

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公開特許公報** ( A ) (11)特許出願公開番号

特開2003 - 304874

(P2003 - 304874A)

(43)公開日 平成15年10月28日(2003.10.28)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00		A 6 1 P 7/02	4 B 0 2 4
A 6 1 P 7/02		C 0 7 K 16/40	4 B 0 5 0
C 0 7 K 16/40		C 1 2 N 9/48	4 B 0 6 3
C 1 2 N 9/48		C 1 2 Q 1/02	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 請求項の数 18 O L (全 28数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2002 - 111241(P2002 - 111241)

(22)出願日 平成14年4月12日(2002.4.12)

(71)出願人 591108880

国立循環器病センター総長

大阪府吹田市藤白台5丁目7番1号

(72)発明者 宮田 敏行

大阪府吹田市古江台3 - 13 - 3 - 801

(72)発明者 小亀 浩市

大阪府吹田市青山台3 - 50 D12 - 106

(72)発明者 松本 雅則

奈良県橿原市見瀬町2305 - 1

(72)発明者 藤村 吉博

奈良県奈良市菅原町133 - 1

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志 (外 1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 血栓形成傾向素因の検査方法

(57)【要約】

【課題】 本発明の目的は、血栓形成傾向素因の検査方法、並びに血栓形成傾向の治療に有用な化合物のスクリーニング方法の提供を課題とする。

【解決手段】 VWF切断酵素の活性低下の原因となるADA MTS13遺伝子の多型を検出する工程を含む、血栓形成傾向素因の検査方法が提供された。この検査方法により、血栓性血小板減少性紫斑病素因等の検査が可能となる。血栓性血小板減少性紫斑病は、抗血小板医薬剤の投与に起因する副作用として重要な疾患である。その素因の検査は、抗血小板医薬剤の安全性の向上に貢献する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 被検者から生体試料を採取し、該試料を解析してVWF切断酵素の活性低下をもたらすADAMTS13遺伝子のエキソン12における多型を検出する工程を含む、血栓形成傾向素因の検査方法。

【請求項2】 多型が、配列番号：1に記載の塩基配列中、1867位における多型である請求項1に記載の検査方法。

【請求項3】 多型が、配列番号：2に記載のアミノ酸配列中、475位のプロリンをセリンに変異させる多型である請求項2に記載の検査方法。

【請求項4】 多型が、配列番号：1に記載の塩基配列中、1867位のcからtへの置換である、請求項3に記載の検査方法。

【請求項5】 次の工程(a)~(c)を含む、血栓形成傾向素因の検査方法。

(a)被検者から生体試料を採取する工程、(b)生体試料中に含まれるゲノムDNA、mRNA、およびそれらの増幅産物のいずれかを、配列番号：1に記載の塩基配列中、1867位のcに相当する塩基がtに置換された塩基配列を含む領域にハイブリダイズするプローブとハイブリダイズ可能な条件下で接触させる工程、および(c)工程(b)におけるプローブのハイブリダイズを血栓形成傾向素因と関連付ける工程

【請求項6】 次の工程(a')~(c')を含む、請求項5に記載の検査方法。

(a')被検者から生体試料を採取する工程、(b')生体試料中に含まれるゲノムDNA、mRNA、およびそれらの増幅産物のいずれかを、配列番号：1に記載の塩基配列中、1867位のcに相当する領域にハイブリダイズするプローブとハイブリダイズ可能な条件下で接触させる工程、および(c')工程(b)および(b')におけるプローブのハイブリダイズを血栓形成傾向素因と関連付ける工程

【請求項7】 次の工程(a)~(c)を含む、血栓形成傾向素因の検査方法。

(a)被検者から生体試料を採取する工程、(b)生体試料中に含まれる、配列番号：2に記載のアミノ酸配列中、475位のプロリンがセリンに変異したアミノ酸配列を含む蛋白質を検出する工程、および(c)475位のプロリンがセリンに変異した蛋白質の存在を血栓形成傾向素因と関連付ける工程

【請求項8】 次の工程(a')~(c')を含む、請求項7に記載の検査方法。

(a')被検者から生体試料を採取する工程、(b')生体試料中に含まれる、配列番号：2に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を検出する工程、および(c')475位のプロリンがセリンに変異した蛋白質、および配列番号：2に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質の存在を血栓形成傾向素因と関連付ける工程

【請求項9】 配列番号：1に記載の塩基配列中、1867位のcに相当する領域を含む塩基配列からなるDNA、またはその相補鎖にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチドを含む、血栓形成傾向素因の検査試薬。

【請求項10】 配列番号：1に記載の塩基配列中、1867位のcに相当する領域を含む塩基配列からなるDNAをPCR法によって増幅するためのプライマーセットを含む、血栓形成傾向素因の検査試薬。

【請求項11】 配列番号：2に記載のアミノ酸配列中、475位のプロリンがセリンに変異したアミノ酸配列を含む蛋白質に結合する抗体を含む、血栓形成傾向素因の検査試薬。

【請求項12】 配列番号：2に記載のアミノ酸配列中、475位のプロリンがセリンに変異したアミノ酸配列を含む蛋白質を、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と免疫学的に識別する抗体。

【請求項13】 次の工程(a)~(d)を含む、被験化合物のVWF切断酵素活性を上昇させる作用を評価する方法。

(a)配列番号：2に記載のアミノ酸配列中、475位のプロリンがセリンに変異したアミノ酸配列を含む蛋白質および/または該蛋白質を発現する細胞を提供する工程、(b)前記蛋白質および/または細胞に対し被験化合物を接触させる工程、および(c)被験化合物を接触させた前記蛋白質および/または細胞におけるVWF切断酵素活性を検出し、被験化合物のVWF切断酵素活性を上昇させる作用と関連付ける工程

【請求項14】 次の工程(1)~(2)を含む、被験化合物のVWF切断酵素活性を上昇させる医薬品候補化合物のスクリーニング方法。

(1)請求項13に記載の方法によって、被験化合物のVWF切断酵素活性を上昇させる作用を評価する工程、および(2)(1)で評価された作用が、被験化合物を接触させない場合の活性と比較して大きい被験化合物を選択する工程

【請求項15】 請求項14に記載のスクリーニング方法によって選択された化合物を含む、配列番号：2に記載のアミノ酸配列中、475位のプロリンのセリンへの変異を含むVWF切断酵素の活性促進剤。

【請求項16】 請求項14に記載のスクリーニング方法によって選択された化合物、および血栓形成傾向を誘導する薬剤を含む、血栓形成傾向の副作用が軽減された抗血小板医薬組成物。

【請求項17】 配列番号：3に記載された塩基配列の蛋白質コード領域を含むポリヌクレオチド。

【請求項18】 次の(A)または(B)に記載の蛋白質。

(A)配列番号：4に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質

(B)配列番号：4に記載のアミノ酸配列から選択され、475位のセリンを含み、かつ連続した少なくとも7アミノ酸からなるアミノ酸配列を含む蛋白質

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、血栓形成傾向(thrombophilia)素因を検査する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】血栓性血小板減少性紫斑病(thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP)は、血小板減少、溶血性貧血、動揺性精神神経障害などを特徴とする症候群である。かつては約80%の患者が3ヶ月以内に死亡する予後不良の疾患であった。現在では血漿交換によって、予後が大幅に改善されるようになっている。

【0003】最近、TTPの病因としてvon Willebrand因子(VWF)切断酵素活性の低下が報告された。すなわち、後天性のTTPは、VWF切断酵素に対するIgG型インヒビターが産生されることによって酵素活性が低下することが原因であることが明らかにされた(Furlan M., et al., New Engl. J. Med. 339,1578-1584,1998; Tsai H-M., et al., New Engl. J. Med.339,1585-1594,1988)。また先天的なTTPであるUpshaw-Schulman症候群(USS)では、遺伝的にVWF切断酵素が欠損していることが判明した(Kinoshita S. et al., Int. J. Hematol.74,101-108,2001)。

【0004】更に、VWF切断酵素をコードする遺伝子は、ADAMTS13であることが判明した(Soejima K. et al., J Biochem.130,475-480,2001; Zheng X. et al., J. Biol. Chem.276,41059-41063,2001)。またUSS患者と、ADAMTS13遺伝子におけるスプライシングの異常や塩基の欠失等の遺伝子異常との関連が報告された(Levy GG. et al. Nature,413,488-494,2001)。この報告では、ADAMTS13遺伝子におけるSNPsの存在も明らかにされている。しかしSNPsと何らかの疾患を結びつける知見は得られていない。

【0005】一方、血栓症には、USSのような先天性の疾患のみならず、様々な要因で誘導される後天的な疾患も知られている。たとえば抗血小板性の薬剤の投与が、血栓症の副作用をもたらすことが知られている。塩酸チクロピジン、血管手術や虚血性脳血管障害等に伴う血栓・塞栓の治療や慢性動脈閉塞症に伴う症状の改善などに使用されている抗血小板剤である。副作用としてTTPが伴う可能性があるため、同剤の投与には注意が必要とされている。

【0006】より副作用の少ない抗血小板剤としてクロピトグレルが開発されている。しかし、このような新しい薬剤においても、副作用の危険性を無視することはできない。また、副作用であるTTPの危険性を予測することができれば、塩酸チクロピジンのような薬剤であっても安全に使用することができる。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、血栓形成傾向素因の検査方法、および血栓形成傾向素因を改善することができる化合物のスクリーニング方法の提供を課題とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、血栓形成傾向に関連する遺伝的な素因を明らかにすれば、血栓を伴う様々な疾患の危険性の予測、あるいは予防が可能になると考えた。たとえば抗血小板剤の副作用であるTTPも、投与される患者の血栓形成傾向を予め知ることができれば、未然に防止できるのではないかと考えた。

【0009】そして血栓形成傾向素因の指標を幅広く探索した結果、ADAMTS13遺伝子の多型と、血栓形成傾向素因の関連性を見出した。そして、ADAMTS13遺伝子の多型を指標として、血栓形成傾向を検査できることを明らかにして本発明を完成した。すなわち本発明は、以下の検査方法、およびスクリーニング方法に関する。

〔1〕被検者から生体試料を採取し、該試料を解析してVWF切断酵素の活性低下をもたらすADAMTS13遺伝子のエキソン12における多型を検出する工程を含む、血栓形成傾向素因の検査方法。

〔2〕多型が、配列番号：1に記載の塩基配列中、1867位における多型である〔1〕に記載の検査方法。

〔3〕多型が、配列番号：2に記載のアミノ酸配列中、475位のプロリンをセリンに変異させる多型である〔2〕に記載の検査方法。

〔4〕多型が、配列番号：1に記載の塩基配列中、1867位のcからtへの置換である、〔3〕に記載の検査方法。

〔5〕次の工程(a)~(c)を含む、血栓形成傾向素因の検査方法。

(a)被検者から生体試料を採取する工程、(b)生体試料中に含まれるゲノムDNA、mRNA、およびそれらの増幅産物のいずれかを、配列番号：1に記載の塩基配列中、1867位のcに相当する塩基がtに置換された塩基配列を含む領域にハイブリダイズするプローブとハイブリダイズ可能な条件下で接触させる工程、および(c)工程(b)におけるプローブのハイブリダイズを血栓形成傾向素因と関連付ける工程

〔6〕次の工程(a')~(c')を含む、〔5〕に記載の検査方法。

(a')被検者から生体試料を採取する工程、(b')生体試料中に含まれるゲノムDNA、mRNA、およびそれらの増幅産物のいずれかを、配列番号：1に記載の塩基配列中、1867位のcに相当する領域にハイブリダイズするプローブとハイブリダイズ可能な条件下で接触させる工程、および(c')工程(b)および(b')におけるプローブのハイブリダイズを血栓形成傾向素因と関連付ける工程

〔7〕次の工程(a)~(c)を含む、血栓形成傾向素因の

検査方法。

(a) 被検者から生体試料を採取する工程、(b) 生体試料中に含まれる、配列番号：2に記載のアミノ酸配列中、475位のプロリンがセリンに変異したアミノ酸配列を含む蛋白質を検出する工程、および(c) 475位のプロリンがセリンに変異した蛋白質の存在を血栓形成傾向素因と関連付ける工程

〔8〕次の工程(a')~(c')を含む、〔7〕に記載の検査方法。

(a') 被検者から生体試料を採取する工程、(b') 生体試料中に含まれる、配列番号：2に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を検出する工程、および(c') 475位のプロリンがセリンに変異した蛋白質、および配列番号：2に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質の存在を血栓形成傾向素因と関連付ける工程

〔9〕配列番号：1に記載の塩基配列中、1867位のcに相当する領域を含む塩基配列からなるDNA、またはその相補鎖にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチドを含む、血栓形成傾向素因の検査試薬。

〔10〕配列番号：1に記載の塩基配列中、1867位のcに相当する領域を含む塩基配列からなるDNAをPCR法によって増幅するためのプライマーセットを含む、血栓形成傾向素因の検査試薬。

〔11〕配列番号：2に記載のアミノ酸配列中、475位のプロリンがセリンに変異したアミノ酸配列を含む蛋白質に結合する抗体を含む、血栓形成傾向素因の検査試薬。

〔12〕配列番号：2に記載のアミノ酸配列中、475位のプロリンがセリンに変異したアミノ酸配列を含む蛋白質を、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と免疫学的に識別する抗体。

〔13〕次の工程(a)~(d)を含む、被験化合物のVWF切断酵素活性を上昇させる作用を評価する方法。

(a) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列中、475位のプロリンがセリンに変異したアミノ酸配列を含む蛋白質および/または該蛋白質を発現する細胞を提供する工程、(b) 前記蛋白質および/または細胞に対し被験化合物を接触させる工程、および(c) 被験化合物を接触させた前記蛋白質および/または細胞におけるVWF切断酵素活性を検出し、被験化合物のVWF切断酵素活性を上昇させる作用と関連付ける工程

〔14〕 次の工程(1)~(2)を含む、被験化合物のVWF切断酵素活性を上昇させる医薬品候補化合物のスクリーニング方法。

(1) 〔13〕に記載の方法によって、被験化合物のVWF切断酵素活性を上昇させる作用を評価する工程、および(2) (1)で評価された作用が、被験化合物を接触させない場合の活性と比較して大きい被験化合物を選択する工程

〔15〕〔14〕に記載のスクリーニング方法によって選択された化合物を含む、配列番号：2に記載のアミノ酸配列中、475位のプロリンのセリンへの変異を含むVWF切断酵素の活性促進剤。

〔16〕〔14〕に記載のスクリーニング方法によって選択された化合物、および血栓形成傾向を誘導する薬剤を含む、血栓形成傾向の副作用が軽減された抗血小板医薬組成物。

〔17〕配列番号：3に記載された塩基配列の蛋白質コード領域を含むポリヌクレオチド。

〔18〕次の(A)または(B)に記載の蛋白質。

(A) 配列番号：4に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質

(B) 配列番号：4に記載のアミノ酸配列から選択され、475位のセリンを含み、かつ連続した少なくとも7アミノ酸からなるアミノ酸配列を含む蛋白質

【0010】

【発明の実施の形態】本発明は、被検者から生体試料を採取し、該試料を解析してVWF切断酵素の活性低下をもたらしADAMTS13遺伝子のエキソン12における多型を検出する工程を含む、血栓形成傾向素因の検査方法に関する。

【0011】本発明において、血栓形成傾向(thrombophilia)とは、血栓を形成しやすい状態にあることを意味する。血栓を生じやすい状態とは、言い換えれば、血栓による疾患のリスクが高まった状態とも言うことができる。また血栓形成傾向素因(thrombophilic diathesis)とは、正常なヒトとの比較において、遺伝的に血栓を生じやすい体質を言う。血栓形成傾向素因は、特定の条件下において、血栓を生じやすい場合を含む。したがって、一般的な条件下では血栓の形成傾向に差が無いが、特定の薬剤の投与に伴って、血栓形成のリスクが高まる個体は、血栓形成傾向を有すると言うことができる。

【0012】本発明者らにより、ADAMTS13遺伝子を構成する特定のエキソンにおける多型が、血栓形成傾向素因を決定していることが明らかにされた。ADAMTS13遺伝子の構造は既に明らかにされている(GenBank Accession No. AB069698)。また、ADAMTS13遺伝子の欠損がUSSの原因であることも知られている。更に、ADAMTS13遺伝子の多型についての報告もある。たとえばLevyは、1、4、5、6、12、15、16、18、19、21、23、24、あるいは29の各エキソンにSNPsがあることを報告した(Levy GG.et al. Nature, 413, 488-494, 2001)。しかしこれらのSNPsと、血栓形成傾向素因の関連は知られていない。

【0013】これらの既知の知見に対して、本発明者らは、エキソン12の多型が血栓形成傾向と密接に関連していることを見出した。更に本発明者らは、エキソン12の多型がVWF切断酵素の活性に大きな影響を与えることを明らかにした。VWF切断酵素の活性は、血栓の形成

と溶解に深く関わっている。つまり、エキソン12における多型は、個人の血栓形成傾向素因を左右する重要な要因であることが、本発明者らによって確認された。

【0014】ADAMTS13遺伝子は、配列番号：1に示した塩基配列を有する遺伝子である。この遺伝子は、配列番号：2に記載のアミノ酸配列をコードしている。ADAMTS13遺伝子は、全体で29のエキソンで構成されていると考えられている。本発明者らは、このうちのエキソン12に、VWF切断酵素の活性を低下させる原因となる多型が存在することを明らかにした。配列番号：1の塩基配列中、1753-1879の127塩基からなる塩基配列が、ADAMTS13遺伝子のエキソン12に相当する。エキソン12を構成する塩基配列と、その塩基配列によってコードされているアミノ酸配列を図1に示した。なお図1は、1867位のcがtとなり、対応するコドンがセリンである多型の塩基配列、およびアミノ酸配列を示している。

【0015】多型とは、遺伝学的には、人口中1%以上の頻度で存在している1遺伝子におけるある塩基の変化と一般的には定義される。しかしながら、本発明の「多型」はこの定義に制限されず、頻度が1%未満の塩基の変化であっても「多型」に含む。本発明における多型の種類は制限されない。具体的には、例えば、一塩基多型(SNPs)や、あるいは数十塩基が欠失、置換あるいは挿入されている多型等を示すことができる。さらに、多型部位の数についても特に制限されない。したがって複数の多型を検査の対象とすることができる。

【0016】ある多型がVWF切断酵素の酵素活性を低下させていることは、配列番号：1に示す塩基配列(野生型)の特定の塩基を変化させた遺伝子改変体の発現産物のVWF切断酵素活性を野生型と比較することによって確認することができる。特定の塩基を置換、欠失、付加、あるいは挿入して遺伝子改変体を得る方法は公知である。たとえば、変異させた塩基配列を含むプライマーを利用したPCRにより、配列番号：1からなる野生型の塩基配列の特定の部位に変異を与えることができる。あるいは、ADAMTS13遺伝子型が明らかになっている被検者から採取された血漿のVWF切断酵素活性を正常人と比較することによっても、VWF切断酵素活性に与える多型の影響を確認することができる。

【0017】遺伝子改変体は、適当な発現ベクターに組み込んで、蛋白質として発現させることができる。あるいは、in vitroにおいて、蛋白質に翻訳する技術も確立されている。発現生成物は、その酵素活性を評価することができる限り、精製する必要はない。あるいは、発現生成物にタグを付加しておいて、精製を容易にすることもできる。得られた、遺伝子改変体によってコードされたアミノ酸配列からなる蛋白質のVWF切断酵素活性を調べれば、その変異の酵素活性に及ぼす影響を評価することができる。

【0018】VWF切断酵素活性を評価する方法は公知で

ある。たとえば、実施例に示した方法(Kinoshita et al., Kinoshita S. et al., Int. J. Hematol.74,101-108,2001)により、VWF切断酵素活性を測定することができる。

【0019】この方法は、in vitroでVWFを切断させ、その断片をVWFに対する抗体で検出するという原理に基づいている。測定に必要なVWFやその抗体の調製方法は公知である。たとえばこの検査に使用するVWFの精製方法は公知である(藤村吉博、他、日本血栓止血学会雑誌、10(4):278-284,1999)。また、抗VWF抗体は市販されている。

【0020】こうして特定された、エキソン12におけるVWF切断酵素の活性を低下させる多型は、本発明における血栓形成傾向素因の指標とすることができる。エキソン12は、VWF切断酵素活性を決定する重要な領域に相当している。したがって、このエキソンにおけるVWF切断酵素の活性を低下させる多型は、血栓形成傾向素因の重要な指標である。本発明において血栓形成傾向素因の指標とすべき多型として、配列番号：1に示すADAMTS13遺伝子の塩基配列(野生型)中、1867位(c)における多型を示すことができる。

【0021】1867位(c)における多型は、血栓形成傾向素因と密接に関連していた。特に、1867位のcがtに変異する場合、この変異は1867位を含むコドン(プロリン)をセリン(P475S)へと変異させる原因となる(図1)。VWF切断酵素におけるP475S変異は、酵素活性の低下をもたらし、その結果、血栓形成傾向素因が誘導されることになる。日本人364人のADAMTS13遺伝子の解析の結果、遺伝子型は次のとおりであった。したがって、日本人におけるTアレルの頻度は5.1%ということになる。  
CC: 328人  
CT: 35人  
TT: 1人

【0022】本発明において、多型の検出とは、遺伝子型の特定を含む。すなわち本発明は、前記指標とする多型について、被験者がホモであるのかヘテロであるのかを解析し、その結果を血栓形成傾向素因と関連付ける工程を含む、検査方法に関する。

【0023】たとえば上記の1867位(c)における多型を指標とする場合には、この部位における塩基がtであるとき、被験者は血栓形成傾向素因を有すると判断される。同じ被験者について、この部位における塩基としてcも検出されれば、その被験者が野生型アレルを有していることを知ることができる。つまりこの被験者は、血栓形成傾向素因をヘテロで有すると結論つけられる。このような被験者は、tをホモで有する場合と比較して、血栓形成傾向が弱いと考えられる。このように、遺伝子型を明らかにすることにより、血栓形成傾向素因を、より定量的に予測することができる。

【0024】本発明の検査方法において、ADAMTS13遺伝

子に生じた多型は、例えば、被検者のADAMTS13遺伝子の塩基配列を直接決定することにより検出することができる。具体的には、まず、被検者からDNA試料を調製する。DNA試料は、例えば被検者の末梢白血球、肝臓、腎臓、副腎、脳、子宮等の組織または細胞から抽出した染色体DNA、あるいはRNAを基に調製することができる。次いで、ADAMTS13遺伝子を含むDNAを単離する。該DNAの単離は、ADAMTS13遺伝子にハイブリダイズするプライマーを用いて、染色体DNA、あるいはRNAを鋳型としたPCR等によって行うこともできる。本方法においては、次いで、単離したDNAの塩基配列を決定する。単離したDNAの塩基配列は、当業者に公知の方法で決定することができる。

【0025】本方法においては、次いで、決定したDNAの塩基配列を、対照と比較する。本方法における対照とは、正常な(野生型)ADAMTS13遺伝子の塩基配列を言う。たとえばGenBankに野生型として登録されているADAMTS13遺伝子の塩基配列(AB069698)と比較してもよい。このような比較の結果、被検者のADAMTS13遺伝子の配列において、指標とすべき多型が見出された場合には、被検者は血栓形成傾向素因を有すると判定される。

【0026】本発明の検査方法は、直接被検者由来のDNAの塩基配列を決定する方法以外に、多型の検出が可能な種々の方法によって行うことができる。例えば、本発明における多型の検出は、以下のような方法によっても行うことができる。まず、被検者からDNA試料を調製する。次いで、調製したDNA試料を制限酵素により切断する。次いで、DNA断片をその大きさに応じて分離する。そして検出されたDNA断片の大きさを、対照と比較する。

【0027】また、他の一つの態様においては、まず、被検者からDNA試料を調製する。次いで、ADAMTS13遺伝子を含むDNAを増幅する。さらに、増幅したDNAを制限酵素により切断する。次いで、DNA断片をその大きさに応じて分離する。次いで、検出されたDNA断片の大きさを対照と比較する。このような方法としては、例えば、制限酵素断片長多型(Restriction Fragment Length Polymorphism/RFLP)を利用した方法やPCR-RFLP法等が挙げられる。具体的には、制限酵素の認識部位に変異が存在する場合、あるいは制限酵素処理によって生じるDNA断片内に塩基挿入または欠失がある場合、制限酵素処理後に生じる断片の大きさが対照と比較して変化する。この変異を含む部分をPCR法によって増幅し、それぞれの制限酵素で処理することによって、これらの変異を電気泳動後のバンドの移動度の差として検出することができる。

【0028】あるいは、染色体DNAをこれらの制限酵素によって処理し、電気泳動した後、本発明のプロープDNAを用いてサザンブロットングを行うことにより、変異の有無を検出することができる。用いられる制限酵素

は、それぞれの変異に応じて適宜選択することができる。この方法では、ゲノムDNA以外にも被検者から調製したRNAを逆転写酵素でcDNAにし、これをそのまま制限酵素で切断した後、サザンブロットングを行うことも可能である。また、このcDNAを鋳型としてPCRでADAMTS13遺伝子を含むDNAを増幅し、それを制限酵素で切断した後、移動度の差を調べることも可能である。

【0029】さらに別の方法は、まず、被検者から調製したADAMTS13遺伝子を含むDNA、および該DNAとハイブリダイズするヌクレオチドプローブが固定された基板とを用意する。次いで、該DNAと該基板を接触させる。さらに、基板に固定されたヌクレオチドプローブにハイブリダイズしたDNAを検出することにより、ADAMTS13遺伝子多型を検出する。

【0030】このような方法としては、DNAアレイ法(SNP遺伝子多型の戦略、松原謙一・榊佳之、中山書店、p128-135)が例示できる。被検者からのADAMTS13遺伝子を含むDNA試料の調製は、当業者に周知の方法で行うことができる。該DNA試料の調製の好ましい態様においては、例えば被検者の末梢白血球、肝臓、腎臓、副腎、脳、子宮等の組織または細胞から抽出した染色体DNAを基に調製することができる。染色体DNAから本方法のDNA試料を調製するには、例えばADAMTS13遺伝子を含むDNAにハイブリダイズするプライマーを用いて、染色体DNAを鋳型としたPCR等によってADAMTS13遺伝子を含むDNAを調製することも可能である。調製したDNA試料には、必要に応じて、当業者に周知の方法によって検出のための標識を施すことができる。

【0031】本発明において「基板」とは、ヌクレオチドを固定することが可能な板状の材料を意味する。本発明においてヌクレオチドには、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドが含まれる。本発明の基板は、ヌクレオチドを固定することが可能であれば特に制限はないが、一般にDNAアレイ技術で使用される基板を好適に用いることができる。一般にDNAアレイは、高密度に基板にプリントされた何千ものヌクレオチドで構成されている。通常これらのDNAは非透過性(non-porous)の基板の表層にプリントされる。基板の表層は、一般的にはガラスであるが、透過性(porous)の膜、例えばニトロセルロースメンブレンを使用することができる。

【0032】本発明において、ヌクレオチドの固定(アレイ)方法として、Affymetrix社開発によるオリゴヌクレオチドを基本としたアレイが例示できる。オリゴヌクレオチドのアレイにおいて、オリゴヌクレオチドは通常インサイチュ(in situ)で合成される。例えば、photolithographicの技術(Affymetrix社)、および化学物質を固定させるためのインクジェット(Rosetta Inpharmatics社)技術等によるオリゴヌクレオチドのインサイチュ合成法が既に知られており、いずれの技術も本発明の基板の作製に利用することができる。

【0033】基板に固定するヌクレオチドプローブは、ADAMTS13遺伝子の多型を検出することができるものであれば、特に制限されない。即ち該プローブは、例えば、野生型のADAMTS13遺伝子、あるいは多型を有するADAMTS13遺伝子と特異的にハイブリダイズするようなプローブである。特異的なハイブリダイズが可能であれば、ヌクレオチドプローブは、検出するADAMTS13遺伝子を含むDNA、または多型を有するADAMTS13遺伝子に対し、完全に相補的である必要はない。本発明において基板に結合させるヌクレオチドプローブの長さは、オリゴヌクレオチドを固定する場合は、通常10~100bであり、好ましくは10~50bであり、さらに好ましくは15~25bである。

【0034】本発明においては、次いで、該cDNA試料と該基板を接触させる。本工程により、上記ヌクレオチドプローブに対し、DNA試料をハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションの反応液および反応条件は、基板に固定するヌクレオチドプローブの長さ等の諸要因により変動しうるが、一般的に当業者に周知の方法により設定することができる。

【0035】本発明においては、次いで、該DNA試料と基板に固定されたヌクレオチドプローブとのハイブリダイズの有無または強度を検出する。この検出は、例えば、蛍光シグナルをスキャナー等によって読み取ることによって行うことができる。尚、DNAアレイにおいては、一般的にスライドガラスに固定したDNAをプローブといい、一方溶液中のラベルしたDNAをターゲットという。従って、基板に固定された上記ヌクレオチドを、本明細書においてヌクレオチドプローブと記載する。

【0036】上記の方法以外にも、特定位置の変異のみを検出する目的にはアレル特異的オリゴヌクレオチド (Allele Specific Oligonucleotide / ASO) ハイブリダイゼーション法が利用できる。変異が存在すると考えられる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを作製し、これと試料DNAでハイブリダイゼーションを行わせると、変異が存在する場合、ハイブリッド形成の効率が低下する。それをサザンブロット法や、特殊な蛍光試薬がハイブリッドのギャップにインターカレーションすることにより消光する性質を利用した方法、等により検出することができる。

【0037】また、リボヌクレアーゼAミスマッチ切断法による検出も可能である。具体的には、ADAMTS13遺伝子を含むDNAをPCR法等によって増幅し、これをプラスミドベクター等に組み込んだADAMTS13遺伝子cDNA等から調製した標識RNAとハイブリダイゼーションを行う。変異が存在する部分においてはハイブリッドが一本鎖構造となるので、この部分をリボヌクレアーゼAによって切断し、これをオートラジオグラフィ等で検出することによって変異の存在を検出することができる。

【0038】その他の本発明の多型の検出が可能な方法としては、

1)質量分析法による方法 (Griffin TJ and Smith LM, *Trends Biotechnol.* vol.18, pp77-84, (2000))、

2)Taq-Man PCRによる方法 (Livak KJ. *Genet. Anal.* vol.14, pp143-149, (1999)、CYPへの応用例: Hiratsuka M et al., *Biol. Pharm. Bull.* vol.23, pp1131-1135, (2000))、

3)Pyrosequencingによる方法 (Ahmadian A et al., *Anal. Biochem.* vol. 280, pp103-110, (2000))、

4)Invader法による方法 (Lyamichev V et al., *Nat. Biotechnol.* vol. 17, pp292-296, (1999)、メディカルドゥ社発行「遺伝子医学」 vol.4, No.1, pp44-51およびpp68-72 (2000))

を挙げることができる。以上、種々の検出方法を例示したが、これらに限らず、VWF切断酵素活性の低下をもたらすADAMTS13遺伝子のエキソン12における多型の検出を可能にする方法であれば、任意の方法を用いることができる。

【0039】本発明の検査方法は、DNAのみならず、蛋白質の解析によって実施することもできる。本発明において指標とすべき多型は、VWF切断酵素活性の低下をもたらす多型である。このような多型は、通常、アミノ酸配列の変異の原因となる。したがって、このアミノ酸配列の変異を指標として、本発明の検査方法を実施することができる。アミノ酸配列の相違を検出する方法は公知である。

【0040】たとえば、1867位の塩基cにおける多型が本発明における望ましい指標であることは既に述べた。1867位の塩基cは、tへの変異によって、この塩基を含むコドンに対応する475位のアミノ酸をプロリンからセリンに変異させる原因となる。変異によって生じる475位のアミノ酸残基がセリンに変異したアミノ酸配列からなる蛋白質を、抗体によって検出することができる。この変異蛋白質と野生型の蛋白質とは、構造的には1アミノ酸残基の違いを有する。このような微細な違いを識別する抗体を得る方法は公知である。たとえば、475位のアミノ酸残基がセリンに変異したアミノ酸配列からなるオリゴペプチドを合成し、これを免疫原として、この領域を特異的に認識するモノクローナル抗体を得ることができる。得られたモノクローナル抗体の中で、野生型の蛋白質と交差しないものを選択し、本発明の検査方法に利用することができる。

【0041】抗体を使って蛋白質を検出する方法は公知である。たとえば、変異型と野生型の両方に対して結合活性を有する抗体と、変異型に特異的に結合する抗体を組み合わせて、サンドイッチ法を構成することができる。より具体的には、前者を固相抗体に、後者を標識抗体に用いたELISA法により、本発明における指標を検出することができる。抗体を酵素等で標識する方法は公知である。

【0042】本発明における指標を、抗体を用いて検出

する場合にも、遺伝子型を検出することができる。すなわち、変異型の蛋白質と、野生型の蛋白質の、それぞれに特定の抗体を用い、いずれか一方のみが反応する場合をホモ、両方の抗体で反応が観察された場合をヘテロと判定することができる。本発明において、蛋白質の解析によって検査を行う場合には、血液試料や、細胞のライセートが生体試料として用いられる。

【0043】本発明はまた、血栓形成傾向素因を検査するための検査薬を提供する。すなわち本発明は、配列番号：1に記載の塩基配列中、1867位のcに相当する領域を含む塩基配列からなるDNA、またはその相補鎖にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチドを含む、血栓形成傾向素因の検査試薬である。これは遺伝子多型を指標とする検査に使用される。

【0044】該オリゴヌクレオチドは、ADAMTS13遺伝子を含むDNAに特異的にハイブリダイズするものである。ここで「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下（例えば、サムブルックら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 第2版1989に記載の条件）において、他のタンパク質をコードするDNAとクロスハイブリダイゼーションを有意に生じないことを意味する。特異的なハイブリダイズが可能であれば、該オリゴヌクレオチドは、検出するADAMTS13遺伝子の塩基配列に対し、完全に相補的である必要はない。

【0045】該オリゴヌクレオチドは、上記本発明の検査方法におけるプローブやプライマーとして用いることができる。該オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる場合、その長さは、通常15b~100bであり、好ましくは17b~30bである。プライマーは、多型部分を含むADAMTS13遺伝子の少なくとも一部を増幅しうるのであれば、特に制限されない。また、上記オリゴヌクレオチドをプローブとして使用する場合、該プローブは、ADAMTS13遺伝子の1867位の塩基を含む領域に対応するDNAに特異的にハイブリダイズするものであれば、特に制限されない。該プローブは、合成オリゴヌクレオチドであってもよく、通常少なくとも15b以上の鎖長を有する。

【0046】本発明のオリゴヌクレオチドは、例えば市販のオリゴヌクレオチド合成機により作製することができる。プローブは、制限酵素処理等によって取得される二本鎖DNA断片として作製することもできる。本発明のオリゴヌクレオチドをプローブとして用いる場合は、適宜標識して用いることが好ましい。標識する方法としては、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、オリゴヌクレオチドの5'端を<sup>32</sup>Pでリン酸化することにより標識する方法、およびクレノウ酵素等のDNAポリメラーゼを用い、ランダムヘキサマーオリゴヌクレオチド等をプライマーとして<sup>32</sup>P等のアイソトープ、蛍光色素、またはピ

オチン等によって標識された基質塩基を取り込ませる方法（ランダムプライム法等）を例示することができる。

【0047】また、本発明における検査薬の別の態様は、ADAMTS13遺伝子の1867位の塩基を含む領域に対応するDNAとハイブリダイズするヌクレオチドプローブが固定された基板からなる、血栓形成傾向素因の検査薬である。これは遺伝子多型を指標とする検査に使用される。これらの調製方法に関しては、上述の通りである。

【0048】また、本発明における検査薬の別の態様は、ADAMTS13遺伝子の1867位を含む領域に対応するDNAを増幅するように設計されたフォワードプライマー及びリバースプライマーを含む、血栓形成傾向素因の検査用試薬である。プライマーの長さは、通常15bp~100bpであり、好ましくは17bp~30bpである。プライマーは、多型部分を含むADAMTS13遺伝子の少なくとも一部を増幅しうるのであれば、特に制限されない。

【0049】上記の検査試薬においては、有効成分であるオリゴヌクレオチド以外に、例えば、滅菌水、生理食塩水、植物油、界面活性剤、脂質、溶解補助剤、緩衝剤、タンパク質安定剤（BSAやゼラチンなど）、保存剤等が必要に応じて混合されていてもよい。

【0050】上記試薬には、検査に用いられる付加的な要素を組み合わせることもできる。このような要素としては、たとえば以下のようなものを示すことができる。

陰性対照

陽性対照

野生型検出用プローブ

解析手順を記載した指示書

【0051】本発明の検査用試薬は、免疫学的な分析に必要な要素によって構成することもできる。すなわち本発明は、配列番号：2に記載のアミノ酸配列中475位のプロリン残基がセリンに変異したアミノ酸配列を含む蛋白質に結合し、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質とは交差反応しない抗体を含む、血栓形成傾向素因の検査試薬に関する。

【0052】本発明はまた、配列番号：2に記載のアミノ酸配列中475位のプロリン残基がセリンに変異したアミノ酸配列を含む蛋白質に結合し、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質とは交差反応しない抗体に関する。本発明において、抗体が、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質とは交差反応しないとは、この抗体が野生型の蛋白質とは実質的に反応しないことを言う。より具体的には、たとえば、変異蛋白質との結合が観察されるのと同じ条件下において、野生型の蛋白質との結合が検出限界に満たないとき、その抗体は野生型の蛋白質とは実質的に反応しないと言うことができる。

【0053】このような抗体は、先に述べたように、配列番号：2に記載のアミノ酸配列中475位のプロリン残基がセリンに変異したアミノ酸配列を含む、オリゴペ

プチドを免疫原として得ることができる。免疫原は、通常、適当なキャリアー蛋白質に結合し、更にアジュバントに懸濁させて動物に免疫される。キャリアー蛋白質としては、キーホールリンペットヘモシアニンなどが用いられる。

【0054】抗体がモノクローナル抗体であれば、免疫原として用いたオリゴペプチドや、変異型の蛋白質を固定化したプレートを使ったELISA法によって、変異型蛋白質に結合するモノクローナル抗体をスクリーニングすることができる。更に、変異型蛋白質に対する結合活性を有する抗体の中から、野生型の蛋白質に対して交差しないものを選択すれば、本発明のモノクローナル抗体を得ることができる。

【0055】また本発明は、次の工程(a) - (d)を含む、被験化合物の、塩基の置換によって活性が低下したVWF切断酵素の酵素活性を上昇させる作用を評価する方法を提供する。

(a) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列中、475位のプロリンがセリンに変異したアミノ酸配列を含む蛋白質および/または該蛋白質を発現する細胞を提供する工程、(b) 前記蛋白質および/または細胞に対し被験化合物を接触させる工程、(c) 被験化合物を接触させた前記蛋白質および/または細胞におけるVWF切断酵素活性を検出する工程、および(d) 被験化合物を接触させた前記蛋白質および/または細胞におけるVWF切断酵素活性を検出し、被験化合物のVWF切断酵素活性を上昇させる作用と関連付ける工程

【0056】前記評価方法において、工程(c)で検出される酵素活性が、被験化合物を接触させなかった対照と比較して差が見られた場合、この差は、当該化合物の(a)に記載の蛋白質のVWF切断酵素活性に対する作用と関連付けることができる。すなわち、対照と比較して(c)で検出される酵素活性が対照と比較して大きい場合、その大きさは、当該化合物の(a)に記載の蛋白質のVWF切断酵素活性を上昇させる作用のレベルを示している。

【0057】複数の化合物の間で前記(a) - (c)の工程を行って、化合物間で前記作用の大きさを比較することもできる。更に、特定の化合物の作用を基準として、より大きな作用を有する化合物を同定することもできる。本発明の評価方法は、配列番号：2に記載のアミノ酸配列中、475位のプロリンがセリンに変異したアミノ酸配列を含む蛋白質の活性を上昇させる化合物のスクリーニング方法に有用である。

【0058】また本発明は、次の工程(1) ~ (2)を含む、被験化合物のVWF切断酵素活性を上昇させる医薬品候補化合物のスクリーニング方法に関する。

(1) 前記工程(a) - (d)を含む被験化合物の、塩基の置換によって活性が低下したVWF切断酵素の酵素活性を上昇させる作用を評価する方法によって、被験化合

物のVWF切断酵素活性を上昇させる作用を評価する工程、および(2)(1)で評価された作用が、被験化合物を接触させない場合の活性と比較して大きい被験化合物を選択する工程

【0059】配列番号：2に記載のアミノ酸配列中、475位のプロリンがセリンに変異したアミノ酸配列を含む蛋白質は、塩基の置換によってもたらされた、VWF切断酵素活性が低下した変異体である。当該変異体の酵素活性を上昇させる活性を有する化合物は、血栓形成傾向素因を有する患者の、血栓形成傾向を改善するための薬剤として有用である。本発明は、当該変異体が血栓形成傾向素因の原因となっていることを見出した。したがって、当該変異体の活性の制御によって、血栓形成傾向素因の治療が実現することは、本発明によってもたらされた新規な知見である。

【0060】本発明の評価方法、あるいはスクリーニング方法は、VWF切断酵素の酵素活性を指標とする方法である。本方法においては、まず、配列番号：2に記載のアミノ酸配列において、475位のプロリンがセリンに変異したアミノ酸配列からなる蛋白質、および/またはこの蛋白質を発現する細胞を発現する細胞に、被験化合物を接触させる。用いられる「細胞」の由来としては、例えば、ヒト、サル、マウス、ラット、ウシ、ブタ、イヌ等に由来する細胞が挙げられるが、これらの由来に制限されない。

【0061】このような細胞としては、前記蛋白質をコードする遺伝子が導入され、該遺伝子が発現している細胞を利用することができる。たとえば配列番号：1に記載の塩基配列中、そのコード領域を含み、1867位のcに相当する塩基がtに置換された遺伝子を導入した細胞は、本発明の評価方法、あるいはスクリーニング方法に用いることができる。このような細胞は、通常、該遺伝子が挿入された発現ベクターを宿主細胞へ形質転換することにより作製することができる。該発現ベクターは、一般的な遺伝子工学技術によって作製することができる。

【0062】あるいはこうして得られた形質転換細胞が発現する前記蛋白質を精製して本発明の評価方法、あるいはスクリーニング方法に用いることができる。形質転換細胞、あるいはその培養上清から、発現生成物を精製する方法は公知である。まず形質転換体を、導入した変異体をコードする遺伝子が発現可能な条件下で培養する。次いで、たとえば、プロテアーゼ阻害剤などのたんぱく質保護剤の存在下で形質転換体を破碎し、塩析などによって蛋白質を分取する。得られた蛋白質画分は、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、各種アフィニティクロマトグラフィー等の精製技術を使って精製することができる。変異体蛋白質に、更に親和性を有するタグを付加した蛋白質を発現させれば、このタグを利用したアフィニティ精製を利用することもできる。

【0063】また本方法に用いる被験化合物としては、例えば、天然化合物、有機化合物、無機化合物、タンパク質、ペプチドなどの単一化合物、並びに、化合物ライブラリー、遺伝子ライブラリーの発現産物、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産物、海洋生物抽出物、植物抽出物等を挙げることができる。

【0064】475位のアミノ酸残基がセリンであるVWF切断酵素変異体、またはそれを発現する細胞への被験化合物の「接触」は、通常、該遺伝子を発現する細胞の培養液に被験化合物を添加することによって行うが、この方法に限定されない。たとえば被験化合物が蛋白質の場合には、該蛋白質を発現するDNAベクターを、該細胞へ導入することにより、両者を「接触」させることができる。本発明のスクリーニング方法においては、次いで、該遺伝子の発現産物であるVWF切断酵素の活性を測定する。VWF切断酵素の活性は、たとえば実施例に示したような方法により測定することができる(Kinoshita et al., Int. J. Hematol. 74, 101-108, 2001)。

【0065】次いで、被験化合物の非存在下において測定した場合(対照)と比較して、VWF切断酵素活性を上昇させる化合物を選択する。

【0066】また本発明は、配列番号：3に記載された塩基配列の蛋白質コード領域を含むポリヌクレオチドに関する。本発明のポリヌクレオチドは、配列番号：4に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、あるいはその断片の製造に有用である。あるいは、上記評価方法またはスクリーニング方法に用いるための細胞を得るために用いることができる。

【0067】更に本発明は、次の(A)または(B)に記載の蛋白質に関する。

(A) 配列番号：4に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質

(B) 配列番号：4に記載のアミノ酸配列から選択され、475位のセリンを含み、かつ連続した少なくとも7アミノ酸からなるアミノ酸配列を含む蛋白質

(A)に記載の蛋白質は、実際にヒトにおいて見出されたVWF切断酵素活性の低下の原因となる多型を含むDNAによってコードされた蛋白質である。この蛋白質はVWF切断酵素活性が低下している。この蛋白質を用いて、前記の評価方法やスクリーニング方法により、低下した活性を上昇させる作用を有する化合物を選択することができる。

【0068】また前記(B)の蛋白質は、野生型の蛋白質と変異型の蛋白質を識別し得る抗体を得るための免疫原として有用である。一般に、7アミノ酸を越える連続したアミノ酸配列が、異なる蛋白質の間で一致する可能性はきわめて低い。したがって、前記少なくとも7アミノ酸残基からなる蛋白質は、変異型の蛋白質を識別する抗体の免疫原として有用である。

【0069】本発明のスクリーニングによって得ること

ができる化合物は、その化合物自体、VWF切断酵素活性の促進剤として有用である。本発明のスクリーニング方法により取得される化合物は、その化合物自体を被検者に投与することも可能であるが、一般的に公知の製剤学的方法により製剤化して投与することも可能である。例えば経口投与の場合、錠剤、散剤、カプセル剤、懸濁液剤等、経皮投与の場合、ハップ剤等を示すことができるが、これらに制限されない。投与方法として、投与方法は、治療効果や予防効果を示し得る限り特に制限はなく、例えば経口投与、経皮投与、注射による血中投与等が考えられる。

【0070】これらの化合物がDNAである場合、該DNAを生体内に投与する際には、レトロウイルス、アデノウイルス、センダイウイルスなどのウイルスベクターやリポソーム等の非ウイルスベクター、或いは、naked DNAの形態で利用することができる。投与方法としては、in vivo法およびex vivo法を例示することができる。

【0071】あるいは本発明のスクリーニング方法によって選択された化合物を、副作用として血栓形成傾向をもたらす可能性がある薬剤に配合して、副作用が軽減された医薬品製剤とすることもできる。たとえば、抗血小板性の医薬品には、血栓形成傾向が副作用として現れる場合があることが報告されている。より具体的には、チクロピジン血栓形成傾向素因を有する患者に投与した場合、TTPを引き起こす可能性が指摘されている。TTPは、血栓形成傾向を背景として生じる、血栓性の病態である。したがって、本発明のスクリーニング方法によって得られる化合物を、このような血栓形成の副作用を伴う薬剤に配合することにより、安全性の高い薬剤とすることができる。

【0072】本発明のスクリーニングによって得ることができる化合物の投与量は、患者の年齢、性別、体重および症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該医薬組成物に含有される活性成分の種類などにより異なるが、通常成人一人あたり、一回につき0.1 mgから500 mgの範囲で、好ましくは0.5 mgから20 mgの範囲で投与することができる。しかし、投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量よりも少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を超える投与量が必要な場合もある。

【0073】

【実施例】(1) ADAMTS13遺伝子エキソン12の塩基配列解析

血栓性血小板減少性紫斑病患者家系4名(患者、父、母、姉)、および一般人364名の全血からゲノムDNAを抽出した(クラボウ社の自動核酸精製装置NA-3000を使用)。いずれも当該倫理委員会の承認を得た試料である。これを鋳型に、エキソン12をはさむイントロンの配列から作成した2本のオリゴヌクレオチド5'-TGAGGCCACACCCACATCTTG-3'(配列番号：5)および5'-ATGCCAGA

GCCTGAACCACTT-3' (配列番号: 6) をプライマーとして、Roche社のFastStart Taq DNA polymeraseでPCRを行った。反応条件は、95 /4分、(95 /30秒、60 /30秒、72 /1分)×30サイクル、72 /3分であった。反応産物の塩基配列をアプライドバイオシステムズ社のBigDye Terminator Kitおよび3700 DNA Analyzerで解析した。

【0074】(2) 血漿中VWF切断酵素活性の測定  
上述の血栓性血小板減少性紫斑病患者家系からクエン酸ナトリウム法で血漿を採取した。この血漿10 μlに、終濃度10 μg/mlの精製 von Willebrand因子、10mM BaCl<sub>2</sub> および1 mM phenylmethylsulfonyl fluorideを加えた尿素含有低イオン強度緩衝液(1.5 M尿素、5 mM Tris-HCl、pH 8.0) 90 μlを加えて37 °Cで24時間加温した。その後、SDSアガロース電気泳動を行い、さらにウェスタンブロットによりPVDF膜に転写した。抗von Willebrand因子抗体によりvon Willebrand因子を可視化し、その切断程度を定量評価した(Kinoshita et al., Int. J. Hematol. 74, 101-108, 2001)。

【0075】(3) 結果  
一般人364名の遺伝子解析の結果、127塩基対からなるエキソン12の115位(cDNA全体では1867位)のCがTに変異した多型を見出した。CCホモ接合体を有する者が328名、CTヘテロ接合体を有する者が35名、TTホモ接合体を有する者が1名であった。

【0076】一方、血栓性血小板減少性紫斑病患者家系4名のVWF切断酵素活性は、正常血漿を100%として、患者3%未満(検出限界以下)、父5.6%、母36%、姉30%であった(Kinoshita et al., Int. J. Hematol. 74, 101-108, 2001)。遺伝子解析の結果、患者および両親にはエキソン12以外に責任変異が見出されたが、姉には上述のC/T多型(475位のプロリンからセリンへの変異)がヘテロ接合体として見出されたのみであった。すなわち、活性と併せて考えると、この変異はVWF切断酵素の活性に重大な欠陥をもたらすことがわかった。以上の結果から、一般人の約10%はエキソン12に変異を有し、VWF切断酵素活性が低下していることが示された。

【0077】

【発明の効果】本発明は、血栓形成傾向素因の検査方法を提供した。本発明の検査方法は、血栓形成傾向の原因となるVWF切断酵素の酵素活性の変化の原因となっている多型を指標としているため、この素因を直接的に検出することができる。また、本発明における検査指標は、遺伝子の多型であることから、DNAの解析技術を使って、容易に検出することができる。あるいは、本発明者\*

\*らが見出した多型はアミノ酸配列の変異を伴っていることから、蛋白質の免疫学的な解析によって、血栓形成傾向素因を明らかにすることもできる。

【0078】血栓形成傾向素因を遺伝子の塩基配列や、蛋白質の構造的な相違に基づいて検査できることは、実用上、大きな利点である。たとえば、VWF切断酵素の活性を測定して血栓形成傾向素因と関連付ける方法が可能かもしれない。しかし、VWF切断酵素の活性測定には、基質となる蛋白質や、それを認識する抗体が必要である。そのため日常的な検査方法として採用するには、経済的とは言いにくい。またその操作も煩雑であるため、普及を妨げる要因となる。

【0079】これに対して本発明の検査方法によれば、遺伝子の塩基配列や蛋白質の構造の違いによって、血栓形成傾向素因を検査することができる。遺伝子の塩基配列は、DNAチップやPCR法を使って簡便に、かつ安価に解析することができる。あるいは、蛋白質の構造の違いも、イムノアッセイなどによって、迅速に、かつ安価に解析することができる。このように、特定のエキソンにおける多型と血栓形成傾向素因との間の関連性を特定したことによって、より容易に、かつ安価に血栓形成傾向素因を検査することが可能となった。

【0080】血栓形成傾向素因は、様々な血栓性疾患の基礎を構成する重要な素因である。たとえば、抗血小板性の医薬品の投与によって引き起こされる、血栓性血小板減少性紫斑病においては、患者の血栓形成傾向が病態形成に果たす役割は大きい。しかしこれまでは血栓形成傾向の適切な指標が無かったために、投与前に、血栓形成傾向を予測することは困難であった。一方本発明の指標を用いれば、遺伝子型やVWF切断酵素蛋白質のアミノ酸配列に基づいて、血栓形成傾向素因を、正しく評価することができる。このように、血栓形成傾向素因の適切な指標を提供した本発明の有用性は明らかである。

【0081】更に本発明は、変異によって活性が低下したVWF切断酵素の酵素活性を上昇させる作用を有する化合物のスクリーニング方法を提供した。本発明のスクリーニング方法によって、血栓形成傾向素因の原因となっている、VWF切断酵素の活性を促進する化合物を選択することができる。このような化合物は、VWF切断酵素活性の促進剤として有用である。あるいは本発明によって選択される化合物を抗血小板性の製剤に配合することによって、血栓形成性の副作用が軽減された薬剤とすることができる。

【0082】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> President of National Cardiovascular Center  
<120> A Method for testing of thrombophilic diathesis  
<130> NCV-A0201

21

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn version 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 4933

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

aaccacgatg tctttggcac agcctctcat ctgt  
cagatg ggagcgggga ccccgagag 60  
ggagttagcc gaggtcctgg cattccttgt gaac  
ccccgt ctgtgggttt ctggtccagt 120  
gtcccttctc cagattagat ggcttaggcc tctt  
ctaagg gggtagggcgt gcacatccgg 180  
agagctgtct ggtgtgcagg actgggctgc aggt  
taccct gaactgcaac catcttagag 240  
caaggcccag ctgtagcag gagtagctgc aggc  
cgcca ccctagccac ggcccctgcc 300  
ctggcaggaa gcttccaaga gtaaacactg ccta  
atcgtc ccgcccagta gtgagcaggc 360  
ctgtccatt ccatactgac cagattcca gtca  
ccaagg cccctctca ctccgtcca 420  
ctcctcgggc tggctctcct gaggatgac cagc  
gtcacc cccgggcaag atgccctccc 480  
ctctgtgtgg ccggaatcct tgctgtggc tttc  
tcttg gctgtgggg accctccat 540  
ttccagcaga gttgtctca ggctttggag ccac  
aggccg tgtcttcta ctgagccct 600  
ggtgctccct taaaaggccg cctccttcc cctg  
gcttcc agaggcagag gcagaggcag 660  
aggcgggctg caggcggcat cctacacctg gagg  
tgctgg tggcctggg ccccgatgtc 720  
ttccaggctc accaggagga cacagagcgc tatg  
tgctca ccaacctcaa catcggggca 780  
gaactgctt cggaccctgc cctgggggct cagt  
ttcggg tgcacctgtt gaagatggtc 840  
attctgacag agcctgaggg tgctccaat atca  
cagcca acctcacctc gtcctgtctg 900  
agcgtctgtg ggtggagcca gaccatcaac cctg  
aggacg acacgatcc tgccatgct 960  
gacctggctc tctatatcac taggtttgac ctgg  
agttgc ctgatggtaa ccggcagggtg 1020  
cggggcgtca cccagctggg cggtagcctgc tccc  
caacct ggagctgcct cattaccgag 1080  
gacactggct tcgacctggg agtcaccatt gcc  
atgaga ttgggcacag ctctggcctg 1140  
gagcacgacg gcgcgcccgg cagcggctgc ggcc  
ccagcg gacacgtgat ggcttcggac 1200

acacacttgg cggtaggat cggagggcgc tatg  
tcgtgg ctgggaagat gagcatctcc 2280  
cctaacacca cctaccctc cctcctggag gatg  
gtcgtg tcgagtacag agtggccctc 2340  
accgaggacc ggctgccccg cctggaggag atcc  
gcatct ggggaccct ccaggaagat 2400  
gctgacatcc aggtttacag gcggtatggc gagg  
agtatg gcaacctcac ccgcccagac 2460  
atcaccttca cctacttcca gcctaagcca cggc  
aggcct ggggtgtggc cgctgtcgt 2520  
gggccctgct cggtagctg tggggcaggg ctgc  
gctggg taaactacag ctgcctggac 2580  
caggccagga aggagtggg ggagactgtc cagt  
gccaag ggagccagca gccaccagcg 2640  
tggccagagg cctgcgtgct cgaaccctgc cctc  
cctact gggcggtggg agacttcggc 2700  
ccatgcagcg cctcctgtgg gggcggcctg cggg  
agcggc cagtgcgctg cgtggaggcc 2760  
cagggcagcc tcctgaagac attgccccca gcc  
ggtgca gagcaggggc ccagcagcca 2820  
gctgtggcgc tggaaacctg caacccccag ccct  
gccctg ccaggtggga ggtgtcagag 2880  
cccagctcat gcacatcagc tggtaggca gcc  
tggcct tggagaacga gacctgtgtg 2940  
ccaggggag atggcctgga ggtccagtg actg  
aggggc ctggctccgt agatgagaag 3000  
ctgcctgcc ctgagccctg tgcgggatg tcat  
gtcctc caggctggg ccatctggat 3060  
gccacctctg caggggagaa ggtccctcc ccat  
ggggca gcatcaggac gggggctcaa 3120  
gctgcacacg tgtggacccc tgcggcaggg tcgt  
gctccg tctcctgcgg gcgaggctg 3180  
atggagctgc gtttctgtg catggactct gcc  
tcaggg tgctgtcca ggaagagctg 3240  
tgtggcctgg caagcaagcc tgggagccgg cggg  
aggctt gccaggctgt cccgtgccct 3300  
gctcgggtgc agtacaagct ggcggcctgc agcg  
tgagct gtgggagagg ggtcgtcgg 3360  
aggatcctgt atttgccccg ggccatggg gagg  
acgatg gtgaggagat cctgttgac 3420  
accagtgcc agggctgcc tcgcccggaa cccc  
aggagg cctgcagcct ggagccctgc 3480  
ccacctaggg gaaagtcat gtccttggc ccat  
gttcgg ccagctgtgg ccttggcact 3540  
gctagacgct cggtagcctg tgtcagctc gacc  
aaggcc aggacgtgga ggtggacgag 3600  
gcggcctg ~~22~~ cggcgtgtg gcggcccag gcc  
gtgtcc cctgtctcat tgccgactgc 3660  
acctaccgct ggcatgttg cacctggatg gagt  
~~g210~~ ~~g~~ ~~2~~ttcctgtgg gtaggcatac 3720  
cagcggcggc gtgacacctg cctcggacc cagg  
cccagg cgcctgtgcc agctgattc 3780  
tgccagcact tgccaagcc ggtgactgtg cgtg

&lt;211&gt; 1427

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met His Gln Arg His Pro Arg Ala Arg Cys

Pro Pro Leu Cys Val Ala

1 5 10 15

Gly Ile Leu Ala Cys Gly Phe Leu Leu Gly

Cys Trp Gly Pro Ser His

20 25 30

Phe Gln Gln Ser Cys Leu Gln Ala Leu Glu

Pro Gln Ala Val Ser Ser

35 40 45

Tyr Leu Ser Pro Gly Ala Pro Leu Lys Gly

Arg Pro Pro Ser Pro Gly

50 55 60

Phe Gln Arg Gln Arg Gln Arg Gln Arg Arg

Ala Ala Gly Gly Ile Leu

65 70 75 80

His Leu Glu Leu Leu Val Ala Val Gly Pro

Asp Val Phe Gln Ala His

85 90 95

Gln Glu Asp Thr Glu Arg Tyr Val Leu Thr

Asn Leu Asn Ile Gly Ala

100 105 110

Glu Leu Leu Arg Asp Pro Ser Leu Gly Ala

Gln Phe Arg Val His Leu

115 120 125

Val Lys Met Val Ile Leu Thr Glu Pro Glu

Gly Ala Pro Asn Ile Thr

130 135 140

Ala Asn Leu Thr Ser Ser Leu Leu Ser Val

Cys Gly Trp Ser Gln Thr

145 150 155 1

60

Ile Asn Pro Glu Asp Asp Thr Asp Pro Gly

His Ala Asp Leu Val Leu

165 170 175

Tyr Ile Thr Arg Phe Asp Leu Glu Leu Pro

Asp Gly Asn Arg Gln Val

180 185 190

Arg Gly Val Thr Gln Leu Gly Gly Ala Cys

Gly Arg Cys Arg Ser Leu Val Glu Leu Thr  
 Pro Ile Ala Ala Val His  
 370 375 380

Gly Arg Trp Ser Ser Trp Gly Pro Arg Ser  
 Pro Cys Ser Arg Ser Cys  
 385 390 395 400

Gly Gly Gly Val Val Thr Arg Arg Arg Gln  
 Cys Asn Asn Pro Arg Pro  
 405 410 415

Ala Phe Gly Gly Arg Ala Cys Val Gly Ala  
 Asp Leu Gln Ala Glu Met  
 420 425 430

Cys Asn Thr Gln Ala Cys Glu Lys Thr Gln  
 Leu Glu Phe Met Ser Gln  
 435 440 445

Gln Cys Ala Arg Thr Asp Gly Gln Pro Leu  
 Arg Ser Ser Pro Gly Gly  
 450 455 460

Ala Ser Phe Tyr His Trp Gly Ala Ala Val  
 Pro His Ser Gln Gly Asp  
 465 470 475 480

Ala Leu Cys Arg His Met Cys Arg Ala Ile  
 Gly Glu Ser Phe Ile Met  
 485 490 495

Lys Arg Gly Asp Ser Phe Leu Asp Gly Thr  
 Arg Cys Met Pro Ser Gly  
 500 505 510

Pro Arg Glu Asp Gly Thr Leu Ser Leu Cys  
 Val Ser Gly Ser Cys Arg  
 515 520 525

Thr Phe Gly Cys Asp Gly Arg Met Asp Ser  
 Gln Gln Val Trp Asp Arg  
 530 535 540

Cys Gln Val Cys Gly Gly Asp Asn Ser Thr  
 Cys Ser Pro Arg Lys Gly  
 545 550 555 560

Ser Phe Thr Ala Gly Arg Ala Arg Glu Tyr  
 Val Thr Phe Leu Thr Val  
 565 570 575

Thr Pro Asn Leu Thr Ser Val Tyr Ile Ala

Cys Val Glu Ala Gln Gly Ser Leu Leu Lys  
 Thr Leu Pro Pro Ala Arg  
 770 775 780

Cys Arg Ala Gly Ala Gln Gln Pro Ala Val  
 Ala Leu Glu Thr Cys Asn  
 785 790 795 800

Pro Gln Pro Cys Pro Ala Arg Trp Glu Val  
 Ser Glu Pro Ser Ser Cys  
 805 810 815

Thr Ser Ala Gly Gly Ala Gly Leu Ala Leu  
 Glu Asn Glu Thr Cys Val  
 820 825 830

Pro Gly Ala Asp Gly Leu Glu Ala Pro Val  
 Thr Glu Gly Pro Gly Ser  
 835 840 845

Val Asp Glu Lys Leu Pro Ala Pro Glu Pro  
 Cys Val Gly Met Ser Cys  
 850 855 860

Pro Pro Gly Trp Gly His Leu Asp Ala Thr  
 Ser Ala Gly Glu Lys Ala  
 865 870 875 880

Pro Ser Pro Trp Gly Ser Ile Arg Thr Gly  
 Ala Gln Ala Ala His Val  
 885 890 895

Trp Thr Pro Ala Ala Gly Ser Cys Ser Val  
 Ser Cys Gly Arg Gly Leu  
 900 905 910

Met Glu Leu Arg Phe Leu Cys Met Asp Ser  
 Ala Leu Arg Val Pro Val  
 915 920 925

Gln Glu Glu Leu Cys Gly Leu Ala Ser Lys  
 Pro Gly Ser Arg Arg Glu  
 930 935 940

Val Cys Gln Ala Val Pro Cys Pro Ala Arg  
 Trp Gln Tyr Lys Leu Ala  
 945 950 955 960

Ala Cys Ser Val Ser Cys Gly Arg Gly Val  
 Val Arg Arg Ile Leu Tyr  
 965 970 975

Cys Ala Arg Ala His Gly Glu Asp Asp Gly

Leu Glu Trp Ser Gln Ala Arg Gly Leu Leu  
 Phe Ser Pro Ala Pro  
 1160 1165 1170

Gln Pro Arg Arg Leu Leu Pro Gly Pro Gln  
 Glu Asn Ser Val Gln  
 1175 1180 1185

Ser Ser Ala Cys Gly Arg Gln His Leu Glu  
 Pro Thr Gly Thr Ile  
 1190 1195 1200

Asp Met Arg Gly Pro Gly Gln Ala Asp Cys  
 Ala Val Ala Ile Gly  
 1205 1210 1215

Arg Pro Leu Gly Glu Val Val Thr Leu Arg  
 Val Leu Glu Ser Ser  
 1220 1225 1230

Leu Asn Cys Ser Ala Gly Asp Met Leu Leu  
 Leu Trp Gly Arg Leu  
 1235 1240 1245

Thr Trp Arg Lys Met Cys Arg Lys Leu Leu  
 Asp Met Thr Phe Ser  
 1250 1255 1260

Ser Lys Thr Asn Thr Leu Val Val Arg Gln  
 Arg Cys Gly Arg Pro  
 1265 1270 1275

Gly Gly Gly Val Leu Leu Arg Tyr Gly Ser  
 Gln Leu Ala Pro Glu  
 1280 1285 1290

Thr Phe Tyr Arg Glu Cys Asp Met Gln Leu  
 Phe Gly Pro Trp Gly  
 1295 1300 1305

<210> 3

20114931 Ser Pro Ser Leu Ser Pro Ala  
 <212>SeqIDNAAsn Ala Gly  
 <213>1 Homo sapiens 1315 1320

<220>

2216 SysCD Arg Leu Phe Ile Asn Val Ala Pro  
 <222>Ala445 Arg. (4728)a  
 <400>325 1330 1335

aaccacgatg tctttggcac agcctctcat ctgt  
 tagatgaggaggagggaAcacTggagg Met60ly Ala  
 gagTgaccGaggttcAag cattccttgt gaac  
 ccccgtgtgtgggttt ctgtcca1045 120 1350  
 gtccctctc cagattagat ggcttaggcc tcct  
 AsaaggaggaggTgtTgcacTcttg Arg80sp Thr

agagctgtct ggtgtgcagg actgggctgc aggt  
 taccct gaactgcaac catcttagag 240  
 caaggcccag cttgcagcag gaggagctgc aggc  
 cgccca ccctagccac ggcccctgcc 300  
 ctggcaggaa gcttccaaga gtaaacactg ccta  
 atcgtc ccgcccagta gtgagcaggc 360  
 ctgtcccatt ccatactgac cagattccca gtca  
 ccaagg ccccctctca ctccgctcca 420  
 ctctcgggc tggctctcct gagg atg cac cag  
 cgt cac ccc cgg gca aga 471

Met His Gln Arg His Pro A

rg Ala Arg

1

5

tgc cct ccc ctc tgt gtg gcc gga atc ctt  
 gcc tgt ggc ttt ctc ctg 519  
 Cys Pro Pro Leu Cys Val Ala Gly Ile Leu  
 Ala Cys Gly Phe Leu Leu  
 10 15 20 25

ggc tgc tgg gga ccc tcc cat ttc cag cag  
 agt tgt ctt cag gct ttg 567  
 Gly Cys Trp Gly Pro Ser His Phe Gln Gln  
 Ser Cys Leu Gln Ala Leu  
 30 35 40

gag cca cag gcc gtg tct tct tac ttg agc  
 cct ggt gct ccc tta aaa 615  
 Glu Pro Gln Ala Val Ser Ser Tyr Leu Ser  
 Pro Gly Ala Pro Leu Lys  
 45 50 55

ggc cgc cct cct tcc cct ggc ttc cag agg  
 cag agg cag agg cag agg 663  
 Gly Arg Pro Pro Ser Pro Gly Phe Gln Arg  
 Gln Arg Gln Arg Gln Arg  
 60 65 70

cgg gct gca ggc ggc atc cta cac ctg gag  
 ctg ctg gtg gcc gtg ggc 711  
 Arg Ala Ala Gly Gly Ile Leu His Leu Glu  
 Leu Leu Val Ala Val Gly  
 75 80 85

ccc gat gtc ttc cag gct cac cag gag gac  
 aca gag cgc tat gtg ctc 759  
 Pro Asp Val Phe Gln Ala His Gln Glu Asp  
 Thr Glu Arg Tyr Val Leu  
 90 95 100 10

5

acc aac ctc aac atc ggg gca gaa ctg ctt  
 cgg gac ccg tcc ctg ggg 807  
 Thr Asn Leu Asn Ile Gly Ala Glu Leu Leu

His Asp Gly Ala Pro Gly Ser Gly Cys Gly  
 Pro Ser Gly His Val Met  
 235 240 245

gct tcg gac ggc gcc gcg ccc cgc gcc ggc  
 ctc gcc tgg tcc ccc tgc 1239  
 Ala Ser Asp Gly Ala Ala Pro Arg Ala Gly  
 Leu Ala Trp Ser Pro Cys  
 250 255 260 2

65  
 agc cgc cgg cag ctg ctg agc ctg ctc agc  
 gca gga cgg gcg cgc tgc 1287  
 Ser Arg Arg Gln Leu Leu Ser Leu Leu Ser  
 Ala Gly Arg Ala Arg Cys  
 270 275 280

gtg tgg gac ccg ccg cgg cct caa ccc ggg  
 tcc gcg ggg cac ccg ccg 1335  
 Val Trp Asp Pro Pro Arg Pro Gln Pro Gly  
 Ser Ala Gly His Pro Pro  
 285 290 295

gat gcg cag cct ggc ctc tac tac agc gcc  
 aac gag cag tgc cgc gtg 1383  
 Asp Ala Gln Pro Gly Leu Tyr Tyr Ser Ala  
 Asn Glu Gln Cys Arg Val  
 300 305 310

gcc ttc ggc ccc aag gct gtc gcc tgc acc  
 ttc gcc agg gag cac ctg 1431  
 Ala Phe Gly Pro Lys Ala Val Ala Cys Thr  
 Phe Ala Arg Glu His Leu  
 315 320 325

gat atg tgc cag gcc ctc tcc tgc cac aca  
 gac ccg ctg gac caa agc 1479  
 Asp Met Cys Gln Ala Leu Ser Cys His Thr  
 Asp Pro Leu Asp Gln Ser  
 330 335 340 3

45  
 agc tgc agc cgc ctc ctc gtt cct ctc ctg  
 gat ggg aca gaa tgt ggc 1527  
 Ser Cys Ser Arg Leu Leu Val Pro Leu Leu  
 Asp Gly Thr Glu Cys Gly  
 350 355 360

gtg gag aag tgg tgc tcc aag ggt cgc tgc  
 cgc tcc ctg gtg gag ctg 1575  
 Val Glu Lys Trp Cys Ser Lys Gly Arg Cys  
 Arg Ser Leu Val Glu Leu  
 365 370 375

acc ccc ata gca gca gtg cat ggg cgc tgg

acc cgg tgt atg cca agt ggc ccc cgg gag  
gac ggg acc ctg agc ctg 2007  
Thr Arg Cys Met Pro Ser Gly Pro Arg Glu  
Asp Gly Thr Leu Ser Leu  
510 515 520

tgt gtg tcg ggc agc tgc agg aca ttt ggc  
tgt gat ggt agg atg gac 2055  
Cys Val Ser Gly Ser Cys Arg Thr Phe Gly  
Cys Asp Gly Arg Met Asp  
525 530 535

tcc cag cag gta tgg gac agg tgc cag gtg  
tgt ggt ggg gac aac agc 2103  
Ser Gln Gln Val Trp Asp Arg Cys Gln Val  
Cys Gly Gly Asp Asn Ser  
540 545 550

acg tgc agc cca cgg aag ggc tct ttc aca  
gct ggc aga gcg aga gaa 2151  
Thr Cys Ser Pro Arg Lys Gly Ser Phe Thr  
Ala Gly Arg Ala Arg Glu  
555 560 565

tat gtc acg ttt ctg aca gtt acc ccc aac  
ctg acc agt gtc tac att 2199  
Tyr Val Thr Phe Leu Thr Val Thr Pro Asn  
Leu Thr Ser Val Tyr Ile  
570 575 580 5

gcc aac cac agg cct ctc ttc aca cac ttg  
gcg gtg agg atc gga ggg 2247  
Ala Asn His Arg Pro Leu Phe Thr His Leu  
Ala Val Arg Ile Gly Gly  
590 595 600

cgc tat gtc gtg gct ggg aag atg agc atc  
tcc cct aac acc acc tac 2295  
Arg Tyr Val Val Ala Gly Lys Met Ser Ile  
Ser Pro Asn Thr Thr Tyr  
605 610 615

ccc tcc ctc ctg gag gat ggt cgt gtc gag  
tac aga gtg gcc ctc acc 2343  
Pro Ser Leu Leu Glu Asp Gly Arg Val Glu  
Tyr Arg Val Ala Leu Thr  
620 625 630

gag gac cgg ctg ccc cgc ctg gag gag atc  
cgc atc tgg gga ccc ctc 2391  
Glu Asp Arg Leu Pro Arg Leu Glu Glu Ile  
Arg Ile Trp Gly Pro Leu  
635 640 645

765	770	775	
aag aca ttg ccc cca gcc cgg tgc aga gca ggg gcc cag cag cca gct 2823 Lys Thr Leu Pro Pro Ala Arg Cys Arg Ala Gly Ala Gln Gln Pro Ala			
780	785	790	
gtg gcg ctg gaa acc tgc aac ccc cag ccc tgc cct gcc agg tgg gag 2871 Val Ala Leu Glu Thr Cys Asn Pro Gln Pro Cys Pro Ala Arg Trp Glu			
795	800	805	
gtg tca gag ccc agc tca tgc aca tca gct ggt gga gca ggc ctg gcc 2919 Val Ser Glu Pro Ser Ser Cys Thr Ser Ala Gly Gly Ala Gly Leu Ala			
810	815	820	8
25 ttg gag aac gag acc tgt gtg cca ggg gca gat ggc ctg gag gct cca 2967 Leu Glu Asn Glu Thr Cys Val Pro Gly Ala Asp Gly Leu Glu Ala Pro			
830	835	840	
gtg act gag ggg cct ggc tcc gta gat gag aag ctg cct gcc cct gag 3015 Val Thr Glu Gly Pro Gly Ser Val Asp Glu Lys Leu Pro Ala Pro Glu			
845	850	855	
ccc tgt gtc ggg atg tca tgt cct cca gcc tgg ggc cat ctg gat gcc 3063 Pro Cys Val Gly Met Ser Cys Pro Pro Gly Trp Gly His Leu Asp Ala			
860	865	870	
acc tct gca ggg gag aag gct ccc tcc cca tgg ggc agc atc agg acg 3111 Thr Ser Ala Gly Glu Lys Ala Pro Ser Pro Trp Gly Ser Ile Arg Thr			
875	880	885	
ggg gct caa gct gca cac gtg tgg acc cct gcg gca ggg tcg tgc tcc 3159 Gly Ala Gln Ala Ala His Val Trp Thr Pro Ala Ala Gly Ser Cys Ser			
890	895	900	9
05 gtc tcc tgc ggg cga ggt ctg atg gag ctg cgt ttc ctg tgc atg gac 3207 Val Ser Cys Gly Arg Gly Leu Met Glu Leu			

Thr Ala Arg Arg Ser Val Ala Cys Val Gln Leu Asp Gln Gly Gln 1035	1040	1045
gac gtg gag gtg gac gag gcg gcc tgt gcg gcg ctg gtg cgg ccc 3627 Asp Val Glu Val Asp Glu Ala Ala Cys Ala Ala Leu Val Arg Pro 1050	1055	1060
gag gcc agt gtc ccc tgt ctc att gcc gac tgc acc tac cgc tgg 3672 Glu Ala Ser Val Pro Cys Leu Ile Ala Asp Cys Thr Tyr Arg Trp 1065	1070	1075
cat gtt ggc acc tgg atg gag tgc tct gtt tcc tgt ggg gat ggc 3717 His Val Gly Thr Trp Met Glu Cys Ser Val Ser Cys Gly Asp Gly 1080	1085	1090
atc cag cgc cgg cgt gac acc tgc ctc gga ccc cag gcc cag gcg 3762 Ile Gln Arg Arg Arg Asp Thr Cys Leu Gly Pro Gln Ala Gln Ala 1095	1100	1105
cct gtg cca gct gat ttc tgc cag cac ttg ccc aag ccg gtg act 3807 Pro Val Pro Ala Asp Phe Cys Gln His Leu Pro Lys Pro Val Thr 1110	1115	1120
gtg cgt ggc tgc tgg gct ggg ccc tgt gtg gga cag ggt acg ccc 3852 Val Arg Gly Cys Trp Ala Gly Pro Cys Val Gly Gln Gly Thr Pro 1125	1130	1135
agc ctg gtg ccc cac gaa gaa gcc gct gct cca gga cgg acc aca 3897 Ser Leu Val Pro His Glu Glu Ala Ala Ala Pro Gly Arg Thr Thr 1140	1145	1150
gcc acc cct gct ggt gcc tcc ctg gag tgg tcc cag gcc cgg ggc 3942 Ala Thr Pro Ala Gly Ala Ser Leu Glu Trp Ser Gln Ala Arg Gly 1155	1160	1165
ctg ctc ttc tcc ccg gct ccc cag cct cgg		

ggg agc cag ctt gct cct gaa acc ttc tac aga gaa tgt gac atg 4347 Gly Ser Gln Leu Ala Pro Glu Thr Phe Tyr Arg Glu Cys Asp Met 1290 1295 1300
cag ctc ttt ggg ccc tgg ggt gaa atc gtg agc ccc tcg ctg agt 4392 Gln Leu Phe Gly Pro Trp Gly Glu Ile Val Ser Pro Ser Leu Ser 1305 1310 1315
cca gcc acg agt aat gca ggg ggc tgc cgg ctc ttc att aat gtg 4437 Pro Ala Thr Ser Asn Ala Gly Gly Cys Arg Leu Phe Ile Asn Val 1320 1325 1330
gct ccg cac gca cgg att gcc atc cat gcc ctg gcc acc aac atg 4482 Ala Pro His Ala Arg Ile Ala Ile His Ala Leu Ala Thr Asn Met 1335 1340 1345
ggc gct ggg acc gag gga gcc aat gcc agc tac atc ttg atc cgg 4527 Gly Ala Gly Thr Glu Gly Ala Asn Ala Ser Tyr Ile Leu Ile Arg 1350 1355 1360
gac acc cac agc ttg agg acc aca gcg ttc cat ggg cag cag gtg 4572 Asp Thr His Ser Leu Arg Thr Thr Ala Phe His Gly Gln Gln Val 1365 1370 1375
ctc ttc acg tgg gag tca gag agc agc cag gct <20>atg 4617 <20>Tyr Phe Trp Glu Ser Glu Ser Ser Gln Ala <20>Met His Phe Ser <400> 4 1380 1385 1390
Met His Gln Arg His Pro Arg Ala Arg Cys Gag Ggc Lcc Cys Val Ggt cag gcc agc ctg 1cgg ggc cag tac5 tgg 4662 10 15 Glu Gly Phe Leu Lys Ala Gln Ala Ser Leu Gly Gly Leu Ala Trp Cys Trp Gly Phe Leu Leu Gly Cys Trp Gly 1395 Ser His 1400 1405 20 25 30
acc ctc caa tca tgg gta ccg gag atg cag Phe Gln Gln Gln Ser Cys Gln Gln Leu Glu Phe Gln Ala Ser Trp Ser Val Pro Glu Met Gln Asp Pro 1410 In Ser Trp 40 45 1410 1415 1420

65	70	75	80
His Leu Glu Leu Leu Val Ala Val Gly Pro			
Asp Val Phe Gln Ala His			
	85	90	95
Gln Glu Asp Thr Glu Arg Tyr Val Leu Thr			
Asn Leu Asn Ile Gly Ala			
	100	105	110
Glu Leu Leu Arg Asp Pro Ser Leu Gly Ala			
Gln Phe Arg Val His Leu			
	115	120	125
Val Lys Met Val Ile Leu Thr Glu Pro Glu			
Gly Ala Pro Asn Ile Thr			
	130	135	140
Ala Asn Leu Thr Ser Ser Leu Leu Ser Val			
Cys Gly Trp Ser Gln Thr			
145	150	155	1
60			
Ile Asn Pro Glu Asp Asp Thr Asp Pro Gly			
His Ala Asp Leu Val Leu			
	165	170	175
Tyr Ile Thr Arg Phe Asp Leu Glu Leu Pro			
Asp Gly Asn Arg Gln Val			
	180	185	190
Arg Gly Val Thr Gln Leu Gly Gly Ala Cys			
Ser Pro Thr Trp Ser Cys			
	195	200	205
Leu Ile Thr Glu Asp Thr Gly Phe Asp Leu			
Gly Val Thr Ile Ala His			
	210	215	220
Glu Ile Gly His Ser Phe Gly Leu Glu His			
Asp Gly Ala Pro Gly Ser			
225	230	235	2
40			
Gly Cys Gly Pro Ser Gly His Val Met Ala			
Ser Asp Gly Ala Ala Pro			
	245	250	255
Arg Ala Gly Leu Ala Trp Ser Pro Cys Ser			
Arg Arg Gln Leu Leu Ser			
	260	265	270
Leu Leu Ser Ala Gly Arg Ala Arg Cys Val			
Trp Asp Pro Pro Arg Pro			
	275	280	285

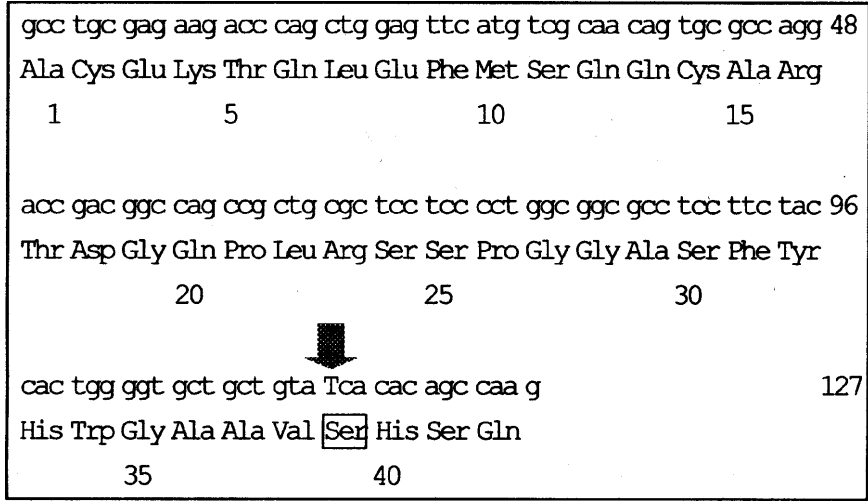
465	470	475	4
80			
Ala Leu Cys Arg His Met Cys Arg Ala Ile			
Gly Glu Ser Phe Ile Met			
	485	490	495
Lys Arg Gly Asp Ser Phe Leu Asp Gly Thr			
Arg Cys Met Pro Ser Gly			
	500	505	510
Pro Arg Glu Asp Gly Thr Leu Ser Leu Cys			
Val Ser Gly Ser Cys Arg			
	515	520	525
Thr Phe Gly Cys Asp Gly Arg Met Asp Ser			
Gln Gln Val Trp Asp Arg			
	530	535	540
Cys Gln Val Cys Gly Gly Asp Asn Ser Thr			
Cys Ser Pro Arg Lys Gly			
545	550	555	5
60			
Ser Phe Thr Ala Gly Arg Ala Arg Glu Tyr			
Val Thr Phe Leu Thr Val			
	565	570	575
Thr Pro Asn Leu Thr Ser Val Tyr Ile Ala			
Asn His Arg Pro Leu Phe			
	580	585	590
Thr His Leu Ala Val Arg Ile Gly Gly Arg			
Tyr Val Val Ala Gly Lys			
	595	600	605
Met Ser Ile Ser Pro Asn Thr Thr Tyr Pro			
Ser Leu Leu Glu Asp Gly			
	610	615	620
Arg Val Glu Tyr Arg Val Ala Leu Thr Glu			
Asp Arg Leu Pro Arg Leu			
625	630	635	6
40			
Glu Glu Ile Arg Ile Trp Gly Pro Leu Gln			
Glu Asp Ala Asp Ile Gln			
	645	650	655
Val Tyr Arg Arg Tyr Gly Glu Glu Tyr Gly			
Asn Leu Thr Arg Pro Asp			
	660	665	670
Ile Thr Phe Thr Tyr Phe Gln Pro Lys Pro			
Arg Gln Ala Trp Val Trp			
	675	680	685

865	870	875	8
80			
Pro Ser Pro Trp Gly Ser Ile Arg Thr Gly			
Ala Gln Ala Ala His Val			
	885	890	895
Trp Thr Pro Ala Ala Gly Ser Cys Ser Val			
Ser Cys Gly Arg Gly Leu			
	900	905	910
Met Glu Leu Arg Phe Leu Cys Met Asp Ser			
Ala Leu Arg Val Pro Val			
	915	920	925
Gln Glu Glu Leu Cys Gly Leu Ala Ser Lys			
Pro Gly Ser Arg Arg Glu			
	930	935	940
Val Cys Gln Ala Val Pro Cys Pro Ala Arg			
Trp Gln Tyr Lys Leu Ala			
945	950	955	9
60			
Ala Cys Ser Val Ser Cys Gly Arg Gly Val			
Val Arg Arg Ile Leu Tyr			
Ala Cys Ala Ala Val Val Arg Pro Glu Ala			975
Ser Val Pro Cys Leu			
Cys Ala Arg Ala His Gly Glu Asp Asp Gly			1065
Glu Glu Ile Leu Leu Asp			
Ile Ala Asp Thr Tyr Arg Trp His Val			990
Gly Thr Trp Met Glu			
Thr Cys Gln Gly Leu Pro Arg Pro Glu			1080
Pro Gln Glu Ala Cys Ser			
Cys Ser Ser Ser Cys Gly Asp Ile Gln			1005
Arg Arg Arg Asp Thr			
Leu Pro Cys Pro Pro Trp Lys Val			1095
Met Ser Leu Gly Pro			
Cys Gly Pro Gln Ala Ala Pro Val			1020
Pro Ala Asp Phe Cys			
Cys Ala Ser Cys Gly Gly Thr Ala			1110
Arg Arg Ser Val Ala			
Gln Leu Pro Lys Pro Thr Val Arg			1035
Gly Cys Trp Ala Gly			
Cys Gln Leu Asp Gln Gln Asp Val			1125
Glu Val Asp Glu Ala			
Pro Val Gly Gln Gly Pro Ser Leu			1050
Val Pro His Glu Glu			
	1130	1135	1140
Ala Ala Ala Pro Gly Arg Thr Thr Ala Thr			
Pro Ala Gly Ala Ser			
	1145	1150	1155
Leu Glu Trp Ser Gln Ala Arg Gly Leu Leu			



た。

【図1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ド <sup>*</sup> (参考)	
C 1 2 Q	1/02	C 1 2 Q	1/37	4 H 0 4 5
	1/37		1/68	A
	1/68	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/15		33/50	Z
	33/50		33/53	D
	33/53	C 1 2 N	15/00	Z N A A

(72)発明者 藤村 吉博  
 奈良県奈良市菅原町133 - 1  
 (72)発明者 河野 雄平  
 大阪府吹田市津雲台 5 - 10 D46 - 104

F タ-ム(参考) 2G045 AA40 DA36 FB03  
 4B024 AA11 BA14 CA04 CA05 CA09  
 CA11 DA02 EA02 EA04 GA11  
 GA18 HA03 HA14  
 4B050 CC01 CC03 DD11 LL03 LL10  
 4B063 QA01 QA12 QA18 QQ03 QQ20  
 QQ42 QQ53 QR07 QR08 QR16  
 QR22 QR32 QR38 QR42 QR55  
 QR57 QR59 QR62 QR67 QR69  
 QR77 QR80 QR82 QS12 QS25  
 QS34 QS39 QX01  
 4C084 AA01 AA18 MA02 NA14 ZA541  
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40  
 DA75 DA86 DA89 EA50 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003304874A5</a>	公开(公告)日	2006-01-19
申请号	JP2002111241	申请日	2002-04-12
[标]申请(专利权)人(译)	KOKURITSU JUNKANKIBYO SENTAA SOCHO		
申请(专利权)人(译)	国家心血管中心一般		
[标]发明人	宫田敏行 小亀浩市 松本雅則 藤村吉博 河野雄平		
发明人	宫田 敏行 小亀 浩市 松本 雅則 藤村 吉博 河野 雄平		
IPC分类号	C12N15/09 A61K45/00 A61P7/02 C07K16/40 C12N9/48 C12Q1/02 C12Q1/37 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K45/00 A61P7/02 C07K16/40 C12N9/48 C12Q1/02 C12Q1/37 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA11 4B024/BA14 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024 /CA09 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/HA03 4B024/HA14 4B050/CC01 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/LL03 4B050/LL10 4B063/QA01 4B063 /QA12 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ20 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR07 4B063/QR08 4B063/QR16 4B063/QR22 4B063/QR32 4B063/QR38 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR57 4B063 /QR59 4B063/QR62 4B063/QR67 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS12 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX01 4C084/AA01 4C084/AA18 4C084/MA02 4C084 /NA14 4C084/ZA541 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/DA89 4H045/EA50 4H045/FA74		
其他公开文献	JP4121764B2 JP2003304874A		

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供检测血栓形成倾向倾向倾向的方法，以及筛选用于治疗血栓形成倾向的化合物的方法。 解决方案：提供了检查血栓形成倾向的倾向的方法，包括检测ADAMTS13基因的多态性的步骤，其导致VWF切割酶的活性降低。通过该检查方法，可以检查血栓性血小板减少性紫癜易感因素等。血栓性血小板减少性紫癜是由给予抗血小板药物制剂引起的副作用的重要疾病。其易感性的测试有助于提高抗血小板药物制剂的安全性。