

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/119253

発行日 平成29年3月30日(2017.3.30)

(43) 国際公開日 平成27年8月13日(2015.8.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 B 0 6 3
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00 Z N A	4 C 0 5 7
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 6
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 63 頁) 最終頁に続く

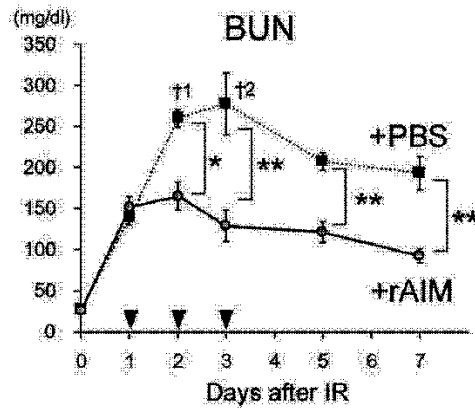
出願番号	特願2015-561061 (P2015-561061)	(71) 出願人	511288304 宮崎 徹 東京都文京区春日2-12-12-1004
(21) 国際出願番号	PCT/JP2015/053415	(74) 代理人	100080791 弁理士 高島 一
(22) 国際出願日	平成27年2月6日(2015.2.6)	(74) 代理人	100125070 弁理士 土井 京子
(31) 優先権主張番号	特願2014-22041 (P2014-22041)	(74) 代理人	100136629 弁理士 鎌田 光宜
(32) 優先日	平成26年2月7日(2014.2.7)	(74) 代理人	100121212 弁理士 田村 弥栄子
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100163658 弁理士 小池 順造

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腎疾患の予防または治療剤

(57) 【要約】

本発明は、AIMもしくはその部分ペプチドまたはそれらをコードする塩基配列を含む核酸を含有してなる、腎疾患の予防・治療剤、またはAIM発現不全非ヒト哺乳動物に片側尿管結紮または一過性腎虚血再灌流を行うことによって得られる動物を用いた、腎疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法などを提供する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

AIMもしくはその部分ペプチド、またはそれらをコードする塩基配列を含む核酸を含有してなる、腎疾患の予防・治療剤。

## 【請求項 2】

AIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤を含有してなる、腎疾患の予防・治療剤。

## 【請求項 3】

腎疾患が急性腎不全、慢性腎炎、慢性腎不全、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、腎硬化症、IgA腎症、高血圧性腎症、膠原病に伴う腎症またはIgM腎症である請求項 1 または 2 に記載の予防・治療剤。

10

## 【請求項 4】

腎疾患が急性腎不全または慢性腎不全である請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の予防・治療剤。

## 【請求項 5】

予防・治療の対象がヒトである請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の予防・治療剤。

## 【請求項 6】

予防・治療の対象がネコである請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の予防・治療剤。

## 【請求項 7】

AIMまたはその部分ペプチドが、ネコIgMと結合することを特徴とする、請求項 6 に記載の予防・治療剤。

20

## 【請求項 8】

ネコIgMと結合するAIMもしくはその部分ペプチドが、マウス由来AIMのSRCR3ドメインを含む、請求項 7 に記載の予防・治療剤。

## 【請求項 9】

AIM発現不全非ヒト哺乳動物に片側尿管結紮、一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流または両側性の一過性腎虚血再灌流を行うことによって得られる動物を用いる、腎疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法。

## 【請求項 10】

以下の工程を含むことを特徴とする、請求項 9 に記載のスクリーニング方法：

30

(1) 片側尿管結紮、一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流または両側性の一過性腎虚血再灌流を行う条件下、AIM発現不全非ヒト哺乳動物に被検物質を投与する工程、

(2) 被検物質を投与されたAIM発現不全非ヒト哺乳動物の下記特性のいずれか一項目以上を観察する工程：

(i) 壊死した尿細管細胞の蓄積と腎実質の線維化、

(ii) 糸球体構造の崩壊と線維化、

(iii) 腎臓における炎症性サイトカインの発現量、

(iv) 腎臓におけるマクロファージの割合、

(v) BUN値、

(vi) 生存率、

40

(3) 被検物質非投与の場合と比較して、前記特性のいずれか一項目以上が改善される被検物質を選択する工程。

## 【請求項 11】

腎疾患が急性腎不全、慢性腎炎、慢性腎不全、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、腎硬化症、IgA腎症、高血圧性腎症、膠原病に伴う腎症またはIgM腎症である請求項 9 または 10 に記載のスクリーニング方法。

## 【請求項 12】

AIM発現不全非ヒト哺乳動物に片側尿管結紮、一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流または両側性の一過性腎虚血再灌流を行うことによって得られる動物を用いる、腎疾患予防・治療剤の予防・治療効果の評価方法。

50

## 【請求項 1 3】

以下の工程を含むことを特徴とする、請求項 1 2 に記載の評価方法：

(1) 片側尿管結紮、一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流または両側性の一過性腎虚血再灌流を行う条件下、AIM発現不全非ヒト哺乳動物に腎疾患予防・治療剤を投与する工程

(2) 腎疾患予防・治療剤を投与されたAIM発現不全非ヒト哺乳動物の下記特性のいずれか一項目以上を観察する工程：

(i) 壊死した尿細管細胞の蓄積と腎実質の線維化、

(ii) 糸球体構造の崩壊と線維化、

(iii) 腎臓における炎症性サイトカインの発現量、

(iv) 腎臓におけるマクロファージの割合、

(v) BUN値、

(vi) 生存率、

(3) 前記特性のいずれか一項目以上を腎疾患予防・治療剤非投与の場合と比較して、腎疾患予防・治療剤の効果を評価する工程。

10

## 【請求項 1 4】

腎疾患が急性腎不全、慢性腎炎、慢性腎不全、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、腎硬化症、IgA腎症、高血圧性腎症、膠原病に伴う腎症またはIgM腎症である請求項 1 2 または 1 3 に記載の評価方法。

## 【請求項 1 5】

被検者の試料中のAIM濃度を測定することを含む、腎疾患患者の予後の予測方法。

20

## 【請求項 1 6】

試料が血液または血清である、請求項 1 5 に記載の予測方法。

## 【請求項 1 7】

AIM濃度の測定方法が抗AIM抗体を用いた免疫学的方法である、請求項 1 5 または 1 6 に記載の予測方法。

## 【請求項 1 8】

腎疾患が急性腎不全、慢性腎炎、慢性腎不全、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、腎硬化症、IgA腎症、高血圧性腎症、膠原病に伴う腎症またはIgM腎症である請求項 1 5 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の予測方法。

30

## 【請求項 1 9】

被検者の試料中のAIM濃度を測定することを含む、急性腎不全の検査方法。

## 【請求項 2 0】

試料が尿である、請求項 1 9 に記載の検査方法。

## 【請求項 2 1】

AIM濃度の測定方法が抗AIM抗体を用いた免疫学的方法である、請求項 1 9 または 2 0 に記載の検査方法。

## 【請求項 2 2】

以下の(a)または(b)を含む、腎疾患の診断または予後の予測キット：

(a) AIM遺伝子の転写産物とハイブリダイズし得る核酸プローブまたは核酸プライマー、および/または

(b) AIMに対する抗体。

40

## 【請求項 2 3】

腎疾患が急性腎不全、慢性腎炎、慢性腎不全、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、腎硬化症、IgA腎症、高血圧性腎症、膠原病に伴う腎症またはIgM腎症である請求項 2 2 に記載のキット。

## 【請求項 2 4】

AIMもしくはその部分ペプチドまたはそれらをコードする塩基配列を含む核酸を対象に有効量投与することを含む、腎疾患の予防・治療方法。

## 【請求項 2 5】

50

AIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤を対象に有効量投与することを含む、腎疾患の予防・治療方法。

【請求項 26】

腎疾患が急性腎不全、慢性腎炎、慢性腎不全、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、腎硬化症、IgA腎症、高血圧性腎症、膠原病に伴う腎症またはIgM腎症である、請求項 24 または 25 に記載の予防・治療方法。

【請求項 27】

腎疾患が急性腎不全または慢性腎不全である、請求項 24 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の予防・治療方法。

【請求項 28】

予防・治療の対象がヒトである、請求項 24 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の予防・治療方法。

【請求項 29】

予防・治療の対象がネコである、請求項 24 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の予防・治療方法。

【請求項 30】

AIMまたはその部分ペプチドが、ネコIgMと結合することを特徴とする、請求項 29 に記載の予防・治療方法。

【請求項 31】

腎疾患の予防・治療に用いるための、AIMもしくはその部分ペプチドまたはそれらをコードする塩基配列を含む核酸。

【請求項 32】

腎疾患が急性腎不全、慢性腎炎、慢性腎不全、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、腎硬化症、IgA腎症、高血圧性腎症、膠原病に伴う腎症またはIgM腎症である、請求項 31 に記載のAIMもしくはその部分ペプチドまたはそれらをコードする塩基配列を含む核酸。

【請求項 33】

腎疾患が急性腎不全または慢性腎不全である、請求項 31 または 32 に記載のAIMもしくはその部分ペプチドまたはそれらをコードする塩基配列を含む核酸。

【請求項 34】

予防・治療の対象がヒトである、請求項 31 ~ 33 のいずれか 1 項に記載のAIMもしくはその部分ペプチドまたはそれらをコードする塩基配列を含む核酸。

【請求項 35】

予防・治療の対象がネコである、請求項 31 ~ 33 のいずれか 1 項に記載のAIMもしくはその部分ペプチドまたはそれらをコードする塩基配列を含む核酸。

【請求項 36】

AIMまたはその部分ペプチドが、ネコIgMと結合することを特徴とする、請求項 35 に記載のAIMもしくはその部分ペプチドまたはそれらをコードする塩基配列を含む核酸。

【請求項 37】

腎疾患の予防・治療に用いるための、AIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤。

【請求項 38】

腎疾患が急性腎不全、慢性腎炎、慢性腎不全、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、腎硬化症、IgA腎症、高血圧性腎症、膠原病に伴う腎症またはIgM腎症である、請求項 37 に記載のAIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤。

【請求項 39】

腎疾患が急性腎不全または慢性腎不全である、請求項 37 または 38 に記載のAIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤。

【請求項 40】

予防・治療の対象がヒトである、請求項 37 ~ 39 のいずれか 1 項に記載のAIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤。

10

20

30

40

50

## 【請求項 4 1】

予防・治療の対象がネコである、請求項 3 7 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載のAIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤。

## 【請求項 4 2】

AIMまたはその部分ペプチドが、ネコIgMと結合することを特徴とする、請求項 4 1 に記載のAIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤。

## 【請求項 4 3】

腎疾患の予防・治療剤を製造するための、AIMもしくはその部分ペプチドまたはそれらをコードする塩基配列を含む核酸またはAIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤の使用。

## 【請求項 4 4】

腎疾患が急性腎不全、慢性腎炎、慢性腎不全、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、腎硬化症、IgA腎症、高血圧性腎症、膠原病に伴う腎症またはIgM腎症である、請求項 4 3 に記載の使用。

## 【請求項 4 5】

腎疾患が急性腎不全または慢性腎不全である、請求項 4 3 または 4 4 に記載の使用。

## 【請求項 4 6】

予防・治療の対象がヒトである、請求項 4 3 ~ 4 5 のいずれか 1 項に記載の使用。

## 【請求項 4 7】

予防・治療の対象がネコである、請求項 4 3 ~ 4 5 のいずれか 1 項に記載の使用。

## 【請求項 4 8】

AIMまたはその部分ペプチドが、ネコIgMと結合することを特徴とする、請求項 4 7 に記載の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、腎疾患の予防または治療剤などに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

近年の生活環境の変化による高血圧、糖尿病、脂質異常など生活習慣病やメタボリックシンドロームの増加に伴い腎臓疾患患者数は増加しており、日本における成人の約8人に1人が慢性腎臓病患者であると考えられている。腎臓疾患の進行により腎臓の機能が低下し腎不全となると、やがて腎臓透析や腎臓移植が必要となり、患者のQOLの観点、あるいは医療経済上の大きな問題となっている。また、急性腎不全（または急性腎障害）は、腎臓の虚血や腎毒性のあるトキシン、敗血症など様々な原因によって生じる疾患であり、長期入院となる率や死亡率は高く、その発症率は近年増加傾向にある。急性腎不全が十分に治療せず慢性化し、慢性腎不全となる場合も少なからず存在することが知られている。

## 【0003】

慢性腎臓疾患の治療法としては、薬物療法、食事療法、安静療法が行われている。例えば、薬物療法としては、降圧薬、利尿薬、活性型ビタミンD製剤、経口吸着炭素製剤、カリウム吸着薬、リン吸着薬等が使用され、疾患の進行を遅らせること、あるいは腎臓機能の低下に伴う症状の改善が目的とされている。しかしながら、いずれの治療法においても、疾患の進行を十分に止めることはできず、新たな治療法が求められている。また、急性腎不全に対する確実な治療法は存在せず、早急な治療法の開発が希求されている。

## 【0004】

また、ネコにおいても腎臓疾患は大きな課題となっている。慢性腎不全は高齢のネコで最も発症しやすい病気であり、腎不全が高齢のネコの死因の1位であると言われている。ほとんどすべてのネコが6 - 7歳くらいに尿路結石や尿路感染症をきっかけに腎機能が悪化し、急性腎不全（または急性腎障害）を発症し、多くが慢性腎不全となって15歳くらいまでに死亡する。ネコにおいても腎臓疾患に対して満足する治療法がなく、新たな治療法が

10

20

30

40

50

求められている。

【0005】

AIM (apoptosis inhibitor of macrophage) は、本発明者が同定したマクロファージが特異的に産生する因子であり (非特許文献1)、これまでにいくつかの疾患との関連が示唆されている。例えば、AIMは、肥満に伴い血中濃度が上昇し、CD36を介したエンドサイトーシスにより脂肪細胞に取り込まれ、蓄積している中性脂肪の分解 (lipolysis) を誘導することから、抗肥満との関係が示唆されている (非特許文献2)。また、AIMは、中性脂肪の分解により脂肪細胞から遊離脂肪酸を放出させ、放出された脂肪酸が、toll様受容体の刺激を介して脂肪組織に慢性炎症を惹起・維持する。メタボリックシンドロームは、肥満に伴うインスリン抵抗性獲得がその基盤となるが、脂肪組織における慢性炎症が重要であることから、AIMがメタボリックシンドロームと関係があるとされている (非特許文献3)。さらに、本発明者は、高カロリー食を負荷した肥満AIM KOマウスが、肥満、脂肪肝、肝実質の線維化、発がんというヒトNASH病態に近似した病態を示すことを明らかにし、AIMの肝臓疾患への適用の可能性を報告している (特許文献1)。しかしながら、AIMと腎臓疾患との関係はこれまでに知られていない。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】WO2013/162021

【非特許文献】

20

【0007】

【非特許文献1】Miyazaki, J Exp Med 189:413-422, 1999

【非特許文献2】Kurokawa, Cell Metab 11:479-492, 2010

【非特許文献3】Kurokawa, PNAS 108:12072-12077, 2011

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の目的は、腎疾患の予防又は治療薬を提供することである。また、新たな腎疾患のモデルマウスを用いた腎疾患の予防又は治療薬の評価方法及びスクリーニング方法などを提供することである。さらに本発明の別の目的は、腎疾患の予後の予測方法を提供することである。

30

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者は、片側尿管結紮(UUO; unilateral ureteral obstruction)、または一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流(IR; ischemia/reperfusion)を行ったAIMノックアウトマウスについて、腎臓の経過を観察したところ、最初に急性腎不全が生じ、日数の経過に伴い壊死した尿細管細胞の蓄積および腎実質の線維化、糸球体構造の崩壊および線維化、という慢性腎疾患で観察される症状が生じるという、非常に興味深い知見を得た。また、両側性の一過性腎虚血再灌流(IR; ischemia/reperfusion)を行ったAIMノックアウトマウスにおいても、急性腎不全が生じ、壊死した尿細管細胞の蓄積とそれともなう腎障害の急速な進行と、全身状態の悪化と高率な死亡が確認された。また、該AIMノックアウトマウスにAIMを投与したところ、BUN値が改善し、腎機能の急速な改善が認められ、それに伴う全身症状と死亡率の改善が認められた。このことから、AIMを補充することは、急性腎不全の治療および慢性腎疾患の予防又は治療になると考えられた。

40

本発明者は、これらの知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0010】

すなわち、本発明は、

[1] AIMもしくはその部分ペプチドまたはそれらをコードする塩基配列を含む核酸を含有してなる、腎疾患の予防・治療剤；

50

[2] AIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤を含有してなる、腎疾患の予防・治療剤；

[3] 腎疾患が急性腎不全、慢性腎炎、慢性腎不全、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、腎硬化症、IgA腎症、高血圧性腎症、膠原病に伴う腎症またはIgM腎症である前記[1]または[2]に記載の予防・治療剤；

[4] 腎疾患が急性腎不全または慢性腎不全である前記[1]～[3]のいずれか1つに記載の予防・治療剤；

[5] 予防・治療の対象がヒトである前記[1]～[4]のいずれか1つに記載の予防・治療剤；

[6] 予防・治療の対象がネコである前記[1]～[4]のいずれか1つに記載の予防・治療剤；

[7] AIMまたはその部分ペプチドが、ネコIgMと結合することを特徴とする、前記[6]に記載の予防・治療剤；

[8] ネコIgMと結合するAIMもしくはその部分ペプチドが、マウス由来AIMのSRCR3ドメインを含む、前記[7]に記載の予防・治療剤；

[9] AIM発現不全非ヒト哺乳動物に片側尿管結紮、一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流または両側性の一過性腎虚血再灌流を行うことによって得られる動物を用いる、腎疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法；

[10] 以下の工程を含むことを特徴とする、前記[9]に記載のスクリーニング方法

(1) 片側尿管結紮、一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流または両側性の一過性腎虚血再灌流を行う条件下、AIM発現不全非ヒト哺乳動物に被検物質を投与する工程、

(2) 被検物質を投与されたAIM発現不全非ヒト哺乳動物の下記特性のいずれか一項目以上を観察する工程；

(i) 壊死した尿細管細胞の蓄積と腎実質の線維化、

(ii) 糸球体構造の崩壊と線維化、

(iii) 腎臓における炎症性サイトカインの発現量、

(iv) 腎臓におけるマクロファージの割合、

(v) BUN値、

(vi) 生存率、

(3) 被検物質非投与の場合と比較して、前記特性のいずれか一項目以上が改善される被検物質を選択する工程；

[11] 腎疾患が急性腎不全、慢性腎炎、慢性腎不全、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、腎硬化症、IgA腎症、高血圧性腎症、膠原病に伴う腎症またはIgM腎症である前記[9]または[10]に記載のスクリーニング方法；

[12] AIM発現不全非ヒト哺乳動物に片側尿管結紮、一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流または両側性の一過性腎虚血再灌流を行うことによって得られる動物を用いる、腎疾患予防・治療剤の予防・治療効果の評価方法；

[13] 以下の工程を含むことを特徴とする、前記[12]に記載の評価方法

(1) 片側尿管結紮、一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流または両側性の一過性腎虚血再灌流を行う条件下、AIM発現不全非ヒト哺乳動物に腎疾患予防・治療剤を投与する工程

(2) 腎疾患予防・治療剤を投与されたAIM発現不全非ヒト哺乳動物の下記特性のいずれか一項目以上を観察する工程；

(i) 壊死した尿細管細胞の蓄積と腎実質の線維化、

(ii) 糸球体構造の崩壊と線維化、

(iii) 腎臓における炎症性サイトカインの発現量、

(iv) 腎臓におけるマクロファージの割合、

(v) BUN値、

(vi) 生存率、

(3) 前記特性のいずれか一項目以上を腎疾患予防・治療剤非投与の場合と比較して、腎

10

20

30

40

50

疾患予防・治療剤の効果を評価する工程；

[14] 腎疾患が急性腎不全、慢性腎炎、慢性腎不全、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、腎硬化症、IgA腎症、高血圧性腎症、膠原病に伴う腎症またはIgM腎症である前記[12]または[13]に記載の評価方法；

[15] 被検者の試料中のAIM濃度を測定することを含む、腎疾患患者の予後の予測方法；

[16] 試料が血液または血清である、前記[15]に記載の予測方法；

[17] AIM濃度の測定方法が抗AIM抗体を用いた免疫学的方法である、前記[15]または[16]に記載の予測方法；

[18] 腎疾患が急性腎不全、慢性腎炎、慢性腎不全、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、腎硬化症、IgA腎症、高血圧性腎症、膠原病に伴う腎症またはIgM腎症である前記[15]～[17]のいずれか1つに記載の予測方法；

[19] 被検者の試料中のAIM濃度を測定することを含む、急性腎不全の検査方法；

[20] 試料が尿である、[19]に記載の検査方法；

[21] AIM濃度の測定方法が抗AIM抗体を用いた免疫学的方法である、[19]または[20]に記載の検査方法；

[22] 以下の(a)または(b)を含む、腎疾患の診断または予後の予測キット；

(a) AIM遺伝子の転写産物とハイブリダイズし得る核酸プローブまたは核酸プライマー、および/または

(b) AIMに対する抗体；

[23] 腎疾患が急性腎不全、慢性腎炎、慢性腎不全、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、腎硬化症、IgA腎症、高血圧性腎症、膠原病に伴う腎症またはIgM腎症である[22]に記載のキット；

[24] AIMもしくはその部分ペプチドまたはそれらをコードする塩基配列を含む核酸を対象に有効量投与することを含む、腎疾患の予防・治療方法；

[25] AIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤を対象に有効量投与することを含む、腎疾患の予防・治療方法；

[26] 腎疾患が急性腎不全、慢性腎炎、慢性腎不全、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、腎硬化症、IgA腎症、高血圧性腎症、膠原病に伴う腎症またはIgM腎症である、前記[24]または[25]に記載の予防・治療方法；

[27] 腎疾患が急性腎不全または慢性腎不全である、前記[24]～[26]のいずれか1つに記載の予防・治療方法；

[28] 予防・治療の対象がヒトである、前記[24]～[27]のいずれか1つに記載の予防・治療方法；

[29] 予防・治療の対象がネコである、前記[24]～[27]のいずれか1つに記載の予防・治療方法；

[30] AIMまたはその部分ペプチドが、ネコIgMと結合することを特徴とする、前記[29]に記載の予防・治療方法；

[31] 腎疾患の予防・治療に用いるための、AIMもしくはその部分ペプチドまたはそれらをコードする塩基配列を含む核酸；

[32] 腎疾患が急性腎不全、慢性腎炎、慢性腎不全、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、腎硬化症、IgA腎症、高血圧性腎症、膠原病に伴う腎症またはIgM腎症である、前記[31]に記載のAIMもしくはその部分ペプチドまたはそれらをコードする塩基配列を含む核酸；

[33] 腎疾患が急性腎不全または慢性腎不全である、前記[31]または[32]に記載のAIMもしくはその部分ペプチドまたはそれらをコードする塩基配列を含む核酸；

[34] 予防・治療の対象がヒトである、前記[31]～[33]のいずれか1つに記載のAIMもしくはその部分ペプチドまたはそれらをコードする塩基配列を含む核酸；

[35] 予防・治療の対象がネコである、前記[31]～[33]のいずれか1つに記載のAIMもしくはその部分ペプチドまたはそれらをコードする塩基配列を含む核酸；

[36] AIMまたはその部分ペプチドが、ネコIgMと結合することを特徴とする、前記[35]に記載のAIMもしくはその部分ペプチドまたはそれらをコードする塩基配列を含む核酸；

10

20

30

40

50

[37]腎疾患の予防・治療に用いるための、AIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤；

[38]腎疾患が急性腎不全、慢性腎炎、慢性腎不全、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、腎硬化症、IgA腎症、高血圧性腎症、膠原病に伴う腎症またはIgM腎症である、前記[37]に記載のAIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤；

[39]腎疾患が急性腎不全または慢性腎不全である、前記[37]または[38]に記載のAIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤；

[40]予防・治療の対象がヒトである、前記[37]～[39]のいずれか1つに記載のAIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤；

[41]予防・治療の対象がネコである、前記[37]～[39]のいずれか1つに記載のAIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤；

[42]AIMまたはその部分ペプチドが、ネコIgMと結合することを特徴とする、前記[41]に記載のAIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤；

[43]腎疾患の予防・治療剤を製造するための、AIMもしくはその部分ペプチドまたはそれらをコードする塩基配列を含む核酸またはAIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤の使用；

[44]腎疾患が急性腎不全、慢性腎炎、慢性腎不全、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、腎硬化症、IgA腎症、高血圧性腎症、膠原病に伴う腎症またはIgM腎症である、前記[43]に記載の使用。

[45]腎疾患が急性腎不全または慢性腎不全である、前記[43]または[44]に記載の使用；

[46]予防・治療の対象がヒトである、前記[43]～[45]のいずれか1つに記載の使用；

[47]予防・治療の対象がネコである、前記[43]～[45]のいずれか1つに記載の使用；

[48]AIMまたはその部分ペプチドが、ネコIgMと結合することを特徴とする、前記[47]に記載の使用；

を提供する。

【発明の効果】

【0011】

本発明は、有効成分としてAIM等を含む、腎疾患の予防・治療剤を提供することができる。また、本発明の腎疾患モデルマウスを用いたスクリーニング方法によれば、腎疾患に対する予防・治療に有効な物質を探索することができる。また本発明の腎疾患モデルマウスを用いて、腎疾患の公知の予防・治療剤の効果を評価することができる。さらに、本発明は、被験者の試料中のAIM濃度を測定することで、腎疾患の予後の予測方法や腎疾患の検査方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】A：片側尿管結紮を行ったAIM KOマウスおよびWTマウスの正常腎臓組織片およびUO後の腎臓組織片のAzanおよびヘマトキシリン同時染色像である。B：片側尿管結紮を行ったAIM KOマウスおよびWTマウスの正常腎臓組織片およびUUO後の腎臓組織片のAzan、PASおよびヘマトキシリン同時染色像である。

【図2】一側性腎摘出後に一過性腎虚血再灌流を行ったAIM KOマウスおよびWTマウスの腎臓組織片のヘマトキシリン・エオジン染色像である。

【図3】A：一側性腎摘出後に一過性腎虚血再灌流を行ったAIM KOマウスおよびWTマウスの腎臓組織片のF4/80に対する免疫染色像である。B：一側性腎摘出後に一過性腎虚血再灌流を行ったAIM KOマウスおよびWTマウスの腎臓組織片のMCP-1の発現量を示すグラフである。\*：P<0.05，\*\*：P<0.01

【図4】A：一側性腎摘出後に一過性腎虚血再灌流を行い、rAIMまたはPBSを投与したAIM KOマウスの腎臓組織片のヘマトキシリン・エオジン染色像である。B：一側性腎摘出後に一過性腎虚血再灌流を行い、rAIMまたはPBSを投与したAIM KOマウスのBUN値を示すグラフである。

【図5】一側性腎摘出後に一過性腎虚血再灌流を行い、rAIMを投与したAIM KOマウスの腎

10

20

30

40

50

臓組織片のphase-contrast像およびAIMに対する免疫染色像である。N：壊死巣を示す。矢印：AIMを示す。

【図6】両側性の一過性腎虚血再灌流を行ったWTマウスの尿中AIM値を示すグラフである。  
\*： $p < 0.05$

【図7】両側性の一過性腎虚血再灌流を行ったAIM KOマウスおよびWTマウスの生存率を示すグラフである。

【図8】両側性の一過性腎虚血再灌流を行ったAIM KOマウスおよびWTマウスのクリニカルスコアを示すグラフである。  
\*\*： $p < 0.01$

【図9】両側性の一過性腎虚血再灌流を行ったAIM KOマウスおよびWTマウスのBUN値を示すグラフである。それぞれの日に死亡したマウスの数を+で記載している。  
\*： $P < 0.05$ , \*  
\*： $P < 0.01$

【図10】両側性の一過性腎虚血再灌流を行ったAIM KOマウスおよびWTマウスの腎臓組織片のPAS染色像である。

【図11】両側性の一過性腎虚血再灌流を行ったAIM KOマウスおよびWTマウスの腎臓組織片の近位尿細管中の死細胞塊の面積を、1切片辺りの全面積に対する割合で表したグラフである。  
\*： $p < 0.05$ , \*\*： $p < 0.01$

【図12】両側性の一過性腎虚血再灌流を行ったAIM KOマウスおよびWTマウスのIL-1bおよびIL-6について定量的RT-PCRによるmRNA発現比率を示すグラフである。  
\*： $p < 0.05$

【図13】両側性の一過性腎虚血再灌流を行ったAIM KOマウスおよびWTマウスのIR後7日目の腎臓由来の細胞のフローサイトメーター解析結果を示す図である。

【図14】両側性の一過性腎虚血再灌流を行ったWTマウスの腎臓組織片のPAS染色像および抗AIM抗体による免疫染色像である。

【図15】腎梗塞による急性腎不全で死亡したヒトの腎臓組織片のPAS染色像および抗AIM抗体による免疫染色像である。

【図16】ヒト急性腎不全(AKI)で病院に搬送された患者および健常人を3名ずつ、また両側性のIRを施したWTマウス5匹について、IR前、IR1日後、および7日後の尿について、ELISAで測定したAIM濃度を示すグラフである。N.D.: not detected

【図17】両側性の一過性腎虚血再灌流を行ったAIM KOマウスの腎臓組織片の継時的なPAS染色像および抗AIM抗体による免疫染色像である。

【図18】AIM-KOマウスに両側性のIRを施し、IR後3日目の腎臓をコラゲナーゼ処理し、F4/80陽性のマクロファージをFACSソーターを用いて単離した後、その貪食能を示したグラフである。

【図19】AIM-KO由来の骨髄細胞をM-CSFによって分化させたマクロファージをFACSソーターを用いて単離した後、その貪食能を示したグラフである。

【図20】両側性の一過性腎虚血再灌流を施した後、1日目から3日目までrAIMまたはPBSを投与したAIM KOマウスの生存率を示すグラフである。

【図21】両側性の一過性腎虚血再灌流を施した後、1日目から3日目までrAIMまたはPBSを投与したAIM KOマウスのクリニカルスコアを示すグラフである。  
\*： $P < 0.05$ , \*\*： $P < 0.01$

【図22】両側性の一過性腎虚血再灌流を施した後、1日目から3日目までrAIMまたはPBSを投与したAIM KOマウスのBUN値を示すグラフである。それぞれの日に死亡したマウスの数を+で記載している。  
\*： $P < 0.05$ , \*\*： $P < 0.01$

【図23】両側性の一過性腎虚血再灌流を施した後、1日目から3日目までrAIMまたはPBSを投与したAIM KOマウスの腎臓組織片のPAS染色像である。

【図24】両側性の一過性腎虚血再灌流を施した後、1日目から3日目までrAIMまたはPBSを投与したAIM KOマウスのIR後7日目の腎臓組織片の近位尿細管中の死細胞塊の面積を、1切片辺りの全面積に対する割合で表したグラフである。  
\*： $p < 0.05$

【図25】両側性の一過性腎虚血再灌流を施した後、1日目から3日目までrAIMまたはPBSを投与したAIM KOマウスのIL-1bおよびIL-6について定量的RT-PCRによるmRNA発現比率を示すグラフである。  
\*： $p < 0.05$

10

20

30

40

50

【図26】両側性の非致死性の一過性腎虚血再灌流を施した後、1日目から3日目までrAIM またはPBSを投与したAIM KOマウスのBUN値を示すグラフである。\*: p<0.05

【図27】両側性の一過性腎虚血再灌流を施した後、1日目から3日目までrAIM またはPBSを投与したWTマウスのBUN値を示すグラフである。

【図28】両側性の非致死性の一過性腎虚血再灌流を行ったAIM KOマウスおよびWTマウスの腎臓組織片のPAS染色像およびAzan染色像である。

【図29】両側性の非致死性の一過性腎虚血再灌流を行ったAIM KOマウスおよびWTマウスの4種類の線維化マーカーについて定量的RT-PCRによるmRNA発現比率を示すグラフである。

【図30】健常者、腎障害のない糖尿病患者、糖尿病性の慢性腎不全患者について男女別の血中AIM濃度を示すグラフである。\*: p<0.05, \*\*: p<0.01

【図31】A:慢性腎不全患者(n=55)における、eGFR(糸球体濾過量; ml/min/1.73m<sup>2</sup>)または血中クレアチニン値(mg/dl)と血中AIM濃度の相関関係を示すグラフである。B:血中AIM濃度と該濃度測定から2~3年後における慢性腎不全患者の腎機能変化の相関関係を示すグラフである。

【図32】A:イヌ(n=3)、ネコ(n=3)およびマウスの血清中に存在するAIMのウエスタンブロット像である。B:ネコおよびマウスのrAIMのウエスタンブロット像である。

【図33】A:組換えネコAIM(1mg)を静注したネコ由来血清の各サイズ画分に対するAIMとIgMのウエスタンブロット像である。B:マウス由来血清の各サイズ画分に対するAIMとIgMのウエスタンブロット像である。

【図34】組換えマウスAIM(1mg)を静注したネコ由来血清の各サイズ画分に対するAIMとIgMのウエスタンブロット像である。

【図35】ネコAIM cDNA配列(配列番号:5)を示す図である。翻訳開始点(atg)と翻訳停止点(tga)をboldで示す。また、non-coding sequenceを斜体で示す。また、リーダーペプチドをコードする塩基配列を実線の下線で示す。さらに、SRCR1とSRCR2間のヒンジ部分、SRCR2とSRCR3間のヒンジ部分およびSRCR3と翻訳停止点間のペプチド配列をコードする塩基配列を破線の下線で示す。

【図36】ネコのAIM蛋白質のリーダーペプチド配列の疎水性を示す図である。

【図37】ヒトのAIM蛋白質のリーダーペプチド配列の疎水性を示す図である。

【図38】マウスのAIM蛋白質のリーダーペプチド配列の疎水性を示す図である。

【図39】イヌのAIM蛋白質のリーダーペプチド配列の疎水性を示す図である。

【図40】ヒト(配列番号:2)、ネコ(配列番号:4)およびマウス(配列番号:6)間のリーダーペプチド(LS)、各SRCRおよびヒンジ部分のアミノ酸配列の比較を示す図である。

【図41】抗ネコAIMモノクローナル抗体を用いた、ネコの血清中AIMに対する還元型のウエスタンブロッティング像を示す。個体1~4はAIMが検出された個体で、コントロールのrcAIMのシグナルとの強度比較によって算出したAIM値を算出した。個体5~7はAIMシグナルが検出できなかった個体である(N.D.:not detectable)。

【図42】両側性の一過性腎虚血再灌流を行ったネコのBUN値およびCre値を示すグラフである。○: Cre, □: BUN

【図43】抗ネコAIMモノクローナル抗体を用いた、IR前または後のネコの血清中または尿中AIMに対する還元型のウエスタンブロッティング像を示す。

【図44】両側性の一過性腎虚血再灌流を行ったネコの腎臓組織片の抗AIM抗体による免疫染色像である。

【図45】両側性の一過性腎虚血再灌流を行った後、rAIM またはPBSを投与したネコのeGFR(糸球体濾過量; ml/min/m<sup>2</sup>)を示すグラフである。n=1 each

【図46】両側性の一過性腎虚血再灌流を行った後、rAIM またはPBSを投与したネコの腎臓組織片のPAS染色像である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

10

20

30

40

50

本発明は、AIMもしくはその部分ペプチド、またはそれらをコードする塩基配列を含む核酸を含有してなる、腎疾患の予防・治療剤を提供する。

本発明におけるAIMは、配列番号：2（ヒト由来AIM蛋白質のアミノ酸配列）または配列番号：4（ネコ由来AIM蛋白質のアミノ酸配列）で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質である。

AIMは、例えば、温血動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジー、トリなど）の免疫細胞であるマクロファージから単離・精製される蛋白質であってよい。また、化学合成もしくは無細胞翻訳系で生化学的に合成された蛋白質であってよいし、あるいは上記アミノ酸配列をコードする塩基配列を含む核酸を導入された形質転換体から産生される組換え蛋白質であってよい。

10

#### 【0014】

配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。ここで「相同性」とは、当該技術分野において公知の数学的アルゴリズムを用いて2つのアミノ酸配列をアラインさせた場合の、最適なアラインメント（好ましくは、該アルゴリズムは最適なアラインメントのために配列の一方もしくは両方へのギャップの導入を考慮し得るものである）における、オーバーラップする全アミノ酸残基に対する同一アミノ酸および類似アミノ酸残基の割合（%）を意味する。「類似アミノ酸」とは物理化学的性質において類似したアミノ酸を意味し、例えば、芳香族アミノ酸（Phe、Trp、Tyr）、脂肪族アミノ酸（Ala、Leu、Ile、Val）、極性アミノ酸（Gln、Asn）、塩基性アミノ酸（Lys、Arg、His）、酸性アミノ酸（Glu、Asp）、水酸基を有するアミノ酸（Ser、Thr）、側鎖の小さいアミノ酸（Gly、Ala、Ser、Thr、Met）などの同じグループに分類されるアミノ酸が挙げられる。このような類似アミノ酸による置換は蛋白質の表現型に変化をもたらさない（即ち、保存的アミノ酸置換である）ことが予測される。保存的アミノ酸置換の具体例は当該技術分野で周知であり、種々の文献に記載されている（例えば、Bowieら、*Science*, 247: 1306-1310 (1990)）を参照）。

20

本明細書におけるアミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST(National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool)を用い、以下の条件（期待値 = 10；ギャップを許す；マトリクス = BLOSUM62；フィルタリング = OFF）にて計算することができる。アミノ酸配列の相同性を決定するための他のアルゴリズムとしては、例えば、Karlinら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5873-5877 (1993)に記載のアルゴリズム [ 該アルゴリズムはNBLASTおよびXBLASTプログラム(version 2.0)に組み込まれている(Altschulら、*Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402 (1997)) ]、Needlemanら、*J. Mol. Biol.*, 48: 444-453 (1970)に記載のアルゴリズム [ 該アルゴリズムはGCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラムに組み込まれている ]、MyersおよびMiller、*CABIOS*, 4: 11-17 (1988)に記載のアルゴリズム [ 該アルゴリズムはCGC配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム(version 2.0)に組み込まれている ]、Pearsonら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2444-2448 (1988)に記載のアルゴリズム [ 該アルゴリズムはGCGソフトウェアパッケージ中のFASTAプログラムに組み込まれている ] 等が挙げられ、それらも同様に好ましく用いられ得る。

30

40

より好ましくは、配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列とは、配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有するアミノ酸配列である。

#### 【0015】

配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、前記の配列番号：2または配列番号：4で表されるア

50

ミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含み、配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。ここで「活性」とは、例えば、動脈硬化薬マクロファージのアポトーシス抑制活性、動脈硬化の維持・促進活性、脂肪細胞分化抑制活性、脂肪細胞の脂肪滴融解活性、脂肪細胞縮小活性、CD36結合活性、脂肪細胞へのエンドサイトーシス活性、FAS結合活性、FAS機能抑制活性、抗肥満活性などをいう。「実質的に同質」とは、それらの活性が定性的（例えば、生理学的または薬理的）に同じであることを示す。したがって、前記活性は同等であることが好ましいが、これらの活性の程度（例えば、約0.1～約10倍、好ましくは約0.5～約2倍）や蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

前記活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができる。

10

#### 【0016】

また、本発明のAIMには、例えば、(1)配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列のうち1または2個以上（好ましくは、1～100個程度、好ましくは1～50個程度、さらに好ましくは1～10個程度、特に好ましくは1～数（2、3、4もしくは5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(2)配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～100個程度、好ましくは1～50個程度、さらに好ましくは1～10個程度、特に好ましくは1～数（2、3、4もしくは5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(3)配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～50個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは1～数（2、3、4もしくは5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(4)配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列のうち1または2個以上（好ましくは、1～50個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは1～数（2、3、4もしくは5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(5)それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども含まれる。

20

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置は、蛋白質の活性が保持される限り特に限定されない。

#### 【0017】

本発明のAIMは、好ましくは、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するヒトAIM蛋白質（GenBankアクセッション番号：AAD01446）または配列番号：4で表されるアミノ酸配列を有するネコAIM蛋白質、あるいは他の哺乳動物におけるそのホモログ〔例えば、GenBankにアクセッション番号：AAD01445として登録されているマウスホモログ等〕であり、より好ましくは、配列番号：2で表されるアミノ酸配列からなるヒトAIM蛋白質または配列番号：4で表されるアミノ酸配列からなるネコAIM蛋白質である。

30

#### 【0018】

本明細書において、蛋白質およびペプチドは、ペプチド表記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）で記載される。配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質をはじめとする、本発明のAIMは、C末端がカルボキシル基(-COOH)、カルボキシレート(-COO<sup>-</sup>)、アミド(-CONH<sub>2</sub>)またはエステル(-COOR)の何れであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチルなどのC<sub>1-6</sub>アルキル基；例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC<sub>3-8</sub>シクロアルキル基；例えば、フェニル、*m*-ナフチルなどのC<sub>6-12</sub>アリール基；例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C<sub>1-2</sub>アルキル基；*m*-ナフチルメチルなどの*m*-ナフチル-C<sub>1-2</sub>アルキル基などのC<sub>7-14</sub>アラールキル基；ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

40

本発明のAIMがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のAIMには、N末端のアミノ酸残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミ

50

ル基、アセチル基などのC<sub>1-6</sub>アルカノイルなどのC<sub>1-6</sub>アシル基など)で保護されているもの、生体内で切断されて生成し得るN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>1-6</sub>アルカノイル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

#### 【0019】

AIMの部分ペプチド(以下、単に「本発明の部分ペプチド」と略称する場合もある)は、上記したAIMの部分アミノ酸配列を有するペプチドであり、且つAIMと実質的に同質の活性を有する限り、何れのものであってもよい。ここで「実質的に同質の活性」とは上記と同意義を示す。また、「実質的に同質の活性」の測定はAIMの場合と同様に行なうことができる。

AIMは、システインを多く含む3つのSRCR(Scavenger-Receptor Cysteine-Rich)ドメイン含んでいることから、それぞれのSRCRドメインを本発明の部分ペプチドとして使用できる。具体的には、例えば、配列番号:2で表されるアミノ酸配列のうち、SRCR1ドメイン(配列番号:2で表されるアミノ酸配列のうち、アミノ酸番号24~125)、SRCR2ドメイン(配列番号:2で表されるアミノ酸配列のうち、アミノ酸番号138~239)、SRCR3ドメイン(配列番号:2で表されるアミノ酸配列のうち、アミノ酸番号244~346)をそれぞれ含む部分アミノ酸配列やSRCRドメインの任意の組合せを含む部分アミノ酸配列を有するものなどが用いられる。また、配列番号:4で表されるアミノ酸配列のうち、SRCR1ドメイン(配列番号:4で表されるアミノ酸配列のうち、アミノ酸番号24~125)、SRCR2ドメイン(配列番号:4で表されるアミノ酸配列のうち、アミノ酸番号139~239)、SRCR3ドメイン(配列番号:4で表されるアミノ酸配列のうち、アミノ酸番号244~346)をそれぞれ含む部分アミノ酸配列やSRCRドメインの任意の組合せを含む部分アミノ酸配列を有するものなども用いられる。本発明の部分ペプチドは、上記の機能ドメインを含む限りそのサイズに特に制限はないが、好ましくは50個以上の部分アミノ酸配列を含むもの、より好ましくは100個以上の部分アミノ酸配列を含むもの、さらに好ましくは200個以上の部分アミノ酸配列を含むものが挙げられる。該部分アミノ酸配列は一個の連続した部分アミノ酸配列であってもよく、あるいは不連続な複数の部分アミノ酸配列が連結されたものであってもよい。

#### 【0020】

また、本発明の部分ペプチドはC末端がカルボキシル基(-COOH)、カルボキシレート(-COO<sup>-</sup>)、アミド(-CONH<sub>2</sub>)またはエステル(-COOR)の何れであってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、AIMについて前記したと同様のものが挙げられる。本発明の部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の部分ペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば、C末端のエステルと同様のものなどが用いられる。

さらに、本発明の部分ペプチドには、上記したAIMと同様に、N末端のアミノ酸残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

#### 【0021】

本発明で用いられるAIMまたはその部分ペプチドは塩の形態であってもよい。例えば、生理学的に許容される酸(例:無機酸、有機酸)や塩基(例:アルカリ金属塩)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。

#### 【0022】

10

20

30

40

50

AIMは、前述した哺乳動物のマクロファージから自体公知の蛋白質の精製方法によって製造することができる。具体的には、哺乳動物のマクロファージをホモジナイズし、低速遠心により細胞デブリスを除去した後、上清を高速遠心して細胞膜含有画分を沈澱させ、該上清を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー等に付すことによりAIMまたはその塩を調製することができる。

【 0 0 2 3 】

AIMまたはその部分ペプチドは、公知のペプチド合成法に従って製造することもできる（以下、これらの化学合成の説明においては、特にことわらない限り、全長AIMおよびその部分ペプチドを包括して、単にAIMという）。

ペプチド合成法は、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれであってもよい。AIMを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合し、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的とする蛋白質を製造することができる。

ここで、縮合や保護基の脱離は、自体公知の方法、例えば、以下の（1）および（2）に記載された方法に従って行われる。

(1)M. BodanszkyおよびM. A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966年)

(2)SchroederおよびLuebke, The Peptide, Academic Press, New York(1965年)

【 0 0 2 4 】

このようにして得られたAIMは、公知の精製法により精製単離することができる。ここで、精製法としては、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶、これらの組み合わせなどが挙げられる。

上記方法で得られるAIMが遊離体である場合には、該遊離体を公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆にAIMが塩として得られた場合には、該塩を公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

【 0 0 2 5 】

さらに、AIMは、それをコードする核酸を含有する形質転換体を培養し、得られる培養物からAIMを分離精製することによって製造することもできる。AIMまたはその部分ペプチドをコードする核酸はDNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよい。好ましくはDNAが挙げられる。また、該核酸は二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（即ち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（即ち、非コード鎖）であってもよい。

AIMまたはその部分ペプチドをコードするDNAとしては、ゲノムDNA、温血動物（例えば、ヒト、ウシ、サル、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ハムスター、トリなど）のマクロファージ由来のcDNA、合成DNAなどが挙げられる。AIMまたはその部分ペプチドをコードするゲノムDNAであれば、前記動物のあらゆる細胞〔例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、臍細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、線維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など〕もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織〔例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆嚢、骨髄、副腎、皮膚、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、脂肪組織（例、褐色脂肪組織、白色脂肪組織）、骨格筋など〕より調製したゲノムDNA画分を鋳型として用い、Polymerase Chain Reaction（以下、「PCR法」と略称する）によって直接

10

20

30

40

50

増幅することができ、AIMまたはその部分ペプチドをコードするcDNAであれば、マクロファージより調製した全RNAもしくはmRNA画分をそれぞれ鋳型として用い、PCR法およびReverse Transcriptase-PCR（以下、「RT-PCR法」と略称する）によって直接増幅することもできる。あるいは、AIMまたはその部分ペプチドをコードするゲノムDNAおよびcDNAは、上記したゲノムDNAおよび全RNAもしくはmRNAの断片を適当なベクター中に挿入して調製されるゲノムDNAライブラリーおよびcDNAライブラリーから、コロニーもしくはブランクハイブリダイゼーション法またはPCR法などにより、それぞれクローニングすることもできる。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。

#### 【0026】

AIMをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：1または配列番号：3で表される塩基配列と同一または実質的に同一な塩基配列を含むDNAなどが挙げられる。

配列番号：1または配列番号：3で表される塩基配列と実質的に同一な塩基配列を含むDNAとしては、例えば、配列番号：1で表される塩基配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上の相同性を有する塩基配列を含有し、前記したAIMと実質的に同質の活性を有する蛋白質をコードするDNAなどが用いられる。

本明細書における塩基配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST(National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool)を用い、以下の条件（期待値=10；ギャップを許す；フィルタリング=ON；マッチスコア=1；ミスマッチスコア=-3）にて計算することができる。塩基配列の相同性を決定するための他のアルゴリズムとしては、上記したアミノ酸配列の相同性計算アルゴリズムが同様に好ましく例示される。

#### 【0027】

AIMをコードするDNAは、好ましくは配列番号：1で表される塩基配列で示されるヒトAIM蛋白質をコードする塩基配列を含むDNA（GenBankアクセッション番号：AF011429）、または配列番号：3で表される塩基配列で示されるネコAIM蛋白質をコードする塩基配列を含むDNAあるいは他の哺乳動物におけるそのホモログ〔例えば、GenBankにアクセッション番号：AF011428として登録されているマウスホモログ等〕である。

#### 【0028】

本発明の部分ペプチドをコードするDNAは、配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列の一部と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むペプチドをコードする塩基配列を含むものであればいかなるものであってもよい。具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、（1）配列番号：1または配列番号：3で表される塩基配列の部分塩基配列を含むDNA、または（2）配列番号：1または配列番号：3で表される塩基配列の部分塩基配列を含むDNAと約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上の相同性を有する塩基配列を含み、前記したAIMと実質的に同質の活性を有する蛋白質をコードするDNAなどが用いられる。

#### 【0029】

AIMまたはその部分ペプチドをコードするDNAは、該AIMまたはその部分ペプチドをコードする塩基配列の一部を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当な発現ベクターに組み込んだDNAを、AIMの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを標識したものとハイブリダイゼーションすることによってクローニングすることができる。ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)第2版(J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、ハイブリダイゼーションは、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。ハイブリダイゼーションは、好ましくは、ストリンジентな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジентな条件としては、例えば、6×SSC(sodium chloride/sodium cit

10

20

30

40

50

rate) 中45 でのハイブリダイゼーション反応の後、0.2×SSC/0.1% SDS中65 での一回以上の洗浄などが挙げられる。当業者は、ハイブリダイゼーション溶液の塩濃度、ハイブリダイゼーション反応の温度、プローブ濃度、プローブの長さ、ミスマッチの数、ハイブリダイゼーション反応の時間、洗浄液の塩濃度、洗浄の温度等を適宜変更することにより、所望のストリンジェンシーに容易に調節することができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、ハイブリダイゼーションは、該ライブラリーに添付された使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

#### 【0030】

AIMまたはその部分ペプチドをコードするDNAを含む発現ベクターは、例えば、AIMをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13）；動物細胞発現プラスミド（例：pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neo）；レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルスなどの動物ウイルスベクターなどが用いられる。

プロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

例えば、宿主が動物細胞である場合、SR プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、MoMuLV（モロニーマウス白血病ウイルス）LTR、HSV-TK（単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ）プロモーターなどが用いられる。なかでも、CMVプロモーター、SRプロモーターなどが好ましい。

宿主がエシェリヒア属菌である場合、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、P<sub>L</sub>プロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが好ましい。

#### 【0031】

発現ベクターとしては、上記の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製起点（以下、SV40 oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（以下、dhfrと略称する場合がある、メソトレキセート（MTX）耐性）、アンピシリン耐性遺伝子（以下、amp<sup>r</sup>と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、neo<sup>r</sup>と略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用い、dhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、チミジンを含まない培地によって目的遺伝子を選択することもできる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列をコードする塩基配列（シグナルコドン）を、AIMまたはその部分ペプチドをコードするDNAの5'末端側に付加（またはネイティブなシグナルコドンと置換）してもよい。例えば、宿主がエシェリヒア属菌である場合、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが；宿主が動物細胞である場合、インスリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ用いられる。

#### 【0032】

上記したAIMまたはその部分ペプチドをコードするDNAを含む発現ベクターで宿主を形質転換し、得られる形質転換体を培養することによって、AIMまたはその部分ペプチドを製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌としては、例えば、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）, 60巻, 160(1968)〕, エシェリヒア・コリJM103〔ヌクレイック・アシッズ・リサーチ（Nucleic Acids Research）, 9巻, 309(1981)〕, エシェリヒア・コリJA221〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー（Journal of Molecular Biology）, 120巻, 517(1978)〕, エシェリヒア・コリHB101〔ジ

10

20

30

40

50

ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], エシェリヒア・コリC600 [ジェネティクス(Genetics), 39巻, 440(1954)]などが用いられる。

【0033】

動物細胞としては、例えば、サルCOS-7細胞、サルVero細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞(以下、CHO細胞と略記)、dhfr遺伝子欠損CHO細胞(以下、CHO(dhfr<sup>-</sup>)細胞と略記)、マウスL細胞、マウスAtT-20細胞、マウスミエローマ細胞、ラットGH3細胞、ヒトFL細胞などが用いられる。

【0034】

形質転換は、宿主の種類に応じ、公知の方法に従って実施することができる。

エシェリヒア属菌は、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン(Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って形質転換することができる。

動物細胞は、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコール, 263-267 (1995) (秀潤社発行)、ウイルス学(Virology), 52巻, 456 (1973)に記載の方法に従って形質転換することができる。

【0035】

形質転換体の培養は、宿主の種類に応じ、公知の方法に従って実施することができる。

宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地[ミラー(Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス(Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972]が好ましい。必要により、プロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3-インドリルアクリル酸のような薬剤を培地に添加してもよい。

宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体の培養は、通常約15~約43で、約3~約24時間行なわれる。必要により、通気や攪拌を行ってもよい。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、約5~約20%の胎児ウシ血清を含む最小必須培地(MEM)[サイエンス(Science), 122巻, 501(1952)], ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)[ウイルス学(Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI1640培地[ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(The Journal of the American Medical Association), 199巻, 519(1967)], 199培地[プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)]などが用いられる。培地のpHは、好ましくは約6~約8である。培養は、通常約30~約40で、約15~約60時間行なわれる。必要に応じて通気や攪拌を行ってもよい。

以上のようにして、形質転換体の細胞内または細胞外にAIMを製造せしめることができる。

【0036】

前記形質転換体を培養して得られる培養物からAIMまたはその部分ペプチドを自体公知の方法に従って分離精製することができる。

例えば、AIMまたはその部分ペプチドを培養菌体あるいは細胞の細胞質から抽出する場合、培養物から公知の方法で集めた菌体あるいは細胞を適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊した後、遠心分離やろ過により可溶性蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。該緩衝液は、尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100<sup>TM</sup>などの界面活性剤を含んでいてもよい。また、AIMまたはその部分ペプチドが菌体(細胞)外に分泌される場合には、培養物から遠心分離またはろ過等により培養上清を分取するなどの方法が用いられる。

このようにして得られた可溶性画分、培養上清中に含まれるAIMまたはその部分ペプチドの単離精製は、自体公知の方法に従って行うことができる。このような方法としては、

塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法；透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法；イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法；アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法；逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法；等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法；などが用いられる。これらの方法は、適宜組み合わせることもできる。

【0037】

かくして得られるAIMまたはその部分ペプチドの存在は、AIMに対する抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンブロッティングなどにより確認することができる。

【0038】

以上の通りにして得られるAIMもしくはその部分ペプチドまたはその塩あるいはAIMもしくはその部分ペプチドをコードする塩基配列を含む核酸（ここでは、AIM類と表現することもある）は、腎疾患の発症の予防・治療剤として提供することができる。

【0039】

本発明はまた、AIM類に替えて、AIMの発現を誘導する薬剤やAIMを安定化させる薬剤も使用することができる。

【0040】

AIMの発現を誘導する薬剤としては、例えば、AIM転写活性作用を持つ化合物などが挙げられ、該化合物としては、AIM遺伝子のプロモーター領域に結合できる転写因子等が挙げられる。また、本発明者は、AIMがマクロファージにおいて発現することを見出している。従って、AIMの発現を誘導する薬剤として、マクロファージ分化誘導剤が挙げられる。マクロファージ分化誘導剤としては、顆粒球マクロファージコロニー形成細胞（CFU-GM）やマクロファージコロニー形成細胞（CFU-M）などの前駆細胞からマクロファージを分化誘導できるものであれば特に制限されないが、例えば、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（granulocyte-macrophage colony stimulating factor：GM-CSF）、マクロファージコロニー刺激因子（macrophage colony stimulating factor：M-CSF）などを用いることができる。転写因子、GM-CSF、M-CSFは、前記の公知手段によって、哺乳動物の組織・細胞から単離・精製される蛋白質であってよいし、化学合成もしくは無細胞翻訳系で生化学的に合成された蛋白質であってよい。あるいは、上記蛋白質をコードする塩基配列を含む核酸を導入された形質転換体から産生される組換え蛋白質であってよい。

【0041】

AIMを安定化させる薬剤としては、AIM分解を阻害する化合物、または尿中への排泄を阻害する化合物などが挙げられる。分解を阻害する化合物としては、プロテアーゼ阻害剤、プロテアソーム阻害剤など挙げられる。プロテアーゼ阻害剤としては、例えば、セリンプロテアーゼ阻害剤（フッ化4-（2-アミノエチル）ベンゼンスルホニル塩酸塩（AEBSGF）、アプロチニン、トリプシンインヒビターなど）、システインプロテアーゼ阻害剤（E-64、ロイペプチンなど）などが挙げられる。プロテアソーム阻害剤としては、ラクタシスチン、MG-115、MG-132、プロテアソームインヒビター-1などが挙げられる。尿中への排泄を阻害する化合物としては、例えば、糸球体の基底膜を通過できない分子量をAIMに付与する化合物が挙げられる。IgMはAIMと結合することから（WO2013/162021；Arai et al., Cell Reports 3: 1187-1198, 2013）、尿中への排泄を阻害する化合物として、IgMが挙げられる。しかし、IgM自体を投与すると免疫系の副作用が懸念されることから、AIMとの結合部位であるIgMのFc部分と尿細管でろ過され尿中に排出されない程度の分子量の蛋白質とを融合させた融合蛋白質が好ましく用いられる。融合させる蛋白質は限定されないが、副作用の懸念が少ない蛋白質が好ましく、例えばアルブミンが使用できる。結合は直接つなげても構わないし、ヒンジ部分を用いてつなげても構わない。ヒンジ部分としてはFLAG tagを並列したものが例示される。このような分子は、それぞれをコードする遺伝子をつなぎ、ひとつの組換えタンパクとして常法により製造することができる。また、IgMと結合するAIMは任意の温血動物由来のAIMであってよいが、ネコ由来のAIMは除かれてもよい。

【0042】

10

20

30

40

50

本発明の後述する実施例においては、AIMのノックアウトマウスは、片側尿管結紮、一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流または両側性の一過性腎虚血再灌流を行う条件下、腎疾患の症状を示した。以上のことから、AIM類、AIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤、或いは、後述するスクリーニング方法で探索することができるAIMの機能を代替できる化合物は、腎疾患の発症、進行を予防・治療できることが示唆される。

【0043】

本発明のAIM類、AIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤を含有する医薬組成物の投与対象は、ヒトまたは他の温血動物（例、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、トリ、好ましくはネコなど）があげられる。

【0044】

本発明のAIM類、AIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤を含有する医薬組成物の適用対象となる腎疾患は、例えば、急性腎不全、慢性腎炎、慢性腎不全、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、腎硬化症、IgA腎症、高血圧性腎症、膠原病に伴う腎症またはIgM腎症があげられ、好ましくは急性腎不全または慢性腎不全が挙げられる。膠原病に伴う腎症としては代表的なものは、ループス腎炎が挙げられる。

【0045】

本発明のAIM類、AIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤を含有する医薬組成物は低毒性であり、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは他の温血動物（例、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、トリ、好ましくはネコなど）に対して経口的または非経口的（例、血管内投与、皮下投与など）に投与することができる。

【0046】

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤等が用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤等の剤形を包含しても良い。このような注射剤は、公知の方法に従って調製できる。注射剤の調製方法としては、例えば、上記本発明のAIM類、AIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤を通常注射剤に用いられる無菌の水性液、または油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製できる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液等が用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、HCO - 50 (polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等を併用してもよい。調製された注射液は、適当なアンプルに充填されることが好ましい。直腸投与に用いられる坐剤は、上記AIM類、AIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製されてもよい。

【0047】

経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等が挙げられる。このような組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有していても良い。錠剤用の担体、賦形剤としては、例えば、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムが用いられる。

【0048】

上記の非経口用または経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。このような投薬単位の剤形としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤が挙げられる。本発明のAIM類、AIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤は、例えば、投薬単位剤形当たり通常5～500mg、とりわけ注射剤では5～100mg、その他の剤形では10～250mg含有されることが好ましい。

10

20

30

40

50

## 【0049】

本発明のAIM類、AIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤を含有する上記予防・治療剤の投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の腎疾患の治療・予防のために使用する場合には、本発明のAIM類を1回量として、通常0.01~20mg/kg体重程度、好ましくは0.1~10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1~5mg/kg体重程度を、1日1~5回程度、好ましくは1日1~3回程度、静脈注射により、1日~21日程度、好ましくは1日~14日程度投与するのが好都合である。他の経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

## 【0050】

なお、前記した各組成物は、本発明のAIM類、AIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

## 【0051】

さらに、本発明のAIM類、AIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤は、腎疾患の治療に有用な他の薬剤、例えば、降圧薬（例、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、アンジオテンシンII受容体拮抗薬、カルシウム拮抗薬、レニン阻害薬、遮断薬、遮断薬等）；利尿薬（例、炭酸脱水素酵素阻害薬、ループ利尿剤、サイアザイド系利尿薬、抗アルドステロン薬、カリウム保持利尿薬等）；活性型ビタミンD3製剤（例、カルシトリオール、アルファカルシドール、マキサカルシトール、ファレカルシトリオール等）；経口吸着炭素製剤（例、活性炭等）；カリウム補正薬（例、ポリスチレンスルホン酸ナトリウム等）；リン吸着薬（例、炭酸カルシウム、酢酸カルシウム、塩酸セベラマー、炭酸ランタン等）、赤血球造血刺激因子製剤(erythropoiesis stimulating agent;ESA)(例、エリスロポエチン製剤)、アミノ酸輸液製剤などと併用してもよい。本発明のAIM類、AIMの発現を誘導する薬剤またはAIMを安定化させる薬剤および上記薬剤は、同時または異なった時間に患者に投与すればよい。

## 【0052】

また、後述する実施例の通り、血中においてAIMが検出できなかったネコについては、血中においてネコAIMがネコIgMと結合することができず、容易に糸球体の基底膜を通じて尿中に排泄されることが示唆される。結果として、ネコAIMは安定的に血中に存在することができず、腎臓疾患の遠因になると考えられる。さらに、マウスAIMはネコIgMとネコ血中において結合できることが明らかとなり、特にマウスAIMのSRCR3ドメインがネコIgMとの結合において重要であることが示唆された。従って、本発明はまた、ネコIgMと結合することを特徴とするAIMもしくはその部分ペプチド、またはそれらをコードする塩基配列を含む核酸を含有してなる、ネコに投与するための腎疾患の予防・治療剤を提供する。

本発明におけるネコIgMと結合するAIMは、配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含み、かつネコIgMと結合することができる蛋白質である。

そのような蛋白質は例えば、化学合成もしくは無細胞翻訳系で生化学的に合成された蛋白質であってもよいし、あるいは上記アミノ酸配列をコードする塩基配列を含む核酸を導入された形質転換体から産生される組換え蛋白質であってもよい。

## 【0053】

配列番号：4で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：4で表されるアミノ酸配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。「相同性」については、上記と同様であってもよい。より好ましくは、配列番号：4で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列とは、配列番号：4で表されるアミノ酸配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有するアミノ酸配列である。また、配列番号：4で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のア

10

20

30

40

50

ミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、前記の配列番号：4で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含み、配列番号：4で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。ここで「実質的に同質の活性」とは上記と同意義を示す。

【0054】

ネコIgMと結合することができるAIM蛋白質としては、ネコ血中においてネコIgMと結合する限り、どのようなAIM蛋白質であってもよいが、例えば、マウス由来AIMのSRCR3ドメインを含む蛋白質であることが好ましい。具体的には、例えば、配列番号：6で表されるアミノ酸配列のうちアミノ酸番号246～348を含むAIM蛋白質が挙げられる。また、マウス由来AIMのSRCR3ドメインを含む蛋白質は、AIMが元来有しているSRCR3ドメインをマウス由来AIMのSRCR3ドメインで置換した蛋白質であってもよい。

10

【0055】

ネコIgMと結合するAIMの部分ペプチドは、上記したネコIgMと結合するAIMの部分アミノ酸配列を有するペプチドであり、且つAIMと実質的に同質の活性を有する限り、何れのものであってもよい。ここで「実質的に同質の活性」とは上記と同意義を示す。

具体的には、例えば、配列番号：4で表されるアミノ酸配列のうち、SRCR1ドメイン（配列番号：4で表されるアミノ酸配列のうち、アミノ酸番号24～125）、SRCR2ドメイン（配列番号：4で表されるアミノ酸配列のうち、アミノ酸番号139～239）、SRCR3ドメイン（配列番号：4で表されるアミノ酸配列のうち、アミノ酸番号244～346）をそれぞれ含む部分アミノ酸配列やSRCRドメインの任意の組合せを含む部分アミノ酸配列を有するものなども用いられる。上記の部分ペプチドは、上記の機能ドメインを含む限りそのサイズに特に制限はない。

20

【0056】

ネコIgMと結合するAIMまたははその部分ペプチドをコードする塩基配列を含むDNAとしては、例えば、配列番号：3で表される塩基配列と同一または実質的に同一な塩基配列を含むDNAなどが挙げられる。

配列番号：3で表される塩基配列と実質的に同一な塩基配列を含むDNAとしては、例えば、配列番号：3で表される塩基配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上の相同性を有する塩基配列を含有し、前記したAIMと実質的に同質の活性を有する蛋白質をコードするDNAなどが用いられる。「相同性」については、上記と同様であってよい。該DNAは、上記した方法と同様に調製される。

30

【0057】

本発明のネコIgMと結合するAIMもしくはその部分ペプチド、またはそれらをコードする塩基配列を含む核酸を含有する医薬組成物の投与対象としては、ネコがあげられる。

【0058】

本発明のネコIgMと結合するAIMもしくはその部分ペプチド、またはそれらをコードする塩基配列を含む核酸を含有する医薬組成物の適用対象となる腎疾患は、例えば、急性腎不全、慢性腎炎、慢性腎不全、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、腎硬化症、IgA腎症、高血圧性腎症、膠原病に伴う腎症またはIgM腎症があげられ、好ましくは急性腎不全または慢性腎不全が挙げられる。膠原病に伴う腎症としては代表的なものは、ループス腎炎が挙げられる。

40

【0059】

本発明のネコIgMと結合するAIMもしくはその部分ペプチド、またはそれらをコードする塩基配列を含む核酸を含有する医薬組成物は低毒性であり、上記と同様に経口的または非経口的に対象に投与することができる。剤形、投与量等は上記と同様であってよい。

【0060】

また、前記の通り、AIMのロックアウトマウスは、片側尿管結紮、一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流または両側性の一過性腎虚血再灌流を行う条件下、腎疾患の症状を示した。このことは、片側尿管結紮、一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流または両側性の一過性腎虚血再灌流を行う条件下に置かれたAIMのロックアウトマウスは、腎疾患の新たな

50

モデルマウスとして提供できることを示唆する。従って、本発明は、AIM発現不全非ヒト哺乳動物に片側尿管結紮、一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流または両側性の一過性腎虚血再灌流を行うことによって得られる動物を用いた、腎疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法を提供する。

#### 【0061】

AIM発現不全非ヒト哺乳動物とは、内在性AIMの発現が不活性化された非ヒト哺乳動物を意味し、AIMがノックアウト(KO)されたES細胞から、作製されるAIM KO動物の他、アンチセンスもしくはRNAi技術によりAIMの発現が不活性化されたノックダウン(KD)動物なども含まれる。ここで「ノックアウト(KO)」とは、内在性遺伝子を破壊したり、除去したりすることにより完全なmRNAを産生不能にすることを意味し、他方、「ノックダウン(KD)」とは、mRNAから蛋白質への翻訳を阻害することにより、結果的に内在性遺伝子の発現を不活性化することを意味する。以下、本発明のAIM KO/KD動物を、単に「本発明のKO/KD動物」という場合がある。本発明のAIM KO動物としては、例えば、Miyazaki T. et al. (J. Exp. Med., 189, 413-422, 1999、またはW02013/162021)に開示されている。

10

#### 【0062】

本発明で対象とし得る「非ヒト哺乳動物」は、トランスジェニック系が確立されたヒト以外の哺乳動物であれば特に制限はなく、例えば、マウス、ラット、ウシ、サル、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなどが挙げられる。好ましくは、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター等であり、なかでも疾患モデル動物作製の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、繁殖が容易な齧歯動物がより好ましく、とりわけマウス(例えば、純系としてC57BL/6系統、BALB/c系統、DBA2系統など、交雑系としてB6C3F<sub>1</sub>系統、BDF<sub>1</sub>系統、B6D2F<sub>1</sub>系統、ICR系統など)およびラット(例えば、Wistar、SDなど)が好ましい。

20

また、哺乳動物以外にもニワトリなどの鳥類を本発明で対象とする「非ヒト哺乳動物」と同様の目的に用いることができる。

#### 【0063】

AIMをノックアウトする具体的な手段としては、前記のMiyazaki T. et al. (J. Exp. Med., 189, 413-422, 1999、またはW02013/162021)にも開示されているが、その他の公知の一般的な手法としては、対象非ヒト哺乳動物由来のAIM(ゲノムDNA)を常法に従って単離し、例えば、(1)そのエキソン部分やプロモーター領域に他のDNA断片(例えば、薬剤耐性遺伝子やレポーター遺伝子等)を挿入することによりエキソンもしくはプロモーターの機能を破壊するか、(2)Cre-loxP系やFlp-frt系を用いてAIMの全部または一部を切り出して該遺伝子を欠失させるか、(3)蛋白質コード領域内へ終止コドン(例えば、完全な蛋白質の翻訳を不能にするか、あるいは(4)転写領域内部へ遺伝子の転写を終結させるDNA配列(例えば、polyA付加シグナルなど)を挿入して、完全なmRNAの合成を不能にすることによって、結果的に遺伝子を不活性化するように構築したDNA配列を有するDNA鎖(以下、ターゲティングベクターと略記する)を、相同組換えにより対象非ヒト哺乳動物のAIM遺伝子座に組み込ませる方法などが好ましく用いられ得る。

30

#### 【0064】

該相同組換え体は、例えば、胚性幹細胞(ES細胞)への上記ターゲティングベクターの導入により取得することができる。

40

ES細胞は胚盤胞期の受精卵の内部細胞塊(ICM)に由来し、インビトロで未分化状態を保ったまま培養維持できる細胞をいう。ICMの細胞は将来、胚本体を形成する細胞であり、生殖細胞を含むすべての組織の基になる幹細胞である。ES細胞としては、既に樹立された細胞株を用いてもよく、また、EvansとKaufmanの方法(ネイチャー(Nature)第292巻、154頁、1981年)に準じて新しく樹立したものでよい。例えば、マウスES細胞の場合、現在、一般的には129系マウス由来のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で、例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF<sub>1</sub>マウス(C57BL/6とDBA/2とのF<sub>1</sub>)から樹立されるES細胞なども良好に

50

用いることができる。BDF<sub>1</sub>マウスは、採卵数が多く、かつ卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これ由来のES細胞は疾患モデルマウスを作製したとき、C57BL/6マウスと戻し交雑することでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり〔M. J. Evans及びM. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin, プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschmanら, ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年〕、本発明のターゲティングベクターを導入されたES細胞を分化させて得られるAIM発現不全非ヒト哺乳動物細胞は、インビトロにおけるAIMの細胞生物学的検討において有用である。

#### 【0065】

例えば、ターゲティングベクターが、AIMのエキソン部分やプロモーター領域に他のDNA断片を挿入することにより、該エキソンもしくはプロモーターの機能を破壊すべく設計されたものである場合、当該ベクターは、例えば、以下のような構成をとることができる。

#### 【0066】

まず、相同組換えにより、AIMのエキソンもしくはプロモーター部分に他のDNA断片が挿入されるために、ターゲティングベクターは、当該他のDNA断片の5'上流および3'下流に、それぞれ標的部位と相同な配列(5'アームおよび3'アーム)を含む必要がある。

#### 【0067】

挿入される他のDNA断片は特に制限はないが、薬剤耐性遺伝子やレポーター遺伝子を用いると、ターゲティングベクターが染色体へ組み込まれたES細胞を、薬剤耐性もしくはレポーター活性を指標として選択することができる。ここで薬剤耐性遺伝子としては、例えば、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼII (nptII) 遺伝子、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ (hpt) 遺伝子などが、レポーター遺伝子としては、例えば、-ガラクトシダーゼ (lacZ) 遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (cat) 遺伝子などがそれぞれ挙げられるが、それらに限定されない。

#### 【0068】

薬剤耐性もしくはレポーター遺伝子は、哺乳動物細胞内で機能し得る任意のプロモーターの制御下にあることが好ましい。例えば、SV40由来初期プロモーター、サイトメガロウイルス (CMV) ロングターミナルリピート (LTR)、ラウス肉腫ウイルス (RSV) LTR、マウス白血病ウイルス (MoMuLV) LTR、アデノウイルス (AdV) 由来初期プロモーター等のウイルスプロモーター、並びに -アクチン遺伝子プロモーター、PGK遺伝子プロモーター、トランスフェリン遺伝子プロモーター等の哺乳動物の構成蛋白質遺伝子のプロモーターなどが挙げられる。しかしながら、薬剤耐性もしくはレポーター遺伝子がAIMの内在性プロモーターの制御下におかれるようにAIM内に挿入される場合は、ターゲティングベクター中に該遺伝子の転写を制御するプロモーターは必要でない。

#### 【0069】

また、ターゲティングベクターは、薬剤耐性もしくはレポーター遺伝子の下流に、該遺伝子からのmRNAの転写を終結させる配列(ポリアデニレーション (polyA) シグナル、ターミネーターとも呼ばれる)を有していることが好ましく、例えば、ウイルス遺伝子由来、あるいは各種哺乳動物または鳥類の遺伝子由来のターミネーター配列を用いることができる。好ましくは、SV40由来のターミネーターなどが用いられる。

#### 【0070】

通常、哺乳動物における遺伝子組換えは大部分が非相同的であり、導入されたDNAは染色体の任意の位置にランダムに挿入される。したがって、薬剤耐性やレポーター遺伝子の発現を検出するなどの選択(ポジティブ選択)によっては相同組換えにより標的となる内

在性AIMにターゲッティングされたクローンのみを効率よく選択することができず、選択されたすべてのクローンについてサザンハイブリダイゼーション法もしくはPCR法による組込み部位の確認が必要となる。そこで、ターゲッティングベクターの標的配列に相同な領域の外側に、例えば、ガンシクロビル感受性を付与する単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ（HSV-tk）遺伝子を連結しておけば、該ベクターがランダムに挿入された細胞はHSV-tk遺伝子を有するため、ガンシクロビル含有培地では生育できないが、相同組換えにより内在性AIM遺伝子座にターゲッティングされた細胞はHSV-tk遺伝子を有しないので、ガンシクロビル耐性となり選択される（ネガティブ選択）。あるいは、HSV-tk遺伝子の代わりに、例えばジフテリア毒素遺伝子を連結すれば、該ベクターがランダムに挿入された細胞は自身の産生する該毒素によって死滅するので、薬剤非存在下で相同組換え体を選択することもできる。

10

20

30

40

50

#### 【0071】

ES細胞へのターゲッティングベクターの導入には、リン酸カルシウム共沈殿法、電気穿孔（エレクトロポレーション）法、リポフェクション法、レトロウイルス感染法、凝集法、顕微注入（マイクロインジェクション）法、遺伝子銃（パーティクルガン）法、DEAE-デキストラン法などのいずれも用いることができるが、上述のように、哺乳動物における遺伝子組換えは大部分が非相同的であり、相同組換え体が得られる頻度は低いので、簡便に多数の細胞を処理できること等の点からエレクトロポレーション法が一般的に選択される。エレクトロポレーションには通常の動物細胞への遺伝子導入に使用されている条件をそのまま用いればよく、例えば、対数増殖期にあるES細胞をトリプシン処理して単一細胞に分散させた後、 $10^6 \sim 10^8$ 細胞/mlとなるように培地に懸濁してキュベットに移し、ターゲッティングベクターを $10 \sim 100 \mu\text{g}$ 添加し、 $200 \sim 600\text{V/cm}$ の電気パルス印加することにより行なうことができる。

#### 【0072】

ターゲッティングベクターが組み込まれたES細胞は、単一細胞をフィーダー細胞上で培養して得られるコロニーから分離抽出した染色体DNAをサザンハイブリダイゼーションまたはPCR法によりスクリーニングすることによっても検定することができるが、他のDNA断片として薬剤耐性遺伝子やレポーター遺伝子を使用した場合は、それらの発現を指標として細胞段階で形質転換体を選択することができる。例えば、ポジティブ選択用マーカー遺伝子としてnptII遺伝子を含むベクターを用いた場合、遺伝子導入処理後のES細胞をG418などのネオマイシン系抗生物質を含有する培地中で培養し、出現した耐性コロニーをトランスフォーマントの候補として選択する。また、ネガティブ選択用マーカー遺伝子として、HSV-tk遺伝子を含むベクターを用いた場合、ガンシクロビルを含有する培地中で培養し、出現した耐性コロニーを相同組換え体の候補として選択する。得られたコロニーをそれぞれ培養プレートに移してトリプシン処理、培地交換を繰り返した後、一部を培養用として残し、残りをPCRもしくはサザンハイブリダイゼーションにかけて導入DNAの存在を確認する。

#### 【0073】

導入DNAの組込みが確認されたES細胞を同種の非ヒト哺乳動物由来の胚内に戻すと、宿主胚のICMに組み込まれてキメラ胚が形成される。これを仮親（受胎用雌）に移植してさらに発生を続けさせることにより、キメラKO動物が得られる。キメラ動物の中でES細胞が将来卵や精子に分化する始原生殖細胞の形成に寄与した場合には、生殖系列キメラが得られることとなり、これを交配することによりAIM発現不全が遺伝的に固定されたKO動物を作製することができる。

#### 【0074】

キメラ胚の作製方法としては、桑実胚期までの初期胚同士を接着させて集合させる方法（集合キメラ法）と、胚盤胞の割腔内に細胞を顕微注入する方法（注入キメラ法）とがある。ES細胞によるキメラ胚の作製においては従来より後者が広く行なわれているが、最近では、8細胞期胚の透明帯内へのES細胞の注入により集合キメラを作る方法や、マイクロマニピュレーターが不要で操作が容易な方法として、ES細胞塊と透明帯を除去した8細胞

期胚とを共培養して凝集させることによって集合キメラを作製する方法も行われている。

【0075】

いずれの場合も、宿主胚は、後述する受精卵への遺伝子導入において、採卵用雌として使用され得る非ヒト哺乳動物から同様に採取することができるが、例えばマウスの場合、キメラマウス形成へのES細胞の寄与率を毛色（コートカラー）で判定し得るように、ES細胞の由来する系統とは毛色の異なる系統のマウスから宿主胚を採取することが好ましい。例えば、ES細胞が129系マウス（毛色：アグーチ）由来であれば、採卵用雌としてC57BL/6マウス（毛色：ブラック）やICRマウス（毛色：アルビノ）を用い、ES細胞がC57BL/6もしくはDBF<sub>1</sub>マウス（毛色：ブラック）由来やTT2細胞（C57BL/6とCBAとのF<sub>1</sub>（毛色アグーチ）由来）であれば、採卵用雌としてICRマウスやBALB/cマウス（毛色：アルビノ）を用いることができる。

10

【0076】

また、生殖系列キメラ形成能はES細胞と宿主胚との組み合わせに大きく依存するので、生殖系列キメラ形成能の高い組み合わせを選択することがより好ましい。例えばマウスの場合、129系統由来のES細胞に対してはC57BL/6系統由来の宿主胚等を用いることが好ましく、C57BL/6系統由来のES細胞に対してはBALB/c系統由来の宿主胚等が好ましい。

【0077】

採卵用雌マウスは約4～約6週齢程度が好ましく、交配用の雄マウスとしては約2～約8ヶ月齢程度の同系統のものが好ましい。交配は自然交配によってもよいが、好ましくは性腺刺激ホルモン（卵胞刺激ホルモン、次いで黄体形成ホルモン）を投与して過剰排卵を誘起した後に行なわれる。

20

【0078】

胚盤注入法による場合は、胚盤胞期胚（例えばマウスの場合、交配後約3.5日）を採卵用雌の子宮から採取し（あるいは桑実胚期以前の初期胚を卵管から採取した後、胚培養用培地（後述）中で胚盤胞期まで培養してもよい）、マイクロマニピュレーターを用いて胚盤胞の割腔内にターゲティングベクターが導入されたES細胞（約10～約15個）を注入した後、偽妊娠させた受胎用雌非ヒト哺乳動物の子宮内に移植する。受胎用雌非ヒト哺乳動物は受精卵への遺伝子導入における受胎用雌として使用され得る非ヒト哺乳動物を同様に用いることができる。

【0079】

共培養法による場合は、8細胞期胚および桑実胚（例えばマウスの場合、交配後約2.5日）を採卵用雌の卵管および子宮から採取して（あるいは8細胞期以前の初期胚を卵管から採取した後、胚培養用培地（後述）中で8細胞期または桑実胚期まで培養してもよい）酸性タイロイド液中で透明帯を溶解した後、ミネラルオイルを重層した胚培養用培地の微小滴中にターゲティングベクターが導入されたES細胞塊（細胞数約10～約15個）を入れ、さらに上記8細胞期胚または桑実胚（好ましくは2個）を入れて一晩共培養する。得られた桑実胚または胚盤胞を上記と同様にして受胎用雌非ヒト哺乳動物の子宮内に移植する。

30

【0080】

移植胚が首尾よく着床し受胎雌が妊娠すれば、自然分娩もしくは帝王切開によりキメラ非ヒト哺乳動物が得られる。自然分娩した受胎雌にはそのまま哺乳を継続させればよく、帝王切開により出産した場合は、産仔は別途用意した哺乳用雌（通常に交配・分娩した雌非ヒト哺乳動物）に哺乳させることができる。

40

【0081】

生殖系列キメラの選択は、まずES細胞の雌雄が予め判別されている場合はES細胞と同じ性別のキメラマウスを選択し（通常は雄性ES細胞が使用されるので、雄キメラマウスが選択される）、次いで毛色等の表現型からES細胞の寄与率が高いキメラマウス（例えば、50%以上）を選択する。例えば、129系マウス由来の雄性ES細胞であるD3細胞とC57BL/6マウス由来の宿主胚とのキメラ胚から得られるキメラマウスの場合、アグーチの毛色の占める割合の高い雄マウスを選択するのが好ましい。選択されたキメラ非ヒト哺乳動物が生殖系列キメラであるか否かの確認は、適当な系統の同種動物との交雑により得られるF<sub>1</sub>動物の

50

表現型に基づいて行なうことができる。例えば、上記キメラマウスの場合、アグーチはブラックに対して優性であるので、雌C57BL/6マウスと交雑すると、選択された雄マウスが生殖系列キメラであれば得られるF<sub>1</sub>の毛色はアグーチとなる。

【0082】

上記のようにして得られるターゲティングベクターが導入された生殖系列キメラ非ヒト哺乳動物（ファウンダー）は、通常、相同染色体の一方のAIMのみがKOされたヘテロ接合体として得られる。相同染色体の両方のAIMがKOされたホモ接合体を得るためには、上記のようにして得られるF<sub>1</sub>動物のうちヘテロ接合体の兄妹同士を交雑すればよい。ヘテロ接合体の選択は、例えばF<sub>1</sub>動物の尾部より分離抽出した染色体DNAをサザンハイブリダイゼーションまたはPCR法によりスクリーニングすることにより検定することができる。得られるF<sub>2</sub>動物の1/4がホモ接合体となる。

10

【0083】

ターゲティングベクターとしてウイルスを用いる場合の別の好ましい一実施態様として、ポジティブ選択用マーカー遺伝子が5'および3'アームの間に挿入され、該アームの外側にネガティブ選択用マーカー遺伝子を含むDNAを含むウイルスで、非ヒト哺乳動物のES細胞を感染させる方法が挙げられる（例えば、プロシーディングズ・オヴ・ナショナル・アカデミー・オヴ・サイエンシーズ・ユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 第99巻, 第4号, 第2140-2145頁, 2002年参照)。例えば、レトロウイルスやレンチウイルスを用いる場合、ディッシュなどの適当な培養器に細胞を播き、培養液にウイルスベクターを加えて（所望によりポリプレンを共存させてもよい）、1~2日間培養後、上述のように選択薬剤を添加して培養を続け、ベクターが組み込まれた細胞を選択する。

20

【0084】

AIMをノックダウンする具体的な手段としては、AIMのアンチセンスRNAもしくはsiRNA（shRNAを含む）をコードするDNAを、自体公知のトランスジェニック作製技術を用いて導入し、対象非ヒト哺乳動物細胞内で発現させる方法などが挙げられる。

【0085】

目的のポリヌクレオチドの標的領域と相補的な塩基配列を含むDNA、即ち、目的のポリヌクレオチドとハイブリダイズすることができるDNAは、該目的のポリヌクレオチドに対して「アンチセンス」であるということができる。

AIMをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に、相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するアンチセンスDNAとしては、AIMをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有し、該ポリヌクレオチドの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスDNAであってもよい。

30

【0086】

AIMをコードするポリヌクレオチドに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、該ポリヌクレオチドの相補鎖の塩基配列と、オーバーラップする領域に関して、約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有する塩基配列である。本明細書における塩基配列の同一性は、例えば、同一性計算アルゴリズムNCBI BLAST(National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool)を用い、以下の条件（期待値=10；ギャップを許す；フィルタリング=ON；マッチスコア=1；ミスマッチスコア=-3）にて計算することができる。

40

特に、AIMをコードするポリヌクレオチドの相補鎖の全塩基配列のうち、（a）翻訳阻害を指向したアンチセンスDNAの場合は、AIMのN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有するアンチセンスDNAが、（b）RNaseHによるRNA分解を指向するアンチセンスDNAの場合は、イントロンを含むAIMをコードするポリヌクレオチドの全塩基配列の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有するアンチセンスDNAがそれぞれ好適である。

50

## 【0087】

具体的には、対象非ヒト哺乳動物がマウスの場合、GenBank accession No.AF011428として登録されている塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部を含むアンチセンスDNA、好ましくは、該塩基配列に相補的な塩基配列またはその一部を含むアンチセンスDNAなどが挙げられる。

## 【0088】

AIMをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するアンチセンスDNA（以下、「本発明のアンチセンスDNA」ともいう）は、クローン化した、あるいは決定されたAIMをコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。かかるアンチセンスDNAは、AIMの複製または発現を阻害することができる。即ち、本発明のアンチセンスDNAは、AIMから転写されるRNA（mRNAまたは初期転写産物）とハイブリダイズすることができ、mRNAの合成（プロセッシング）または機能（蛋白質への翻訳）を阻害することができる。

10

## 【0089】

本発明のアンチセンスDNAの標的領域は、アンチセンスDNAがハイブリダイズすることにより、結果としてAIMへの翻訳が阻害されるものであればその長さ特に制限はなく、該蛋白質をコードするmRNAの全配列であっても部分配列であってもよく、短いもので約10塩基程度、長いものでmRNAまたは初期転写産物の全配列が挙げられる。具体的には、AIMの5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域または3'端ヘアピンループなどが、アンチセンスDNAの好ましい標的領域として選択しうるが、AIM内の如何なる領域も対象として選択しうる。例えば、該遺伝子のイントロン部分を標的領域とすることもできる。

20

さらに、本発明のアンチセンスDNAは、AIMのmRNAもしくは初期転写産物とハイブリダイズして蛋白質への翻訳を阻害するだけでなく、二本鎖DNAであるAIMと結合して三重鎖（トリプレックス）を形成し、RNAの転写を阻害し得るものであってもよい。あるいはDNA:RNAハイブリッドを形成してRNaseHによる分解を誘導するものであってもよい。

## 【0090】

AIMをコードするmRNAもしくは初期転写産物を、コード領域の内部（初期転写産物の場合はイントロン部分を含む）で特異的に切断し得るリボザイムをコードするDNAもまた、本発明のアンチセンスDNAに包含され得る。リボザイムとして最も汎用性の高いものとしては、ウイロイドやウイルス等感染性RNAに見られるセルフスプライシングRNAがあり、ハンマーヘッド型やヘアピン型等が知られている。ハンマーヘッド型は約40塩基程度で酵素活性を発揮し、ハンマーヘッド構造をとる部分に隣接する両端の数塩基ずつ（合わせて約10塩基程度）をmRNAの所望の切断部位と相補的な配列にすることにより、標的mRNAのみを特異的に切断することが可能である。このタイプのリボザイムは、RNAのみを基質とするので、ゲノムDNAを攻撃することがないというさらなる利点を有する。AIM mRNAが自身で二本鎖構造をとる場合には、RNAヘリカーゼと特異的に結合し得るウイルス核酸由来のRNAモチーフを連結したハイブリッドリボザイムを用いることにより、標的配列を一本鎖にすることができる[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98(10): 5572-5577 (2001)]。さらに、転写産物の細胞質への移行を促進するために、tRNAを改変した配列をさらに連結したハイブリッドリボザイムとすることもできる[Nucleic Acids Res., 29(13): 2780-2788 (2001)]。

30

40

## 【0091】

本明細書においては、AIMのmRNAもしくは初期転写産物のコード領域内の部分配列（初期転写産物の場合はイントロン部分を含む）に相同なオリゴRNAとその相補鎖とからなる二本鎖RNA、いわゆる単鎖干渉RNA（siRNA）もまた、本発明のKD動物作製のために用いることができる。siRNAを細胞内に導入するとそのRNAに相同なmRNAが分解される、いわゆるRNA干渉（RNAi）と呼ばれる現象は、以前から線虫、昆虫、植物等で知られていたが、この現象が動物細胞でも広く起こることが確認されて以来[Nature, 411(6836): 494 - 49

50

8(2001)]、リボザイムの代替技術として汎用されている。siRNAは標的となるmRNAの塩基配列情報に基づいて、市販のソフトウェア(例:RNAi Designer; Invitrogen)を用いて適宜設計することができる。

#### 【0092】

本発明のアンチセンスオリゴDNA及びリボザイムは、AIMのcDNA配列もしくはゲノミックDNA配列に基づいてmRNAもしくは初期転写産物の標的配列を決定し、市販のDNA/RNA自動合成機(アプライド・バイオシステムズ社、ベックマン社等)を用いて、これに相補的な配列を合成することにより調製することができる。合成されたアンチセンスオリゴDNAまたはリボザイムは、必要に応じて適当なリンカー(アダプター)配列を介して発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、アンチセンスオリゴRNAまたはリボザイムをコードするDNA発現ベクターを調製することができる。ここで用いられ得る発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物もしくは昆虫ウイルスなどが用いられる。なかでも、プラスミド(好ましくは大腸菌由来、枯草菌由来または酵母由来、特に大腸菌由来のプラスミド)や、動物ウイルス(好ましくはレトロウイルス、レンチウイルス)が好ましく例示される。また、プロモーターとしては、例えば、SV40由来初期プロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)ロングターミナルリピート(LTR)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)LTR、マウス白血病ウイルス(MoMuLV)LTR、アデノウイルス(AdV)由来初期プロモーター等のウイルスプロモーター、並びに -アクチン遺伝子プロモーター、PGK遺伝子プロモーター、トランスフェリン遺伝子プロモーター等の哺乳動物の構成蛋白質遺伝子のプロモーターなどが挙げられる。

#### 【0093】

より長いアンチセンスRNA(例えば、AIM mRNAの相補鎖全長など)をコードするDNA発現ベクターは、常法によりクローニングしたAIM cDNAを、必要に応じて適当なリンカー(アダプター)配列を介して発現ベクターのプロモーターの下流に逆方向に挿入することにより調製することができる。

#### 【0094】

一方、siRNAをコードするDNAは、センス鎖またはアンチセンス鎖をコードするDNAとして別個に合成し、それぞれを適当な発現ベクター中に挿入することにより調製することができる。siRNAの発現ベクターとしては、U6やH1などのPol III系プロモーターを有するものが用いられ得る。この場合、該ベクターが導入された動物細胞内で、センス鎖とアンチセンス鎖がそれぞれ転写されてアニーリングすることにより、siRNAが形成される。shRNAはセンス鎖およびアンチセンス鎖を適当なループ構造を形成しうる長さ(例えば15から25塩基程度)を間に挿入したユニットを適当な発現ベクター中に挿入することにより調製することができる。shRNAの発現ベクターとしてはU6やH1などのPol III系プロモーターを有するものが用いられ得る。この場合、該発現ベクターを導入された動物細胞内で転写されたshRNAは、自身でループを形成した後に、内在の酵素ダイサー(dicer)などによってプロセシングされることにより成熟siRNAが形成される。あるいは、Pol II系プロモーターで、ターゲットのsiRNA配列を含むマイクロRNA(miRNA)を発現させてRNAiによりノックダウンを達成することも可能である。この場合には組織特異的発現を示すプロモーターにより、組織特異的ノックダウンも可能となる。

#### 【0095】

AIMのアンチセンスRNA、siRNA、shRNA、もしくはmiRNAをコードするDNAを含む発現ベクターを細胞に導入する方法としては、標的細胞に応じて自体公知の方法が適宜用いられる。例えば、受精卵などの初期胚への導入については、マイクロインジェクション法が用いられる。また、ES細胞への導入については、リン酸カルシウム共沈殿法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、レトロウイルス感染法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などが用いられ得る。あるいは、ベクターとしてレトロウイルスやレンチウイルスなどを用いる場合には、初期胚やES細胞

にウイルスを添加して1~2日培養し、該細胞を該ウイルスに感染させることにより、簡便に遺伝子導入を達成し得る場合がある。ES細胞からの個体再生（ファウンダーの樹立）、継代（ホモ接合体の作製）等は、本発明のKO動物において上記したと同様の方法により行うことができる。

【0096】

好ましい一実施態様においては、AIMのアンチセンスRNA、siRNA、shRNA、もしくはmiRNAをコードするDNAを含む発現ベクターは、マイクロインジェクション法により対象となる非ヒト哺乳動物の初期胚（受精卵）に導入される。

【0097】

受精卵へのDNAの顕微注入は、マイクロマニピュレーター等の公知の装置を用いて常法に従って実施することができる。簡潔に言えば、胚培養用培地の微小滴中に入れた受精卵をホールディングピペットで吸引して固定し、インジェクションピペットを用いてDNA溶液を雄性もしくは雌性前核、好ましくは雄性前核内に直接注入する。導入DNAはCsCl密度勾配超遠心または陰イオン交換樹脂カラム等で高度に精製したものをを用いることが好ましい。また、導入DNAは制限酵素を用いてベクター部分を切断し、直鎖状にしておくことが好ましい。

【0098】

DNA導入後の受精卵は胚培養用培地中で微小滴培養法等により5%炭酸ガス/95%大気下で1細胞期~胚盤胞期まで培養した後、偽妊娠させた受胎用雌非ヒト哺乳動物の卵管または子宮内に移植される。受胎用雌非ヒト哺乳動物は移植される初期胚が由来する動物と同種のものであればよく、例えば、マウス初期胚を移植する場合は、ICR系の雌マウス（好ましくは約8~約10週齢）などが好ましく用いられる。受胎用雌非ヒト哺乳動物を偽妊娠状態にする方法としては、例えば、同種の精管切除（結紮）雄非ヒト哺乳動物（例えば、マウスの場合、ICR系の雄マウス（好ましくは約2ヶ月齢以上））と交配させて、膣栓の存在が確認されたものを選択する方法が知られている。

【0099】

受胎用雌は自然排卵のものを用いてもよいし、あるいは精管切除（結紮）雄との交配に先立って、黄体形成ホルモン放出ホルモン（一般にLHRHと略する）もしくはその類縁体を投与し、受精能を誘起させたものを用いてもよい。LHRH類縁体としては、例えば、[3, 5-Dil-Tyr<sup>5</sup>]-LH-RH、[Gln<sup>8</sup>]-LH-RH、[D-Ala<sup>6</sup>]-LH-RH、[des-Gly<sup>10</sup>]-LH-RH、[D-His(Bzl)<sup>6</sup>]-LH-RHおよびそれらのEthylamideなどが挙げられる。LHRHもしくはその類縁体の投与量、ならびにその投与後に雄非ヒト哺乳動物と交配させる時期は、非ヒト哺乳動物の種類によりそれぞれ異なる。例えば、非ヒト哺乳動物がマウス（好ましくはICR系のマウスなど）の場合には、通常、LHRHもしくはその類縁体を投与した後、約4日目に雄マウスと交配させることが好ましく、LHRHあるいはその類縁体の投与量は、通常、約10~60 µg/個体、好ましくは約40 µg/個体である。

【0100】

通常、移植される初期胚が桑実胚期以後の場合は受胎用雌の子宮に、それより前（例えば、1細胞期~8細胞期胚）であれば卵管に胚移植される。受胎用雌は、移植胚の発生段階に応じて偽妊娠からある日数が経過したものが適宜使用される。例えばマウスの場合、2細胞期胚を移植するには偽妊娠後約0.5日の雌マウスが、胚盤胞期胚を移植するには偽妊娠後約2.5日の雌マウスが好ましい。受胎用雌を麻酔（好ましくはAvertin、ネプタール等が使用される）後、切開して卵巣を引き出し、胚培養用培地に懸濁した初期胚（約5~約10個）を胚移植用ピペットを用いて、卵管腹腔口もしくは子宮角の卵管接合部付近に注入する。

【0101】

移植胚が首尾よく着床し受胎雌が妊娠すれば、自然分娩もしくは帝王切開により仔非ヒト哺乳動物が得られる。自然分娩した受胎雌にはそのまま哺乳を継続させればよく、帝王切開により出産した場合は、産仔は別途用意した哺乳用雌（例えばマウスの場合、通常に交配・分娩した雌マウス（好ましくはICR系の雌マウス等））に哺乳させることができる

10

20

30

40

50

。

## 【0102】

受精卵細胞段階におけるAIMのアンチセンスRNA、siRNA、shRNA、もしくはmiRNAをコードするDNAの導入は、導入DNAが対象非ヒト哺乳動物の生殖系列細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。導入DNAが染色体DNAに組み込まれているか否かは、例えば、産仔の尾部より分離抽出した染色体DNAをサザンハイブリダイゼーションまたはPCR法によりスクリーニングすることにより検定することができる。上記のようにして得られる仔非ヒト哺乳動物 ( $F_0$ ) の生殖系列細胞において発現ベクターが存在することは、その後代 ( $F_1$ ) の動物全てが、その生殖系列細胞および体細胞のすべてに発現ベクターが存在することを意味する。

10

通常、 $F_0$ 動物は相同染色体の一方にのみ導入DNAを有するヘテロ接合体として得られる。また、個々の $F_0$ 個体は相同組換えによらない限り異なる染色体上にランダムに挿入される。相同染色体の両方に発現ベクターを有するホモ接合体を得るためには、 $F_0$ 動物と非トランスジェニック動物とを交雑して $F_1$ 動物を作製し、相同染色体の一方にのみ導入DNAを有するヘテロ接合体の兄妹同士を交雑すればよい。1遺伝子座にのみ導入DNAが組み込まれていれば、得られる $F_2$ 動物の1/4がホモ接合体となる。

## 【0103】

ベクターとしてウイルスを用いる場合の別の好ましい一実施態様として、上記KO動物の場合と同様に、AIMのアンチセンスRNA、siRNA、shRNA、もしくはmiRNAをコードするDNAを含むウイルスで、非ヒト哺乳動物の初期胚もしくはES細胞を感染させる方法が挙げられる。細胞として受精卵を用いる場合は、感染に先立って透明帯を除いておくことが好ましい。ウイルスベクターを感染させて1~2日間培養後、初期胚であれば、上述のように偽妊娠させた受胎用雌非ヒト哺乳動物の卵管または子宮内に移植し、ES細胞であれば、上述のように選択薬剤を添加して培養を続け、ベクターが組み込まれた細胞を選択する。

20

## 【0104】

さらに、プロシーディングズ・オヴ・ナショナル・アカデミー・オヴ・サイエンシーズ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 第98巻, 第13090-13095頁, 2001年に記載されるように、雄非ヒト哺乳動物から採取した精原細胞をSTOフィーダー細胞と共培養する間にウイルスベクターに感染させた後、雄性不妊非ヒト哺乳動物の精細管に注入して雌非ヒト哺乳動物と交配させることにより、効率よくAIMのアンチセンスRNA、siRNA、shRNA、もしくはmiRNAをコードするDNAのヘテロTg(+/-)産仔を得ることができる。

30

## 【0105】

Miyazaki T. et al. (J. Exp. Med., 189, 413-422, 1999、またはW02013/162021) に記載された、あるいは上記の手法によって取得されうる本発明のAIM発現不全非ヒト哺乳動物は、片側尿管結紮、一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流または両側性の一過性腎虚血再灌流を行う条件下において、以下の特性：

(1) 対照腎臓と比較して、尿管結紮または一過性腎虚血再灌流を行った腎臓において壊死した尿細管細胞が蓄積し、腎実質が線維化する、

(2) 対照腎臓と比較して、尿管結紮または一過性腎虚血再灌流を行った腎臓において糸球体構造が崩壊し、糸球体が線維化する、

40

(3) 対照腎臓と比較して、尿管結紮または一過性腎虚血再灌流を行った腎臓において炎症性サイトカインの発現が亢進する、

(4) 対照腎臓と比較して、尿管結紮または一過性腎虚血再灌流を行った腎臓においてマクロファージの浸潤が亢進する、

(5) 対照非ヒト哺乳動物と比較して、AIM発現不全非ヒト哺乳動物の血中BUN値が高い、

(6) 対照非ヒト哺乳動物と比較して、AIM発現不全非ヒト哺乳動物の生存率が低い、

(7) AIM投与によって、前記(1)~(6)が改善する、

を有する。これらの表現型は、従来公知のAIM KOマウスにおいては、少なくとも報告されていない。特に、尿管結石、上行性尿路感染症、あるいは腫瘍等による尿管の圧迫・閉塞を引金とした急性腎障害(急性腎不全)に伴う慢性的な腎障害、および、腫瘍、血栓、あ

50

るいは糖尿病、高血圧等による腎血管狭窄・閉塞による虚血性腎障害に伴う慢性的な腎障害の病態と近似したものであることは新たな発見である。

【0106】

(1) 対照腎臓(正常腎臓、あるいは尿管結紮または一過性腎虚血再灌流を行っていない腎臓をいう。以下同様。)と比較して、尿管結紮または一過性腎虚血再灌流を行った腎臓において壊死した尿細管細胞が蓄積し、腎実質が線維化するとは、本発明のAIM発現不全非ヒト哺乳動物に片側尿管結紮、一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流または両側性の一過性腎虚血再灌流を行うことによって、対照腎臓と比較して、尿管結紮または一過性腎虚血再灌流を行った腎臓において、壊死した尿細管細胞の蓄積、および腎実質の広範な線維化が認められることをいう。壊死した尿細管細胞の蓄積は、例えば、腎組織片をヘマトキシリン・エオジン染色によって確認することができ、腎実質の線維化はAzan染色およびヘマトキシリン染色の同時染色によって確認することができる。後述する実施例においては、AIMノックアウトマウスでは、尿管結紮後14日目から対照腎臓と比べて有意な差が認められた。また、一過性腎虚血再灌流後7日目から対照腎臓と比べて有意な差が認められた。

10

(2) 対照腎臓と比較して、尿管結紮または一過性腎虚血再灌流を行った腎臓において糸球体構造が崩壊し、糸球体が線維化するとは、本発明のAIM発現不全非ヒト哺乳動物に片側尿管結紮、一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流または両側性の一過性腎虚血再灌流を行うことによって、対照腎臓と比較して、尿管結紮または一過性腎虚血再灌流を行った腎臓において糸球体構造の崩壊と糸球体の線維化が認められることをいう。糸球体構造の崩壊は、例えば、腎組織片をヘマトキシリン・エオジン染色によって確認することができ、糸球体の線維化はAzan染色およびヘマトキシリン染色の同時染色によって確認することができる。後述する実施例においては、AIMノックアウトマウスでは、尿管結紮後14日目から正常腎臓と比べて有意な差が認められた。また、AIMノックアウトマウスでは、一過性腎虚血再灌流後7日目から正常腎臓と比べて有意な差が認められた。

20

(3) 対照腎臓と比較して、尿管結紮または一過性腎虚血再灌流を行った腎臓において炎症性サイトカインの発現が亢進するとは、本発明のAIM発現不全非ヒト哺乳動物に片側尿管結紮、一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流または両側性の一過性腎虚血再灌流を行うことによって、対照腎臓と比較して、尿管結紮または一過性腎虚血再灌流を行った腎臓においてMCP-1、IL-1 およびIL-6の発現が亢進することをいう。発現の亢進は、例えば、定量的RT-PCRやノーザンブロット法などによって確認することができる。後述する実施例においては、AIMノックアウトマウスでは、MCP-1およびIL-6は正常腎臓と比べて有意な差が認められ、IL-1 についても、発現が高い傾向が認められた。

30

(4) 対照腎臓と比較して、尿管結紮または一過性腎虚血再灌流を行った腎臓においてマクロファージの浸潤が亢進するとは、本発明のAIM発現不全非ヒト哺乳動物に片側尿管結紮、一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流または両側性の一過性腎虚血再灌流を行うことによって、対照腎臓と比較して、尿管結紮または一過性腎虚血再灌流を行った腎臓においてマクロファージ(Mac-1陽性細胞)の数が多いいことをいう。細胞数のカウントは、例えば、フローサイトメーターなどによってMac-1陽性細胞を識別することによって確認することができる。後述する実施例においては、AIMノックアウトマウスでは、正常腎臓と比べてマクロファージの割合が高いことが確認された。

40

(5) 対照非ヒト哺乳動物と比較して、AIM発現不全非ヒト哺乳動物の血中BUN値が高値であるとは、本発明のAIM発現不全非ヒト哺乳動物に片側尿管結紮、一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流または両側性の一過性腎虚血再灌流を行うことによって、対照非ヒト哺乳動物と比較して、AIM発現不全非ヒト哺乳動物の血中BUN値が高いことをいう。

(6) 対照非ヒト哺乳動物と比較して、AIM発現不全非ヒト哺乳動物の生存率が低いとは、本発明のAIM発現不全非ヒト哺乳動物に片側尿管結紮、一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流または両側性の一過性腎虚血再灌流を行うことによって、対照非ヒト哺乳動物と比較して、生存率が低くなることをいう。

(7) AIM投与によって、前記(1)~(6)が改善するとは、本発明のAIM発現不全非ヒト哺乳

50

動物に片側尿管結紮、一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流または両側性の一過性腎虚血再灌流を行った後、AIM投与によってBUN値に有意な低下が認められることと、壊死した尿細管細胞の蓄積と糸球体構造の崩壊、またそれらに伴う腎実質および糸球体の線維化が、明瞭に改善すること、炎症性サイトカインの発現が低下すること、生存率が改善すること、マクロファージの浸潤を抑制することをいう。

#### 【0107】

これらの知見は、AIM発現不全非ヒト哺乳動物を片側尿管結紮、一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流または両側性の一過性腎虚血再灌流を行うことで、腎疾患のモデル動物として有用であることを示し、さらに腎疾患の予防・治療薬のスクリーニングに用いることができることを示す。具体的には、本発明のスクリーニング方法は、以下の工程を含む。

(1) 片側尿管結紮、一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流または両側性の一過性腎虚血再灌流を行う条件下、AIM発現不全非ヒト哺乳動物に被検物質を投与する工程、

(2) 被検物質を投与されたAIM発現不全非ヒト哺乳動物の下記特性のいずれか一項目以上を観察する工程：

- (i) 壊死した尿細管細胞の蓄積と腎実質の線維化、
- (ii) 糸球体構造の崩壊と線維化、
- (iii) 腎臓における炎症性サイトカインの発現量、
- (iv) 腎臓におけるマクロファージの割合、
- (v) BUN値、
- (vi) 生存率、

(3) 被検物質非投与の場合と比較して、前記特性のいずれか一項目以上が改善される被検物質を選択する工程。

#### 【0108】

本発明のスクリーニング方法で、片側尿管結紮とは、片側の腎臓の尿管を結紮することをいう。尿管結紮により、結紮を施した腎臓の腎実質の尿細管および糸球体の壊死を誘導し、それに引き続いて炎症や線維化を生じさせ、最終的にその腎臓を機能不全にすることができる。また、一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流とは、あらかじめ一方の腎臓を摘出し、2週間後に残った腎臓側の腎動脈を結紮することによって虚血を誘導し、30分後結紮を解除し血流の再灌流を行うことをいう。この一過性の虚血のために尿細管の壊死が軽度の線維化を伴い3日間程度進行し、それに伴い腎機能が悪化する。また、両側性の一過性腎虚血再灌流とは、一方の腎臓を摘出せずに、両方の腎臓の腎動脈を結紮することによって虚血を誘導し、30分後結紮を解除し血流の再灌流を行うことをいう。

#### 【0109】

AIM発現不全非ヒト哺乳動物に投与される被験物質としては、蛋白質、ペプチド、抗体、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などが用いられてよい。被検物質を投与する時期は、片側尿管結紮、一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流または両側性の一過性腎虚血再灌流の前であっても、同時であってもよいし、あるいはAIM発現不全非ヒト哺乳動物が片側尿管結紮、一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流または両側性の一過性腎虚血再灌流が行われて、前記した特性が観察されるようになってからでもよい。投与の方法としては、経口的であっても非経口的であってもよい。経口的投与としては飼料や飲料水に混ぜて投与することができる。非経口的投与としては、腹腔内投与、静脈注射、皮下注射、皮内注射、筋肉注射、点滴注射等による投与、坐剤による直腸投与などが挙げられる。また、投与は単回投与であっても複数回投与であってもよい。

#### 【0110】

被検物質を投与されたAIM発現不全非ヒト哺乳動物の特性は、被検物質の投与後、通常3または4日目以降、好ましくは7日目以降、より好ましくは14日目以降に観察する。壊死した尿細管細胞の蓄積およびそれに伴う腎実質の線維化については、前記哺乳動物から摘出した腎臓の腎組織片をヘマトキシリン・エオジン染色、またはAzan染色およびヘマトキシリン染色し、その染色程度を数値化することで観察することができる。糸球体構造の崩壊

ならびに糸球体の線維化の程度については、上記と同様に、前記摘出した腎臓の腎組織片をヘマトキシリン・エオジン染色またはAzan染色およびヘマトキシリン染色し、その染色程度を数値化することで観察することができる。腎臓における炎症性サイトカインの発現量については、定量的RT-PCRなどで測定することができる。ここで、測定する炎症性サイトカインとしては、例えば、MCP-1、IL-1 およびIL-6が挙げられる。腎臓におけるマクロファージの割合については、フローサイトメーターなどによってMac-1陽性細胞を識別することによって確認することができる。BUN値については、血中尿素窒素(blood urea nitrogen)濃度を測定することによって観察することができる。

#### 【0111】

上記のようにして得られた前記特性の観察結果について、被検物質非投与の場合と比較する。あるいは、前記特性について腎疾患の有無との相関図をあらかじめ作成しておき、得られた前記特性の観察結果をその相関図と比較してもよい。比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行われる。

10

#### 【0112】

そして、得られた前記特性の観察結果が、被検物質非投与の場合に比べて改善される場合には、該被検物質を腎疾患の予防・治療剤として選択することができる。ここで改善されるとは、(i)壊死した尿細管細胞の蓄積の程度(ヘマトキシリン・エオジン染色、またはAzan染色およびヘマトキシリン染色の程度)が被検物質非投与の場合に比べて有意に低いこと、(ii)糸球体構造の崩壊の程度(ヘマトキシリン・エオジン染色、またはAzan染色およびヘマトキシリン染色の程度)が被検物質非投与の場合に比べて有意に低いこと、(iii)腎臓における炎症性サイトカインの発現量が被検物質非投与の場合に比べて有意に低いこと、(iv)腎臓におけるマクロファージの割合が被検物質非投与の場合に比べて有意に低いこと、(v)BUN値が被検物質非投与の場合に比べて有意に低いこと、(vi)生存率が被検物質非投与の場合に比べて有意に高いことをいう。

20

#### 【0113】

前記選択された被検物質を腎疾患の予防・治療剤として用いる場合、本発明のAIM類と同様に製剤化され、同様の投与経路・用量で投与することができる。該予防・治療剤の対象となる腎疾患についても、前記と同様でありうる。

#### 【0114】

また、AIM発現不全非ヒト哺乳動物は片側尿管結紮、一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流または両側性の一過性腎虚血再灌流を行う条件下、腎疾患のモデル動物として有用であることから、該哺乳動物は、腎疾患の予防・治療薬の評価方法に用いることができる。従って、本発明はまた、AIM発現不全非ヒト哺乳動物に片側尿管結紮、一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流または両側性の一過性腎虚血再灌流を行うことによって得られる動物を用いる、腎疾患予防・治療剤の予防治療効果の評価方法を提供する。具体的には、本発明の評価方法は、以下の工程を含む。

30

(1)片側尿管結紮、一側性腎摘出後の一過性腎虚血再灌流または両側性の一過性腎虚血再灌流を行う条件下、AIM発現不全非ヒト哺乳動物に腎疾患予防・治療剤を投与する工程

(2)腎疾患予防・治療剤を投与されたAIM発現不全非ヒト哺乳動物の下記特性のいずれか一項目以上を観察する工程：

40

- (i)壊死した尿細管細胞の蓄積と腎実質の線維化、
- (ii)糸球体構造の崩壊と線維化、
- (iii)腎臓における炎症性サイトカインの発現量、
- (iv)腎臓におけるマクロファージの割合、
- (v)BUN値、
- (vi)生存率、

(3)前記特性のいずれか一項目以上を腎疾患予防・治療剤非投与の場合と比較して、腎疾患予防・治療剤の効果の評価する工程。

#### 【0115】

50

本発明の評価方法で、AIM発現不全非ヒト哺乳動物に投与される腎疾患予防・治療剤としては、公知の腎疾患予防・治療剤であってよく、たとえば、降圧薬（例、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、アンジオテンシンII受容体拮抗薬、カルシウム拮抗薬、レニン阻害薬、遮断薬、遮断薬等）；利尿薬（例、炭酸脱水素酵素阻害薬、ループ利尿剤、サイアザイド系利尿薬、抗アルドステロン薬、カリウム保持利尿薬等）；活性型ビタミンD3製剤（例、カルシトリオール、アルファカルシドール、マキサカルシトール、ファレカルシトリオール等）；経口吸着炭素製剤（例、活性炭等）；カリウム補正薬（例、ポリスチレンスルホン酸ナトリウム等）；リン吸着薬（例、炭酸カルシウム、酢酸カルシウム、塩酸セベラマー、炭酸ランタン等）、赤血球造血刺激因子製剤(erythropoiesis stimulating agent;ESA)(例、エリスロポエチン製剤)、アミノ酸輸液製剤等が挙げられるが、それら

10

**【0116】**

本発明の評価方法で観察される特性の観察方法は、前記スクリーニング方法における記載に従って実施してよい。また、その評価方法について、得られた前記特性の観察結果が、腎疾患予防・治療剤非投与の場合に比べて改善される程度が大きい程、該被検物質を腎疾患の予防・治療剤として予防・治療効果が高いと評価することができる。ここで改善されるとは前記と同様であってよい。

**【0117】**

また、本発明の後述する実施例において、慢性腎疾患患者の血中AIM濃度が腎機能（eGFR:糸球体濾過量）と相関していることが確認された。特に、血中AIM濃度が一定量より低い慢性腎疾患患者は、2～3年後において腎機能の悪化が確認された。以上のことから、被験者の血中AIM濃度を測定することによって、慢性腎疾患患者の予後を予測できることが示唆される。従って、本発明は、被験者の試料中のAIM濃度を測定することを含む、腎疾患患者の予後の予測方法を提供する。

20

**【0118】**

本発明の予測方法が適用できる被験者は特に制限されないが、例えば、急性腎不全または慢性腎疾患を発症するおそれがあるか、もしくは発症していることが疑われる被験者が挙げられる。慢性腎疾患としては、限定されるものではないが、例えば、慢性腎炎、慢性腎不全、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、腎硬化症、IgA腎症、高血圧性腎症、膠原病に伴う腎症またはIgM腎症などが含まれる。

30

**【0119】**

本発明の予測方法に用いられる試料としては、上記被験者から採取されるものであって、測定対象であるAIM遺伝子産物（例、RNA、蛋白質、その分解産物など）を含有するものであれば特に制限されない。例えば、血液、血漿、血清、リンパ液、尿、汗、唾液、関節液等の体液もしくはそのフラクション、あるいはそれらに含まれる細胞、特にマクロファージなどが挙げられ、好ましくは、血液、血漿、血清が挙げられる。

**【0120】**

被験者から採取した試料におけるAIM濃度の測定は、前記試料からRNA（例：全RNA、mRNA）画分を調製し、該画分中に含まれるAIM遺伝子の転写産物を測定することにより調べることができる。RNA画分の調製は、グアニジン-CsCl超遠心法、AGPC法など公知の手法を用いて行うことができるが、市販のRNA抽出用キット（例：RNeasy Mini Kit；QIAGEN製等）を用いて、微量のマクロファージから迅速且つ簡便に高純度の全RNAを調製することができる。RNA画分中のAIM遺伝子の転写産物を検出する手段としては、例えば、ハイブリダイゼーション（ノーザンブロット、ドットブロット、DNAチップ解析等）を用いる方法、あるいはPCR（RT-PCR、競合PCR、リアルタイムPCR等）を用いる方法などが挙げられる。微量のマクロファージから迅速且つ簡便に定量性よくAIM遺伝子の発現変動を検出できる点で競合PCRやリアルタイムPCRなどの定量的PCR法が好ましい。

40

**【0121】**

ノーザンブロットまたはドットブロットハイブリダイゼーションによる場合、AIM遺伝

50

子の転写産物の測定は、該遺伝子の転写産物とハイブリダイズし得る核酸（プローブ）を用いて行うことができる。そのような核酸としては、AIM遺伝子の転写産物に示される塩基配列（例えば、配列番号：1に示される塩基配列）を含む核酸とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る核酸が挙げられる。ハイストリンジェントな条件とは、前記した条件などが挙げられる。より好ましくは、AIM遺伝子の転写産物に示される塩基配列（例えば、配列番号：1に示される塩基配列）と相補的な塩基配列を含む核酸が挙げられる。

#### 【0122】

プローブとして用いられる核酸は、二本鎖であっても一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA：RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、アンチセンス鎖を用いることができる。該核酸の長さは標的核酸と特異的にハイブリダイズし得る限り特に制限はなく、例えば約15塩基以上、好ましくは約30塩基以上である。該核酸は、標的核酸の検出・定量を可能とするために、標識剤により標識されていることが好ましい。標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{32}\text{P}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、プローブと標識剤との結合にビオチン-（ストレプト）アビジンを用いることもできる。

10

20

#### 【0123】

ノーザンハイブリダイゼーションによる場合は、上記のようにして調製したRNA画分をゲル電気泳動にて分離した後、ニトロセルロース、ナイロン、ポリビニリデンジフロリド等のメンブレンに転写し、上記のようにして調製された標識プローブを含むハイブリダイゼーション緩衝液中、上記ハイストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションさせた後、適当な方法でメンブレンに結合した標識量をバンド毎に測定することにより、AIM遺伝子の発現量を測定することができる。ドットプロットの場合も、RNA画分をスポットしたメンブレンを同様にハイブリダイゼーション反応に付し、スポットの標識量を測定することにより、AIM遺伝子の発現量を測定することができる。

30

#### 【0124】

別の好ましい実施態様によれば、AIM濃度を測定する方法として定量的PCR法が用いられる。定量的PCRとしては、例えば、競合PCRやリアルタイムPCRなどがある。

PCRにおいてプライマーとして用いられるオリゴヌクレオチドのセットとしては、AIM遺伝子転写産物のセンス鎖（コード鎖）およびアンチセンス鎖（非コード鎖）とそれぞれ特異的にハイブリダイズすることができ、それらに挟まれるDNA断片を増幅し得るものであれば特に制限はなく、例えば、各々約15～約100塩基、好ましくは各々約15～約50塩基の長さを有し、約100bp～1kbpのDNA断片を増幅するようにデザインされたオリゴDNAのセットが挙げられる。より具体的には、プライマーとして用いられるオリゴヌクレオチドのセットとしては、配列番号：1に示される塩基配列を含む核酸（センス鎖）とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る核酸、及び前記の塩基配列に相補的な塩基配列を含む核酸（アンチセンス鎖）とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る核酸が挙げられる。ここでハイストリンジェントな条件とは前記と同義である。より好ましくは、配列番号：1に示される塩基配列と相補的な塩基配列を含む核酸、及び該核酸の塩基配列に相補的な塩基配列を含む核酸が挙げられる。

40

#### 【0125】

競合RT-PCRとは、目的のDNAを増幅し得るプライマーのセットにより増幅され得る既知量の他の鋳型核酸をcompetitorとして反応液中に共存させて競合的に増幅反応を起こさせ、増幅産物の量を比較することにより、目的DNAの量を算出する方法をいう。したがって、競合RT-PCRによる場合、上記したプライマーセットに加えて、該プライマーセットで

50

増幅でき、増幅後に標的核酸（すなわち、AIM遺伝子の転写産物）の増幅産物と区別することができる（例えば、増幅サイズが異なる、制限酵素処理断片の泳動パターンが異なるなど）既知量のcompetitor核酸が用いられる。標的核酸とcompetitor核酸とはプライマーを奪い合って増幅が競合的に起こるので、増幅産物の量比が元の鋳型の量比を反映することになる。competitor核酸はDNAでもRNAでもよい。DNAの場合、上記のようにして調製されるRNA画分から逆転写反応によりcDNAを合成した後に、上記プライマーセットおよびcompetitorの共存下でPCRを行えばよく、RNAの場合は、RNA画分にcompetitorを添加して逆転写反応を行い、さらに上記プライマーセットを添加してPCRを実施すればよい。後者の場合、逆転写反応の効率も考慮に入れているので、元のmRNAの絶対量を推定することができる。

10

**【0126】**

一方、リアルタイムPCRは、蛍光試薬を用いて増幅量をリアルタイムでモニタリングする方法であり、サーマルサイクラーと分光蛍光光度計を一体化した装置を必要とする。このような装置は市販されている。用いる蛍光試薬によりいくつかの方法があり、例えば、インターカレンター法、TaqMan<sup>TM</sup>プローブ法、Molecular Beacon法等が挙げられる。いずれも、上記のようにして調製されるRNA画分から逆転写反応によりcDNAを合成した後に、上記プライマーセットとSYBR Green I、エチジウムブロマイド等の二本鎖DNAに結合することにより蛍光を発する試薬（インターカレンター）、上記プローブとして用いることができる核酸（但し、該核酸は増幅領域内で標的核酸にハイブリダイズする）の両端をそれぞれ蛍光物質（例：FAM、HEX、TET、FITC等）および消光物質（例：TAMRA、DABCYL等）で修飾したものの（TaqMan<sup>TM</sup>プローブまたはMolecular Beaconプローブ）などの蛍光試薬（プローブ）とを、それぞれPCR反応系に添加するというものである。インターカレンターは合成された二本鎖DNAに結合して励起光の照射により蛍光を発するので、蛍光強度を測定することにより増幅産物の生成量をモニタリングすることができ、それによって元の鋳型cDNA量を推定することができる。TaqMan<sup>TM</sup>プローブは両端を蛍光物質と消光物質でそれぞれ修飾した、標的核酸の増幅領域にハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチドであり、アニーリング時に標的核酸にハイブリダイズするが消光物質の存在により蛍光を発せず、伸長反応時にDNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性により分解されて蛍光物質が遊離することにより蛍光を発する。従って、蛍光強度を測定することにより増幅産物の生成量をモニタリングすることができ、それによって元の鋳型cDNA量を推定することができる。Molecular Beaconプローブは両端を蛍光物質と消光物質をそれぞれで修飾した、標的核酸の増幅領域にハイブリダイズし得るとともにヘアピン型二次構造をとり得るオリゴヌクレオチドであり、ヘアピン構造をとっている時は消光物質の存在により蛍光を発せず、アニーリング時に標的核酸にハイブリダイズして蛍光物質と消光物質との距離が広がることにより蛍光を発する。従って、蛍光強度を測定することにより増幅産物の生成量をモニタリングすることができ、それによって元の鋳型cDNA量を推定することができる。リアルタイムRT-PCRは、PCRの増幅量をリアルタイムでモニタリングできるので、電気泳動が不要で、より迅速にAIM遺伝子の発現を解析可能である。

20

30

**【0127】**

別の態様では、被験者から採取した試料におけるAIM濃度の測定は、該試料から蛋白質画分を調製し、該画分中に含まれるAIMを検出することにより調べることができる。AIMの検出は、AIMに対する抗体を用いて、免疫学的測定法（例：ELISA、FIA、RIA、ウエスタンブロット等）によって行うことができる。あるいはまた、AIMの検出は、MALDI-TOFMS等の質量分析法を用いても行うことができる。

40

尚、AIMに対する抗体は、配列番号：2または配列番号：4に示されるアミノ酸配列と、同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列もしくは部分アミノ酸配列を含む蛋白質を感作抗原として、通常使用されるポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体作製技術に従って取得することができる。

**【0128】**

個々の免疫学的測定法を本発明の診断方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作

50

等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の方法、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えてAIMの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。例えば、入江寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays))、同書Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

10

**【0129】**

本発明の予測方法において、具体的には、以下の工程を含む方法であってよい。

- (1) 健常者および被験者の試料中のAIM濃度を測定する工程、
- (2) 健常者で測定されたAIM濃度と被験者で測定されたAIM濃度を比較する工程。

**【0130】**

前述のとおり、本発明のAIMは、慢性腎疾患患者において血中濃度が一定水準より低い慢性腎疾患患者は、2～3年後において腎機能が悪化する。したがって、上記のようにして、AIM濃度を測定した結果、健常者または一定水準と比べて低下していた場合、被験者の慢性腎疾患が将来的に悪化する可能性が高いと判定することができる。あるいは、慢性腎疾患の悪化とAIM濃度との相関図をあらかじめ作成しておき、得られた測定結果をその相関図と比較してもよい。比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行われる。

20

**【0131】**

また、本発明の予測方法は、上記(1)、(2)の工程に加えて、(3)被験者においてAIM濃度が、健常者に比べて有意に高かった場合には、被験者の慢性腎疾患が将来的に悪化する可能性が高いと判断する工程を含んでもよい。

**【0132】**

さらに、本発明の後述する実施例において、急性腎不全患者や両側性の一過性腎虚血再灌流を実施したマウスにおいて、健常個体と比較して、尿中に有意に高い濃度のAIMを認められた。以上のことから、被験者の尿中AIM濃度を測定することによって、急性腎不全を検査できることが示唆される。従って、本発明は、被験者の試料中のAIM濃度を測定することを含む、急性腎不全の検査方法を提供する。

30

**【0133】**

本発明の検査方法が適用できる被験者は特に制限されないが、例えば、急性腎不全を発症するおそれがあるか、もしくは発症していることが疑われる被験者が挙げられる。また、本発明の検査方法に用いられる試料としては、本発明の腎疾患患者の予後の予測方法において記載された通りであるが、好ましくは、尿が挙げられる。また、被験者から採取した試料におけるAIM濃度の測定は、本発明の腎疾患患者の予後の予測方法において記載された通りである。

40

**【0134】**

本発明の検査方法において、具体的には、以下の工程を含む方法であってよい。

- (1) 健常者および被験者の試料中のAIM濃度を測定する工程、
- (2) 健常者で測定されたAIM濃度と被験者で測定されたAIM濃度を比較する工程。

**【0135】**

前述のとおり、本発明のAIMは、急性腎不全患者において尿中濃度が、健常者より有意に高い。したがって、上記のようにして、AIM濃度を測定した結果、健常者と比べて有意に高い場合、被験者が急性腎不全に罹患していると判定することができる。あるいは、急

50

性腎不全とAIM濃度との相関図をあらかじめ作成しておき、得られた測定結果をその相関図と比較してもよい。比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行われる。

【0136】

また、本発明の検査方法は、上記(1)、(2)の工程に加えて、(3)被験者においてAIM濃度が、健常者に比べて有意に高かった場合には、被験者が急性腎不全に罹患していると判断する工程を含んでもよい。

【0137】

さらに、本発明は、腎疾患の診断または予後の予測キットにも及ぶ。該キットは、上述の本発明の検査方法または予測方法を簡便に実施するためのキットであればよく、特に限定されない。該キットは、

(a) AIM遺伝子の転写産物とハイブリダイズし得る核酸プローブまたは核酸プライマー、および/または

(b) AIMに対する抗体

を含有してなる。該キットが2以上の上記核酸および/または抗体を含む場合、各核酸または抗体は互いにAIM遺伝子の塩基配列上の異なる部分を特異的に認識、またはAIM遺伝子の翻訳産物の異なるエピトープを特異的に認識し得るものである。

【0138】

本発明のキットが前記(a)の核酸を含有する試薬を構成として含む場合、該核酸としては、本発明の検査方法または予測方法において前記したプローブ用核酸もしくはプライマー用オリゴヌクレオチドが挙げられる。

【0139】

AIM遺伝子の発現を検出し得る核酸は、乾燥した状態もしくはアルコール沈澱の状態、固体として提供することもできるし、水もしくは適当な緩衝液(例:TE緩衝液等)中に溶解した状態で提供することもできる。標識プローブとして用いられる場合、該核酸は予め上記のいずれかの標識物質で標識した状態で提供することもできるし、標識物質とそれぞれ別個に提供され、用時標識して用いることもできる。

あるいは、該核酸は、適当な固相に固定化された状態で提供することもできる。固相としては、例えば、ガラス、シリコン、プラスチック、ニトロセルロース、ナイロン、ポリビニリデンジフロリド等が挙げられるが、これらに限定されない。また、固定化手段としては、予め核酸にアミノ基、アルデヒド基、SH基、ビオチンなどの官能基を導入しておき、一方、固相上にも該核酸と反応し得る官能基(例:アルデヒド基、アミノ基、SH基、ストレプトアビジンなど)を導入し、両官能基間の共有結合で固相と核酸を架橋したり、ポリアニオン性の核酸に対して、固相をポリカチオンコーティングして静電結合を利用して核酸を固定化するなどの方法が挙げられるが、これらに限定されない。

【0140】

該キットに含有される核酸は、同一の方法(例:ノーザンブロット、ドットブロット、DNAアレイ技術、定量RT-PCR等)によりAIM遺伝子の発現を検出し得るように構築されていることが特に好ましい。

【0141】

本発明のキットが前記(b)の抗体を含有する試薬を構成として含む場合、該抗体としては、本発明の検査方法または予測方法において前記した抗体が挙げられる。

【0142】

本発明のキットを構成する試薬は、AIM遺伝子の発現を検出し得る核酸や抗体に加えて、該遺伝子の発現を検出するための反応において必要な他の物質であって、共存状態で保存することにより反応に悪影響を及ぼさない物質をさらに含有することができる。あるいは、該試薬は、AIM遺伝子の発現を検出するための反応において必要な他の物質を含有する別個の試薬とともに提供されてもよい。例えば、AIM遺伝子の発現を検出するための反応がPCRの場合、当該他の物質としては、例えば、反応緩衝液、dNTPs、耐熱性DNAポリメラーゼ等が挙げられる。競合PCRやリアルタイムPCRを用いる場合は、competitor核酸や蛍光試薬(上記インターカレーターや蛍光プローブ等)などをさらに含むことができる。ま

10

20

30

40

50

た、AIM遺伝子の発現を検出するための反応が抗原抗体反応の場合、当該他の物質としては、例えば、反応緩衝液、competitor抗体、標識された二次抗体（例えば、一次抗体がウサギ抗ヒトAIM抗体の場合、ペルオキシダーゼやアルカリホスファターゼ等で標識されたマウス抗ウサギIgGなど）、ブロッッキング液等が挙げられる。

【0143】

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

ヒトAIMの塩基配列を示す。

〔配列番号：2〕

ヒトAIMのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：3〕

ネコAIMの塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕

ネコAIMのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：5〕

ネコAIMの転写産物の相補的配列を示す。

〔配列番号：6〕

マウスAIMのアミノ酸配列を示す。

【実施例】

【0144】

以下において、実施例および参考例により本発明をより具体的に示すが、この発明はこれらに限定されるものではない。

【0145】

実施例1：AIMによる慢性腎不全または腎線維化の進行抑制

動物を用いた、多用される腎疾患モデルの一つに片側尿管結紮術（UUO）モデルがある。これは、片側の尿管を結紮することにより、結紮を施した腎実質の尿細管および糸球体が、徐々に壊死し、それに引き続き炎症や線維化が生じ、最終的にはその腎臓は機能不全となる。AIM欠損マウス（AIM-KO）と野生型マウス（WT）にそれぞれUUOを施術し、経過を観察した（n=6 for each）（図1A）。正常腎の構造はWT、AIM-KOとも全く差異はなかった。しかし、14日目のUUO腎において、線維を染色するAzan染色と、ヘマトキシリン染色を同時に行うと、WTでは線維化の広がりが見られるが、相当数の糸球体および尿細管は未だ正常構造を保ち、壊死に陥っていない尿細管も多くみられた。それに対してAIM-KOでは、壊死した尿細管細胞が広範囲に蓄積し、糸球体構造も破壊されており、腎実質の構造がもはや崩壊していた。観察した全てのマウスで同様の結果が得られた。

また同様に、AIM-KOとWTマウスにそれぞれUUOを施術し、14日目でHE、PAS、Azan染色によって腎臓を観察した（n=6 for each）（図1B）。WTでは線維化の広がりが見られるが、相当数の糸球体および尿細管は未だ正常構造を保っていた（HE、Azan染色）。一方AIM-KOでは、線維化が進行し、糸球体構造は破壊されており、腎実質の構造がもはや崩壊していた。PAS染色では、AIM-KOマウスで尿細管内外に壊死した細胞塊（PAS陽性）が広範囲に蓄積していた。観察した全てのマウスで同様の結果が得られた。

【0146】

実施例2：AIMによる急性腎不全（day7まで）から腎障害の慢性化（慢性腎不全化）（day14）の進行抑制

別の腎疾患モデルに一過性腎虚血再灌流（IR）モデルがある。一過性腎虚血再灌流では、あらかじめ一方の腎臓を摘出しておき、残った腎臓側の腎動脈を結紮し虚血にする。30分後結紮を解除し血流の再灌流を行うが、この一過性の虚血のために尿細管の壊死が軽度の線維化を伴い3日間程度進行し、それに伴い腎機能が悪化する。AIM欠損マウス（AIM-KO）と野生型マウス（WT）にそれぞれIRを施術し、経過を観察した（図2）。WTでは、腎機能の悪化後、壊死した細胞が除去され、壊死しなかった尿細管が急速に分裂し、14日後には、ほぼ正常の尿細管構造を回復した。それと並行して、腎機能も正常化した。ところ

10

20

30

40

50

が、AIM-KOでは、初期の尿細管のダメージの程度はWTと差異は見られないが、壊死した細胞の除去が進まず、壊死細胞が蓄積した。壊死細胞の除去が進行しないため、新しい尿細管細胞の分裂は抑制され、二次的な炎症や線維化が進行した。N=6で実験を行ったが、全てのマウスで同様の結果が得られた。すなわち、実施例1と実施例2の結果から、AIMがないと壊死した尿細管細胞が蓄積し、腎臓の構造・機能修復が著しく損なわれることが明らかとなった。

#### 【0147】

実施例3：AIMによる急性腎不全後の炎症の遷延（腎障害の慢性化）抑制

実施例2で行った一過性腎虚血再灌流（IR）を野生型マウス（WT）およびAIM欠損マウス（AIM-KO）に施し、術後の炎症性マクロファージの浸潤をマクロファージマーカーであるF4/80の免疫染色によって観察した（図3A）。術後3日目ではWTに比べAIM KOマウスでは、F4/80陽性のマクロファージの浸潤が明らかに亢進した。また、術後14日目でWTでは、マクロファージの浸潤は軽減したが、AIM KOマウスでは更に増悪した。このマクロファージ浸潤の経過に伴い、炎症性サイトカインの一つであるMCP-1の発現も同様にAIM KOマウス腎臓で有意に増加していることが、quantitative RT-PCRの実験により明らかになった（図3B）。N=6で実験を行ったが、全てのマウスで同様の結果が得られた。

10

#### 【0148】

実施例4：AIMによる急性腎不全の回復

AIM-KOマウスに実施例2で行ったIRを施し、腎機能が一過性に最も悪化する3日目、および4日目、7日目にそれぞれ組換えAIM(rAIM)またはPBSを100 µg腹腔内投与し（n=6 for each）、経過を観察した（図4）。PBSを投与した群では、実施例2の結果と同様に、その後壊死細胞の蓄積や糸球体の破壊など進行し、腎機能（BUN値）も、3日目よりはある程度改善するものの正常値に復旧することはなく、後半徐々に悪化の傾向を見せた。しかし、rAIMを投与した群では、3日目のrAIM投与後にBUN値は有意に改善し、7日目には既に正常範囲に戻り、その後もさらに低下した。組織学的にも、7日目には壊死した尿細管細胞は除去されており、腎実質の構造も正常化した。すなわち、AIM投与は壊死細胞の除去を亢進させ、尿細管の再生を促し、腎機能を回復できることが明らかとなった。

20

#### 【0149】

実施例5：急性腎不全により壊死した尿細管上皮細胞塊へのAIMの付着と壊死巣の除去

AIM-KOマウスに実施例2で行ったIRを施し、術後rAIM（100 µg）を静脈投与し、3、6、12時間後に腎臓の切片を抗AIM抗体で染色した。AIM投与後3時間で、尿細管の壊死部分にAIMが強く付着していることが確認された（図5上段：phase-contrastによる写真中、壊死巣をNで指している。図5下段：AIMシグナル（矢頭）は壊死巣と重なって観察された）。また、時間経過と共に、壊死巣部分は縮小し、12時間後にはほぼ痕跡程度しか確認されなかった。すなわち、AIMによるIR後の腎機能回復（実施例4）は、壊死巣にAIMが付着することによって、その除去を促し、それに伴い炎症の抑制ひいては組織再生が進行していたと考えられる。

30

#### 【0150】

実施例6：急性腎不全後の尿中AIMの出現

一方の腎臓を摘出せず、両方の腎臓の腎動脈を結紮し虚血にする、両側性の一過性腎虚血再灌流（IR）を施した野生型マウス（WT）の尿をIR後1日目、7日目にELISA法によって検出した（図6）。通常状態のマウスの尿にはAIMはほとんど検出されなかった（IR前）が、腎障害が最も激しいIR後1日目では尿中に多量のAIMが検出された。腎障害の回復と共に尿中AIMは減少した（IR後7日目）。なお、IRによる腎障害時は排出される尿は希釈尿となるため、尿中AIM値は尿中クレアチニン値でnormalizationした。

40

#### 【0151】

実施例7：AIM欠損による急性腎不全の増悪（生存率）

WTおよびAIM-KOマウスに両側性のIRを施し、生存率をみた（n=8 each）（図7）。IR後7日目で、WTは80%以上生存している条件でAIM-KOは30%以下の生存率であり、死亡したマウスのほとんどはIR後3日目までに死亡していた。

50

## 【 0 1 5 2 】

## 実施例 8 : クリニカルスコア

WTおよびAIM-KOマウスに両側性のIRを施し、経時的にクリニカルスコアを解析した(図8)。クリニカルスコアは、動きの機敏さの欠如、目の混濁、尾における痛み刺激に対する反応性の低下、毛並の悪さ、についてそれぞれ加点(0:異常なし、1:軽度の症状有、2:中等度の症状有、3:重度の症状有)し、その合計をグラフ化した。WTではIR後一日目にスコアが最大値を示し徐々に軽減したが、AIM-KOではスコアは高値のままであった。

## 【 0 1 5 3 】

## 実施例 9 : 急性腎不全に伴う腎機能障害 (BUN値)

WTおよびAIM-KOマウスに両側性のIRを施し、腎機能のマーカーであるBUNを継時的に計測した(n=8)(図9)。実施例8のクリニカルスコアと同様に、BUNはWTでは一日目がピークでその後低下するが、AIM-KOでは2日目まで上昇しその後も著明な低下は認められなかった。

## 【 0 1 5 4 】

## 実施例 10 : 急性腎不全に伴う腎機能障害 (腎組織 : PAS染色)

WTおよびAIM-KOマウスに両側性のIRを施し、腎組織を継時的にPAS染色で解析した(図10)。実施例8のクリニカルスコアや実施例9のBUN値と同様に、腎機能障害は、WTでは一日目がピークでその後回復し、7日目には正常な尿細管構造とbrush border(冊子縁; 矢頭)を持った近位尿細管上皮が再生した。しかしAIM-KOでは、障害は継続し、近位尿細管中にPAS陽性の死細胞塊が蓄積しており7日目に至っても除去されなかった。

## 【 0 1 5 5 】

## 実施例 11 : 急性腎不全により壊死した尿細管上皮細胞塊の定量化

図10で認められる近位尿細管中の上皮細胞の死細胞塊の面積を、1切片辺りの全面積に対する割合として算出することによって定量化した(n=3~5)(図11)。実施例8~10から得られる知見と同様の推移を示しており、AIM-KOでは死細胞塊の蓄積・残留が明らかであった。

## 【 0 1 5 6 】

## 実施例 12 : AIMによる急性腎不全後の炎症の遷延 (炎症性サイトカイン)

WTおよびAIM-KOマウスに両側性のIRを施し、IR前およびIR後7日目の腎臓からRNAを抽出し、炎症性サイトカインであるIL-1 およびIL-6について定量的RT-PCRで解析を行った(n=3 each)(図12)。両方のマーカーについてAIM-KOではWTに比べて高値であり、IRによる腎組織破壊に伴う炎症の遷延が示唆された。

## 【 0 1 5 7 】

## 実施例 13 : AIMによる急性腎不全後の炎症の遷延 (浸潤マクロファージ)

WTおよびAIM-KOマウスに両側性のIRを施し、IR後7日目の腎臓をコラゲナーゼ処理したのちフローサイトメーターで解析することによって、マクロファージ(Mac-1陽性細胞)の割合を調べた(図13)。実施例12の結果と同様に、AIM-KOでは腎臓内のマクロファージの割合がWTに比べ高かった。それぞれ3匹のマウスについて解析を行い、同様の結果を得た。図13は、representative resultを提示している。

## 【 0 1 5 8 】

## 実施例 14 : 急性腎不全により壊死したマウス尿細管内上皮細胞塊へのAIMの集積

両側性のIRを施したWTマウスの腎臓連続切片について、PAS染色(左)と抗AIM抗体による免疫染色(右)を行った(図14)。多くの死細胞塊にAIM(白)が集積していることが認められた。

## 【 0 1 5 9 】

## 実施例 15 : 急性腎不全患者の壊死した尿細管内上皮細胞塊へのAIMの集積

腎梗塞による急性腎不全で死亡したヒト患者の腎臓連続切片について、PAS染色(左)と抗AIM抗体による免疫染色(右)を行った(図15)。実施例14のIRマウス同様、多くの死細胞塊にAIM(白)が集積していることが認められる。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 6 0 】

## 実施例 1 6 : 急性腎不全患者及び急性腎不全マウスにおける尿中AIMの検出

急性腎不全 (AKI) で病院に搬送された患者および健常人を3名ずつ、また両側性のIRを施したWTマウス5匹について、IR前、IR1日後、および7日後の尿について、AIM濃度をELISAによって解析した (図 1 6)。健常人の尿にはAIMはほとんど認められないが、AKI患者の尿には認められた。マウスにおいても、IR前には認められないが、腎障害が著しいIR1日後では有意な量のAIMが尿中に認められ、腎障害が改善した7日目ではAIMの量が減少していた。

## 【 0 1 6 1 】

## 実施例 1 7 : AIM集積による尿細管内上皮細胞塊の縮小

AIM-KOマウスに両側性のIRを施し、IR後3日目に200 µgのrAIMを投与して経時的に取得した腎臓切片について、PAS染色および抗AIM抗体による免疫染色を行った (図 1 7)。AIMが集積した死細胞塊は速やかに縮小した。

## 【 0 1 6 2 】

## 実施例 1 8 : in vitro phagocytosis assay (腎由来マクロファージを用いた実験)

AIM-KOマウスに両側性のIRを施し、IR後3日目の腎臓をコラゲナーゼ処理し、F4/80陽性のマクロファージをFACSソーターを用いて単離した後、その貪食能を解析した (図 1 8)。貪食の標的として、ヒト尿細管細胞株であるHK2細胞を熱処理で壊死させFITCでラベルした後、リコンビナントAIM (rAIM) またはbovine serum albumin (BSA) でコートしたHK2死細胞を用いた。Noneとしては、rAIMでもBSAでもコートしていないHK2死細胞を用いた。マクロファージと上記3種類のHK2死細胞をincubateし、マクロファージ内に取り込まれたFITC陽性のHK2死細胞をフローサイトメーター (FACS) で経時的に解析した。BSAでコートしたHK2死細胞、あるいはコートしていないHK2死細胞に対してrAIMでコートしたHK2死細胞はより高効率にマクロファージに貪食されることが示された。

## 【 0 1 6 3 】

## 実施例 1 9 : in vitro phagocytosis assay (骨髄由来マクロファージを用いた実験)

実施例 1 8 と同様の実験を、貪食細胞としてAIM-KO由来の骨髄細胞をM-CSFによって分化させたマクロファージを用いて行った (図 1 9)。実施例 1 8 では、BSAでコートしたHK2死細胞とコートしていないHK2死細胞では貪食のされ方に差がなかったため、本実施例ではコートしていないHK2死細胞は使用しなかった。実施例 1 8 の結果と同様に、rAIMでコートしたHK2死細胞の貪食が上昇した。

## 【 0 1 6 4 】

## 実施例 2 0 : AIM投与によるAIM-KOマウスの急性腎不全治療

AIM-KOマウスに両側性のIRを施した後、1日目から3日目までrAIM 200 µg/マウスまたは等容量のPBSを静脈注射した (n=5 - 6)。PBSを打ったマウスの生存率は7日目で40%以下であったが、rAIMを投与したマウスでは100%に回復した (図 2 0)。

## 【 0 1 6 5 】

## 実施例 2 1 : AIM投与によるクリニカルスコアの回復

実施例 2 0 のマウスについて、実施例 8 と同様にクリニカルスコアを検討した (図 2 1)。rAIM投与後からクリニカルスコアの著しい回復を認めた。

## 【 0 1 6 6 】

## 実施例 2 2 : AIM投与による腎機能回復

実施例 2 0 のマウスについて、実施例 9 と同様に経時的にBUNを測定した (図 2 2)。rAIM投与によりBUN値の有意な低下を認めた。

## 【 0 1 6 7 】

## 実施例 2 3 : AIM投与による壊死した尿細管内上皮細胞塊の除去

AIM-KOマウスに両側性のIRを施した後、1日目から3日目までrAIM 200 µg/マウスまたは等容量のPBSを静脈注射し、3日目と7日目の腎臓の状態をPAS染色で解析した (図 2 3)。PBS投与では近位尿細管内死細胞が蓄積しているが、rAIMを投与したマウスでは著しい除去が認められ、7日目にはbrush border (冊子縁) を持つ尿細管細胞が回復した。

10

20

30

40

50

## 【0168】

## 実施例24：AIM投与後の壊死した尿細管内上皮細胞塊の定量化

IR後7日目の腎臓で、図23で認められるような近位尿細管中の死細胞塊の面積を、1切片辺りの全面積に対する割合として算出することによって定量化した(n=3 each)(図24)。rAIM投与群では死細胞塊の著しい減少が認められた。

## 【0169】

## 実施例25：AIM投与による炎症反応の低下(炎症性サイトカイン)

実施例20のマウスについて、IR後7日目の腎臓からRNAを抽出し、炎症性サイトカインであるIL-1 およびIL-6について定量的RT-PCRで解析を行った(図25)。rAIM投与群ではIL-1、IL-6ともPBS投与群に比較して低下しており、急性腎不全に伴う炎症反応もrAIM投与によって抑制されたことが示唆された。

10

## 【0170】

## 実施例26：非致死性(マイルド)のIRによる急性腎不全に対するAIMの効果

実施例6~25で実施した両側性のIRでは、虚血を30分間実施し、AIM-KOに対し致死率の高い程度の急性腎不全を誘導した。本実施例では、虚血時間を短くし(30分→25分)、AIM-KOでも7日目での生存率が100%ある程度の腎不全をAIM-KOマウスに誘導し、実施例20と同様に1日目から3日目までrAIMまたはPBSを頸静脈に注射投与した。このようなマイルドな条件のIRにおいても、rAIM投与によってBUNの改善をより加速させることが出来た(n=5 each)(図26)。

## 【0171】

## 実施例27：WTマウスに対するAIMの治療効果

もともと内因性のAIMを持っているWTマウスに対し両側性のIR(虚血30分間)を施し、実施例20と同様に、rAIMまたはPBSを投与した(n=5~6)。WTではもともと内因性のAIMによって腎障害は回復するが、rAIMによってその改善をさらに加速できた(図27)。rAIM投与によって、2日目まで上昇していたBUN値が既に低下していることが分かった。

20

## 【0172】

## 実施例28：AIM欠損による腎不全の慢性化

実施例26と同様のマイルドなIRをWTおよびAIM-KOマウスに施し、IR後28日目の腎臓の状態をPAS染色(死細胞塊をみるため)とAzan染色(線維化をみるため)によって解析した(図28)。28日目でもAIM-KOではPAS陽性の死細胞塊がWTに比べて多少残っていた。またAIM-KOでは著明な線維化(Azan陽性)が認められ、尿細管の構造もWTに比べていびつであった。

30

## 【0173】

## 実施例29：AIM欠損による腎線維化の亢進

実施例28のマウスについて、IR後28日後の腎臓からRNAを抽出し、定量的RT-PCRで4種類の線維化マーカーについて解析した(n=4 each)(図29)。AIM-KOではWTに比べ、線維化マーカーが全て上昇した。

## 【0174】

## 実施例30：ヒト糖尿病性慢性腎不全患者での血中AIM値

年齢がほぼ等しい、(1)健常者(男142、女:54)、(2)腎障害のない(Cre<1.0 mg/dl)糖尿病患者(男:70、女:57)、(3)糖尿病性の慢性腎不全患者(男:146、女:54)、について男女分けて血中AIM濃度を計測した(図30)。男女とも、(1)と(2)ではAIM値に有意差はなかったが、(3)では有意に低かった。

40

## 【0175】

## 実施例31：ヒト慢性腎臓病患者における腎機能と血中AIMの相関

慢性腎臓疾患(CKD)患者の血中AIM値を解析し、個々の腎機能のマーカーであるeGFR(糸球体濾過量)および血中クレアチニン値との相関を調べた(n=55)。CKDの原因疾患としては、糖尿病性腎症、糸球体腎炎、高血圧性腎症、IgA腎症などが挙げられる。また男女混合で患者年齢は60歳以下である。図31Aのように、血中AIM値と腎機能は有意な相関関係を示した。さらに、この解析の時点で比較的AIM値が高い人は、2-3年後の追跡調査

50

で腎機能が改善しており、逆にAIMが低値だった患者は腎機能が悪化していた（図3 1 B）。すなわち、AIMはCKD患者において、現在の腎機能のみならず予後を予測する有用なマーカーとなり得る。

#### 【0 1 7 6】

実施例 3 2：ネコにおける血中AIMの欠損（あるいは著しい低下）

イヌ（3匹）、ネコ（3匹）およびマウスのそれぞれの血清を抗AIM抗体（Rab2:マウスrAIMをウサギに免疫して作製したポリクローナル抗体。これまでマウスおよびヒトAIMを検出することが分かっている）を用い、還元条件で免疫プロットを行った（図3 2 A）。その結果、イヌ血清にはシグナルが確認できたが、ネコでは3匹ともほとんどシグナルが検出できなかった。これは抗体の問題ではなく、ネコAIM cDNAをクローニングし（実施例 3 6 参照）、pCAGGS発現ベクターにC末端にHAタグを付けた形で組み込み、HEK293T細胞に発現させた培養上清から抗HA抗体カラムを用いて精製したネコrAIM蛋白質は、マウスrAIMと同程度に本抗体を用いた還元条件での免疫プロットで検出することが出来た（図3 2 B）。これらの結果から、本実施例で検討を行ったネコは機能的なAIM mRNAを発現しているが、血中にAIM蛋白質としてほとんど存在していないことが分かった。

#### 【0 1 7 7】

実施例 3 3：ネコ血中におけるネコAIMとIgMの結合性

図3 5 に示すネコAIM cDNAを発現ベクターに挿入したプラスミドを、HEK293T細胞にトランスフェクションし、その培養上清から精製した組換えネコAIM（1 mg）をネコ（雑種、オス2歳3か月齢）に静注し1時間後に採血し、血清分離した。血清を、ゲルによるサイズ分画を行い、各分画についてAIMとIgMについてウエスタンプロット法により解析した。図3 3 Aに示すように、AIMの存在する分画とIgMの存在する分画は明らかに異なっている。この結果は、マウスAIMをAIM KOマウスに静注した血清を同様に分画解析した結果（図3 3 B、比較例）（IgMとAIMの分画が完全に一致している）とは異なっている。すなわち、本来AIMは、血液中でIgMと結合し、その安定性が保たれる（先行文献：Arai et al., Cell Reports 3: 1187-1198, 2013）結果、AIMの血中濃度が維持される。しかし、ネコではAIMがIgMと結合できないため、血中におけるAIMの安定性が保てず、その結果、AIMの血中濃度が維持できないと考えられる。

#### 【0 1 7 8】

実施例 3 4：ネコ血中におけるマウスAIMとIgMの結合性

マウスAIMを用いて、実施例 3 3 と同様な試験を実施した。組換えマウスAIM（1 mg）をネコ（雑種、オス2歳3か月齢）に静注し1時間後に採血し、血清分離した。血清を、ゲルによるサイズ分画を行い、各分画についてAIMとIgMについてウエスタンプロット法により解析した。図3 4 に示すように、マウスAIMの存在する分画とネコIgMの存在する分画は完全に一致した。したがって、ネコAIMと異なり、マウスAIMはIgMと結合し、血中で安定すると考えられる。

#### 【0 1 7 9】

実施例 3 5：マウスAIMのIgMへの結合部位

C末端を欠損した組換え改変マウスAIMを複数作製した。これらの改変マウスAIMとIgMの結合をin vitroで確認した。その結果、SRCR3ドメインの一部を欠損した改変マウスAIMは、IgMとの結合が著しく低下した。よって、マウスAIMのSRCR3ドメインがIgMとの結合に重要であることがわかった。

#### 【0 1 8 0】

実施例 3 6：ネコAIM cDNA配列

NCBI Resourcesに公開されているネコCD5L（=AIM）の予想配列（GenBank Accession No.:XM\_003999688.1）をもとにプライマーを複数設計し、ネコ脾臓のcDNAプールからネコAIM cDNAの全長（配列番号：5）を単離した（図3 5）。配列上、特にリーダーペプチドをコードする配列が、公開されている配列と大きく異なっていた。

#### 【0 1 8 1】

実施例 3 7：リーダーペプチドの疎水性

10

20

30

40

50

ネコ、ヒト、マウス、イヌ、それぞれのAIM蛋白質のリーダーペプチド配列の疎水性を示す(図36~39)。いずれも十分な疎水性を持ち、分泌蛋白質としての条件を満たした。なお、ネコは我々が単離したcDNAから、イヌAIMに関しては、NCBI Resourcesに公開されている予想配列(GenBank Accession No.:XM\_846487.2)からリーダーペプチドについて解析した。

#### 【0182】

実施例38:ヒト、ネコ、マウスのAIMアミノ酸配列の比較

リーダーペプチド(LS)、各SRCR、およびヒンジ部分について3者でアミノ酸配列の比較を示す(図40)。図中、3者で共通しているアミノ酸を“\*”で、ヒトとネコのみで共通しているものは“.”で、ヒトとマウスでのみ共通しているものは“:”で示した。

10

#### 【0183】

実施例39:ネコの血中AIMの解析

実施例32においては、抗マウスAIM抗体を使用してネコAIMの検出を試みたが、本実施例においては、ネコAIMのcDNAにHAタグを連結したDNAを発現ベクターに組み込み、HEK293T細胞に遺伝子導入することによってC末端にHAペプチドを付与したリコンビナント・ネコAIMタンパク質(rcAIM-HA)を産生した。それをマウスに免疫して、抗ネコAIMモノクローナル抗体を樹立した。その抗体を用いて、様々な系統のネコ(48個体)について血中AIM濃度を還元型のウエスタンブロッティング法により解析した(図41)。濃度のコントロールとしてrcAIM-HAを用いた。その結果、系統に関わらず、AIMが検出される個体と、AIMが検出されない個体がいることが分かった。AIMが検出される個体のうち、代表的な4個体の血中AIM濃度の平均値は16.8µg/mlであり、これはマウスやヒトの約5µg/mlよりも著しく高値であった。

20

#### 【0184】

実施例40:ネコに対するIR法の確立

血中AIM濃度が高いネコでIRによる急性腎不全誘導法を確立した。全身麻酔下で腹腔鏡下で両側腎動脈をクランプで1時間結紮したのち開放した。その後血液及び尿を経時的に採取し、腎機能を検討した。図42に血中BUN値とCre値の推移を示す。IR後12時間でBUN値、Cre値は共にピークとなったが、その後7日目まで改善しなかった。すなわちAIM-KOマウスと同じように急性腎不全からの回復が障害されている可能性が高いことが示唆された。

30

#### 【0185】

実施例41:IR後のネコにおける血中および尿中AIMの解析

マウスではIR後尿中にAIMが検出され、それが尿細管中に詰まった死細胞塊に集積すると考えられる。IR後のネコの血清および尿を抗ネコAIM抗体を用いて還元型ウエスタンブロッティング法によって解析した結果、ネコではIR後尿中にAIMは検出されなかった(図43)。また血中AIMの量にも明らかな変化は起こらなかった。

#### 【0186】

実施例42:急性腎不全を誘導されたネコの近位尿細管内の死細胞塊におけるAIM集積の有無

ネコに両側性のIRを施し3日目の腎臓について、尿細管内壊死細胞塊にAIMが集積しているかについて免疫染色によって解析した(図44)。近位尿細管内に壊死細胞塊は検出された(白矢印部)が、同箇所AIMの集積は認められなかった。実施例41において、IR後尿中にAIMは検出されなかったことを示したが、その結果、尿細管中の死細胞塊にAIMが達しなかったことが示唆された。

40

#### 【0187】

実施例43:急性腎不全を誘導されたネコに対するAIM投与の効果

実施例40の記載の方法と同様に、ネコ(メス5歳)に両側性のIRを施し、24時間後に麻酔下で動脈カテーテルを鼠蹊部動脈より挿入し、腎動脈までカテーテル先端を進め、rAIM 50mgをPBS50mlに溶解した溶液を片側腎動脈にそれぞれ25ml(rAIM:25mg)ずつ注入した。別のネコ(同じくメス5歳)に同様にIRおよびカテーテル挿入を行い、PBSのみを片側

50

腎動脈にそれぞれ25mlずつ注入した。IR前とrAIMまたはPBS注入後24時間（IR後48時間）での体表面積で標準化したGFR（Glomerular Filtration Rate；糸球体濾過量）を示す（図45）。PBSのみ注入したネコでは、GFRが低下し腎機能が低下していたが、rAIMを注入したネコではGFRの低下は見られず、腎機能の低下が起きなかった。

【0188】

実施例44：急性腎不全を誘導されたネコに対するAIM投与の効果

実施例43の記載の方法と同様に、両側性のIRを施し、rAIMまたはPBS注入後24時間（IR後48時間）で腎組織をPAS染色で解析した（図46）。PBSを注入したネコでは尿細管上皮細胞の壊死と脱落、尿細管構造の破壊および間質の増殖が認められたが、rAIM注入したネコでは尿細管上皮細胞は既に回復しており冊子縁も復活し、構造も復元していた。また間質もPBSを注入したネコに比べて薄く、増殖は認められなかった。組織学的にもrAIMによる腎不全の治癒は明らかである。

10

【0189】

実施例45：ネコに対するAIM投与の効果

6～8歳のネコに、AIMまたはvehicleを連日投与する。投与2～4週後に腎機能（BUN値）を測定する。AIM投与群では、vehicle投与群で観察される腎機能の悪化が抑制される。従って、AIMがネコの腎機能悪化、腎不全の予防に有用であることがわかる。また、AIMの代わりに、AIMの機能をアゴニスティックに調節できる薬剤（AIM活性を有するAIMの部分ペプチドを含む）やAIMの発現を誘導する薬剤を使用しても同様の結果が得られる。

【0190】

20

実施例46：ネコに対する改変AIM投与の効果

ネコAIMのSRCR3ドメインをマウスAIMのSRCR3ドメインに改変し、IgMと結合する改変ネコAIMを作製する。6～8歳のネコに、改変AIMまたはvehicleを連日投与する。投与2～4週後に腎機能（BUN値）を測定する。改変AIM投与群では、vehicle投与群で観察される腎機能の悪化が抑制される。従って、AIMがネコの腎機能悪化、腎不全の予防に有用であることがわかる。また、改変ネコAIMは血中のIgMと結合し、安定化することから、ネコAIMを投与するよりも低用量の改変ネコAIM投与で有効性が得られる。改変ネコAIMは、ネコIgMと結合すれば良く、限定されない。

【産業上の利用可能性】

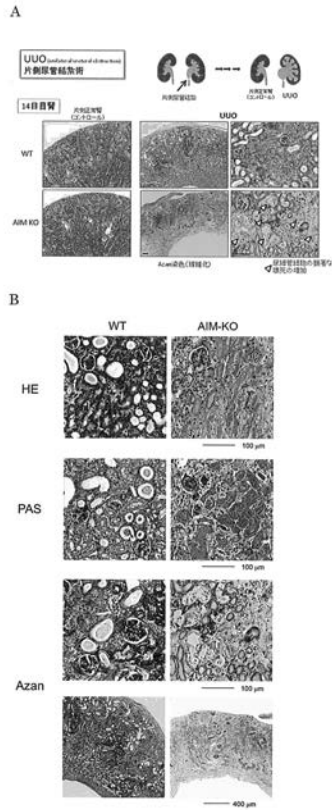
【0191】

30

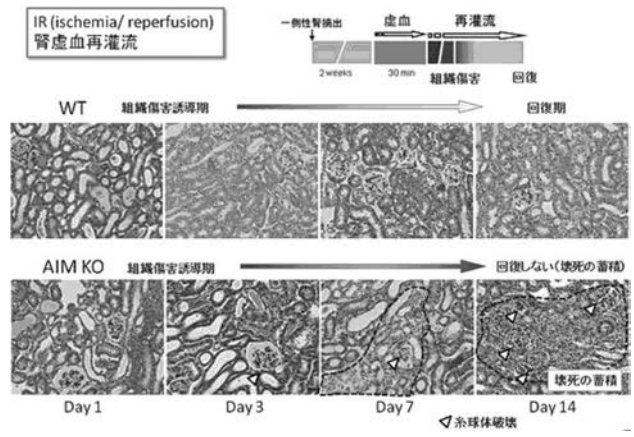
本発明は、有効成分としてAIMを含む、腎疾患の予防・治療剤を提供することができる。また、本発明の腎疾患モデルマウスは、腎疾患の発症メカニズムを解明に寄与し、さらに該モデルマウスを用いたスクリーニング方法によれば、腎疾患に対する予防・治療に有効な物質を探索することができる。また本発明の腎疾患モデルマウスを用いて、腎疾患の公知の予防・治療剤の効果を評価することができる。さらに本発明は、腎疾患の診断方法を提供することができる。

本出願は、日本で出願された特願2014-022041（出願日：平成26年2月7日）を基礎としており、その内容はすべて本明細書に包含されるものとする。

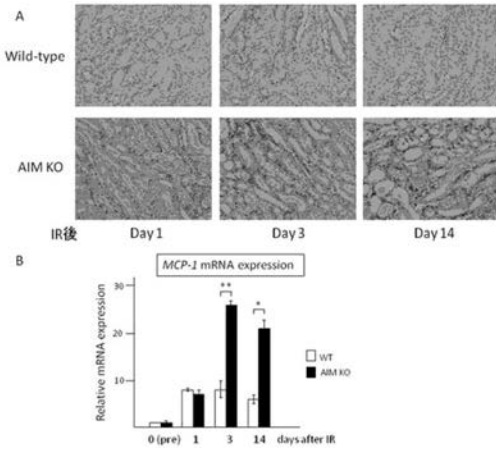
【 図 1 】



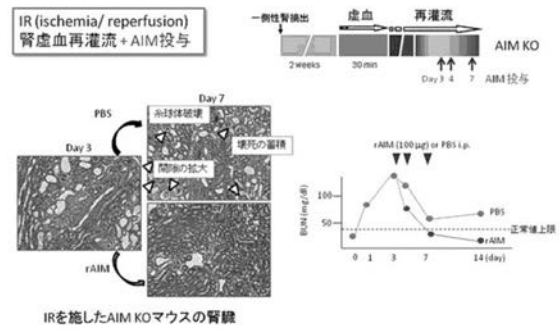
【 図 2 】



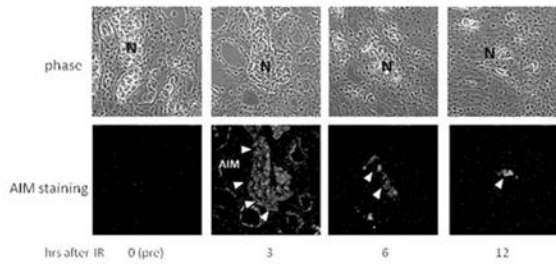
【 図 3 】



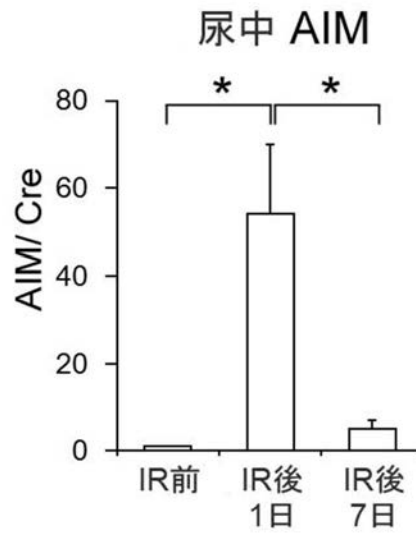
【 図 4 】



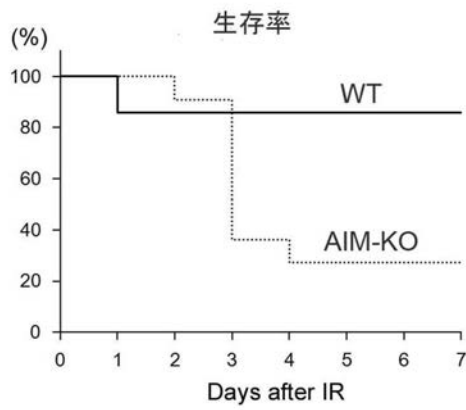
【 図 5 】



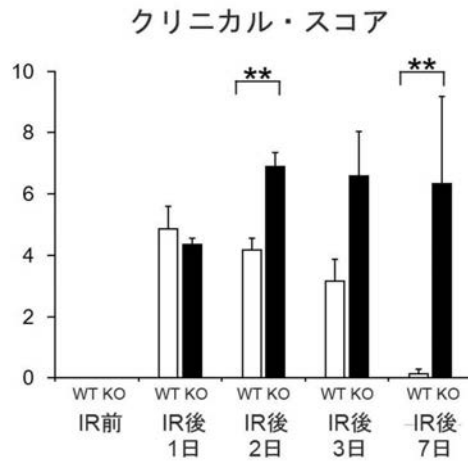
【 図 6 】



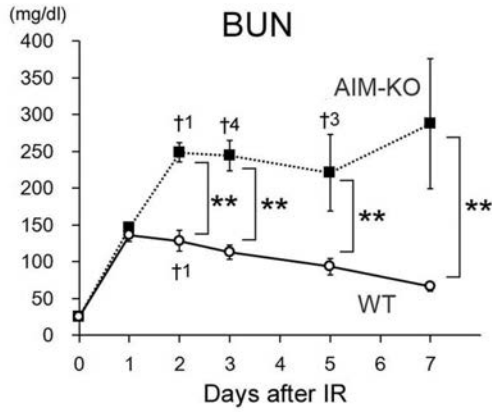
【 図 7 】



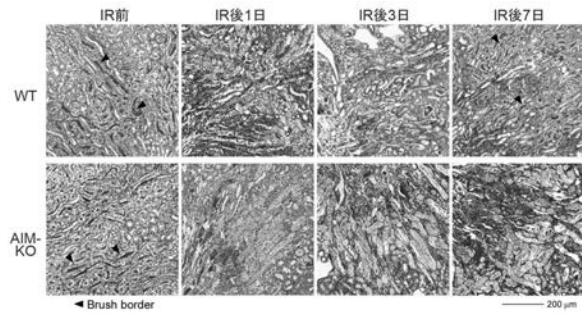
【 図 8 】



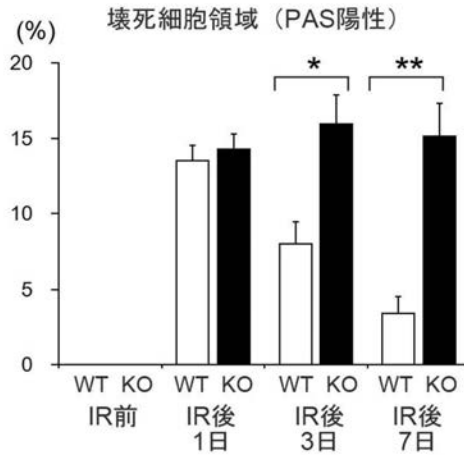
【 図 9 】



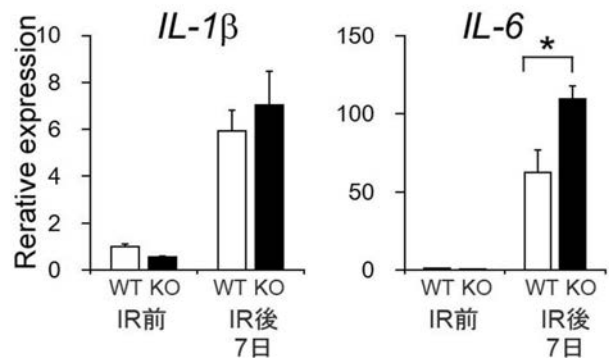
【 図 1 0 】



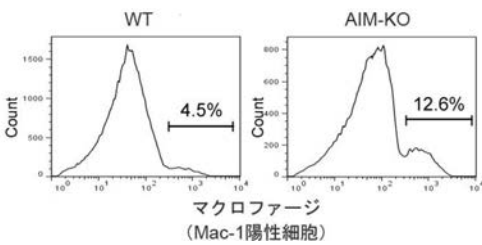
【 図 1 1 】



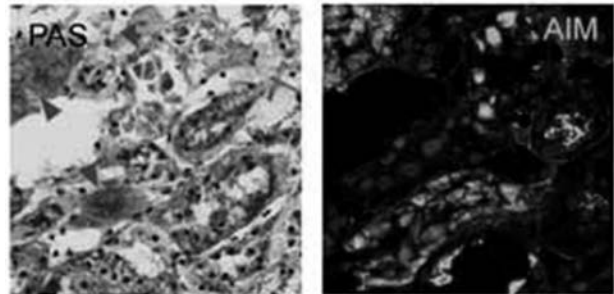
【 図 1 2 】



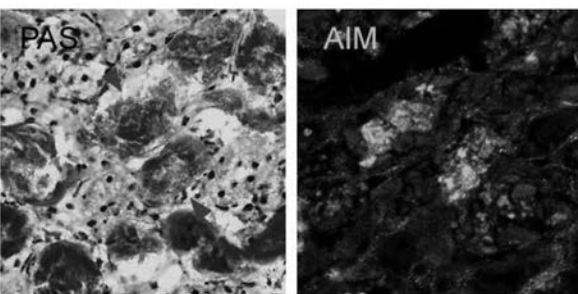
【 図 1 3 】



【 図 1 5 】

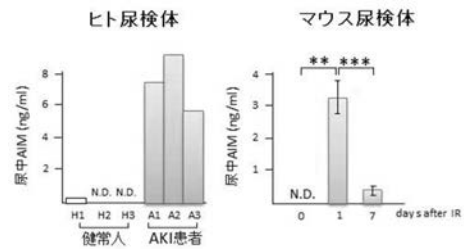


【 図 1 4 】

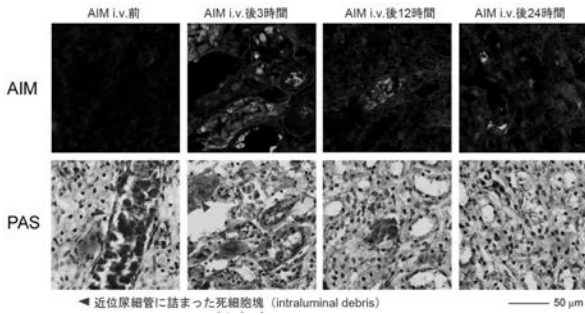


◀ 近位尿細管内に詰まった死細胞塊 (intraluminal debris)

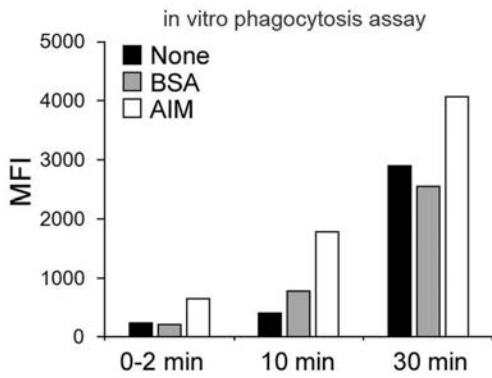
【 図 1 6 】



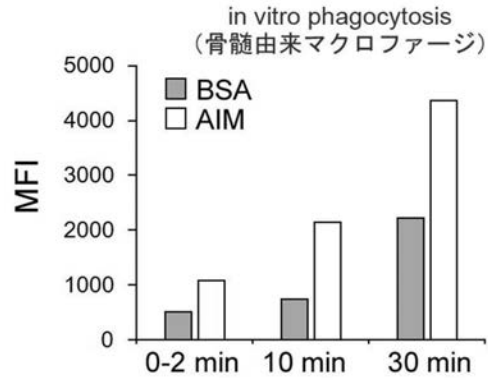
【図 17】



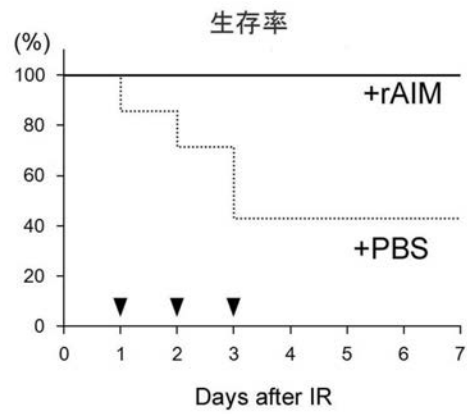
【図 18】



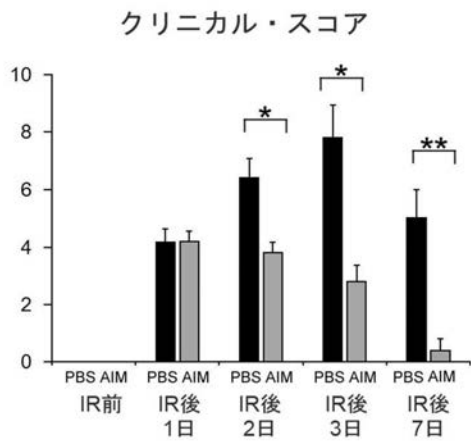
【図 19】



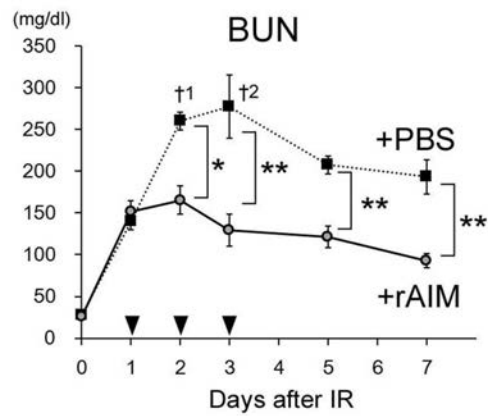
【図 20】



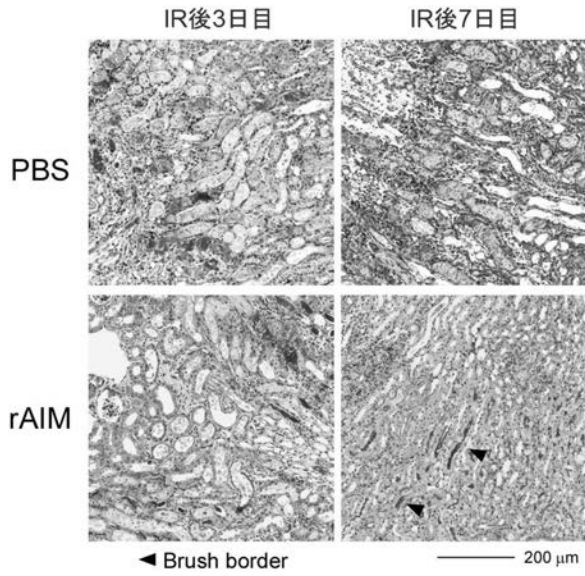
【図 21】



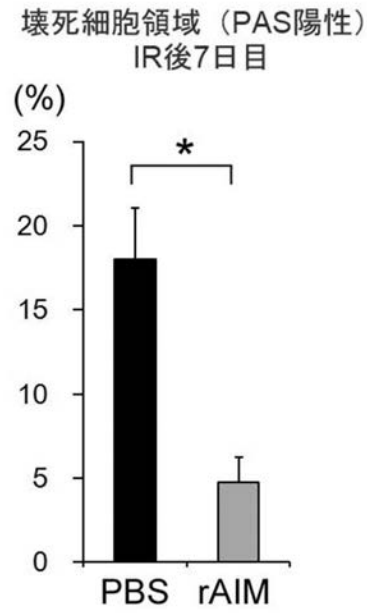
【図 22】



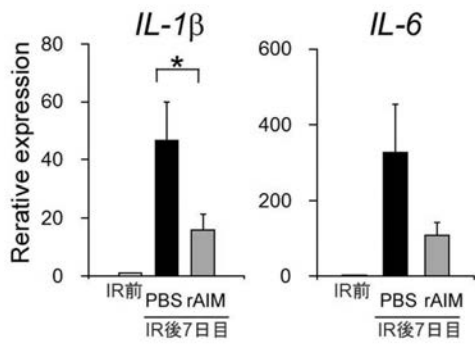
【 図 2 3 】



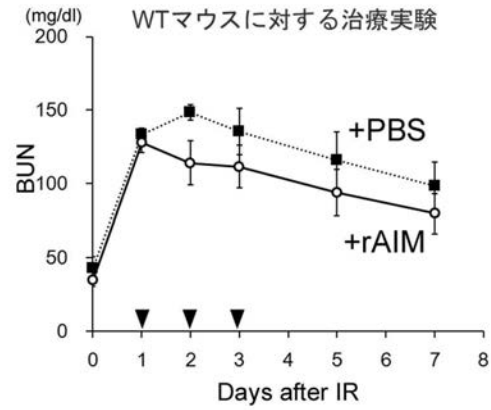
【 図 2 4 】



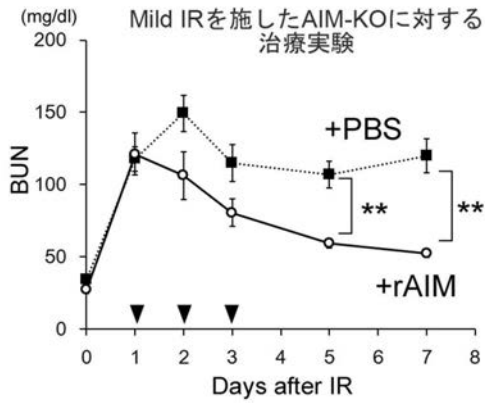
【 図 2 5 】



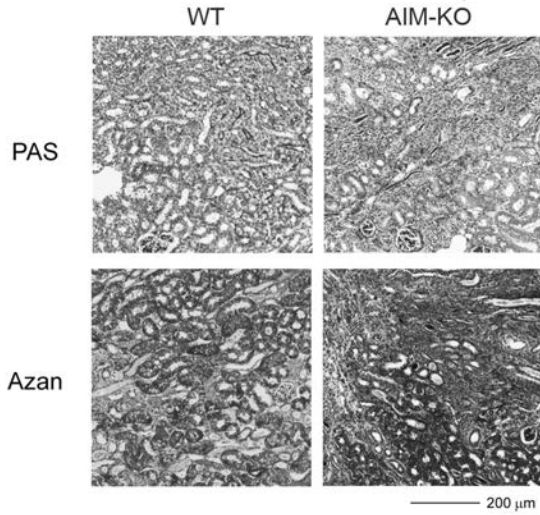
【 図 2 7 】



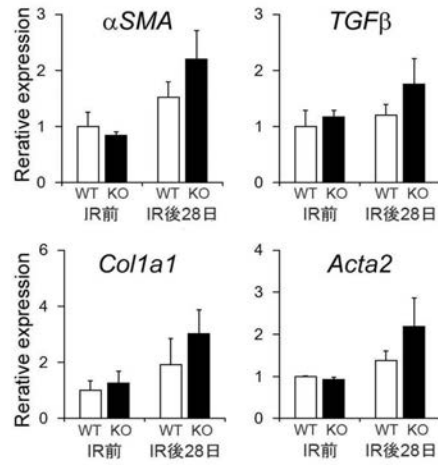
【 図 2 6 】



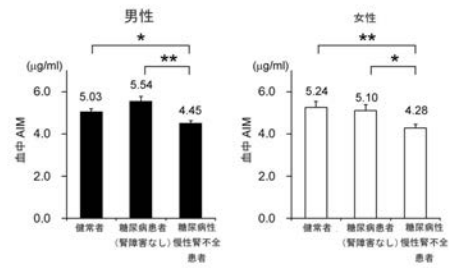
【 図 2 8 】



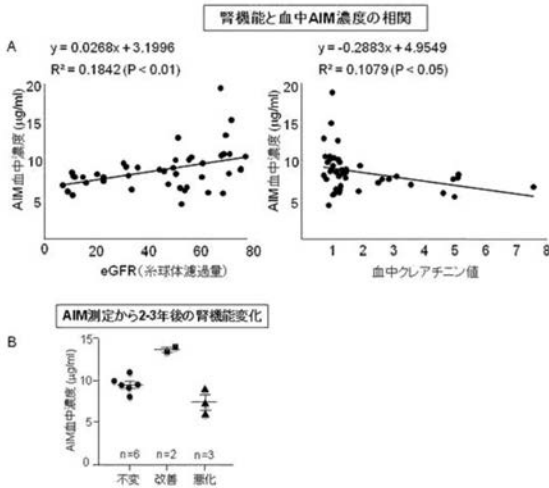
【 図 2 9 】



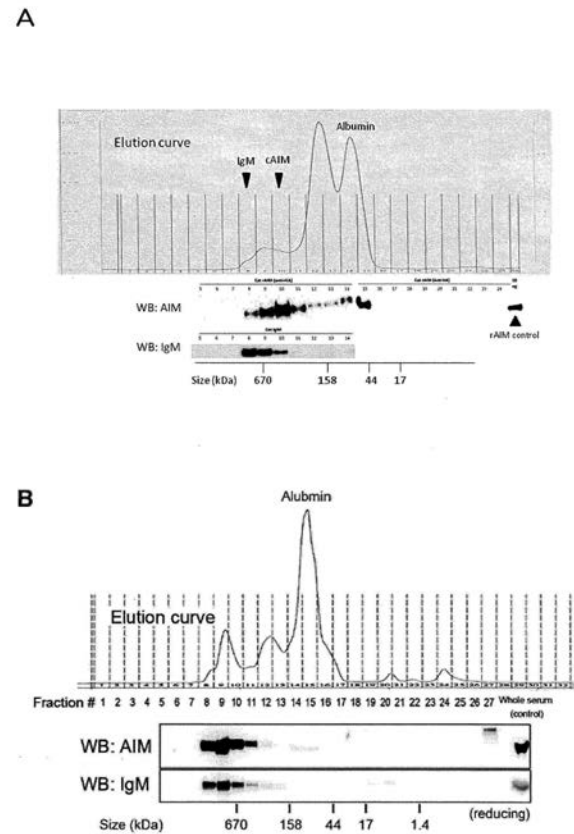
【 図 3 0 】



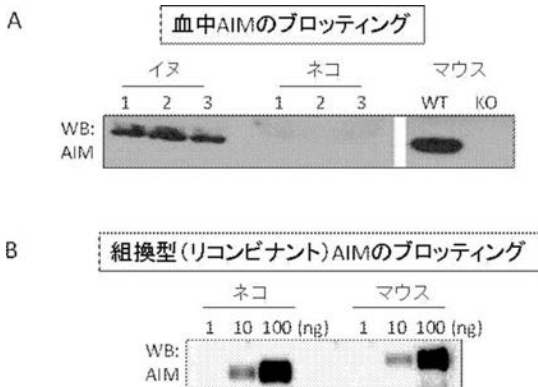
【 図 3 1 】



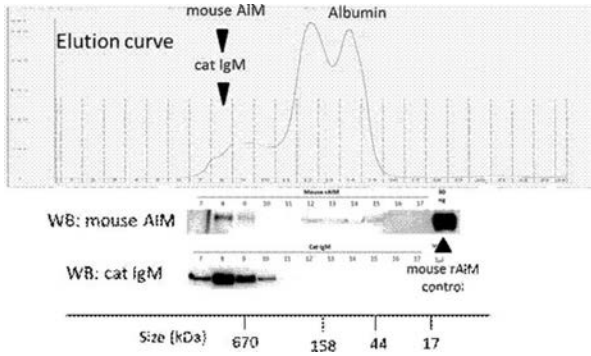
【 図 3 3 】



【 図 3 2 】



【 図 3 4 】



【 図 3 5 】

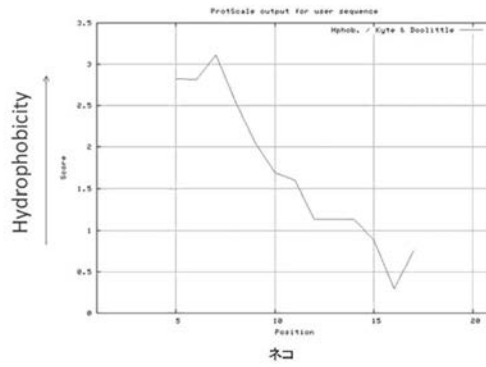
ネコ AIM cDNA配列

```

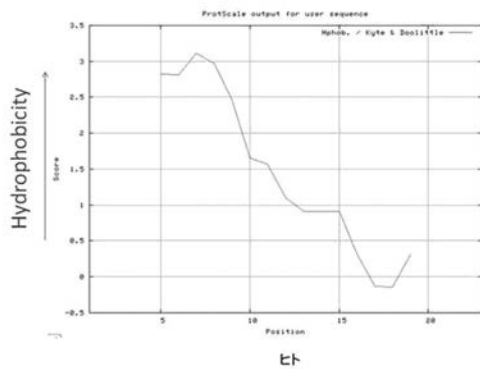
agaactctcc gttggtgccc tggggcctcc togggcctc ggattccagc
tcagctcttc ccgtcgcctg gctcagggcg ctactcttct cctaaactct
ggcatttac actggacctg gctattttagg gcttttttcc agagtgggc
taqtgggagg cgaaccaccg tqtgaaggtc gttgtgagtt gcagcaggat
gacgagtggg tcaccgctg tgatgactac tggacaatgg actctgtggc
cgtgctgtgc cgggagctgg cctgtggggc gcccaggaag accatgagtg
gcaccgtgta tggaccagtg acaccaaagg accaaaagt ctcatccac
ctgttcagat gcaatgggat cgaagaagc ctgtctcagt ggagagggg
agatgcaatc ggatgctccc atgttgagga tgcgggagcc gttgtcgagc
ccatttacac tggacctggc attttagggc cggagagttg gaggctggcc
gatggccccc ggcgctgcca ggcocgagtg gagtgaagt tccaggggga
gtggagctct gttgccaag cagcctggag ctttgcagcc gccaaagtgg
tgtgccggca gctggggtgt ggaaggcca cctgacccg gagagctgc
aacaagcga ccaaggcca agggccatc tggcagaaa agcgtcatg
ctcaggaca gaagtggcc ttaagattg cctttctgaa gtttgggaac
acaactgtac ccacaatgag gacgtgtggg togaatgta agatcccttt
gccttgaagc tggtagggg acgcagccac tgtgaggga ggctggaggt
gctgcacaag ggcgagtggg gctctgtctg cgaacggcg tgggacaag
acgcagaccg ggtggtgtgc agcagctgg gctcgggca gcccctgtct
ccgctgtca aagtccggag aaggttcggc cccgggtcgc gccgcatctg
gctggacgac gtcaagtgtc cggggaagga gccgtccctg gacagtgcc
tgcacagctc ctggggtcac cacaaactga accacagaga ggatgtggct
gtgtctgtg aagaacagca gctcggccta cctgatgctt gacccacagg
ccccaaagc tcttacttct cctgggacct gatggcccg gactga

```

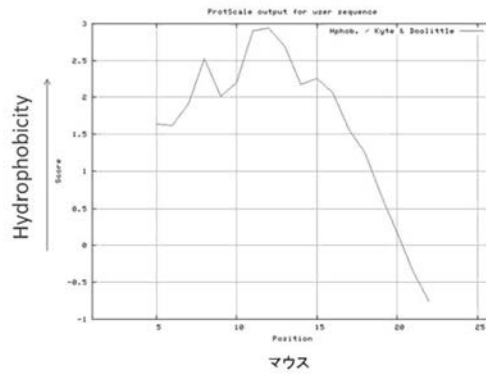
【 図 3 6 】



【 図 3 7 】



【 図 3 8 】





【配列表】

2015119253000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2015/053415
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> A61K38/00(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P13/12(2006.01)i, C07K14/435(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K38/00, A61K31/7088, A61K48/00, A61P13/12, C07K14/435, C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/162021 A1 (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.), 31 October 2013 (31.10.2013), entire text; particularly, claims (Family: none)	31-36
X	WO 2011/145725 A1 (Toru MIYAZAKI), 24 November 2011 (24.11.2011), entire text; particularly, claims; paragraph [0014] & EP 2573192 A1	15-18, 22, 23
A	Toshiki MORIYAMA, "Metabolic Shokogun to CKD", Medical Practice, 2011, vol.28, no.6, pages 1033 to 1037, entire text	18-21, 23
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 06 March 2015 (06.03.15)		Date of mailing of the international search report 24 March 2015 (24.03.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/053415

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Tadashi URAMATSU et al., "Nosocchu Shizen Hassho Koketsuatsu Rat (SHRSP) Jin ni Okeru Shinjun Macrophage to AIM no Kanren", The Japanese Journal of Nephrology, 2008, vol.50, no.3, page 362, column P-263	1-14, 19-21, 29, 30, 37-48
A	WO 2011/145723 A1 (Toru MIYAZAKI), 24 November 2011 (24.11.2011), entire text; particularly, claims & US 2013/0115220 A1 & EP 2572730 A1 & CN 103648531 A	1-14, 19-21, 29, 30, 37-48
A	ARAI, S. et al.: "Obesity-Associated Autoantibody Production Requires AIM to Retain the Immunoglobulin M Immune Complex on Follicular Dendritic Cells" Cell Reports, 2013, vol.3, pp.1187-1198, entire text, particularly, Summary, page 1187, left column, line 30 to page 1188, left column, line 18	1-14, 19-21, 29, 30, 37-48
A	JP 2001-523264 A (Creative Biomolecules, Inc.), 20 November 2001 (20.11.2001), entire text; particularly, claims; page 23, lines 8 to 13; example 3 & US 2010/0105621 A1 & US 2011/0257093 A1 & EP 980252 A & WO 1998/050060 A1	1-14, 19-21, 29, 30, 37-48
P,X	Kento KITADA et al., "Apoptosis inhibitor of macrophage(AIM) wa Nyosaikan Eshi no Jokyo o Sokushinshi, Jinshogai no Shufuku Saisei o Yudo suru", The Japanese Journal of Nephrology, 25 May 2014 (25.05.2014), vol.56, no.3, page 321	1-14, 29-48

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/053415

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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.: 24-28  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 24-28 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search.
2.  Claims Nos.:  
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:
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 No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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 and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 5 3 4 1 5	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K38/00(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P13/12(2006.01)i, C07K14/435(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K38/00, A61K31/7088, A61K48/00, A61P13/12, C07K14/435, C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2015年 日本国実用新案登録公報 1996-2015年 日本国登録実用新案公報 1994-2015年			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X	WO 2013/162021 A1 (大日本住友製薬株式会社) 2013.10.31, 全文、特に、請求の範囲 (ファミリーなし)	31-36	
X	WO 2011/145725 A1 (宮崎徹) 2011.11.24, 全文、特に、請求の範囲、段落 [0014] & EP 2573192 A1	15-18, 22, 23	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 06.03.2015		国際調査報告の発送日 24.03.2015	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 長岡 真	4U 5277
		電話番号 03-3581-1101 内線 3439	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2015/053415
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	守山敏樹： 「メタボリック症候群とCKD」 Medical Practice, 2011, vol.28, No.6, pp.1033-1037 全文	18-21, 23
A	浦松正ら： 「脳卒中自然発症高血圧ラット (SHRSP) 腎における浸潤マクロファージとAIMの関連」 日本腎臓学会誌, 2008, vol.50, No.3, p.362 P-263 欄	1-14, 19-21, 29, 30, 37-48
A	WO 2011/145723 A1 (宮崎徹) 2011.11.24, 全文、特に、請求の範囲 & US 2013/0115220 A1 & EP 2572730 A1 & CN 103648531 A	1-14, 19-21, 29, 30, 37-48
A	ARAI, S. et al. : “Obesity-Associated Autoantibody Production Requires AIM to Retain the Immunoglobulin M Immune Complex on Follicular Dendritic Cells” Cell Reports, 2013, vol.3, pp.1187-1198 全文、特に、Summary、第1187頁左欄第30行-第1188頁左欄第18行	1-14, 19-21, 29, 30, 37-48
A	JP 2001-523264 A (クリエイティブ バイオモレキュールズ、インコーポレイテッド) 2001.11.20, 全文、特に、特許請求の範囲、第23頁第8-13行、実施例3 & US 2010/0105621 A1 & US 2011/0257093 A1 & EP 980252 A & WO 1998/050060 A1	1-14, 19-21, 29, 30, 37-48
P, X	北田研人ら： 「Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) は、尿細管壊死の除去を促進し、腎障害の修復・再生を誘導する」 日本腎臓学会誌, 2014.05.25, vol.56, No.3, p.321	1-14, 29-48

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2015/053415

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求項 24-28 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項24-28は、治療による人体の処置方法に関するものであって、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2.  請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
C 0 7 H 21/04 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
	C 0 7 H 21/04	Z

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

(74)代理人 100174296  
弁理士 當麻 博文

(74)代理人 100137729  
弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100151301  
弁理士 戸崎 富哉

(72)発明者 宮崎 徹  
東京都文京区春日 2 - 1 2 - 1 2 - 1 0 0 4

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA05 QA19 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55 QR62  
QS25 QS34 QX02  
4C057 BB01 BB05 MM04  
4C084 AA02 AA13 BA44 CA26 NA14 ZA811 ZA812 ZC021 ZC022  
4C086 AA01 AA02 EA01 GA16 MA01 MA04 NA14 ZA81 ZC02

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2015119253A5</a>	公开(公告)日	2018-03-22
申请号	JP2015561061	申请日	2015-02-06
申请(专利权)人(译)	宫崎彻		
[标]发明人	宫崎 徹		
发明人	宫崎 徹		
IPC分类号	A61K38/00 A61K48/00 A61P13/12 A61P43/00 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/15 A61K31/7088 C07H21/04		
CPC分类号	A01K67/0276 A01K2217/075 A01K2227/105 A01K2267/035 A61K31/7088 A61K38/00 A61K38/1761 A61P13/12 A61P43/00 C07K14/435 A61K35/15 A61K48/00 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/53 A01K2267/03 A61K45/06 G01N33/6893 G01N2333/775 G01N2800/347 G01N2800/52		
FI分类号	A61K37/02 A61K48/00.ZNA A61P13/12 A61P43/00.111 C12N15/00.A C12Q1/68.A C12Q1/02 G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/15.Z A61K31/7088 C07H21/04.Z		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4C057/BB01 4C057/BB05 4C057/MM04 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA44 4C084/CA26 4C084/NA14 4C084/ZA811 4C084/ZA812 4C084/ZC021 4C084/ZC022 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA01 4C086/GA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA81 4C086/ZC02		
代理人(译)	高岛肇 当麻 博文		
优先权	2014022041 2014-02-07 JP		
其他公开文献	JPWO2015119253A1 JP6460483B2		

#### 摘要(译)

本发明提供了用于肾脏疾病的预防/治疗剂，其在AIM表达缺陷的非人类哺乳动物中包含AIM或其部分肽或包含编码它们的核苷酸序列的核酸，或单侧输尿管结扎或瞬时。提供了一种使用通过进行肾脏缺血-再灌注获得的动物来筛选用于肾脏疾病的预防/治疗剂的方法。