V S 番号、ヌクレオチド変化、塩基番号。^e Miyata I, Cogan J, Prince MA, Kamijo T, Ogawa M, Phillips JA Detection of growth hormone defects by dideoxy fingerprinting (ddF) Endocrinol J. 44 149-154 (1997).* この突然変異は *in vivo* で初めて同定された。以前に *in vitro* で同定されたものはアラニンのスキヤニング突然変異誘発の結果である (Cunningham et al USP 5 849 535 (1998))。

【0162】

GH1 参照配列は Genbank を通じてアクセスが可能な (アクセッション番号: J03071) Chen et al. から得た。分析を行った 15 人の患者の内、6 人で突然変異が見出された。検出された突然変異はすべてヘテロの状態で見られた。

【0163】

(a) ミスセンス突然変異

GH1 遺伝子のコード領域内で、コードされるアミノ酸を変化させる 2 個の一塩基対置換が発見された。これらの 1 つ (Gln91Leu) は新規なものである。このミスセンス突然変異が病理学的に関与していることの証左は次の 4 つのソースから得られた。すなわち、(i) コントロール集団の研究、(ii) アミノ酸置換の性質及び問題とされる残基の進化上の保存度、(iii) 分子モデリング、及び (iv) シグナルトランスダクション活性の *in vitro* アッセイである。

10

(i) コントロールにおける GH1 コード配列変異の研究

全部で 80 人の健康な白人系イギリス人をコントロールとして GH1 遺伝子のコード領域内の変異についてスクリーニングを行った。個別の患者で 5 例のサイレント置換が見出された [Asp26 での GAC(R)GAT、Ser85 での TCG(R)TCC、Ser85 での TCG(R)TCA、Thr123 での ACG(R)ACA、及び Asn109 での AAC(R)AAT]。更に 2 個のミスセンス突然変異が見出された [AAC(R)GAC、Asn47(R)Asp; GTC(R)ATC、Val110(R)Ile、4/160 個のアレル]。本発明者等の患者の研究では Val110 Ile の置換のみが見出された (患者 66)。

20

(ii) アミノ酸置換の性質及び関連する残基の進化上の保存

ミスセンス突然変異が臨床上的の注意を喚起する確率は、問題とされる遺伝子の配列構造、アミノ酸置換の程度、タンパク質分子内での置換残基の正確な位置及び周辺環境、ならびにタンパク質の構造及び機能に対するその影響など、多くの因子に依存する (Wacey et al Hum Genet 94 594-608 (1994))。検出されたミスセンス突然変異が病理学的に重要であるかを評価するため、これらの変化の生物物理学的性質を個別に調べた (第 7 表 C)。

30

【0164】

ミスセンス突然変異が病理に関与していることの証拠は、進化上の保存度のデータから得られる。これは進化上保存されているアミノ酸残基は所定の生物学的機能を有している確率が高いためである。逆に進化上保存されていない残基が機能的に重要である可能性は低い。したがって病理に関与する損傷は進化上保存された残基に見られる傾向があるのに対して、中立な多型やまれな変異体ではそうした傾向はみられない (Wacey et al, *ibid*)。そこで 19 種の他の脊椎動物のオーソログ的な GH タンパク質配列との比較を行うことによって、ミスセンス突然変異 (Gln91) への関与が示されている GH 残基を進化上の保存度について調べた (第 7 表 C)。突然変異が影響する残基は保存されていることが示され、この損傷が病理的重要性を有するという見方を支持するものである。

40

【0165】

【表 1 2】

第7表C：関連残基のミスセンス突然変異、生物物理的性質及び進化過程での保存

アミノ酸置換	変化の生物物理的性質 (保存的/非保存的)	脊椎動物のGHタンパク質でのアミノ酸残基の進化過程での保存
Gln→Leu 91	NC：極性→疎水性	ある種のタイ及びタラ（Argが帯電）を除きすべての脊椎動物で保存。

10

【0166】

オーソロガスなGHタンパク質の比較

(一致率(%)、ヒトに対する保存的变化率(%))

マウス(66, 77)、ラット(64, 75)、ウサギ(66, 77)、クジラ、イヌ(67, 78)、ブタ(67, 78)、ヒツジ(66, 76)、ウシ(66, 76)、シチメンチョウ(55, 74)、ニワトリ(56, 73)、アヒル(55, 72)、カメ、カエル(45, 68)、サメ、タイの一種、タラの一、サケ、コイ(38, 57)、金魚(37, 57)。

(iii) 分子モデリングによって提示される、機能的影響があると考えられるミスセンス突然変異

20

ヒト成長ホルモンのX線結晶解析構造において、適当なアミノ酸残基を単に置き換えることによってミスセンス突然変異のモデリングを行った。次いで野性型と突然変異体の「構造」を、静電相互作用、水素結合、疎水性相互作用、及び表面露出度について比較した。C末端のヘリックス2にGln91が存在している。Leuの導入によって疎水性が増大してタンパク質の折り畳みに影響する可能性がある。

(iv) GH変異体のシグナルトランスダクションのアッセイ

ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイシステム(Ross RJM et al, Molec Endocrin 11: 265-73 (1997))に基づく)を利用してGH変異体のシグナルトランスダクション活性(生物学的活性)をアッセイした。成長ホルモンが生物学的活性を有するためには2個のGH受容体に結合して受容体の二量化を引き起こす必要がある。これによりJAK-2として知られる細胞内チロシンキナーゼが活性化される。JAK-2は更に転写因子STAT5をリン酸化して活性化する。リン酸化されたSTAT5は二量化し、核に転位してSTAT5応答性プロモーターに結合することによりGH応答性遺伝子の発現のスイッチを入れる。ここで本発明者等が用いたGHの生物学的活性のアッセイではこの経路の全ての段階が機能性であることが必要である。

30

【0167】

【表 1 3】

第7表D：GH変異体のシグナルトランスダクション活性のアッセイ

40

患者番号	突然変異	% WT	SEM	p vs WT
野性型	-	100	3	-
79	Thr-24Ala	92	5	NS
62	Glu91Leu	81	5	NS

【0168】

結果は、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイにおいて1 nMの用量で野性型と比

50

較した活性率 (%) として表した (1 n M = アッセイにおける野性型 GH の ED 5 0 (約))。p は観察された値と野性型で見られた値との差が有意であることを示す。NS は「有意でない」ことを示す。

【0169】

(b) プロモーター突然変異

本発明者等の患者のコホートで2個の新たなプロモーター変異体が検出された。無関連の3人の患者において一塩基対置換の1つ(-60 G A)と-48 G Aへの置換が見られた。損傷が実際のものであることの証拠を、(i)健康なコントロールでのGH1プロモーターの研究、(ii)異なる哺乳動物種での突然変異を生じたヌクレオチドの進化上の保存度の研究、(iii)ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイによる in vitroでのGH1プロモーター機能への遺伝子損傷の影響の決定、によって得た。

10

【0170】

本発明者等の患者サンプルにおいて見出された3/6(50%)の突然変異アレルに相当する再発性突然変異(-48 G A)が見られた。このことは、GH1遺伝子で頻発する病理的損傷を速やかに検出する観点から極めて有望である。

(i) コントロールにおけるGH1プロモーター変異体

157人の健康な白人系イギリス人をコントロールとして突然変異についてGH1プロモーター領域をスクリーニングした。患者サンプルで見られた突然変異に対応した唯一の配列変化は、2名で検出された-48におけるG Aへの変化であった。単一の複数個人でコントロールサンプルに特異的な更なる3個の置換が見られた(+62 A G、-123 T C、及び-373 G A)。最後に、1名で遺伝子変換が見られ(最小で-57~-31、最大で-168~-6)、これはコントロールサンプルでも特異的であった。したがって、患者と比較してコントロールではより少ない変化が数多く見られた。この発見は患者の突然変異が病理的重要性を有することと一致する。コントロールでは-60 G Aへの置換が見られなかったが、このことはこの置換の病理的関連性の証拠となるものである。

20

(ii) 進化上の保存度

GH1遺伝子の転写開始部位の130bp上流に相当するDNA配列が10種の哺乳動物から得られている。確認が可能な部分では、患者57で変異しているヌクレオチド-60は進化上保存されていることが分かった。この発見はこのヌクレオチドが機能的な重要性を有することと一致する。

30

(iii) GH1プロモーターの突然変異のルシフェラーゼレポーター遺伝子分析

レポーター遺伝子アッセイを行ってルシフェラーゼ遺伝子の発現を引き起こす能力について-48 G Aの突然変異を評価した(第7表G)。ラット脳下垂体GH3細胞及びヒトHeLa細胞のそれぞれで3つの異なる実験を6回ずつ繰り返して行った(全部で18回)。したがってこのレポーター遺伝子発現アッセイではこの損傷の病理への関与を支持する結果は得られなかった。

【0171】

【表14】

第7表G： 潜在的プロモーター突然変異とレポーター遺伝子発現

40

プロモーター突然変異	関連ハプロタイプ	ハプロタイプに対して正規化したルシフェラーゼ活性	正規化したハプロタイプ±sem
		GH3	HeL
G→A-60	19	ND	ND
G→A-48	2	90 ± 16	107 ± 18

50

【図面の簡単な説明】

【0172】

【図1】下垂体成長ホルモン（GH1）をコードした遺伝子は、染色体17q23の5個の関連遺伝子のクラスター内に位置していることを示す図。

【図2】5個の遺伝子はすべて非常に似通った構造を有し、5個のエクソンが短いイントロンによって同じ位置で分断されていることを示す図。

【図3】ヒトGH1遺伝子プロモーター/5'側非翻訳領域の公知の多型を示す図。

【図4A】GenBank（アクセッション番号：AF010280）の配列。

【図4B】GenBank（アクセッション番号：AF010280）の配列。

【図4C】GenBank（アクセッション番号：AF010280）の配列。

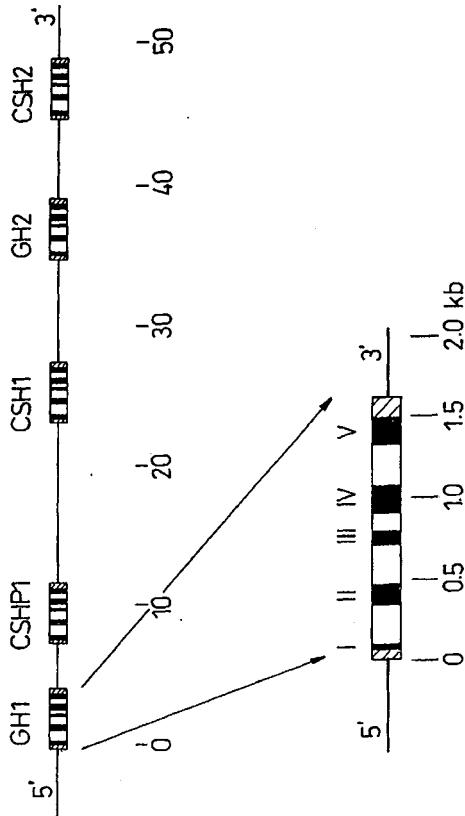
10

【図5A】GH1の参照配列。

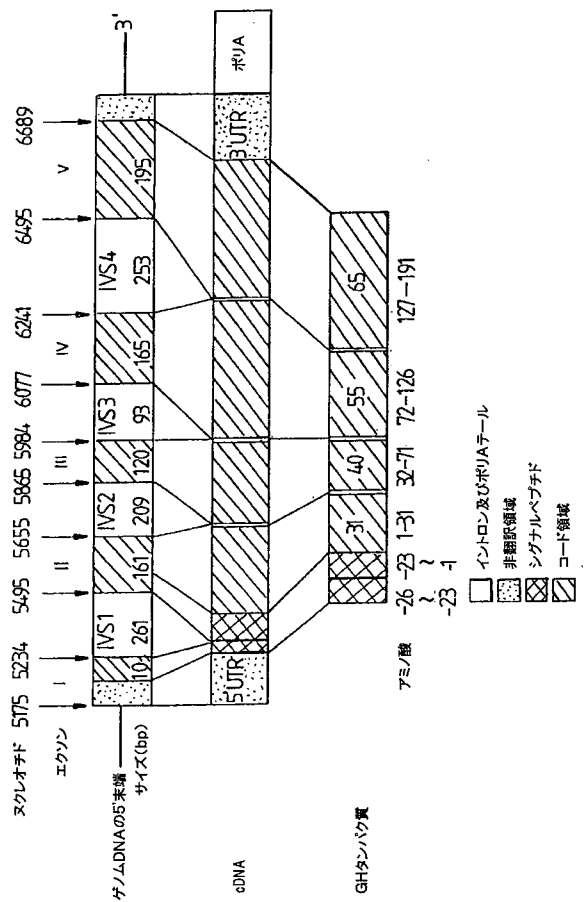
【図5B】GH1の参照配列。

【図6】GH1遺伝子のコード領域のヌクレオチド配列及び26個のアミノ酸からなるリーダーペプチドを含んだタンパク質のアミノ酸配列。

【図1】



【図2】



【 図 5 A 】

-700 ctgtttttct gtttgtgtct ctgctgcaag tccaaggagc tggggcaata -651
-650 ccttgagctt gggttcttcg tccccaaggaa cctgggggag cccccagcaat -601
-600 gctcaggaaa aggggagagc aaagtgtggg gttggttctc tctagtgttc -551
-550 agtgttggaa ctgcatccag ctgactcagg ctgaccacag agtccctcagc -501
-500 aagagtgaaa ttcaggactg aaagtgtggc acaaccacca caatctatgt -451
-450 gctgtgcttg gccctctttc ccaacacaca cactctgtct ggtgggtgga -401
-400 gtttaaacat gggggagaga ggaaggatg aggatagaga atgggagtgt -351
-350 gtcggttagg ggtctcaagg actgctatc ctgacatctc tctcccgctt -301
-300 caggttggcc accatggcct gcggccagag ggcaccacag tgaccttaa -251
-250 agagagagaca agttgggtgg tatctctggc tgacactctg tgcacaaccc -201
-200 tcacaacact ggtgacggtg ggaagggaaa gatgacaagc cagggggcat -151
-150 gatcccagca tgtgtggggg gaggctctaa attatccatt agcaacaagc -101
-100 cgtcagtggc cccatgcata aatgtacaca gaaacaggtg ggggcaacag -51
-50 tgggagagaa ggggcccagg tataaaaagg gccccaaga gaccagctca -1
+1 aggatcccaa gggccaactc ccgcaaccac ccctaaaatc cctttgggca +100
+51 cacctagggc caATGGCTAC AGgttaagcgc ccctaaaatc cctttgggca +100
+101 caatgtgccc tgaggggaga ggcagcgacc tgtagatggg acgggggac +150
+151 taaccctcag tttggggctg tctgaaatgt agtatcgcca gtaagccca +200
+201 gtaatttgcc aatctcagaa agctcctggt cctcggaggg atggagagag +250
+251 aaaaaacaa agctcctgga gcaggagag tgctggcctc ttgctctcag +300
+301 gctccctctg tggcctctg gtttctcccc agGCTCCCG AGTCCCTGC +350
+351 TCCTGGCTTT TGGCCTGCTC TGCTGCCCCT GGCTTCAAGA GGGCAGTGCC +400
+401 TTCCCAACCA TTCCCTATC CAGGCTTTT GACAAACGTA TGCTCCGCGC +450
+451 CCATCGTCTG CACCAGTGG CCTTTGACAC CTACCAGGAG TTTgttaagct +500
+501 ctctgggaaat ggggtgcgat caggggtggc aggaaggggg gactttcccc +550
+551 ccctgggaaa taagagagag agactaagga gctcagggtt tttccggaag +600
+601 cgaanaatgca ggcagatgag cacacgctga gtgagggtcc cagaaaagta +650
+651 acaatgggag ctggcttcca gcgtagacct tggggggggg tctctctcct +700
+701 agGAGGAGC CTATATCCCA AAGGAACMGA AGTATTTCATT CTGCAGAAC +750
+751 CCCAGACCT CCTCTGTTT CTCAGAGTCT ATTCCGACAC CCTCCACAG +800
+801 GGAGGAAACA CAACAGAAAT CCgtgagtg atgccttctc cccaggcggg +850
+851 gatgggggag acctgtatgc agagcccccg ggcagcagag ccaatgcccg +900
+901 tctctcccct gcagAACCTA GAGCTGCTCC GCATCTCCCT GCTGCTCATC +950
+951 CAGTCGTGGC TGGAGCCCGT GCAGTTCCTC AGGAGTGTCT TCGCCAACAG +1000
+1001 CTTGGTGTAC GGCCTCTG ACAGCAAGT CTATGACCTC CTAAGGACC +1050
+1051 TAGAGGAAGG CATCCAACG CTGATGGGGG tgagggtggc gccaggggct +1100
+1101 ccaatcctg gagccccact gactttgaga gctgtgttag agaaaacatg +1150
+1151 ctgcccctct ttagcagtc aggcctcag ccaagagaac tcacctatt +1200
+1201 ctctatttcc cctcgtgaa cctccagggc tttctctaca cctggaagg +1250
+1251 gaggagagaa aatgaatgaa tgagaaaggg agggaaacagt acccaagcgc +1300
+1301 ttggcctctc ctctctctcc ttcactttgc agAGGCTGA AGATGGCAGC +1350
+1351 CCCGGACTG GGCAGATCTT CAAGCAGCC TACAGCAAGT TCGACACAAA +1400
+1401 CTCACACAC GATGACGAC TACTCAAGAA CTACGGGCTG CTCTACTGCT +1450
+1451 TCAGGAAGGA CATGGACAAG GTCGAGACAT TCCTGCGCAT CGTGCAGTGC +1500
+1501 CGCTCTGGG AGGGCAGCTG TGGCTCTAG ctgcccgggt ggcactccctg +1550
+1551 tgaccctccc ccagtgcctc tctggcccct ggaagttgccc actccagtgc +1600
+1601 ccaccagcct tctctataa aatgaagtt gcatcatttt gtctgactag +1650
+1651 ggtccttctc ataattatg ggggtggagg ggggtggat gggagcaagg +1700

【 図 5 B 】

+1701 gcaagttggg aagacaacct gtagggcctg cggggtctat tccgggaacca +1750
+1751 agctggagtg cagtggcaca atcttggtc actgcaatc cccctccctg +1800
+1801 ggttcaagcg attctcctgc ctcagcctcc cgagtgtgtg ggattccagg +1850
+1851 catgcatgac caggctcagc taatttttgt ttttttgta gagacggggt +1900
+1901 ttcaccatag tggccaggct gggtcccaac tcttaactc agtgatcta +1950
+1951 cccaccctgt cctcccaaat tgctgggatt acaggcgtga accactgtcc +2000
+2001 ccttccctgt cctctgtatt ttaaaatac tataccagca gggagacgtc +2050
+2051 cagacaacag ataggctacc tgccatgccc aaccggggg acatttgatg +2100
+2101 tggttgcttg gcaactgtct ctcagctgtt ggttccact agtagatgac +2150
+2151 tgttgaaatc ctgggcttag ggctgtgcca gctgctcgt cccgtcaact +2200
+2201 tctggcttct tctctccctc catatcttag cgttttctc catgagaatg +2250
+2251 ttcocaaatc gaaatttcta ttaaccatt atatattac ttgttgcta +2300
+2301 ttatctctgc cccagtaga ttgttagctc cagaagaaa aggatcagt +2350
+2351 cttttgtcta tctagatag cccatctgcc tggtaaatc tctggacat +2400
+2401 gttacagcca acaactactt gtggaaatgg tgaatgcatg aatagaagaa +2450
+2451 tgagtgaatg aatgaataga caaaaggcag aatccagcc tcaagaact +2500
+2501 tacagtctgg taagaggaat aaaaatgctg caaatagcca caggacaggt +2550
+2551 caaaggaagg agggctatt tccagctgag ggcacccat caggaagca +2600
+2601 cccagactc ctacaacta ctgacacat ctgctgctt ttcactctc +2650
+2651 tateaatgga tctctccct ggaaataat ccccaagctt aaattacta +2700
+2701 gcaagctcag ttaggtagat ccttgtgtac tttttgtgtg ttcagagatc +2750
+2751 atcaaccagt gcaacaactc ccccatcaa tacacagag tgccctgccc +2800
+2801 tctcccccg aggtctccg aggcctctcc tccgtgctg aacccccgg +2850
+2851 acatataata tggcaactg aagtgccaa cgagatagag gaagtgaac +2900
+2901 acgatgaca ctgaaacgtg caatacaaat atgcagcatg aagtgcctg +2950
+2951 gttcaactaac ccgagctacg ctgggtgctt cttttctacc actttccta +3000

【 図 6 】

成長ホルモン1
遺伝子記号: GHI
位置: 17 q

1 2
-26 ATG GCT ACA G↓GC TCC CGG ACG TCC CTG CTC CTG GCT TTT GGC CTG -12
Met Ala Thr G ly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu
-11 CTC TGC CTG CCC TGG CTT CAA GAG GGC AGT GCC TTC CCA ACC ATT 4
Leu Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile
5 CCC TTA TCC AGG CTT TTT GAC AAC GCT ATG CTC CGC GCC CAT CGT 19
Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg
20 CTG CAC CAG CTG GCC TTT GAC ACC TAC CAG GAG TTT ↓ GAA GAA GCC 34
Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala
35 TAT ATC CCA AAG GAA CAG AAG TAT TCA TTC CTG CAG AAC CCC CAG 49
Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln
50 ACC TCC CTC TGT TTC TCA GAG TCT ATT CCG ACA CCC TCC AAC AGG 64
Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg
65 GAG GAA ACA CAA CAG AAA TCC ↓ AAC CTA GAG CTG CTC CGC ATC TCC 79
Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser
80 CTG CTG CTC ATC CAG TCG TGG CTG GAG CCC GTG CAG TTC CTC AGG 94
Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg
95 AGT GTC TTC GCC AAC AGC CTG GTG TAC GGC GCC TCT GAC AGC AAC 109
Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn
110 GTC TAT GAC CTC CTA AAG GAC CTA GAG GAA GGC ATC CAA ACG CTG 124
Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu
125 ATG GGG ↓ AGG CTG GAA GAT GGC AGC CCC CGG ACT GGG CAG ATC TTC 139
Met Gly ↓ Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe
140 AAG CAG ACC TAC AGC AAG TTC GAC ACA AAC TCA CAC AAC GAT GAC 154
Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp
155 GCA CTA CTC AAG AAC TAC GGG CTG CTC TAC TGC TTC AGG AAG GAC 169
Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp
170 ATG GAC AAG GTC GAG ACA TTC CTG CGC ATC GTG CAG TGC CGC TCT 184
Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser
185 GTG GAG GGC AGC TGT GGC TTC TAG
Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe *

【配列表】

2005509423000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/GB 02/05103
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BOGUSZEWSKI C L ET AL: "Increased proportion of circulating non-22-kilodalton growth hormone isoforms in short children: a possible mechanism for growth failure." THE JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM. UNITED STATES SEP 1997, vol. 82, no. 9, September 1997 (1997-09), pages 2944-2949, XP002262399 ISSN: 0021-972X	1-10
Y	page 2945, left-hand column page 2947, right-hand column --- -/-	11-18
<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. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 24 November 2003		Date of mailing of the international search report 16/12/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Reuter, U

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/GB 02/05103

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WAJNRAJCH M P ET AL: "Arg183His, a new mutational 'hot-spot' in the growth hormone (GH) gene causing isolated GH deficiency type II" JOURNAL OF ENDOCRINE GENETICS, FREUND PUBLISHING, TEL AVIV, IR, vol. 1, no. 3, 2000, pages 125-135, XP002957923 ISSN: 1565-012X page 126 page 130-131</p>	11-18
A	<p>MIYATA I ET AL: "DETECTION OF GROWTH HORMONE GENE DEFECTS BY DIDEOXY FINGERPRINTING (DDF)" ENDOCRINE JOURNAL, TOKYO, JP, vol. 44, no. 1, February 1997 (1997-02), pages 149-154, XP000990097 ISSN: 0918-8959 cited in the application the whole document</p>	1-18
A	<p>GLUCKMAN P D ET AL: "Congenital idiopathic growth hormone deficiency associated with prenatal and early postnatal growth failure. The International Board of the Kabi Pharmacia International Growth Study." THE JOURNAL OF PEDIATRICS, UNITED STATES DEC 1992, vol. 121, no. 6, December 1992 (1992-12), pages 920-923, XP008024432 ISSN: 0022-3476 cited in the application page 921, left-hand column, last paragraph page 922 page 923, left-hand column, paragraph 3</p>	1-18
A	<p>COWELL C T: "9: SHORT STATURE" CLINICAL PAEDIATRIC ENDOCRINOLOGY, 1995, pages 136-172, XP001149900 page 158, right-hand column; table 9.8 page 163; figure 9.18</p>	1-18
A	<p>PROCTER A M ET AL: "THE MOLECULAR GENETICS OF GROWTH HORMONE DEFICIENCY" HUMAN GENETICS, BERLIN, DE, vol. 103, no. 3, September 1998 (1998-09), pages 255-272, XP000990238 the whole document</p>	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/GB 02/05103

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEN E Y ET AL: "THE HUMAN GROWTH HORMONE LOCUS: NUCLEOTIDE SEQUENCE, BIOLOGY, AND EVOLUTION" GENOMICS, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, US, vol. 4, no. 4, 1989, pages 479-497, XP000990095 ISSN: 0888-7543 cited in the application the whole document	1-18
A	EP 0 790 305 A (JAPAN CHEM RES) 20 August 1997 (1997-08-20) page 5, line 49 -page 6, line 9	1-18
A	WO 93 00445 A (UNIV VANDERBILT) 7 January 1993 (1993-01-07) example 1	1-18
P,X	EP 1 156 123 A (UNIV WALES MEDICINE) 21 November 2001 (2001-11-21) the whole document	1-18
T	MILLAR D S ET AL: "NOVEL MUTATIONS OF THE GROWTH HORMONE 1 (GH1) GENE DISCLOSED BY MODULATION OF THE CLINICAL SELECTION CRITERIA FOR INDIVIDUALS WITH SHORT STATURE" HUMAN MUTATION, WILEY-LISS, NEW YORK, NY, US, vol. 21, no. 4, April 2003 (2003-04), pages 424-440, XP008024249 ISSN: 1059-7794	1-18

International Application No. PCT/GB 02 05103

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ASA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 19-26

Present claims 19-26 relate to a method that is based on products that are defined by reference to a desirable characteristic or property, namely that the variants are detectable by the method of claims 1-18. The claims cover all methods that are based on products having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such products and methods. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Furthermore claims 19-26 are directed to a diagnostic method containing steps that are practised on the human/animal body. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT) to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Consequently, no search has been carried out for claims 19-26.

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

International application No.
PCT/GB 02/05103**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claim 1-18 are directed to a diagnostic method containing a step that is practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the the general method disregarding said step.
2. Claims Nos.: 19-26
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/GB 02/05103

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0790305	A	20-08-1997	AT 216723 T	15-05-2002
			AU 723494 B2	31-08-2000
			AU 1266497 A	21-08-1997
			BR 9700957 A	08-12-1998
			CA 2197408 A1	14-08-1997
			DE 69712124 D1	29-05-2002
			DE 69712124 T2	12-12-2002
			EP 0790305 A1	20-08-1997
			US 6238915 B1	29-05-2001
			JP 10080277 A	31-03-1998
WO 9300445	A	07-01-1993	WO 9300445 A1	07-01-1993
EP 1156123	A	21-11-2001	AU 5649901 A	20-11-2001
			BR 0110756 A	08-07-2003
			CA 2409510 A1	15-11-2001
			CN 1444661 T	24-09-2003
			EP 1156123 A1	21-11-2001
			EP 1340820 A2	03-09-2003
			EP 1342795 A2	10-09-2003
			EP 1340821 A2	03-09-2003
			WO 0185993 A2	15-11-2001
			US 2002081605 A1	27-06-2002

 フロントページの続き

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, 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, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 クーパー, デヴィッド, ニール

イギリス国 カーディフ シーエフ14 4エックスエヌ, ヒース パーク, ユニバーシティ オブ ウェールズ カレッジ オブ メディスン, デパートメント オブ メディカル ジェネティックス

(72) 発明者 プロクター, アン, マリー

イギリス国 カーディフ シーエフ14 4エックスエヌ, ヒース パーク, ユニバーシティ オブ ウェールズ カレッジ オブ メディスン, デパートメント オブ メディカル ジェネティックス

(72) 発明者 グレゴリー, ジョン

イギリス国 カーディフ シーエフ14 4エックスエヌ, ヒース パーク, ユニバーシティ オブ ウェールズ カレッジ オブ メディスン, デパートメント オブ メディカル ジェネティックス

(72) 発明者 ミラー, デヴィッド, スチュアート

イギリス国 カーディフ シーエフ14 4エックスエヌ, ヒース パーク, ユニバーシティ オブ ウェールズ カレッジ オブ メディスン, デパートメント オブ メディカル ジェネティックス

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA03 CA02 CA20 HA11 HA19

4B063 QA13 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QQ43 QQ48 QR08 QR32 QR35

QR40 QR42 QR62 QS17 QS25 QS36 QS39 QX01

专利名称(译)	检测人生长激素突变，突变和用途的方法		
公开(公告)号	JP2005509423A	公开(公告)日	2005-04-14
申请号	JP2003544222	申请日	2002-11-12
[标]申请(专利权)人(译)	医学威尔士大学学院		
申请(专利权)人(译)	医学威尔士大学学院		
[标]发明人	クーパーデヴィッドニール プロクターアンマリー グレゴリージョン ミラーデヴィッドスチュアート		
发明人	クーパー,デヴィッド,ニール プロクター,アン,マリー グレゴリー,ジョン ミラー,デヴィッド,スチュアート		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6883 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/156 C12Q2600/158 C12Q2600/172		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA03 4B024/CA02 4B024/CA20 4B024/HA11 4B024/HA19 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ43 4B063/QQ48 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR62 4B063/QS17 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01		
优先权	2001027213 2001-11-12 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及天然存在的生长激素突变;涉及检测它们的方法及其在筛选患者生长激素不规则性或产生适于治疗这种不规则性的变体蛋白质中的用途。在一个方面,公开了用于检测GH1的变化的检测方法,其有效地充当个体中GH功能障碍的指示剂,该检测方法包括以下步骤:(a)获得包含人的核苷酸序列的测试样品GH1基因;和(b)将从测试样品获得的序列与已知为人GH1基因的标准序列进行比较,其中测试样品序列和标准序列之间的差异表明存在变异(下文称为“GH1变体”)有效地充当GH1功能障碍的指标,其特征在于测试样品获自个体,或两者之一:显示子宫内生长迟缓(IUGR),定义为通过已知的标准方法诊断的足够的胎儿身高速度艺术;和/或小于孕龄(SGA),定义为通过本领域已知的标准方法诊断的用于孕龄的不足(小)胎儿体尺寸(重量和/或长度)。

		特許2005-5094 (P2005-5094)	
		(43) 公表日 平成17年4月14日 (2005.4.14)	
(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)	
C12Q 1/68	C12Q 1/68	ZNAA	4B024
C12N 15/09	GO1N 33/53	D	4B063
GO1N 33/53	GO1N 33/53	M	
GO1N 37/00	GO1N 37/00	IO2	
	C12N 15/00	A	
		審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 54)	
(21) 出願番号	特願2003-544222 (P2003-544222)	(71) 出願人	501484828
(86) (22) 出願日	平成14年11月12日 (2002.11.12)		ユニバーシティ オブ ウェールズ ;
(85) 翻訳文提出日	平成16年5月11日 (2004.5.11)		ッジ オブ メディシン
(86) 国際出願番号	PCT/GB2002/005103		イギリス国, カーディフ シーエフ4
(87) 国際公開番号	W02003/042408		エックスエヌ, ヒース パーク
(87) 国際公開日	平成15年5月22日 (2003.5.22)	(74) 代理人	100067541
(31) 優先権主張番号	0127213.7		弁理士 岸田 正行
(32) 優先日	平成13年11月12日 (2001.11.12)	(74) 代理人	100087388
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 水野 勝文
		(74) 代理人	100103506
			弁理士 高野 弘晋
		(74) 代理人	100104628
			弁理士 水本 敬也
		(74) 代理人	100105072
			弁理士 小川 英重
		最終頁に続	