

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-528063
(P2013-528063A)

(43) 公表日 平成25年7月8日(2013.7.8)

(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 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 3

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 33 頁)

(21) 出願番号 特願2013-514399 (P2013-514399)
 (86) (22) 出願日 平成23年6月10日 (2011.6.10)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年12月11日 (2012.12.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/040057
 (87) 国際公開番号 W02011/156763
 (87) 国際公開日 平成23年12月15日 (2011.12.15)
 (31) 優先権主張番号 61/354,098
 (32) 優先日 平成22年6月11日 (2010.6.11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 000004455
 日立化成株式会社
 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号
 (71) 出願人 500294958
 ヒタチ ケミカル リサーチ センター
 インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 926
 17 アーバイン ヘルズ サイエンス
 ズ ロード 1003
 (71) 出願人 591123724
 札幌市
 北海道札幌市中央区北1条西2丁目1番地
 の甲のイの1
 (74) 代理人 100100549
 弁理士 川口 嘉之

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腎機能の特徴を決定する方法

(57) 【要約】

本発明の実施形態は、一般的には、腎機能の特徴を決定する方法に関する。具体的には、いくつかの実施形態では、患者の尿試料中に含有される小胞から単離された腎臓関連マーカーRNAが定量化される。いくつかの実施形態においては、尿小胞からの定量化されたRNAを正常集団と比較し、また、いくつかの実施形態においては、患者と比較して、腎機能を経時的に評価する。

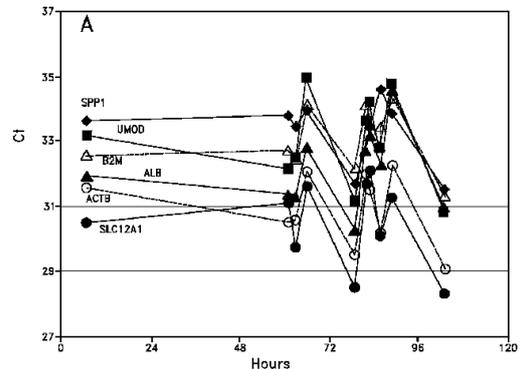


FIG. 4A

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

R N A に関連する小胞を含む尿の第一試料を患者から採取すること；
前記小胞を前記第一試料から捕捉すること；
前記小胞を溶解させて、腎機能に関連する R N A を含む前記小胞関連 R N A を放出させること；
前記腎機能に関連する R N A を定量化すること；および
前記患者からの前記腎機能に関連する R N A の量を、正常な腎機能を有する個体からの対応する R N A の量と比較すること、
を含む、腎機能の特徴を決定する方法であって、前記患者と前記個体との間の前記腎機能に関連する R N A の量の差が、前記患者の腎機能の変化を示す、方法。

10

【請求項 2】

前記小胞を前記試料から捕捉することは、前記尿を濾過することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記濾過により、前記小胞がフィルター上に捕集される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記小胞が前記フィルター上に捕集されている間に、前記溶解が行われる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

細胞残屑を除去するために前記試料を遠心することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記遠心が、前記小胞を捕捉することよりも前に行われる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記小胞を捕捉することは、前記遠心した尿の上清を濾過することをさらに含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記定量化することは、P C R を用いて前記 R N A を増幅することを含む、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記腎機能が、腎臓損傷に起因して変化する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記腎臓損傷が、糸球体に対する損傷、内皮に対する損傷、近位尿細管に対する損傷、ヘンレ係蹄に対する損傷、遠位尿細管に対する損傷、集合管に対する損傷、および尿管に対する損傷の 1 つ以上を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記腎機能が、腎臓に入る血流または腎臓から出る血流の変化に起因して変化する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記腎機能が、疾患に起因して変化する、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 13】

前記疾患が、慢性腎疾患、急性腎不全、糖尿病性腎症、糸球体腎炎、糸球体硬化症、巣状分節性糸球体硬化症、膜性腎症、微小変化群、ならびにアテローム性動脈硬化症、高血圧、心血管疾患、肥満症、高コレステロール血症、糖尿病、膠原病、自己免疫疾患、および感染症などの他の疾患に続発する腎疾患、からなる群より選択される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記腎機能が、前記患者への薬理学的物質の投与に起因して変化する、請求項 1 に記載の方法。

50

- 【請求項 15】
前記薬理学的物質が、疾患を治療するために前記患者へと投与される、請求項 14 に記載の方法。
- 【請求項 16】
前記腎機能に関連する RNA は、腎臓の特定の領域から採取されたものである、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 17】
前記腎機能に関連する RNA が、腎臓の特定の領域の機能に関連する、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 18】 10
前記腎臓の特定の領域が糸球体を含む、請求項 16 または請求項 17 に記載の方法。
- 【請求項 19】
前記腎臓の特定の領域が近位尿細管を含む、請求項 16 または請求項 17 に記載の方法。
- 【請求項 20】
前記腎臓の特定の領域が遠位尿細管を含む、請求項 16 または請求項 17 に記載の方法。
- 【請求項 21】
前記腎機能に関連する RNA がポドシンをコードする、請求項 18 に記載の方法。
- 【請求項 22】 20
前記腎機能に関連する RNA が、SLC12A1、UMOD、およびアルブミンからなる群より選択される、請求項 19 に記載の方法。
- 【請求項 23】
前記腎機能に関連する RNA が AQP9 をコードする、請求項 20 に記載の方法。
- 【請求項 24】
前記腎機能に関連する RNA が、SLC12A1、UMOD、vWF、MMP1、MMP3、SLC22A6、SLC22A8、SLC22A12、ポドシン、キュビリン、LRP2、AQP9、およびアルブミンからなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 25】 30
前記腎機能に関連する RNA が SLC12A1 である、請求項 24 に記載の方法。
- 【請求項 26】
前記小胞が、
(a) 前記尿の第一試料の少なくとも一部を小胞捕捉デバイスの試料装填領域中へ装填すること；
(b) 前記尿を前記試料装填領域から前記小胞捕捉デバイス中のガラス様材料を含む小胞捕捉材料を通過させ、上清を得ること；ならびに
(c) 前記上清を前記小胞捕捉デバイスの試料受け取り領域へと通過させることおよびその上清を捨てること、
を含む方法により単離される、請求項 1 に記載の方法であって、 40
前記通過の結果として前記小胞捕捉材料上または前記小胞捕捉材料中の前記尿試料からの前記小胞の捕捉がもたらされ、それにより前記小胞が捕捉される、方法。
- 【請求項 27】
前記小胞捕捉材料が、前記材料の複数の層を含む、請求項 26 に記載の方法。
- 【請求項 28】
前記小胞捕捉材料の前記複数の層が、ガラス繊維の、少なくとも第一層および第二層を含む、請求項 26 に記載の方法。
- 【請求項 29】
工程 (b) が、直径が約 1.6 ミクロン以上である前記生体試料からの材料を捕捉するために、前記生体液を、前記ガラス繊維の第一層を通過させることを含む、請求項 26 に 50

記載の方法。

【請求項 30】

工程 (b) が、直径の最小サイズが約 0.6 ミクロン～約 0.8 ミクロンであり、かつ、最大サイズが 1.6 ミクロン未満である小胞を捕捉するために、前記生体液を、前記ガラス繊維の第二層を通過させることをさらに含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 31】

細胞残屑および RNA に関連する小胞を含む尿の試料を患者から採取すること；
前記小胞を前記細胞残屑から分離すること；
前記小胞を溶解させて、腎機能に関連する RNA を含む溶解物を得ること；ならびに前記腎機能に関連する RNA を定量化すること
を含む、核酸に基づき腎機能の変化を検出する方法であって；
尿中に通常みられる量と比較した、前記尿試料からの前記 RNA の量の増加または減少が、前記患者における変化した腎機能と相関する、方法。

10

【請求項 32】

RNA に関連する小胞を含む少なくとも 2 つの尿の試料を患者から採取すること；
前記小胞を前記試料から捕捉すること；
前記小胞を溶解させて、腎機能に関連する RNA および腎機能に応じて変化しない RNA を含む前記小胞関連 RNA を放出させること；
前記腎機能に関連する RNA および前記腎機能に応じて変化しない RNA を定量化すること；ならびに
前記患者からの前記腎機能に関連する RNA の量と腎機能に応じて変化しない RNA の量との間の割合を決定すること、
を含む、腎機能の特徴を決定する方法であって、
前記 2 つ以上の尿試料の間の割合における差が、前記患者の腎機能の変化を示す、方法。

20

【請求項 33】

前記腎機能に応じて変化しない RNA が、ベータ - アクチンまたはベータ - 2 - ミクログロブリンのいずれか 1 つである、請求項 32 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

関連案件

本出願は、2010年6月11日に提出された米国仮出願第 61 / 354 , 098 号の利益を主張するものであり、この仮出願は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられるものとする。

【0002】

発明の背景

発明の分野

本開示は、腎機能の特徴を決定する方法に関する。いくつかの実施形態は、腎疾患の診断に関し、より具体的には、本開示は、腎機能の特徴を決定するために、小胞中に含まれる腎臓関連 RNA を定量化することにより特徴を決定するという分野に関する。

40

【背景技術】

【0003】

関連技術の記載

多くの場合、医師は、患者の症状、病歴、および身体検査の結果を解釈して、最初の診断を導く。医学的検査は、最初の診断の確認または変更の、欠かせない部分である。現在、健康な患者には存在しない生化学的パターンまたは以前に採取した患者試料から変化した生化学的パターンから疾患を決定するために、患者から抽出された血液に対していくつかの診断医学的検査が行われている。これらの検査では、一般に血漿または血清が利用され、例えば電解質、尿素、クレアチニン、およびグルコースが測定される。他の検査では

50

、血漿タンパク質、例えばアルブミン、免疫グロブリン、フィブリノーゲン、および制御タンパク質などが測定される。さらに他の検査では、他の生物学的化合物、例えばチアミン、リボフラビン、ナイアシン、ビタミンB6、葉酸、ビタミンD、ビオチン、鉄、ならびに凝固因子である第V因子、および第X因子などが測定される。

【0004】

同様に、腎機能を評価するという状況では、腎機能を調べるために、機能的腎臓によって除去されるべき老廃物質（例えばクレアチニンおよび尿素など）の血漿中濃度または電解質の濃度の測定が行われることが多い。しかしながら、血中尿素およびクレアチニンレベルは、多くの場合、全腎機能のうちのかなりの量（例えば40%以上）が失われるまで、正常な範囲を超えて上昇することはない。腎機能を評価するために、糸球体濾過率（GFR）または薬理的マーカー化合物の浄化値の評価が用いられることもある。また、腎機能を評価するために、24時間の尿試料の分析が用いられることもある。別の腎機能の予後マーカーは、尿における上昇したレベルのタンパク質であるタンパク尿である。尿中のタンパク質（例えばアルブミンなど）の増加する量は、腎臓損傷の進行的に増加する量および関連する機能喪失を示す。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかしながら、これらの診断検査は、典型的には、抗体に基づく検査（一般にはELISA）であり、これらは感度に限界があることがある。低いアッセイ標的濃度範囲における疑わしいアッセイ精度と、疾患の早期段階における、おそらく低いレベルのクレアチニン（または他のアッセイ標的）との組み合わせにより、早期疾患段階での診断がなされないおそれがある。加えて、特定の診断検査では、血液または他の流体試料からマーカーを同定するために、化学反応（例えば比色変化）が採用される。こうした検査も、上述したのと同様の制限により影響を受けることがある。よって、損なわれた腎機能の早期検出および/または診断を可能にする、腎機能を評価するための、感度がよく正確かつ再現性のある診断検査が必要とされている。

20

【課題を解決するための手段】

【0006】

概要

これらの必要性に基づき、本明細書において、RNAに関連する小胞を含む尿の試料を患者から採取すること、前記小胞を前記試料から捕捉すること、前記小胞を溶解させて、腎機能に関連するRNAを含む前記小胞関連RNAを放出させること、前記腎機能に関連するRNAを定量化すること；および前記患者からの前記腎機能に関連するRNAの量を、正常な腎機能を有する個体からの対応するRNAの量と比較することを含む、腎機能の特徴を決定する方法であって、前記患者と前記個体との間の前記腎機能に関連するRNAの量の差が、前記患者の腎機能の変化を示す方法、が提供されている。

30

【0007】

いくつかの実施形態においては、前記小胞を前記試料から単離することは、前記尿を濾過することを含む。いくつかの実施形態においては、前記濾過により、前記小胞がフィルター上に捕集される。いくつかの実施形態においては、前記小胞が前記フィルター上に捕集されている間に、前記溶解が行われる。

40

【0008】

いくつかの実施形態においては、前記方法は、細胞残屑を除去するために前記試料を遠心することをさらに含む。一実施形態においては、前記遠心は、前記小胞を単離することよりも前に行われる。いくつかの実施形態においては、前記小胞を濃縮することは、前記遠心した尿の上清を濾過することをさらに含む。

【0009】

いくつかの実施形態においては、定量化することは、PCRを用いて前記RNAを増幅することを含む。

50

【0010】

いくつかの実施形態においては、前記腎機能は、腎臓損傷に起因して変化する。いくつかの実施形態においては、前記腎臓損傷は、糸球体に対する損傷、内皮に対する損傷、近位尿細管に対する損傷、ヘンレ係蹄に対する損傷、集合管に対する損傷、および尿管に対する損傷のいずれか1つ以上を含む。

【0011】

いくつかの実施形態においては、前記腎機能に関連するRNAは、SLC12A1、UMOD、vWF、MMP1、MMP3、SLC22A6、SLC22A8、SLC22A12、ポドシン、キュピリン、LRP2、AQP9、およびアルブミンからなる群より選択される。一実施形態においては、前記腎機能に関連するRNAはSLC12A1である。

10

【0012】

いくつかの実施形態においては、前記腎機能は、腎臓に入る血流または腎臓から出る血流の変化に起因して変化する。いくつかの実施形態においては、前記腎機能は、疾患に起因して変化する。いくつかの実施形態においては、前記疾患は、慢性腎疾患、急性腎不全、糖尿病性腎症、糸球体腎炎、糸球体硬化症、巣状分節性糸球体硬化症、膜性腎症、微小変化群、ならびにアテローム性動脈硬化症、高血圧、心血管疾患、肥満症、高コレステロール血症、糖尿病、膠原病、自己免疫疾患、および感染症などの他の疾患に続発する腎疾患からなる群より選択される。

【0013】

いくつかの実施形態においては、前記腎機能は、前記患者への薬理的物質の投与に起因して変化する。いくつかの実施形態においては、前記薬理的物質は、疾患を治療するために前記患者へと投与される。

20

【0014】

いくつかの実施形態においては、前記腎機能に関連するRNAは、腎臓の特定の領域から採取する。いくつかの実施形態においては、前記腎機能に関連するRNAは、腎臓の特定の領域の機能に関連する。いくつかの実施形態においては、前記腎臓の特定の領域は糸球体を含む。いくつかの実施形態においては、前記腎臓の特定の領域は近位尿細管を含む。いくつかの実施形態においては、前記腎臓の特定の領域は遠位尿細管を含む。

【0015】

いくつかの実施形態においては、前記小胞は、尿の第一試料の少なくとも一部を小胞捕捉デバイスの試料装填領域中へ装填すること、前記尿を前記試料装填領域から前記小胞捕捉デバイス中のガラス様材料を含む小胞捕捉材料を通過させ、上清を得ること、前記上清を前記小胞捕捉デバイスの試料受け取り領域へと通過させること、およびその上清を捨てること、を含む方法であって、前記通過の結果として前記小胞捕捉材料上または前記小胞捕捉材料中の前記尿試料からの前記小胞の捕捉がもたらされ、それにより前記小胞が捕捉される方法により単離される。

30

【0016】

いくつかの実施形態においては、前記小胞捕捉材料は、前記材料の複数の層を含む。いくつかの実施形態においては、前記小胞捕捉材料の前記複数の層は、ガラス繊維の、少なくとも第一層および第二層を含む。いくつかの実施形態においては、直径が約1.6ミクロン以上である前記生体試料からの材料を捕捉するために、前記生体液を、前記ガラス繊維の第一層を通過させる。いくつかの実施形態においては、直径の最小サイズが約0.6ミクロン～約0.8ミクロンであり、かつ最大サイズが1.6ミクロン未満である小胞を捕捉するために、前記生体液を前記ガラス繊維の第二層を通過させる。

40

【0017】

RNAに関連する小胞を含む少なくとも2つの尿の試料を患者から採取すること、前記小胞を前記試料から単離すること、前記小胞を溶解させて、腎機能に関連するRNAおよび腎機能に応じて変化しないRNAを含む前記小胞関連RNAを放出させること、前記腎機能に関連するRNAおよび前記腎機能に応じて変化しないRNAを定量化すること；な

50

らびに前記患者からの前記腎機能に関連するRNAの量と腎機能に応じて変化しないRNAの量との間の割合を決定すること、を含む腎機能の特徴を決定する方法であって、前記2つ以上の尿試料の間の割合における差が、前記患者の腎機能の変化を示す方法も、本明細書において提供されている。

【0018】

一実施形態においては、前記腎機能に応じて変化しないRNAは、ベータ - アクチンまたはベータ - 2 - ミクログロブリンのいずれか1つである。

【0019】

いくつかの実施形態においては、細胞残屑およびRNAに関連する小胞を含む尿の試料を患者から採取すること、前記小胞を前記細胞残屑から分離すること、前記小胞を溶解させて、腎機能に関連するRNAを含む溶解物を得ること；ならびに前記腎機能に関連するRNAを定量化することを含む、核酸に基づき腎機能の変化を検出する方法であって、尿中に通常みられる量と比較した前記尿試料からの前記RNAの量の増加または減少が、前記患者における変化した腎機能と相関する方法も提供されている。

10

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1A】尿量の分析を示す。

【図1B】尿量の分析を示す。

【図2A】3人のドナーの尿試料からのRT - PCRの結果を示す。

【図2B】3人のドナーの尿試料からのRT PCRの結果を示す。

20

【図3A】尿に対する、凍結 - 解凍サイクルの効果を示す。

【図3B】尿に対する、凍結 - 解凍サイクルの効果を示す。

【図3C】尿に対する、凍結 - 解凍サイクルの効果を示す。

【図4A】尿mRNAの経時的なモニタリングを示す。

【図4B】尿mRNAの経時的なモニタリングを示す。

【図5A】早朝尿試料とその後の試料からの蓄尿との比較を示す。

【図5B】早朝尿試料とその後の試料からの蓄尿との比較を示す。

【図5C】早朝尿試料とその後の試料からの蓄尿との比較を示す。

【図5D】早朝尿試料とその後の試料からの蓄尿との比較を示す。

【図5E】早朝尿試料とその後の試料からの蓄尿との比較を示す。

30

【図5F】早朝尿試料とその後の試料からの蓄尿との比較を示す。

【図6A】対照群および（血清クレアチニン濃度に基づいて分けられた）移植後の患者の2つの群における、陽性に検出された腎臓機能関連mRNAの発現の比較を示す。

【図6B】対照群および（血清クレアチニン濃度に基づいて分けられた）移植後の患者の2つの群における、陽性に検出された腎臓機能関連mRNAの発現の比較を示す。

【図6C】対照群および（血清クレアチニン濃度に基づいて分けられた）移植後の患者の2つの群における、陽性に検出された腎臓機能関連mRNAの発現の比較を示す。

【図6D】対照群および（血清クレアチニン濃度に基づいて分けられた）移植後の患者の2つの群における、陽性に検出された腎臓機能関連mRNAの発現の比較を示す。

【図6E】対照群および（血清クレアチニン濃度に基づいて分けられた）移植後の患者の2つの群における、陽性に検出された腎臓機能関連mRNAの発現の比較を示す。

40

【図6F】対照群および（血清クレアチニン濃度に基づいて分けられた）移植後の患者の2つの群における、陽性に検出された腎臓機能関連mRNAの発現の比較を示す。

【図6G】対照群および（血清クレアチニン濃度に基づいて分けられた）移植後の患者の2つの群における、陽性に検出された腎臓機能関連mRNAの発現の比較を示す。

【図6H】対照群および（血清クレアチニン濃度に基づいて分けられた）移植後の患者の2つの群における、陽性に検出された腎臓機能関連mRNAの発現の比較を示す。

【図7A】データ分析のための代替正規化スキームを示す。アルブミンの発現に正規化したmRNA発現データを示す。

【図7B】データ分析のための代替正規化スキームを示す。アルブミンの発現に正規化し

50

た mRNA 発現データを示す。

【図 7 C】データ分析のための代替正規化スキームを示す。アルブミンの発現に正規化した mRNA 発現データを示す。

【図 7 D】ベータ - アクチンの発現に正規化した mRNA 発現データを示す。

【図 7 E】ベータ - アクチンの発現に正規化した mRNA 発現データを示す。

【図 7 F】ベータ - アクチンの発現に正規化した mRNA 発現データを示す。

【発明を実施するための形態】

【0021】

詳細な説明

一般

医師の診断は、典型的には、現在の症状に基づくものであるのはもちろんのこと、患者の病歴に基づくものでもある。基礎疾患の徴候を明らかにする可能性のある身体検査に加え、最初の診断を確認するために、診断検査が発注されることもある。腎機能の評価によって、臓器の尿を産生する機能として、診断分析のための独特な状況が提供され、その結果の構成は、血液中の化合物の濃度変化に伴って反映される。よって、腎機能は、尿および/または血液の2種類の流体を用いて評価することができる。

【0022】

多くの診断検査は、流体中の特定のタンパク質を検出することに向けられたものである。しかしながら、タンパク質に基づくアッセイは、特定の標的濃度では効率的であるものの、低い標的濃度では、感度の不足に悩まされる可能性がある。核酸検出に基づく診断技術は、より高い度合いの感度を多くの場合において提供する、タンパク質検出に対する代替法を提供する。核酸は、血液または尿試料から得られる細胞から単離することができるが、細胞外にも存在する。本明細書において開示されているいくつかの実施形態は、患者尿試料中に存在する小胞に関連するRNAの単離に向けられたものであるが、いくつかの実施形態においては、通常は血液または血漿中にみられるRNA（および関連マーカー）を、尿試料から単離する。いくつかの実施形態においては、これらの血液によって運ばれるマーカーは、腎臓の正常な血液濾過機能を損なってきた腎臓の損傷または疾患に起因して尿中に存在する。

【0023】

腎機能の喪失は本質的に進行性であり、機能喪失または疾患のいくつかのマーカーは、その疾患が十分に確立されるまで、伝統的な診断法では検出されないことがある。こうした場合には、その腎疾患が進行するにつれて予後は次第に悪くなる。したがって、腎疾患の早期検出はより容易な治療体制につながり、あるいは患者の転帰の有意な改善にもつながる可能性がある。よって、腎疾患または機能喪失の早期段階の検出および特徴決定において現在用いられている診断検査に対する、より感度のよい代替法が必要とされている。

【0024】

小胞関連RNA

本明細書において開示されているいくつかの実施形態においては、患者体液の試料からのRNAの捕捉および疾患および/または組織特異的マーカーについてのそのRNAのその後の分析のための方法が提供されている。いくつかの実施形態において当該方法は、RNAに関連する小胞の、患者尿試料からの単離を含む。他の実施形態においては、小胞は、血漿、血清、脳脊髄流体、痰、唾液、粘液、涙等から得る。多くの診断検査は、少量の患者流体試料を使用することを中心に設計され、またいくつかの実施形態においては、少量（例えば15～50mLの尿）を用いる。しかしながら、いくつかの実施形態では、大量の患者尿が容易に利用可能であるため、特に有利である。

【0025】

いくつかの実施形態においては、患者から採取した尿の試料を、腎臓および/または腎機能に関連する核酸について評価する。以下で記載されているように、いくつかの実施形態においては、これらの核酸は小胞関連である。いくつかの実施形態においては、検出される核酸は、腎疾患および/または機能を示すものである。いくつかの実施形態において

10

20

30

40

50

は、これは、これらの核酸は通常は尿中に存在しないからである。いくつかの実施形態においては、検出される核酸は、これらの核酸が正常な腎機能を有することが分かっている個体の集団（例えば対照群）に比べてより大きいまたはより小さい濃度で患者尿試料中に存在することから、腎疾患および/または機能を示すものである。いくつかの実施形態においては、（例えば治療または疾患の進行に対する患者の応答をモニターするために）尿を回収し、経時的に核酸を評価する。

【0026】

種々の実施形態に従って、mRNAを定量化するための種々の方法を用いるが、これらにはノーザンプロット分析、RNase保護アッセイ、PCR、核酸配列に基づく増幅、分岐DNA増幅、およびDNAまたはRNAマイクロアレイ分析が含まれる。加えて、いくつかの実施形態においては、クロマチン免疫沈降を核酸配列決定と組み合わせてタンパク質・核酸相互作用を同定するチップ・シーケンシングを用いて、小胞関連RNAを分析してもよい。

10

【0027】

RNAは、典型的には細胞内環境中に含有されるが、RNAは細胞外にも存在する。いくつかの場合においては、RNAは裸である（例えば、封じ込められていないか、または、別の構造若しくは化合物と関連しない）。RNAを分解するRNaseは、いくつかの病態において、例えば特定の癌において、上昇することが知られている。血漿、血清または尿などの細胞外環境は、かなりの量のRNaseを含有することが知られている。この状況を考慮すると、細胞外RNAは、そのレベルが細胞内のメッセージの真のレベルを代表してはいないかもしれないからというだけでなく、RNAの不安定性および質の悪さにも起因して、細胞外試料の無意味な分解産物とみなされることが多い。しかしながら、いくつかの場合においては、RNAは、細胞外小胞に関連する。いくつかの実施形態においては、腎疾患/機能の診断および特徴決定は、患者試料（例えば尿）から単離した、RNAを含有する小胞からの特異的RNA種の検出および定量化により行われる。いくつかの実施形態においては、こうした小胞はフィルター上に捕集され、それにより小胞からのRNA抽出が可能となる。

20

【0028】

細胞外環境における速い速度のRNA分解に起因して、従来理解では、多くの組織は診断の標的として適した細胞外RNAを産生することができないが、これは、かかるRNAが検出のための鋳型として用いられるより前に分解されるであろうためである、ということが示唆される。しかしながら、本出願人は期せずして、細胞外RNAは、本明細書において開示されている方法のうちいくつかに従って評価する場合には、患者尿試料中の細胞外小胞からの腎機能または疾患を反映する腎臓特異的マーカーの検出を有利に可能にする、ということを見出した。

30

【0029】

細胞外RNAは、膜粒子（大きさが50~80nmの範囲）、エキソソーム（大きさが50~100nmの範囲）、エキソソーム様小胞（大きさが20~50nmの範囲）、および微小胞（大きさが100~1000nmの範囲）のいずれか1つ以上の異なるタイプに関連することが多い。いくつかの実施形態においては、これらの小胞は単離および/または濃縮され、それにより高RNase細胞外環境にもかかわらず小胞関連RNAが保持される。いくつかの実施形態においては、これらの技術では、診断法の感度を上昇させるために、質の高いRNAの、この予期せぬ供給源が利用された。

40

【0030】

いくらかのRNAは小胞関連である、との認識の後でさえ、多くのRNA精製技術は、小胞関連RNAを効率的に捕捉および保持するよう適合されることはなかった。多くの場合、試料を遠心により密度勾配で分離し、試料の非細胞部を分画する。いくつかの場合においては、この後には、小胞の沈降またはペレット成形を生じさせるための、高速遠心が続く。こうしたアプローチは時間のかかるものであり、また、本明細書において開示されている特定の実施形態において用いられている形式と比べると、高価でかつ特殊化された

50

機器を要する可能性がある。さらには、いくつかの場合においては、RNAは超遠心に伴う高い圧力によって損傷を受ける可能性がある。いくつかの実施形態においては、本明細書に記載されている方法は、速く、安価で、再現性が高く、また、繰り返される測定間での変動性が低い。さらに、いくつかの実施形態は、それらがRNA分解の危険を冒すような冗長なプロトコルを必要としないという点で、特に有利である。

【0031】

いくつかの実施形態においては、本明細書に記載されている方法および装置では、種々の大きさの小胞を捕捉するために種々のタイプのフィルターが採用される。いくつかの実施形態においては、小胞の示差的(differential)捕捉は、タンパク質マーカの表面発現に基づいて行われる。特異的表面マーカに対して反応性であるフィルター、例えば小胞の表面のマーカに結合する抗体に結合するフィルターなどを有することにより、特異的なタイプの小胞または異なる起源の小胞が単離される。いくつかの実施形態においては、当該マーカは、独特な小胞タンパク質またはペプチドである。また、いくつかの病態においては、当該マーカは特定の修飾を含んでいてもよく、それらは、いくつかの実施形態においては、特定の小胞を単離するために用いられる。修飾としては、脂質、炭水化物、および他の分子、例えばアシル化、ホルミル化、リポイル化、ミリストリル化、パルミトイル化、アルキル化、メチル化、イソプレニル化、プレニル化、アミド化、グリコシル化、ヒドロキシル化、ヨウ素化、アデニル化、リン酸化、硫酸化、およびセレノイル化、ユビキチン化など、の付加が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態においては、当該小胞マーカには、例えば脂質、炭水化物、核酸、RNA、DNA等の、非タンパク質が含まれる。

10

20

【0032】

いくつかの実施形態においては、表面マーカに基づく小胞の特異的捕捉は、種々の捕捉分子(例えば、種々の特異性を有する抗体)でコートしたプローブを患者尿試料中にディップすることによってそれぞれ異なるタイプの小胞を捕捉する、「ディップ・スティック」形式も可能にする。

【0033】

腎臓の構造、機能、および疾患

ヒトの腎臓は、通常、豆形の構造を有し、各腎臓は凹状表面と凸状表面とを有する。腎門は、凹状表面であり、また、腎臓に腎動脈が入り、腎静脈と尿管とが出る箇所である。腎臓の内部の解剖学的構造は、2つの主要構造(組織型)、腎皮質(表面領域)、および腎髄質(より内部の領域)に分けられる。腎臓の機能単位であるネフロンは皮質と髄質とにまたがる。ネフロンの最初の濾過部は、皮質中に位置する腎小体であり、その後皮質から髄質深くへと通過する腎尿細管が続く。

30

【0034】

腎小体は、血液を濾過して尿を形成する際の最初の工程を行う糸球体と糸球体を取り囲むボーマン嚢とを含む。ほとんどの他の毛細血管床とは対照的に、糸球体は、細静脈というよりも、むしろ輸出細動脈へと流し込み、その結果として、糸球体における高い逆圧がもたらされる。この糸球体における高圧力は、血液中の流体および可溶性材料が毛細血管から押し出されてボーマン嚢へと入る限外濾過に役立つ。この高い圧力は、特定の病態では、腎臓損傷につながる可能性もある。例えば、糖尿病においては、血液中における比較的大きな溶質であるグルコースのレベルの上昇は、糸球体への物理的損傷を引き起こすことがある。上昇したグルコースレベルは、腎臓に入る血流の速度を上昇させて、濾過糸球体にさらなる負荷をかけ、血圧を上昇させると思われるため、この最初の損傷は、さらなる高血中グルコース期間によりさらに悪化する可能性がある。

40

【0035】

糸球体を通過した後、濾液は、近位尿細管、ヘンレ係蹄、遠位曲尿細管、および集合管を通過する。要するに、これらの解剖学的構造は、皮質から髄質への濃度勾配を生じさせる機能を果たし、これにより濾液からの水の再吸収が可能となり、これにより排出のための濃縮尿が作り出される。

50

【0036】

腎臓は、泌尿器系の必須の要素であり、また、恒常性機能、例えば電解質の制御、酸塩基バランスの維持、および血圧の制御などを提供するものでもある。腎臓の機能とは、おおまかに言えば、血液を濾過すること、種々の毒素、代謝老廃物を分泌すること、ならびに/または特定の栄養素、アミノ酸、および水を再吸収することである。健康な腎臓は、毎日約180リットルの濾液から約2リットルの尿を生じることから、水の再吸収は重要な機能である。加えて、腎臓は細胞外液量および血圧の制御を制御する、酸塩基バランスおよび電解質濃度の制御に関与する。これらの多様な腎機能は、腎臓の濾過機能を通じて、また内分泌系との統合を経て達成されるものである。腎臓は、種々のホルモン、とりわけレニン、アンジオテンシンII、アルドステロン、抗利尿ホルモン、および心房性ナトリウム利尿ペプチドなどに応答性であるか、またはこれらを産生する。

10

【0037】

腎臓に関係する一般的な臨床的状态としては、腎炎症候群（具体的に、糸球体に対する損傷）および腎炎症候群（一般的に、腎臓に対する損傷）、腎嚢胞、急性腎傷害、慢性腎疾患、尿路感染症、腎石症（腎石）、ならびに尿路閉塞症が挙げられる。種々の腎臓の癌が存在しており、これらに限定されるものではないが例えば腎細胞癌、ウィルムス腫瘍、および腎細胞癌などが挙げられる。

【0038】

本明細書に記載されているいくつかの実施形態は、腎機能および/または疾患に関連するマーカーをハイスループットプロトコルにて迅速に評価することができるため有利である。このような試料採取アプローチは、超遠心または他の特殊化したおよび/もしくは広範な単離手順を必要とする伝統的な精製技術では難しい。いくつかの実施形態は、これらに限定されるものではないが例えば慢性腎疾患、急性腎不全、糖尿病性腎症、糸球体腎炎、糸球体硬化症、巣状分節性糸球体硬化症、膜性腎症、微小変化群、ならびに他の疾患、例えばアテローム性動脈硬化症、高血圧、心血管疾患、肥満症、高コレステロール血症、糖尿病、膠原病、および医薬または他の化合物により引き起こされる腎臓損傷などに続発する腎疾患などを含む、種々の腎疾患（またはそれに関連する機能喪失）を診断および/またはモニターするために用いられる。

20

【0039】

いくつかの実施形態においては、腎臓の脈管構造、特に腎血管の内皮に対する損傷を、いくつかの実施形態における診断の標的である腎内皮細胞特異的mRNAの評価によって検出する。本発明のいくつかの実施形態においては、当該マーカーは、血液恒常性に関連し、例えば内皮細胞マーカーであるフォン・ウィルブランド因子（VWF）、トロンピン、第VII因子、プラスミン、およびフィブリンなどである。フォン・ウィルブランド因子は、内皮が損傷を受けた場合に放出されるといったような、血小板粘着のメディエーターである血漿糖タンパク質である。VWFは、血小板凝集、および血栓形成に関与する。いくつかの実施形態においては、当該マーカーは、例えばウロモジュリンとしても知られるタム・ホースフォール糖タンパク質（THP）、レニン、溶質キャリアトランスポーター（とりわけ、SLC12A1、SLC22A6、SLC22A8、およびSLC22A12を含む）、ウロモジュリン関連腎疾患マーカー（UMOD）、オステオポンチン（SPP1）、およびアルブミン（ALB）などの腎マーカー、または例えばマトリックスメタロペプチダーゼ1（MMP1）、およびマトリックスメタロペプチダーゼ3（MMP3）などの腎線維症マーカーであってもよい。

30

40

【0040】

いくつかの実施形態においては、尿小胞から単離されるマーカーRNAは、腎臓癌を示すものである。このようなマーカーとしては、いくつかの実施形態においては、胎児性癌抗原（CEA）、ムチン、アルファフェトプロテイン、チロシナーゼ、メラノーマ関連抗原、および変異腫瘍タンパク質53、p21、PUMA、前立腺特異抗原（PSA）またはサイログロブリンが挙げられる。患者の尿小胞からの癌関連RNAのレベルを定量化し、それを既知の健康な範囲または標準と比較することにより、腎臓癌の存在を検出するこ

50

とができる。当該分野において公知の他の腎臓癌マーカーが、他の実施形態において用いられる。

【0041】

本明細書において開示されている方法のいくつかの実施形態は、既存の診断方法およびモニタリング方法に勝る、予期せぬ利点を提供する。例えば、腎疾患のための診断検査のいくつかは、典型的には針による臓器の穿刺を経て行われる腎生検を必要とする。生検技術には、例えば制御不能な出血および感染など関連するリスクがある。本明細書に記載されている方法は、腎疾患を示すかまたは腎機能の特徴づけるRNAを非侵襲的に同定する機会を提供する。よって、いくつかの実施形態は、意外にも遠隔試料採取および関連する患者リスクの増加を伴わない腎臓の評価を可能にする。

10

【0042】

腎疾患を直接的に検出することに加え、本明細書において開示されている方法のいくつかの実施形態は、腎機能の喪失（またはその症状）を、腎臓特有ではないが腎臓に二次的に影響を与える他の疾患と関連させるために用いられるため特に有利である。例えば、真性糖尿病は高い血中グルコースレベルを特徴とするものであり、脂肪、タンパク質、および炭水化物代謝の慢性的障害である。上記にて考察したように、血中グルコースレベルの上昇は腎臓損傷および最終的な腎機能の低下につながる可能性がある。いくつかの場合においては、真性糖尿病は、1種類以上の心血管疾患の発生をもたらすか、または1種類以上の心血管疾患に関連し、これにより腎臓損傷がさらに悪化するおそれがある。正常に機能する代謝を有する健常人においては、インスリンは膵臓のベータ細胞により産生される。その後のインスリン放出によって、細胞がグルコースを吸収するということが可能となる。対照的に、病気の状態では細胞はグルコースを吸収せず、血液中に蓄積する。これは、腎臓に対する損傷および/または合併症、ならびに例えば心血管疾患（冠動脈疾患、末梢血管疾患、および高血圧）のような合併症につながる可能性がある。糖尿病のタイプによって、糖尿病を患っている患者は、十分なインスリンを産生しないか、または彼らの体が産生しているインスリンに彼らの細胞が適切に応答しないかのいずれかである。多くの場合、前糖尿病性の人々および/または糖尿病を患っている人々は、早期症状と共に生活しているが、それらの早期症状は彼らの生活または健康の他の局面に関連しているとして忘れられてしまう。例えば、食後の吐き気は、この症状が実際には血中グルコースレベルの上昇に起因する場合であっても、胸やけとして無視される可能性がある。長期にわたるこうした症状の無視は、実際の診断の前に、他の症状の中でもとりわけ極端な腎臓損傷につながる可能性がある。いくつかの実施形態においては、本明細書において開示されている方法は、不可逆的腎臓損傷を既に受けるほど症状が重篤になる前に、糖尿病に起因する腎臓損傷の早期マーカーを検出するために、定期身体検査において行うことができる。

20

30

【0043】

他の疾患によって、二次的な腎臓損傷をもたらされることがあるが、この腎臓損傷は、いくつかの実施形態に従った尿小胞の分析により検出される。二次的腎臓損傷を引き起こすこのような疾患としては、例えば、テローム性動脈硬化症、高血圧、肥満症、高コレステロール血症、高リポタンパク質血症、高トリグリセリド血症、自己免疫疾患、感染症（ウイルス性および/または細菌性）が挙げられる。

40

【0044】

例えば、いくつかの実施形態においては、腎臓に対する全身性疾患の影響の特徴を決定する。そうした全身性疾患としては、全身性自己免疫疾患、例えば関節リウマチ、全身性紅斑性狼瘡、グッドパスチャー症候群、IgA腎症、および全身性硬化症など、が挙げられるが、これらに限定されない。これらの疾患は、患者の体に向けられた過剰な免疫応答の結果として生じることが多い。腎臓損傷、疾患、または機能喪失を検出することは、特に有益であり、いくつかの実施形態においては、これらの疾患のうちのいくつか（例えば全身性紅斑性狼瘡など）は、体の細胞および組織に対する進行性の免疫攻撃を特徴とし、それにより、例えば腎臓などの、進行的なより大きな損傷組織がもたらされるといえる。よって、いくつかの実施形態は、疾患過程の早期の穏やかな腎臓作用の検出が、

50

より壊滅的な組織損傷の予防を助ける可能性があるため、有利である。

【0045】

いくつかの実施形態においては、体の他の部分における感染は腎疾患につながる可能性がある。いくつかの実施形態において、本明細書において開示されている方法は、連鎖球菌感染（例えば連鎖球菌咽頭炎）の後に生じ得る急性の連鎖球菌感染後糸球体腎炎（PSGN）を検出するために用いられる。いくつかの実施形態において、本明細書において開示されている方法は、細菌性心内膜炎の結果として生じる腎疾患を検出するために用いられる。細菌性心内膜炎は心臓の内部の組織の感染症であるが、それに続く糸球体疾患にも関連する。心内膜炎は、時には慢性腎疾患を引き起こす。加えて、いくつかの実施形態において、本明細書において開示されている方法は、HIV感染の結果として生じる腎疾患を検出するために用いられる。

10

【0046】

他の実施形態において、感染症の診断は、尿小胞中に存在する感染性因子からのRNAまたはDNAの検出により達成される。いくつかの実施形態において、当該感染性因子は、重症急性呼吸器症候群（SARS）関連コロナウィルス、インフルエンザ、およびC型肝炎、A型インフルエンザ、口蹄疫ウィルス、ヒトボカウィルス（HBov）であってもよく、またトリパノソーマ・ブルーセイのような寄生生物であってもよい。

【0047】

いくつかの実施形態においては、ハウスキーピング遺伝子産物もしくは構成的に発現する遺伝子産物、または基本的細胞機能のマーカーを、マーカーまたは対照として用いることができ、これらとしては例えばグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ、アクチン（ACTB）、およびβ2ミクログロブリン（β2M）が挙げられる。当該分野において公知の他のハウスキーピング遺伝子が、他の実施形態において用いられる。

20

【0048】

いくつかの実施形態においては、患者の腎臓の疾患および/または機能状態を経時的にモニターする。いくつかの実施形態においては、尿の第一試料を患者から回収し、特異的遺伝子（1または複数）についての小胞または粒子関連RNAのレベルを決定する。第二試料またはその後の試料を、その患者から回収し、特異的RNAのレベルを決定する。よって、患者の腎臓における変化は、第一試料RNAレベルを第二試料RNAレベルと比較することによって決定してもよく、またはこれら試料を対照または標準と比較することによって決定してもよい。いくつかの実施形態においては、第一および/または第二患者試料の回収の前または後に、患者に薬が投与されていてもよい。いくつかの実施形態においては、当該薬は、薬剤、栄養補助食品、ビタミン、免疫抑制剤、抗炎症剤、麻酔薬もしくは鎮痛薬、幹細胞、移植片または腎臓移植であってもよい。いくつかの実施形態においては、当該モニタリングは、患者の、例えばカロリー摂取量の減少などの栄養の変化、または増加した水分補給、または運動ルーチンの変化、または睡眠パターンの変化に関するものであってもよい。

30

【0049】

方法論

遊離の細胞外RNAは、ヌクレアーゼによって急速に分解され、このヌクレアーゼが、当該RNAを潜在的に乏しい診断マーカーにしている。上述したように、いくらかの細胞外RNAは、尿中にみられる粒子または小胞に関連する。mRNAを含むこの小胞関連RNAは、尿における分解プロセスから保護される。微小胞は、ほとんどの細胞型から抜け落ちるものであり、また細胞膜の断片からなるものである。微小胞は、RNA、mRNA、マイクロRNA、およびタンパク質を含有するものであり、またそれらが抜け落ちる際の起源となる細胞の組成を反映するものである。エキソソームは、広い範囲の哺乳類細胞により分泌される小さな微小胞であり、また正常条件および病的条件の下で分泌される。これらの小胞は、特定のタンパク質、ならびにmRNAおよびマイクロRNAなどのRNAを含有する。また、エキソソームは腎臓によって尿中へ放出され得るので、それらの検出は本明細書におけるいくつかの実施形態において記載されているように、診断ツールと

40

50

して役立つ可能性がある。エキソソーム様小胞は、尿の他にも多くの体液にもみられ、とりわけ血液、腹水、および羊水などが挙げられる。いくつかの実施形態では、核酸が評価され、とりわけ低分子干渉RNA (siRNA)、tRNA、および低分子活性化RNA (saRNA)などが挙げられる。

【0050】

いくつかの実施形態においては、当該RNAは相補的DNA (cDNA) を作製するための鋳型として用いられる。いくつかの実施形態においては、cDNAはポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて増幅される。また、他の実施形態においては、核酸およびRNAの増幅はなんらかの適切な増幅技術、例えば核酸に基づく増幅 (NASBA) もしくは核酸のプライマー依存性連続増幅またはリガーゼ連鎖反応などによって達成されてもよい。

10

【0051】

いくつかの実施形態においては、疾患は1種類以上のマーカーの発現を誘導するが、前記マーカーをコードするmRNAの量により測定される。いくつかの実施形態においては、尿を患者から回収し、そのまま評価する。他の実施形態においては、尿小胞をフィルター上に捕集することにより濃縮する。単離した小胞は、次いでそれら小胞からRNAを放出させるために溶解緩衝液と共にインキュベートするが、このRNAはその後、例えば定量的PCRなどの方法 (または他の適切な増幅技術) で定量化されるcDNAの鋳型として働く。いくつかの実施形態においては、患者小胞からの特異的マーカーRNAのレベルを、例えば健康な患者の集団からのRNAレベル、または同じ患者からのより早い時点からのRNAレベルもしくは同じ患者からの対照遺伝子などの所望の対照と比較する。

20

【0052】

いくつかの実施形態においては、1種類以上のマーカーをコードするmRNAのレベルは、一人の患者において、疾患の有無に依存して有意に変化することとなる。これらのmRNAレベルを決定するために、いくつかの実施形態においては、mRNAを単離および増幅するためのデバイスを用いて、mRNAを含有する小胞を血漿から単離する。このデバイスの実施形態は、米国特許出願：第10/796,298号、第11/525,515号、第11/376,018号、第11/803,593号、第11/803,594号、および第11/803,663号により詳細に記載されており、これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み入れられるものとする。

30

【0053】

特定の実施形態には、マルチウェルプレートが含まれ、このマルチウェルプレートは複数の試料運搬ウェル、それらのウェルの下の小胞捕捉フィルターおよびそのフィルターの下の、固定化オリゴ (dT) を含有するmRNA捕捉ゾーンを有する。特定の実施形態においては、当該デバイスは真空箱をも有し、この真空箱は真空圧が印加される場合に尿が当該試料運搬ウェルから当該小胞捕捉フィルターを通過して引かれ、それにより小胞が捕捉され、またそのフィルターを洗浄することにより非小胞尿中成分が除去されることが可能となるよう、当該プレートと当該箱との間の封をするために当該フィルタープレートを受けよう適合されている。他の実施形態においては、試料ウェルを通過しておよび小胞捕捉フィルターを通過して尿試料を引く他の手段、例えば遠心または陽圧などを用いる。当該デバイスのいくつかの実施形態においては、小胞は一緒になって層をなす複数のフィルター膜上に捕捉される。いくつかの実施形態においては、その捕捉された小胞をその後溶解緩衝液で溶解し、それによりその捕捉された小胞からmRNAを放出させる。その後、このmRNAは当該mRNA捕捉ゾーン中に固定化されたオリゴ (dT) にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において用いられてもよい溶解緩衝液の組成に関するさらなる詳細は、米国特許出願：第11/376,018号中に記載されており、この特許出願は参照によりその全体が本明細書に組み入れられるものとする。いくつかの実施形態においては、cDNAをオリゴ (dT) 固定化mRNAから合成する。いくつかの実施形態においては、その後このcDNAを、疾患関連マーカーの増幅用に特異的に設計されたプライマーでリアルタイムPCRを用いて増幅する。このような実施形態において用いられるプラ

40

50

イマーを表 1 に示す。いくつかの実施形態において用いられる PCR 反応に関するさらなる詳細も、米国特許出願：第 11 / 376, 018 号に記載されている。

【 0 0 5 4 】

【 表 1 】

表 1: RT-PCR増幅用プライマー配列

標的	配列番号	フォワードプライマー(5'-3')	配列番号	リバースプライマー(3'-5')
β アクチン	1	CCTGGCACCCAGCACAAAT	2	GCCGATCCACACGGAGTACT
β-2マイグロブリン(B2M)	3	TGACTTTGTACACAGCCCAAGATA	4	AATGCGGCATCTTCAAACCT
VWF	5	CCCTGGGTTACAAGGAAGAAAAT	6	AGTGTCATGATCTGICCTCCTCTTAG
MMP1	7	CGGTTTTTCAAAGGGAATAAGTACTG	8	GAAGCCAAAGGAGCTGTAGATGTC
MMP3	9	TCCCAAGCAAATAGCTGAAGACT	10	TICTTTGCATTTGGGTCAAAACCTC
REN	11	GFGCACACTGGCCATCCA	12	AAACTCTGTGTAGAACTTTCCGGATGA
SLC12A1	13	ACTCCAGAGCTGCTAATCTCATTTGT	14	AACTAGTAAGACAGGTGGGAGGTTCT
SLC22A6	15	ACAATGATCC GCGCTGTCA	16	GTCGCGTCTG TTCCCTTTC
SLC22A8	17	TCTACACAAGTGAATTATACCCACAGT	18	CGCGGGTCCACAGGTTACT
SLC22A12	19	GGACCTGTATCTCCACGTTG TG	20	GATGTCCACGACACCAATGA AC
UMOD	21	CCTGAAC TTGGGTCCCA	22	GCCCCAAGCTGCTAAAAGC
SPP1	23	AGCCAATGATGAGAGCAATGAG	24	TGGAATTCACGGCTGACTTTG
ALB	25	TGCAAGGCTGACGATAAGGA	26	GTAGGCTGAGATGCTTTTAAATGTGA
PDCN	27	AGGATGGCAGCTGAGATTCTGT	28	AGAGACTGAAGGGTGTGGAGGTAT
NPHN	29	CTTCCCTGGGCACTTGTATG A	30	TCATAGATTCTCTTGGATCCTGAT
CUBN	31	CCGGCTATCCAGGCACATA	32	CCTTCCAGCAGGAGCAACAA
LRP2	33	GCACAGATGGAGAACGAGCAA	34	AGCAGGGAGCGAAGGTGAT
AQP9	35	AAACAAC TTCTGGTGGATTCTGT A	36	GCTCTGGATGGTGGATTTC AA

10

20

30

40

50

【 0 0 5 5 】

当該 PCR 反応の完了後、1 種類以上のマーカーについての mRNA (検出された、PCR で増幅された cDNA の量により表される) を定量化する。特定の実施形態においては、定量化は、疾患マーカーをコードする mRNA の量を、基準値と比較することにより算出される。いくつかの実施形態においては、当該基準値は、病気でない健康な患者にみられる mRNA の量である。他の実施形態においては、当該基準値はハウスキーピング遺伝子の発現レベルである。特定のこのような実施形態においては、ベータ - アクチンまたは他の適切なハウスキーピング遺伝子が、当該基準値として用いられる。また、当該分野においてよく知られている多数の他のハウスキーピング遺伝子を、基準値として用いてもよい。他の実施形態においては、最終的な比較が、病気の患者からのマーカーの発現レベルの、病気でない (対照) 試料からの同じマーカーの発現レベルとの比較となるように、ハウスキーピング遺伝子を補正因子として用いる。いくつかの実施形態においては、当該ハウスキーピング遺伝子は、組織特異的遺伝子またはマーカー、例えば上記で検討したものなどである。さらに他の実施形態においては、当該基準値は、マーカーの定量化が絶対数により表されるようにゼロである。いくつかの実施形態においては、病気の患者からの 1 種類以上のマーカーの発現を、病気でない人からの 1 種類以上の他のマーカーの発現と比較する割合が作成される。

【 0 0 5 6 】

いくつかの他の実施形態においては、患者への薬剤の投与の前および / または後に、腎マーカー発現を測定する。このような実施形態においては、(例えば腎疾患の治療における) 薬剤化合物の有効性を予測するためか、または、その薬剤化合物のを副作用 (例えば腎機能に対する影響) をモニターするために、発現プロファイルを用いてもよい。いくつかの実施形態においては、モニターされる薬剤は、慢性腎疾患、急性腎不全、糖尿病性腎症、糸球体腎炎、糸球体硬化症、巣状分節性糸球体硬化症、膜性腎症、微小変化群、アテローム性動脈硬化症、高血圧、心血管疾患、肥満症、高コレステロール血症、糖尿病、膠原病、癌、感染症、および / または免疫抑制疾患のいずれか 1 つ以上を治療するために投

与されていてもよい。いくつかの実施形態においては、薬剤化合物は特色のある mRNA プロファイルの発現を誘導することとなる。同様に、他の実施形態においては、薬剤は 1 種類以上のマーカーを阻害し得る。いくつかのこのような実施形態においては、薬剤処理の有効性を、特定の病態に関連するマーカーの消失によりモニターすることができる。

【0057】

いくつかの実施形態においては、本明細書に記載されている分析はヒト患者に適用可能であり、一方いくつかの実施形態においては、これらの方法は動物に適用可能である（例えば、獣医が診断する）。

【実施例】

【0058】

以下、限定する意味でというよりもむしろ例証としてみなされるべき以下の実施例を参照しながら、具体的な実施形態を説明する。

【0059】

実施例 1 - 尿 RNA 関連小胞の分析による腎機能の特徴の決定

潜在的に大量の患者尿試料の入手のしやすさを考慮すると、診断試料として尿を使用するのは一般的である。現在のほとんどの診断検査では、腎機能または損傷もしくは疾患に起因するその喪失の特徴を決定するために、尿中に排出される溶質が測定されるか、または尿生産速度が測定される。しかしながらここでは、RNA 種に関連する尿中に存在する小胞の存在を利用して、高感度かつ特異的な腎機能の診断分析を腎臓特異的マーカーの単離および増幅に基づいて行う。

【0060】

方法

3 人の健康なドナーからのヒト尿試料（各 3 つずつ）を、真空圧を印加しながら（上述したような）小胞捕捉フィルタープレートのフィルター膜に対して添加し、その後 2000 × g で 5 分間遠心を行った。遠心後、50 μL の溶解緩衝液を各ウェルに加え、次いでそれを 37 °C にて 10 分間インキュベートして、小胞を溶解させた。当該溶解緩衝液に、5 nM の標的遺伝子のリバースプライマーおよび / またはアンチセンスプライマーを追加した。プライマー配列を表 1 に示す。当該溶解緩衝液には、所望により、対照として働く合成 RNA も追加した。次いで、このフィルタープレートを、96 ウェルオリゴ (dT) 固定化プレート (GENE PLATE (登録商標)) 上に置き、小胞溶解物をこの GENE PLATE (登録商標) へと移動させるために 2,000 × g で 5 分間遠心した。遠心後、この GENE PLATE (登録商標) を、オリゴ (dT) と mRNA のポリ A テールとの間のハイブリダイゼーションのために、冷蔵庫に一晩入れた。次いで、この GENE PLATE (登録商標) を、150 μL の洗浄緩衝液 (0.5 M NaCl、10 mM Tris (pH 7.4)、1 mM EDTA) で 6 回洗浄した。1.25 mM の各デオキシヌクレオシド三リン酸、4 ユニットの rRNasin、および 80 U の MMLV 逆転写酵素を追加した、30 μL の逆転写緩衝液 (50 mM KCl、10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、5.5 mM MgCl₂、0.1% Tween 20) を各ウェルへ添加して、37 °C にて 2 時間で cDNA を合成した。

【0061】

次いで、この cDNA 溶液を iTaq SYBR (バイオ・ラッド社、カリフォルニア州ハーキュリーズ) を用いるリアルタイム PCR に使用した。cDNA の一部を、各 0.4 mM の dATP、dCTP、dGTP、および dTTP、50 U/mL の iTaq DNA ポリメラーゼ、6 mM の Mg²⁺、SYBR Green I、ROX リファレンス色素、ならびに安定剤を含有する、等しい量の 2 × 反応混合物と混合した。この混合物に、順方向および逆方向の遺伝子特異的プライマーを追加した。蛍光がバックグラウンドレベルを上回る閾値であるサイクル閾値 (Ct) は、SDS ソフトウェア (アプライドバイオシステムズ社) を用いる分析により決定した。Ct 値を使って、マーカー mRNA の元の相対量を算出した。

【0062】

10

20

30

40

50

結果

図1 Aに示されるように、対照遺伝子（ β -アクチン、ACTB）および図1 Bの腎臓特異的遺伝子（溶質キャリアファミリー12 A1（SLC12 A1、ナトリウム・カリウム・塩化物トランスポーター））は、100 μ Lの全尿から、用量依存的に検出された。100 μ Lと1000 μ Lとの間（10倍）の ΔCt は、およそ3（ $2^3 = 8$ 倍）であった。これは、理論値の範囲内である。これらの結果が示しているのは、本明細書に記載されている方法の実施形態によって、使用可能なRNAは尿小胞から得ることができるということである。全粗尿を用いた場合は、細胞残屑が存在するため、各フィルタープレートウェルに添加可能な最大尿量はおおよそ1 mLであった。しかしながら、尿試料を当該フィルタープレートに（ペレット細胞残屑に）加えるよりも前に、2000 \times gで15分間遠心した場合には、20 mLを超える上清をフィルタープレートに添加することができた（データ不掲載）。よって、大量の尿は容易に入手可能かつ処理可能であるため、いくつかの実施形態は尿に対して特に有用である。

10

【0063】

したがって、これらの方法を用いて、さらなる腎マーカーを分析した。1 mLの患者尿（各3つずつ）をフィルターウェルに添加し、遺伝子特異的プライマーを用いて、上述したように分析した。図2 Aには ΔCt データが示され、一方図2 Bは%ACTBへの正規化後の同じデータを示す。それぞれの印は、各ドナーにおける3つずつの試料の平均値を表す。図2 Aに示されているように、2つの対照遺伝子（ACTBおよび β 2ミクログロブリン（B2M））、ならびに腎臓特異的SLC12 A1、およびアルブミン（ALB、肝臓特異的であるが、腎臓でも発現）は、同程度に定量化された。もう一つの腎臓特異的遺伝子であるレニン（REN）および内皮細胞マーカーであるフォン・ウィルブラント因子（VWF）は、検出されなかった。これらの結果も、ACTBの値により正規化した（図2 B）。

20

【0064】

尿小胞から単離されたRNAの質に対する、尿試料の凍結および解凍の影響を判定するために、非凍結尿と完全な凍結-解凍サイクルを経験した尿とを比較した。各タイプの尿1 mL（各3つずつ）を、上述したように分析した。図3 Aに示すように、凍結試料のPCRの結果は、非凍結新鮮尿試料の結果と類似していた。さらに、凍結-解凍サイクルの回数は、mRNA分析に影響を与えなかった（図3 B）。また、粗尿を、遠心して細胞分画を除去しておいた尿と比較した。尿の2,000 \times g上清中のmRNAの量は、粗尿のそれよりもわずかに低かったが（図3 C）、mRNAは尿の非細胞分画中においてはしっかりと検出され、それにより尿の非細胞分画から単離された小胞はRNA分析に使用することができるということが示された。

30

【0065】

経時的に患者を正確にモニターする能力を実証するために、尿mRNAの日々の変動を、1人のドナーから5日間にわたって回収した尿試料を用いて分析した。回収した試料は、直ちに-80 $^{\circ}$ Cにて保存した。その後、試料を解凍して遠心した。5 mLの解凍尿の2000 \times G上清（各3つずつ）を、フィルタープレートに対して添加し、2つの対照遺伝子（ACTBおよびB2M）、ならびに4つの腎臓特異的遺伝子（SLC12 A1、ALB、UMOD、およびSPP1）を定量化した。図4 Aは ΔCt データを示し、一方図4 Bは%ACTBに変換したCt値を示す。

40

【0066】

SLC12 A1、ALB、UMOD、SPP1、ならびにACTB、およびB2MのmRNAは、すべての尿試料から絶えず検出されたが（図4 A）、一方他の遺伝子は検出されなかった。SLC12 A1、ALB、UMOD、SPP1が、いくつかの実施形態において用いられるが、他の実施形態においては、個体および腎臓の状態によっては他のマーカーが用いられる。当該経時的データは、腎臓特異的マーカー発現に日々の変動があったことを示していると思われ、これはおそらく腎機能の日周期的な変化を反映したものである。

50

【 0 0 6 7 】

図 5 A ~ 5 F に示されるように、腎マーカー発現の経時的な決まった変化はなかったようである。図 5 A ~ 5 F は、1 つの早朝尿試料中の腎臓特異的マーカー発現を、その後の試料からの蓄尿と比較したものを示している。統計的有意性はみられないが、いくつかの実施形態においては、個体および評価されているマーカーによっては、遺伝子発現の経時的な変化を検出することができる。

【 0 0 6 8 】

考察

上記に提示されているデータは、患者尿試料中に存在する小胞から単離すれば、RNA は、単離でき、処理でき、そして首尾よく遺伝子発現を評価することができるということを示す。この実験において使用したマーカーの組織発現プロファイルの特徴を決定するために、組織特異的な(体全体の)発現データを表 2 にまとめた。

【 0 0 6 9 】

【 表 2 】

表 2: 実験に用いた種々の遺伝子の発現プロファイル

	ACTB	B2M	VWF	MMP1	MMP3	REN	SLC12A	SLC22A	SLC22A	SLC22A	SLC22A	UMOD	SPPT	ALB
脂肪組織	4,484	3,040	836	0	0	0	0	0	0	0	0	0	152	0
副腎	4,018	3,328	59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	179	29
尿水	6,615	1,997	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24
腎臓	3,783	862	0	33	0	33	0	0	0	0	33	0	199	1,626
血液	7,283	5,132	8	56	0	0	0	0	0	0	0	0	288	2,118
骨	2,757	1,573	55	41	139	0	0	0	0	0	0	0	515	0
骨髄	3,990	3,501	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	223	0
能	4,004	207	57	1	2	10	14	15	0	0	20	642	66	66
腎部	6,433	701	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	41	0
結合組織	4,278	902	100	4,646	9,934	0	13	0	0	0	0	0	53	73
耳	1,896	61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,774	0
胚組織	4,864	120	0	41	0	4	0	0	0	0	0	0	403	268
食道	13,655	1,266	49	2,275	197	0	0	0	0	0	0	0	49	0
食道	2,269	368	94	4	33	0	9	52	0	0	0	0	276	18
食道	2,325	509	188	0	0	0	0	0	0	0	11	66	13,044	8
心臓	4,806	967	76	63	25	76	0	0	0	0	0	0	38	8
腎臓	3,076	446	56	9	0	37	752	404	465	583	10,956	1,735	1,213	0
腎臓	4,064	530	81	163	122	0	0	0	0	0	0	0	449	0
喉頭	2,466	1,319	9	4	0	0	4	0	0	0	0	0	187	58,985
肝臓	3,696	1,652	124	277	20	2	0	0	0	0	0	0	233	221
肺	8,603	472	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22
リンパ液	3,144	1,664	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10
リンパ節	3,177	478	116	0	0	0	0	0	0	0	0	0	90	9,552
乳腺	565	1,071	59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	59	0
口	804	425	73	46	18	0	27	9	0	0	9	36	942	0
筋肉	2,338	884	442	0	0	0	0	0	0	0	0	0	189	0
神経	3,741	662	68	19	0	0	0	0	0	0	0	0	107	0
卵巣	2,466	2,489	23	41	0	4	0	0	0	0	0	0	589	41
脾臓	290	2,324	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	145
副甲状腺	1,614	23,102	144	0	0	0	0	0	0	0	0	0	120	0
咽頭	896	2,749	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
下垂体	2,702	833	221	95	3	10	0	0	0	0	0	1,069	52	0
胎盤	2,428	902	52	0	5	0	0	0	0	0	5	15	0	0
前立腺	6,067	345	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
唾液腺	4,369	529	9	581	61	4	0	0	0	0	0	0	122	0
皮膚	6,346	2,664	388	0	72	0	0	0	0	0	0	0	18	7,660
脾臓	6,297	2,222	92	113	72	0	0	0	0	0	0	0	92	10
胃	2,326	87	36	0	3	3	0	0	0	0	0	0	66	9
睾丸	4,582	1,478	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	184
胸腺	6,027	729	208	7,799	62	0	0	0	0	0	0	0	20	0
甲状腺	12,146	1,232	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
扁桃腺	724	478	133	0	0	0	0	0	0	0	0	0	57	0
尿管	15,696	1,017	3,996	0	0	0	0	0	0	0	0	0	145	0
腎管	5,825	1,495	98	42	4	0	0	0	0	0	0	0	145	12
子宮	5,178	1,982	288	33,575	0	0	0	0	0	0	0	0	98	0
血管														

各値は、1,000,000のcDNAクロンでの発現頻度を表す。データは、UniGeneのEST(発現配列タグ)データベースから取得した。

【 0 0 7 0 】

表 2 に示されるように、ACTB および B2M はすべての組織にみられ、これらの遺伝子がハウスキーピング対照遺伝子として機能したということが確認された。しかしながら

、他の実施形態では、他のハウスキーピング遺伝子が用いられる。上記にて考察したように、vWF、MMP1、およびMMP3は、これらの患者からの尿試料では検出されなかった。しかしながら、これらの結果は、これらのmRNAの腎臓における低い発現レベル（表2）によって部分的に説明される。しかしながら、他の患者または特定の病態/損傷状態ではvWFは検出されており、これは、腎臓におけるいくらかの内皮損傷を示すものである可能性がある。同様に、いくつかの実施形態においては、MMP1および/またはMMP3は尿中に検出されており、これは、これらのMMPは両方とも結合組織中で高発現する（表2）ことから、腎臓における線維性変化を示すものである可能性がある。評価した腎臓特異的遺伝子（REN、SLC12A1、SLC22A6、SLC22A8、SLC22A12、UMOD）のうち、SLC12A1は、尿中でACTBおよびUMODよりも多く豊富に発現した（図2、4、5）。これらのデータは、いくつかの実施形態では、SLC12A1は腎機能の高感度マーカーであるということを示唆する。SLC12A1は、腎臓のヘンレのループの太い上行脚の頂端膜および緻密斑においてみられる。これは、太い上行脚において、ナトリウム・塩化物再吸収の程度が大きいことの説明となる。さらに、これは、例えばフロセミドおよびブメタニドなどの特定の利尿薬、高血圧の治療の際に用いられる薬剤に対して感度がある。よって、いくつかの実施形態においては、SLC12A1の発現の検出変化は、変化した塩バランス、降圧療法に起因する腎臓の機能の変化または腎臓に対する損傷等を示すものである可能性がある。いくつかの実施形態においては、これは、SLC12A1の変化が、認識可能な症状があらわれるよりずっと前に特定の治療に対するそれぞれの患者の感受性を同定するのを助ける可能性があるため、特に有利である。よって、いくつかの実施形態においては、SLC12A1発現のバリエーションは、特定の腎疾患、疾患の段階、および/または治療に対する応答性により様々である（また、これらに相関し得る）。

【0071】

他の実施形態においては、投与されている治療薬または治療されている疾患に応じて、他の腎マーカーが、同様に用いられる。例えば、SLC22A6はナトリウム依存性、またSLC22A8はナトリウム非依存性トランスポーターおよび有機陰イオンのエクスクレーター（excretor）であり、一方SLC22A12は血液中の尿酸塩のレベルを制御する機能を果たす尿酸塩-陰イオン交換体である。（SLC12A1に比べて）様々な輸送機構を考慮すれば、尿におけるこれらのSLC22Aの検出は、いくつかの実施形態においては、腎臓における他の分子病理学的変化を示す可能性がある。さらに、UMODは正常尿中において最も豊富なタンパク質である。いくつかの実施形態においては、UMODの発現の変化は、正常な腎機能からの逸脱を示すものである。上記にて考察したように、尿試料から単離された小胞中のSLC12A1および他の遺伝子の測定により、腎機能の評価のための、速く正確かつシンプルな診断検査がもたらされる。

【0072】

実施例2 - 移植後の腎機能を決定するための尿RNA関連小胞の分析

尿試料は、10人の健康な成人のドナー（1人のドナーから3つの異なる試料、計12試料）および68人の腎臓移植後の患者から採集した。移植後の患者を、血清クレアチニンの値によってさらに分類した（28人の患者は1.2mg/dLであり、40人の患者は>1.2mg/dLであった）。クレアチニンは、腎臓によって濾過（かつ血流から除去）されるべき筋肉分解老廃物であるため、血清クレアチニンは、一般に使用される腎機能の尺度である。正常血清クレアチニンレベルは、約0.8~約1.2mg/dLの範囲である。上昇したクレアチニンレベルは、腎機能の低下（例えば、低下した濾過効率）を示す。尿試料を、上述したように処理した。

【0073】

表3に示されているように、それらのカテゴリー（例えば、対照の、正常な、または高いクレアチニン）にかかわらず、すべての試料のうちの75%以上で、ACTBが検出された。これらのデータは、すべての群の尿におけるエキソソームの、検出可能な存在を示す。

【 0 0 7 4 】

【 表 3 】

表3:尿エキソソームにおける腎臓特異的mRNAの検出

		ACTB	PDCN	NPHN	CUBN	LRP2	UMOD	SLC12A1	ALB	AQP9
対照 (n=12)	# 陽性	12	7	0	10	8	12	12	12	10
	%	100	58	0	83	67	92	100	100	83
sCr<1.2* (n=28)	# 陽性	21	6	0	9	4	13	12	18	7
	%	75	21	0	32	14	46	43	64	25
	p(対照に 対して)**	n.s.	p<0.05	n.s.	p<0.01	p<0.001	p<0.01	p<0.001	p<0.05	p<0.001
sCr>1.2* (n=40)	# 陽性	39	5	1	20	13	19	15	24	10
	%	87	13	3	50	33	48	38	60	25
	p(対照に 対して)**	n.s.	p<0.001	n.s.	p<0.05	p<0.05	p<0.01	p<0.001	p<0.01	p<0.001
	p(sCr=1.2に 対して)**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

*: 血清クレアチニン値が ≤ 1.2 mg/dLまたは > 1.2 mg/dLである腎移植後の患者

**: カイ二乗検定

【 0 0 7 5 】

移植後の患者からの試料においては、(血清クレアチニンレベルにかかわらず、)ポドシン(PDCN)、キュビリン(CUBN)、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質2(LRP2)、ウロモジュリン(UMOD)、SLC12A1、アルブミン(ALB)、およびアクアポリン9(AQP9)のmRNAの検出の発生率は、すべて、対照被験者のそれに比べて、有意に、より低かった。血清クレアチニンレベルに基づいて分けた場合に、2つの患者の群の間に有意な差は検出されなかった。

【 0 0 7 6 】

ポドシンは、腎臓中のポーマン囊の足細胞を並べるタンパク質である。ポドシンは、糸球体基底膜にて障壁を維持するのを助け、また、糸球体透過性の制御ならびに細胞膜と細胞骨格との間のつなぎ役として機能することにおける役割を果たす。ポドシンの減少(または変異)は、糸球体濾過の低下につながり、ネフローゼ症候群においてみられるような、アルブミン尿症、高コレステロール血症、高血圧、および腎不全を引き起こすことがある。

【 0 0 7 7 】

キュビリンは、糸球体限外濾過液からのいくつかの重要なリガンドの受容体介在性の尿細管再吸収に関与するものであり、腎臓の近位尿細管において(もう1つの受容体、(LRP2としても知られる)メガリンと共に)発現する。腎糸球体において濾過されたタンパク質は、通常キュビリン/メガリン介在性エンドサイトーシスにより、尿細管液から除去される。エンドサイトーシスによる取り込み後、それらタンパク質は分解のためにリソソームへと運ばれるが、一方キュビリンおよびメガリンは、種々のタンパク質の再吸収を続けるために尿細管表面へと戻される。ヒトでは、正常尿は低いタンパク質濃度を有する。キュビリンおよびメガリンは、腎臓限外濾過液からのタンパク質の除去を促進するだけでなく、例えば血漿タンパク質により運ばれる微量元素およびビタミンなどの種々の必須物質の維持もする。例えば糸球体に影響を与える疾患などの特定の状況下でのこれらの発現の低下は、濾過/再吸収系に過負荷をかける可能性があり、その結果としてタンパク尿および/または上昇した血漿タンパク質濃度がもたらされる。一貫して高いレベルの血漿タンパク質は、糸球体にさらに損傷を与える可能性があり、タンパク尿を強め、最終的には腎機能が損なわれることにつながる。

【 0 0 7 8 】

ウロモジュリンは、尿中において通常排出される最も豊富なタンパク質のうちの1つであるが、しかしながら、ウロモジュリンにおける変異は、その溶解性における変化および結果として生じる腎臓中の沈着物をもたらす。これらの沈着物は進行的に成長し、最終的

10

20

30

40

50

には正常な腎機能を乱す。

【0079】

S L C 1 2 A 1 は、上記にて考察したように、腎臓の正常機能に必須である溶質キャリアタンパク質である。腎細胞の中へおよび外へのイオン流束制御に参与する。血流中へと戻る尿から腎臓が塩を再吸収する機構の立役者であり、体液レベル（例えば水量）および血圧の維持において役割を果たす。

【0080】

アルブミンは、通常ほとんどのタンパク質が腎臓により保持されるため、近位尿細管機能のマーカーである。尿中への少量のアルブミンの放出（マイクロアルブミン尿）は、腎機能を悪くしていることを示している可能性がある。マイクロアルブミン尿は、タンパク尿をもたらし進行性腎臓損傷の発生の指標である場合もある。A Q P 9 は、主に遠位尿細管における水の再吸収により尿を濃縮する機能を果たす腎臓の領域である遠位尿細管機能のマーカーである。

【0081】

表3の発現データをさらに評価するために、当該3つの群の中の陽性に検出されたmRNAの発現レベルを比較した。ベータ-アクチンは全被験者のうちの75%以上で検出されたが、ベータ-アクチンレベルは、対照群では2つの患者群と比べて、有意により高かった（図6A参照）。このデータは、1つの患者群が正常血清クレアチニンレベルを有するにもかかわらず、彼らの尿中に存在するエキソソームの量は、対照患者のそれよりも少ない（かつ、臨床的に上昇した血清クレアチニンを有する患者とは有意には異なる）ということを示す。ベータ-アクチンとは異なり、P D C N、C U B N、U M O D、S L C 1 2 A 1、L R P 2 のレベルは、もはや3つの群の間で異なるとは算出されず、それによりベータ-アクチンに関しての正規化によって実験誤差および生じ得る偽陰性の結果がもたらされたことが示唆される。興味深いことに、ベータ-アクチンへの正規化にもかかわらず、A L B（近位尿細管機能のマーカー）の発現レベルは、患者において有意により低かった（対照に対して $p < 0.001$ ）が、一方A Q P 9（遠位尿細管機能のマーカー）のレベルは、患者群において有意により高かった（対照に対して $p < 0.001$ ）。これは、対照および患者のアルブミンおよび/またはアクアポリンの間の実際の差が、統計分析のベータ-アクチン誘導性の鈍化にもかかわらず有意なままであるのに十分に大きかったということを示唆する。さらに、対照群と正常血清クレアチニン患者群との間で、エキソソームmRNA分析のための本明細書において開示されている方法のいくつかの実施形態が、従来の血清クレアチニン分析よりも感度がよいということを示唆する有意な差がみられた。

【0082】

種々の被験者からの尿試料中のエキソソームの種々の濃度に起因して（かつ、個々の被験者の個々の試料の中でさえ）、アルブミンレベルへの正規化が行われた（図6に示されているようなベータ-アクチンに比べた発現のその反対のパターンに基づいた）。図7A~7Cには、C U B N、A Q P 9、およびC U B N x A Q P 9のデータが、A L Bに関して正規化されて示されている。その結果、A Q P 9 / A L BおよびC U B N x A Q P 9 / A L B（それぞれ、7Bおよび7C）では、対照群と患者群とが、いかなる重複もなしに分かれた。この重複は、A C T Bでの正規化では除去されなかった（図7D~7F）。

【0083】

これらのデータは、検査したマーカーのうちのいくつかは、腎機能の特徴を決定するのに適しており、よって、早期病態を同定するのに適しているということも示す。アルブミンは、対照被験者においては一貫して検出されるが、移植後の患者では検出不可能であることも多く、また、検出される場合、アルブミンレベルは、移植後の患者においては、有意に低下する。アルブミンは近位尿細管機能に関連するため、正常被験者と移植後被験者との間のアルブミン発現の有意な差は、腎機能の特徴を決定するためにアルブミン発現レベルを用いることができるということを示唆する。よって、いくつかの実施形態においては、アルブミンは腎機能の高感度マーカーとして用いられる。例えば、移植後の患者にお

10

20

30

40

50

ける低下したアルブミンレベルは、損なわれた尿細管構造または機能亢進を示唆する可能性があり、損なわれた尿細管構造または機能亢進のいずれも、結果として尿エキソソームからのアルブミンの過剰な除去をもたらし得るであろう。

【0084】

加えて、アクアポリン9発現は、正常な患者と移植後の患者との間で有意に異なる。アルブミンとは対照的に、AQP9のレベルは、患者尿エキソソーム中のアクアポリンの、全体的により低いパーセントの検出(表3)にもかかわらず、患者では対照の人々に比べて有意により高かった(図6Hおよび7B)。加えて、他のマーカー(またはマーカーの組み合わせ)が、腎機能を決定するために、いくつかの実施形態において用いられる。例えば、キュビリン発現レベル(図7A)は、移植後の患者の尿エキソソームにおいては低下した発現に向かう傾向を示す。いくつかの実施形態においては多重分析が行われ、例えば、マーカーの組み合わせを用いて腎機能を評価する。例えば(図7C参照)、キュビリンおよびアクアポリン発現の同時評価が示されている。いくつかの実施形態においては、複数のマーカーの評価により、より正確なおよび/またはより感度のよい診断をもたらすことができる。特定の疾患を同定するために一方のマーカーが用いられ、かつ冒された特異的組織型を同定するためにもう一方のマーカーが用いられるよう、組織特異的マーカーを疾患特異的マーカーと共に評価してもよい。いくつかの実施形態においては、複数のマーカーの使用は、テーラード治療にもつなげる可能性がある。例えば、第一マーカーが腎臓の近位尿細管機能に特異的であり、かつ第二マーカーが遠位尿細管に特異的である場合には、多重分析における双方の有意な変化の検出は、全体として尿細管(または腎臓)に対する損傷を示唆するものである可能性がある。対照的に、一方またはもう一方のマーカーの発現の変化は、より局所的な領域において腎機能を損なう部位特異的損傷または傷害を示唆する可能性がある。さらに追加の実施形態においては、3種類以上のマーカーの使用を用いて、より詳細な腎機能の分析を提供する。重要なことに、従来検査(血清クレアチニン)が正常である場合でさえ、本明細書において開示されているエキソソーム分析は腎機能障害を検出できる。その結果、本明細書において開示されている方法は、より早期の診断および早期治療につながる可能性があり、このことは腎機能に対する負の効果を低下させることを助ける可能性がある。

10

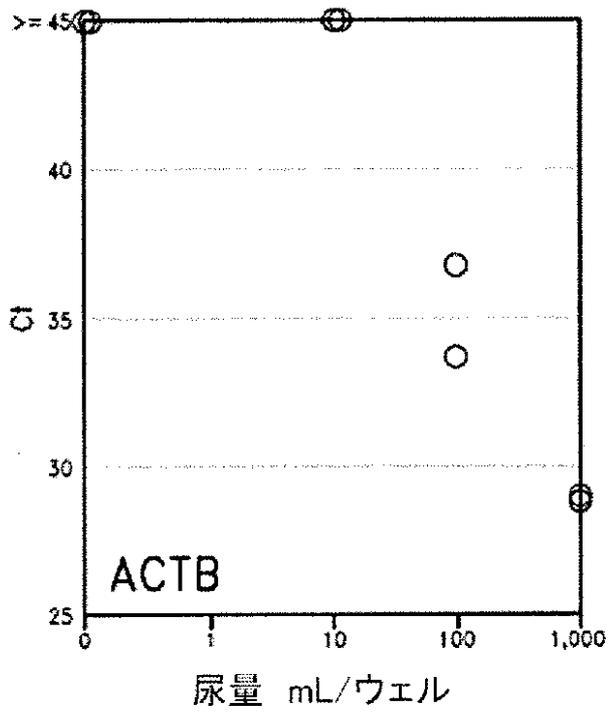
20

【0085】

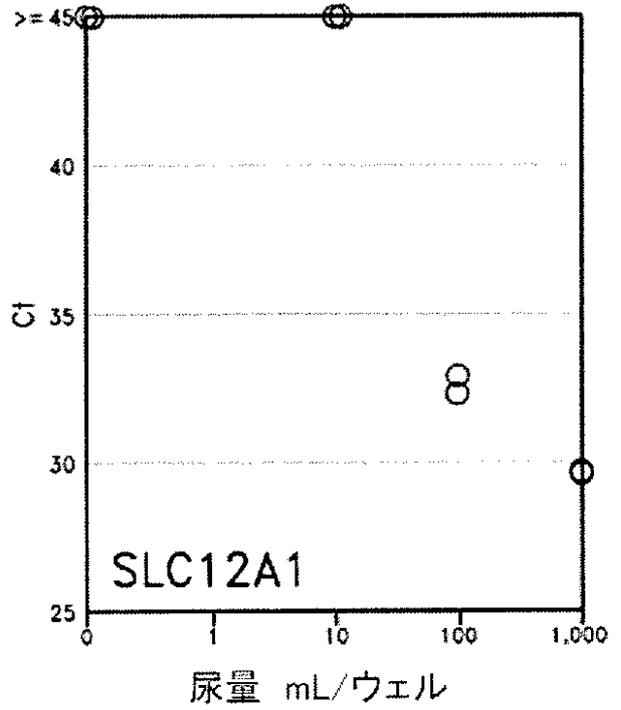
本発明の種々の実施形態を上記にて述べてきた。これらの具体的な実施形態を参照しながら本発明について述べてきたが、それらの説明は本発明の例証となるよう意図したものであって、限定することを意図したものではない。添付の特許請求の範囲において定義されているような本発明の真の精神および範囲から逸脱しない限り、当業者は種々の変更および応用を思いついてよい。

30

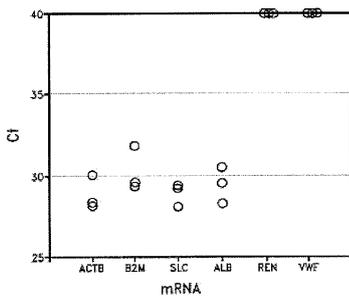
【 図 1 A 】



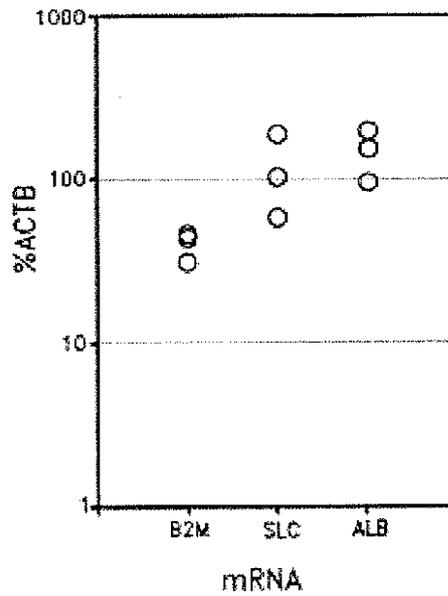
【 図 1 B 】



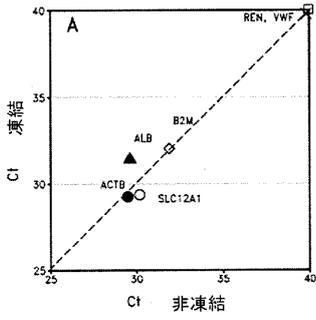
【 図 2 A 】



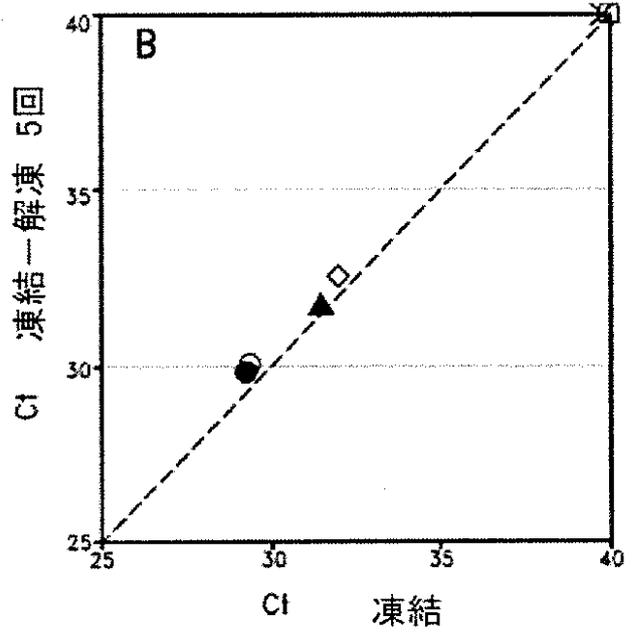
【 図 2 B 】



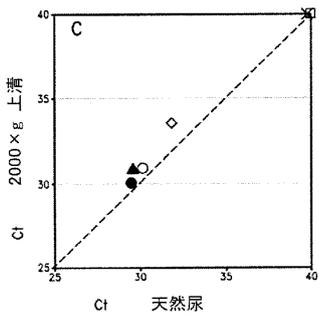
【 図 3 A 】



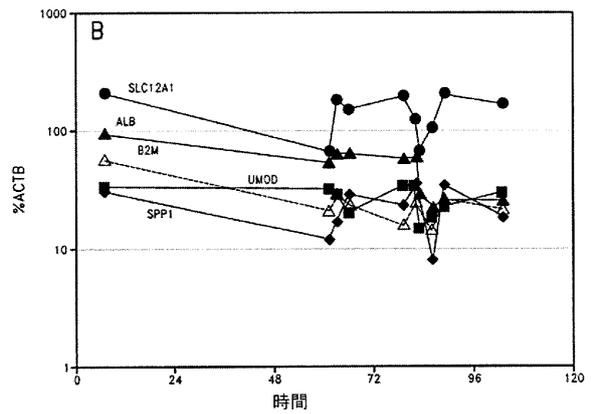
【 図 3 B 】



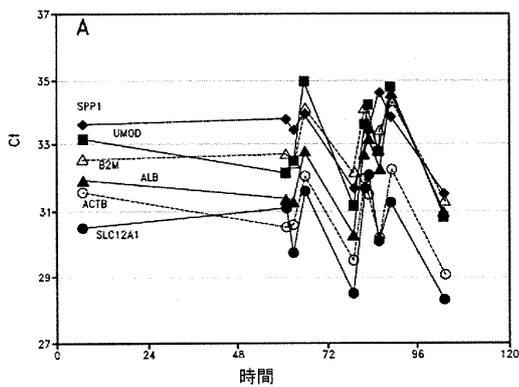
【 図 3 C 】



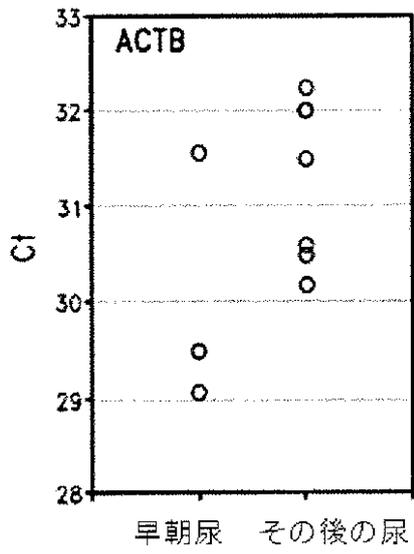
【 図 4 B 】



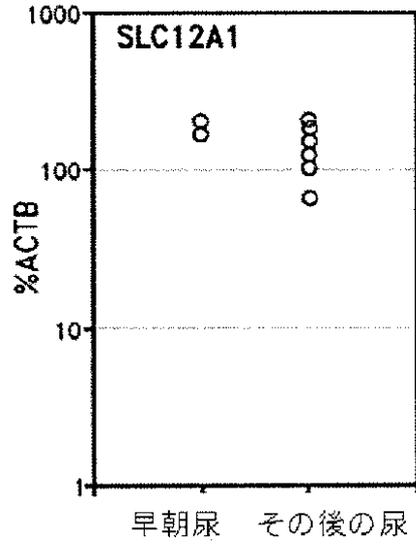
【 図 4 A 】



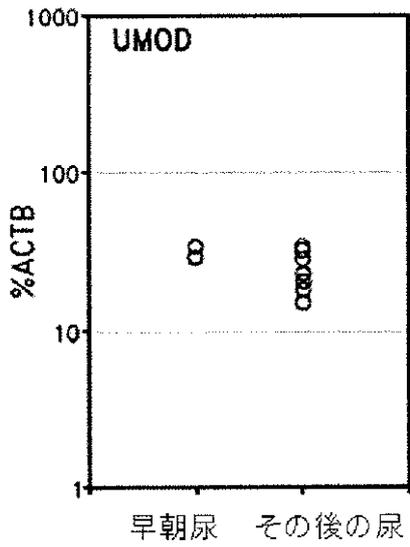
【 図 5 A 】



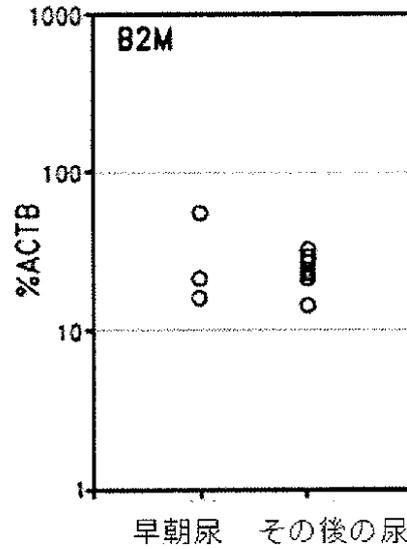
【 図 5 B 】



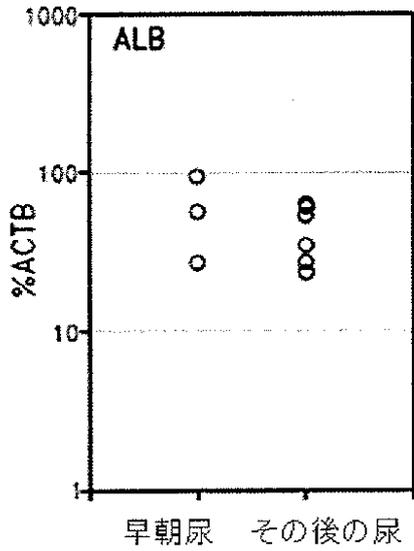
【 図 5 C 】



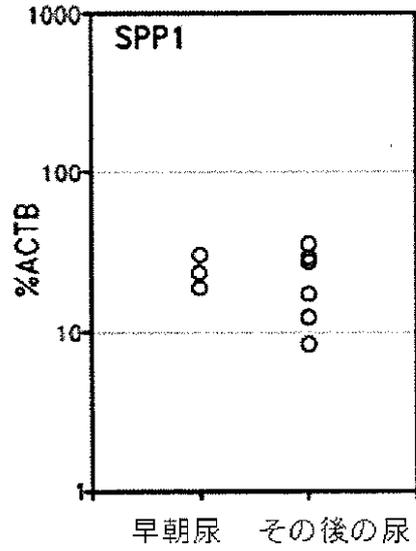
【 図 5 D 】



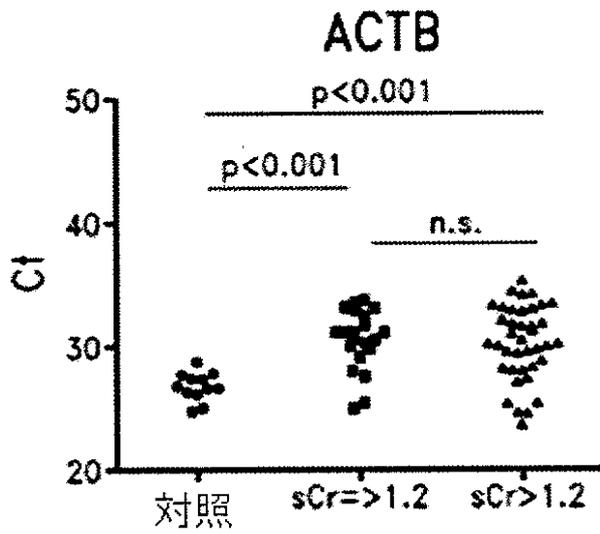
【図 5 E】



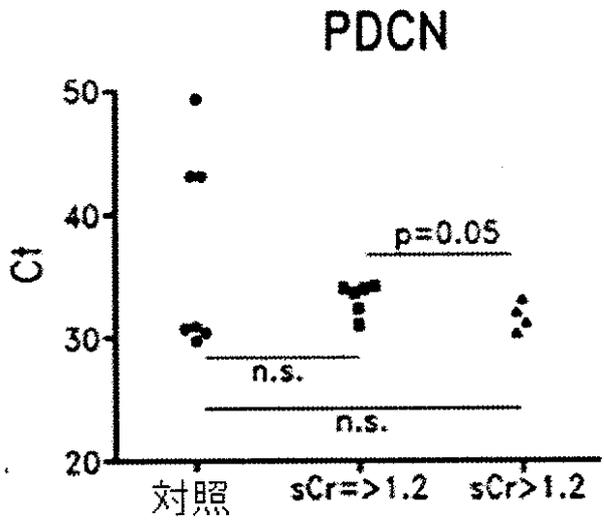
【図 5 F】



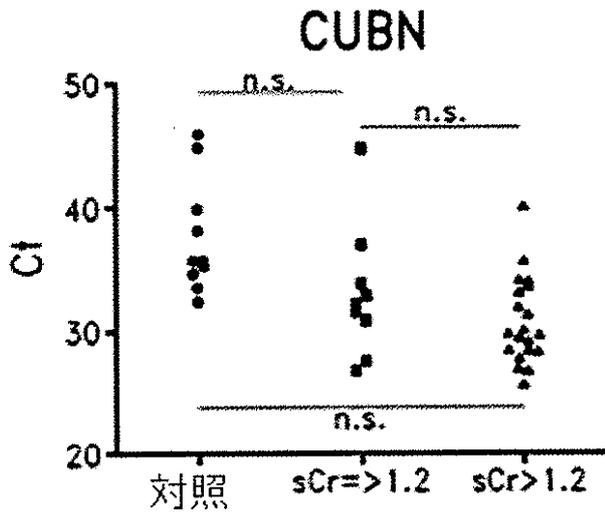
【図 6 A】



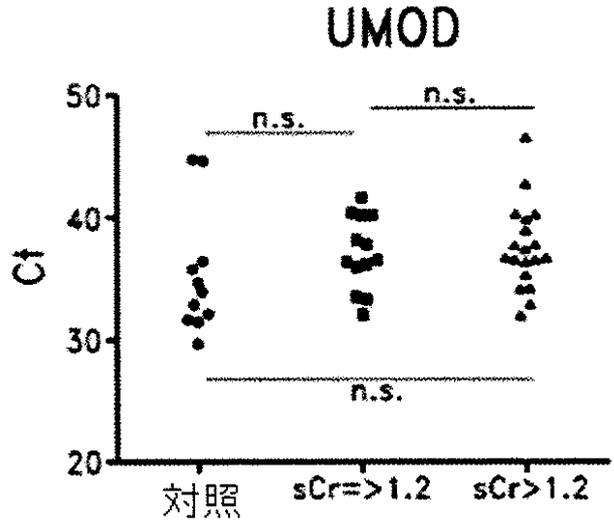
【図 6 B】



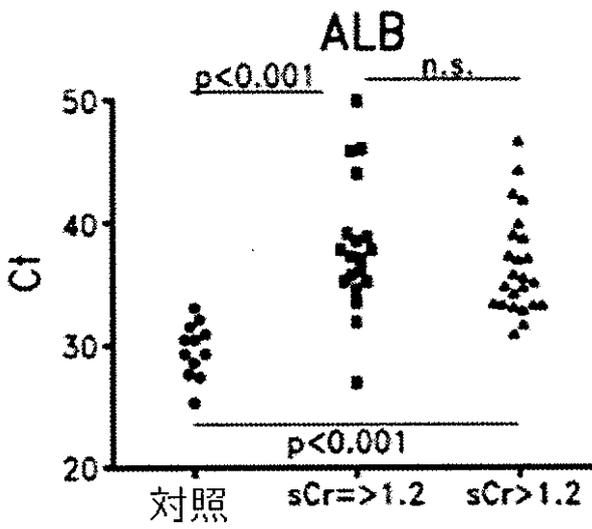
【图 6 C】



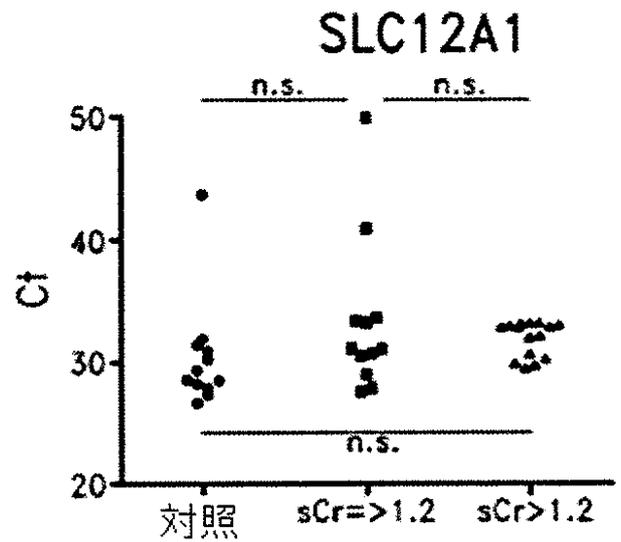
【图 6 D】



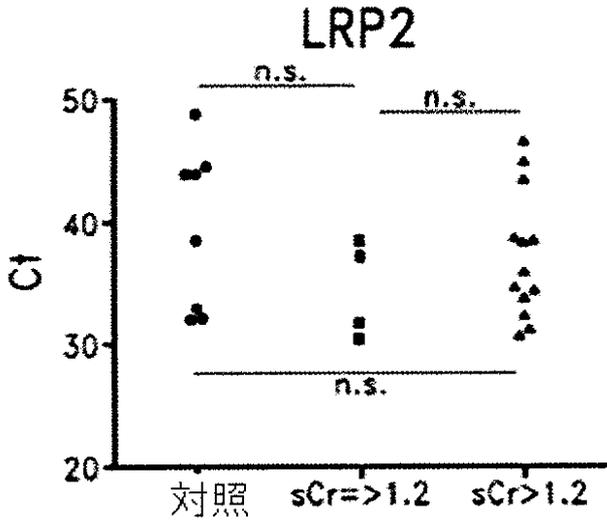
【图 6 E】



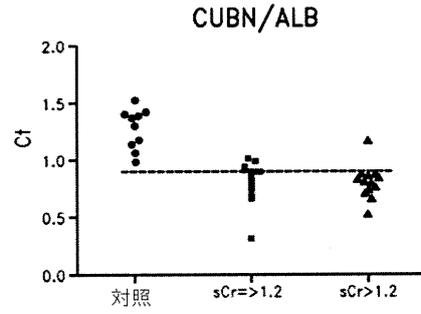
【图 6 F】



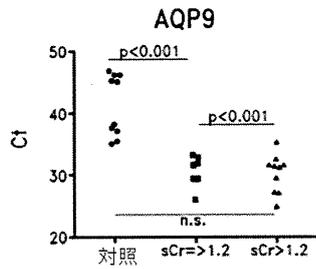
【 图 6 G 】



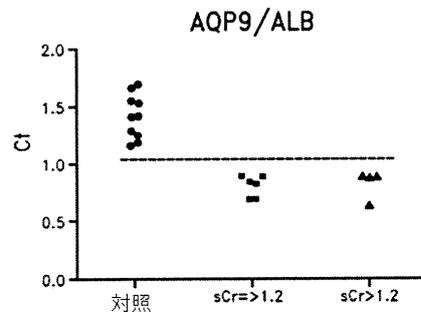
【 图 7 A 】



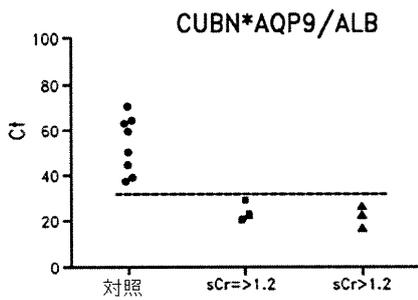
【 图 6 H 】



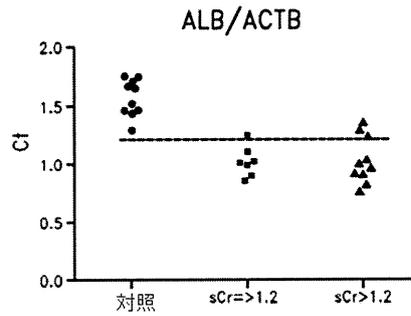
【 图 7 B 】



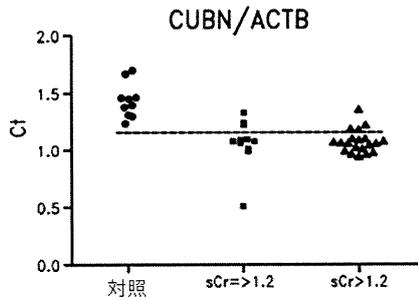
【 图 7 C 】



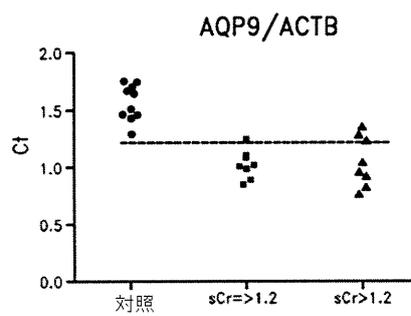
【 图 7 E 】



【 图 7 D 】



【 图 7 F 】



【手続補正書】

【提出日】平成25年4月18日(2013.4.18)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

患者から採取した、RNAに関連する小胞を含む尿の試料を用意すること；

前記小胞を前記試料から捕捉すること；

前記小胞を溶解させて、腎機能に関連するRNAを含む前記小胞に関連するRNAを放出させること；

前記腎機能に関連するRNAを定量化すること；および

前記患者からの前記腎機能に関連するRNAの量を、正常な腎機能を有する個体からの対応するRNAの量と比較すること、

を含む、腎機能の特徴を決定する方法であって、前記患者と前記個体との間の前記腎機能に関連するRNAの量の差が、前記患者の腎機能の変化を示す、方法。

【請求項2】

前記小胞を前記試料から捕捉することは、前記尿を濾過することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記濾過により、前記小胞がフィルター上に捕集される、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記小胞が前記フィルター上に捕集されている間に、前記溶解が行われる、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

細胞残屑を除去するために前記試料を遠心することをさらに含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

前記遠心が、前記小胞を捕捉することよりも前に行われる、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記小胞を捕捉することは、前記遠心した尿の上清を濾過することをさらに含む、請求項5または6に記載の方法。

【請求項8】

前記定量化することは、PCRを用いて前記腎機能に関連するRNAを増幅することを含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記腎機能が、腎臓損傷に起因して変化する、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

前記腎臓損傷が、糸球体に対する損傷、内皮に対する損傷、近位尿細管に対する損傷、ヘンレ係蹄に対する損傷、遠位尿細管に対する損傷、集合管に対する損傷、および尿管に対する損傷の1つ以上を含む、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記腎機能が、腎臓に入る血流または腎臓から出る血流の変化に起因して変化する、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

前記腎機能が、疾患に起因して変化する、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記疾患が、慢性腎疾患、急性腎不全、糖尿病性腎症、糸球体腎炎、糸球体硬化症、巣状分節性糸球体硬化症、膜性腎症、微小変化群、ならびにアテローム性動脈硬化症、高血圧、心血管疾患、肥満症、高コレステロール血症、糖尿病、膠原病、自己免疫疾患、および感染症のいずれかである他の疾患に続発する腎疾患、からなる群より選択される、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記腎機能が、前記患者への薬理的物質の投与に起因して変化する、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記薬理的物質が、疾患を治療するために前記患者へと投与される、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記腎機能に関連する RNA は、腎臓の特定の領域から採取されたものである、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記腎機能に関連する RNA が、腎臓の特定の領域の機能に関連する、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記腎臓の特定の領域が糸球体を含む、請求項 1 6 または請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記腎臓の特定の領域が近位尿細管を含む、請求項 1 6 または請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記腎臓の特定の領域が遠位尿細管を含む、請求項 1 6 または請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記腎機能に関連する RNA がポドシンをコードする、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記腎機能に関連する RNA が、SLC12A1、UMOD、およびアルブミンからなる群より選択されるタンパク質をコードする、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記腎機能に関連する RNA が AQP9 をコードする、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記腎機能に関連する RNA が、SLC12A1、UMOD、vWF、MMP1、MMP3、SLC22A6、SLC22A8、SLC22A12、ポドシン、キュビリン、LRP2、AQP9、およびアルブミンからなる群より選択されるタンパク質をコードする、請求項 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記腎機能に関連する RNA が SLC12A1 をコードする、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記小胞が、

(a) 前記尿の試料の少なくとも一部を小胞捕捉デバイスの試料装填領域中へ装填すること；

(b) 前記尿を前記試料装填領域から前記小胞捕捉デバイス中のガラス様材料を含む小胞捕捉材料を通過させ、上清を得ること；ならびに

(c) 前記上清を前記小胞捕捉デバイスの試料受け取り領域へと通過させることおよびその上清を捨てること、

を含む方法により単離される、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記通過の結果として前記小胞捕捉材料上または前記小胞捕捉材料中の前記尿試料から

の前記小胞の捕捉がもたらされ、それにより前記小胞が捕捉される、方法。

【請求項 27】

前記小胞捕捉材料が、前記材料の複数の層を含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記小胞捕捉材料の前記複数の層が、ガラス繊維の、少なくとも第一層および第二層を含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記工程 (b) が、直径が 1.6 ミクロン以上である前記尿からの材料を捕捉するために、前記尿を、前記ガラス繊維の第一層を通過させることを含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記工程 (b) が、直径の最小サイズが 0.6 ミクロン ~ 0.8 ミクロンであり、かつ、最大サイズが 1.6 ミクロン未満である小胞を捕捉するために、前記尿を、前記ガラス繊維の第二層を通過させることをさらに含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

患者から採取した、細胞残屑および RNA に関連する小胞を含む尿の試料を用意すること；

前記小胞を前記細胞残屑から分離すること；

前記小胞を溶解させて、腎機能に関連する RNA を含む溶解物を得ること；ならびに

前記腎機能に関連する RNA を定量化すること

を含む、核酸に基づき腎機能の変化を検出する方法であって；

尿中に通常みられる量と比較した、前記尿試料からの前記 RNA の量の増加または減少が、前記患者における変化した腎機能と相関する、方法。

【請求項 32】

患者から採取した、RNA に関連する小胞を含む少なくとも 2 つの尿の試料を用意すること；

前記小胞を前記試料から捕捉すること；

前記小胞を溶解させて、腎機能に関連する RNA および腎機能に応じて変化しない RNA を含む前記小胞に関連する RNA を放出させること；

前記腎機能に関連する RNA および前記腎機能に応じて変化しない RNA を定量化すること；ならびに

前記患者からの前記腎機能に関連する RNA の量と腎機能に応じて変化しない RNA の量との間の割合を決定すること、

を含む、腎機能の特徴を決定する方法であって、

前記 2 つ以上の尿試料の間の割合における差が、前記患者の腎機能の変化を示す、方法

。

【請求項 33】

前記腎機能に応じて変化しない RNA が、ベータ - アクチンまたはベータ - 2 - ミクログロブリンのいずれか 1 つのタンパク質をコードする、請求項 32 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0010】

いくつかの実施形態においては、前記腎機能は、腎臓損傷に起因して変化する。いくつかの実施形態においては、前記腎臓損傷は、糸球体に対する損傷、内皮に対する損傷、近位尿細管に対する損傷、ヘンレ係蹄に対する損傷、遠位尿細管に対する損傷、集合管に対する損傷、および尿管に対する損傷のいずれか 1 つ以上を含む。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 11/40057
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12Q 1/68 (2011.01) USPC - 435/6.11 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 435/6.11 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (PGPB, USPT, EPAB, JPAB); Google Scholar: Kidney or renal, exosome, microvesicle or vesicle, urine, RNA, capture, filtration capture, disease, nephrotic, biomarker, AQP9, podocin (NPHS2), SLC12A1		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MIRANDA et al. Nucleic acids within urinary exosomes/microvesicles are potential biomarkers for renal disease. <i>Kidney Int</i> ePub 28 April 2010, 78(2):191-199; abstract, pg 194 fig 3A-C; pg 197 col 1 para 4-5, pg 197 col 2 para 1-4	1-8, 17-22, 24-25, 32-33
Y	ZHOU et al. Urinary exosomal transcription factors, a new class of biomarkers for renal disease. <i>Kidney Int</i> 2008, 74(5):613-621; abstract, pg 3 para 3	9-16, 23, 26-31
Y	HEWITT et al. Discovery of Protein Biomarkers for Renal Diseases. <i>J Am Soc Nephrol</i> 2004, 15(7):1677-1689; pg 1680 col 2 para 2	9-15
Y	HASHEM. Biochemical and expression studies on Aquaporin 9 (AQP9) in wild and AQP9 knockout mice. <i>Veterinarski Arhiv</i> 1 January 2010, 80(1):93-112; pg 97 para 4	16
Y	Zefon International. Glass Fiber Filters. 14 January 2010 [Retrieved from the Internet 7 October 2011: <http://web.archive.org/web/20100114112921/http://www.zefon.com/store/glass-fiber-filters/>]; pg 2-3	23
Y	CUTILLAS et al. The urinary proteome in Fanconi syndrome implies specificity in the reabsorption of proteins by renal proximal tubule cells. <i>Am J Physiol Renal Physiol</i> 2004, 287(3):F353-364; F355 Fig 1	26-30
		31
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 7 October 2011 (07.10.2011)		Date of mailing of the international search report 21 OCT 2011
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100126505

弁理士 佐貫 伸一

(74)代理人 100131392

弁理士 丹羽 武司

(72)発明者 ミツハシ, マサト

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92614 アーバイン フェアードーン 11

(72)発明者 原田 浩

日本国北海道札幌市中央区北11条西13丁目

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA09 CA11 CA12 HA12

4B063 QA01 QA19 QQ52 QQ53 QR32 QR62 QS10 QS25 QS34 QX02