

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2008 年 8 月 28 日 (28.08.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/102777 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/00 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
 A61K 31/7105 (2006.01) A61P 9/12 (2006.01)
 A61K 48/00 (2006.01) A61P 13/12 (2006.01)
 A61P 1/16 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
 A61P 3/00 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)
 A61P 3/04 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
 A61P 3/06 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
 A61P 3/10 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
 A61P 9/04 (2006.01)

福住 昌司 (FUKUSUMI, Shoji) [JP/JP]; 〒3004293 茨城県つくば市和台 10 番地 武田薬品工業株式会社内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目 1 番 1 号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(21) 国際出願番号: PCT/JP2008/052767

(22) 国際出願日: 2008 年 2 月 19 日 (19.02.2008)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2007-039947 2007 年 2 月 20 日 (20.02.2007) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目 1 番 1 号 Osaka (JP).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 木澤 秀樹 (KIZAWA, Hideki) [JP/JP]; 〒3004293 茨城県つくば市和台 10 番地 武田薬品工業株式会社内 Ibaraki (JP).

添付公開書類:

— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) Title: AMELIORATING AGENT FOR INSULIN RESISTANCE

(54) 発明の名称: インスリン抵抗性改善剤

(57) Abstract: Disclosed are an ameliorating agent for insulin resistance and a prophylactic/therapeutic agent for a disease associated with impaired glucose metabolism, each of which comprises a substance which inhibits the expression or activity of CPSF5 protein and/or a substance which inhibits the expression or activity of CPSF6 protein. As the substance, the following substances (a) to (c) and the like are provided: (a) an antisense nucleic acid for a nucleic acid encoding CPSF5 (or CPSF6); (b) siRNA for RNA encoding CPSF5 (or CPSF6); and (c) a nucleic acid which can produce siRNA for RNA encoding CPSF5 (or CPSF6). Further disclosed is a method for the screening of a substance capable of ameliorating insulin resistance, which utilizes a cell capable of producing CPSF5 and/or CPSF6.

(57) 要約: 本発明は、CPSF5タンパク質の発現もしくは活性を阻害する物質、および/またはCPSF6タンパク質の発現もしくは活性を阻害する物質を含有してなるインスリン抵抗性改善剤、糖代謝異常が関与する疾患の予防・治療剤を提供する。該物質として、(a) CPSF5 (もしくはCPSF6) をコードする核酸に対するアンチセンス核酸、(b) CPSF5 (もしくはCPSF6) をコードするRNAに対するsiRNA、(c) CPSF5 (もしくはCPSF6) をコードするRNAに対するsiRNAを生成し得る核酸などが提供される。さらに、CPSF5および/またはCPSF6を産生する細胞を用いたインスリン抵抗性改善物質のスクリーニング法が提供される。

WO 2008/102777 A1

明 細 書

インスリン抵抗性改善剤

技術分野

[0001] 本発明は、インスリン抵抗性の改善剤、糖尿病の予防・治療剤、並びにそれらのスクリーニングなどに関する。

[0002] [発明の背景]

インスリン抵抗性は、肝臓および骨格筋、脂肪でのインスリン感受性が低下する病態で、特にII型糖尿病では、インスリン分泌不全に加え、糖尿病の発症や進展に関わる主な病因となっている。一般的に、肥満を伴う糖尿病患者の多くがインスリン抵抗性を呈していることから、インスリン抵抗性は肥満と深く関わっていると考えられている。さらに、糖尿病のみならず動脈硬化等の脂質代謝異常に起因する疾病にもインスリン抵抗性が見られることが知られている(非特許文献1)。

[0003] 糖尿病患者においては、肝臓での糖放出亢進と、肝臓での糖取り込み低下が認められ、その両者が高血糖状態形成にきわめて重要である。肝臓糖放出を規定する要素はグリコーゲン分解、合成系の制御不全と糖新生系の亢進に分けられるが、中でも糖尿病における糖新生系のメカニズムの異常が注目されている。肝臓糖新生の調節は、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ(phosphoenolpyruvate carboxy kinase; PEPCK)、グルコース-6-ホスファターゼ(glucose-6-phosphatase; G6Pase)等が律速酵素として働いている。これらの酵素をマウスの肝臓で過剰発現させると、インスリン抵抗性、耐糖能異常を生じ、また、各種糖尿病モデル動物の肝臓でこれらの酵素の発現が亢進していることが知られている(非特許文献2)。

[0004] 肝臓でのこれら酵素の発現を抑制することにより、将来の糖尿病治療につながることを期待される(非特許文献3)。具体的には、肝臓インスリン抵抗性に関して、これらの酵素の転写調節を行う因子としてforkhead box O1 (Foxo1)やperoxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha (PGC-1 α)が報告されている。PGC-1 α は、代表的な糖新生酵素PEPCKの遺伝子発現調節機構に関して転写活性化の方向に働く。また、Foxo1は、PGC-1 α とPEPCKの両方の転写を正に調節する。Foxo1はインスリンにより負に制御されている。したがって、インスリン作用によってFoxo1

、PGC-1 α の両者の活性が低下するため、糖新生が抑制される(非特許文献3)。このことから、これらの転写調節因子は、肝臓インスリン抵抗性に関して、抑制すればよい創薬標的と考えられている(非特許文献3および4)。

[0005] DNA上の遺伝情報がタンパク質として発現するまでにはさまざまな過程が存在する。DNAから転写されてできたmRNA前駆体がさまざまなプロセッシングを受け、細胞質に輸送されてタンパク質合成の鋳型として働く。そしてmRNA以外にも、tRNA、Uridine-rich small nuclear RNA (UsnRNA)、micro RNA (miRNA)といったRNAが必須な機能を果たす。RNAは遺伝子発現過程の中枢を担い、複雑かつ精巧な遺伝子発現調節を行なうことで、発現の多様性を生み出している。この調節機構に狂いが生じた時、個体レベルでは疾病として現れる。転写調節以外にも、現在までに数多くの疾病の原因として、これらの遺伝子発現過程の異常が同定されている。例えば、mRNAスプライシング異常の例として家族性高コレステロール血症(LDL-Rスプライシング異常)、サラセミア(β -グロビンスプライシング異常)が、3'末端のプロセッシングとRNA輸送の異常の例として眼咽頭筋ジストロフィー(PABP2のGCGリピート増幅)、血栓性素因(プロトロンビンのpolyAの変異)が、RNA編集の異常の例としてアルツハイマー病、ハンチントン病(GluR2のEditing異常)が知られている(非特許文献5)。このように転写調節以外の機能としてもRNAが疾患と関係することが明確になっている。

[0006] CPSF5およびCPSF6は、mRNA前駆体から3'末端のプロセッシングを触媒する酵素複合体であるCleavage factor I, mammal (CFIm)を構成するサブユニットである。CPSF5およびCPSF6はmRNAの3'末端のpolyA付加に関係する一群の遺伝子群に含まれる遺伝子であり、3'末端の切断促進に必要である。また、mRNAの3'末端にpolyA付加シグナルが存在する際、切断部位の決定にCPSF5が必要であることも報告されている(非特許文献6)。さらに、最近、CPSF5およびCPSF6はスプライシングにも関係することが報告されている(非特許文献7および8)。

非特許文献1: Saltiel, A.R., Cell, 104巻, 517-529頁, 2001年

非特許文献2: Friedman, J.E. et al., J. Biol. Chem., 272巻, 31475-31481頁, 1997年

非特許文献3: Samuel, V.T. et al., Diabetes, 55巻, 2042-2050頁, 2006年

非特許文献4: Puigserver, P. et al., Nature, 423巻, 550-555頁, 2003年

非特許文献5:Stoilov, P. et al., DNA Cell Biol., 21巻, 803-818頁, 2002年

非特許文献6:Kraimer, A.R. ed., "Eukaryotic mRNA Processing" IRL (Oxford University) Press, 1997年

非特許文献7:Millevoi, S. et al., EMBO J., 25巻, 4854-4864頁, 2006年

非特許文献8:Kubo, T. et al., Nucleic Acids Res., 34巻, 6264-6271頁, 2006年

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0007] インスリン抵抗性を改善する安全で優れた糖尿病治療薬が求められている。

課題を解決するための手段

[0008] RNA干渉は、二重鎖RNAがRNA-induced silencing complex (RISC)効果を介して特異的にmRNAを分解し翻訳や転写の調節を行なう技術であり、遺伝子を配列特異的に抑制できることから、将来の医薬品への応用を考えて研究開発が進んでいる。また、本技術は簡便に遺伝子をノックダウンできることから、実験室レベルで遺伝子の機能喪失の実験に用いることができる。さらに、肝臓は、in vivoの全身投与を考えた時、核酸が到達しやすい臓器であり、short interfering RNA (siRNA) やアンチセンスオリゴヌクレオチド等の核酸で創薬標的を探した次のステップとして、簡便な核酸デリバリーシステムと組み合わせた修飾核酸の投与により、医薬品への応用など臓器特異性の面から実現可能性が高い。

以上のことから、本発明者らは、上記の課題を解決する手段を得るべく、RNA機能に関係すると予想される種々の遺伝子をsiRNAを用いてノックダウンし、肝臓糖新生を指標として、肝臓でのインスリン抵抗性に関与する遺伝子を探索した。その結果、CPSF5 (cleavage and polyadenylation specificity factor 5) およびCPSF6 (cleavage and polyadenylation specificity factor 6) に対するsiRNAが、肝臓インスリン抵抗性改善作用を有することを見出した。

本発明者らは、これらの知見に基づいてさらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

[0009] すなわち、本発明は、

[1]配列番号:2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列

を含むタンパク質の発現もしくは活性を阻害する物質、および／または配列番号:4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現もしくは活性を阻害する物質を含有してなるインスリン抵抗性改善剤;

[2]配列番号:2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現を阻害する物質、および／または配列番号:4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現を阻害する物質が、以下の(a)~(c)のいずれかである、上記[1]記載の剤;

(a) 各タンパク質をコードする核酸に対するアンチセンス核酸

(b) 各タンパク質をコードするRNAに対するsiRNA

(c) 各タンパク質をコードするRNAに対するsiRNAを生成し得る核酸

[3]糖新生阻害作用を有するものである、上記[1]記載の剤;

[4]糖代謝異常が関与する疾患の予防・治療剤である、上記[1]記載の剤;

[5]配列番号:2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現もしくは活性を阻害する物質、および／または配列番号:4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現もしくは活性を阻害する物質の有効量を動物に投与することによる、該動物におけるインスリン抵抗性の改善方法;

[6]インスリン抵抗性改善剤の製造のための、配列番号:2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現を阻害する物質、および／または配列番号:4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現を阻害する物質の使用;

[7]インスリン抵抗性改善物質のスクリーニング方法であって、以下の(a)および／または(b):

(a) 配列番号:2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質またはその部分ペプチド

(b) 配列番号:4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質またはその部分ペプチド

を産生する細胞を試験化合物に接触させ、前記(a)のタンパク質またはその部分ペプ

チドおよび／または前記(b)のタンパク質またはその部分ペプチドの発現量あるいは活性を測定することを含む方法；

[8]インスリン抵抗性改善物質が糖新生阻害作用を有するものである、上記[7]記載の方法；および

[9]インスリン抵抗性改善物質が糖代謝異常が関与する疾患を予防・治療し得るものである、上記[7]記載の方法などを提供する。

発明の効果

- [0010] CPSF5および／またはCPSF6の発現もしくは活性を阻害する物質は、インスリン刺激した時の糖新生を抑制する一方、デキサメタゾン (Dex)/8-(4-CHLOROPHENYLTHIO)-ADENOSINE 3':5'-CYCLIC MONOPHOSPHATE SODIUM SALT (8CPT)刺激による糖産生には影響しないので、乳酸アシドーシス等の毒性を発現することなく、インスリン抵抗性を改善し得るという優れた効果を奏し、安全かつ有効な抗糖尿病薬などとして用いられ得る。

図面の簡単な説明

- [0011] [図1]H4IIE-C3-No.75株(A)および76株(B)のインスリン刺激糖産生抑制作用を示す図である。
- [図2]siRNAライブラリーに含まれる標的RNA関連因子を示す図である。
- [図3]CPSF5、CPSF6に対するsiRNAの糖産生評価(AおよびB)およびmRNAノックダウンのTaqman解析(CおよびD)の結果を示す図である。図中、NCはネガティブコントロール(siRNA導入なし)を示す。

- [0012] [発明の詳細な説明]

本発明におけるCPSF5は、配列番号:2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質である。また、本発明におけるCPSF6は、配列番号:4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質である。本明細書において、タンパク質およびペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)で記載される。

CPSF5およびCPSF6タンパク質は、ヒトや他の温血動物(例えば、モルモット、ラット

、マウス、ニワトリ、ウサギ、イヌ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)の細胞[例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓 β 細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、線維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など]もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織[例えば、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉(例、平滑筋、骨格筋)、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、脂肪組織(例、白色脂肪組織、褐色脂肪組織)など]等から、自体公知のタンパク質分離精製技術により単離・精製されるものであってよい。

- [0013] 「配列番号:2(もしくは配列番号:4)で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列」としては、配列番号:2(もしくは配列番号:4)で表されるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、いっそう好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。ここで「相同性」とは、当該技術分野において公知の数学的アルゴリズムを用いて2つのアミノ酸配列をアラインさせた場合の、最適なアラインメント(好ましくは、該アルゴリズムは最適なアラインメントのために配列の一方もしくは両方へのギャップの導入を考慮し得るものである)における、オーバーラップする全アミノ酸残基に対する同一アミノ酸および類似アミノ酸残基の割合(%)を意味する。「類似アミノ酸」とは物理化学的性質において類似したアミノ酸を意味し、例えば、芳香族アミノ酸(Phe、Trp、Tyr)、脂肪族アミノ酸(Ala、Leu、Ile、Val)、極性アミノ酸(Gln、Asn)、塩基性アミノ酸(Lys、Arg、His)、酸性アミノ酸(Glu、Asp)、水酸基を有するアミノ酸(Ser、Thr)、側鎖の小さいアミノ酸(Gly、Ala、Ser、Thr、Met)などの同じグループに分類されるアミノ酸が挙げられる。このような類似アミノ酸による置換はタンパク質の表現型に変化をもたらさない(即ち、保存的アミノ酸置換である)ことが予

測される。保存的アミノ酸置換の具体例は当該技術分野で周知であり、種々の文献に記載されている(例えば、Bowieら, Science, 247:1306-1310 (1990)を参照)。

[0014] 本明細書におけるアミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool)を用い、以下の条件(期待値=10;ギャップを許す;マトリクス=BLOSUM62;フィルタリング=OFF)にて計算することができる。アミノ酸配列の相同性を決定するための他のアルゴリズムとしては、例えば、Karlinら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5877 (1993)に記載のアルゴリズム[該アルゴリズムはNBLASTおよびXBLASTプログラム(version 2.0)に組み込まれている(Altschulら, Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402 (1997))], Needlemanら, J. Mol. Biol., 48: 444-453 (1970)に記載のアルゴリズム[該アルゴリズムはGCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラムに組み込まれている], MyersおよびMiller, CABIOS, 4: 11-17 (1988)に記載のアルゴリズム[該アルゴリズムはCGC配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム(version 2.0)に組み込まれている], Pearsonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444-2448 (1988)に記載のアルゴリズム[該アルゴリズムはGCGソフトウェアパッケージ中のFASTAプログラムに組み込まれている]等が挙げられ、それらも同様に好ましく用いられ得る。

[0015] より好ましくは、配列番号:2(もしくは配列番号:4)で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列とは、配列番号:2(もしくは配列番号:4)で表されるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、いっそう好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有するアミノ酸配列である。

[0016] 「配列番号:2(もしくは配列番号:4)で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質」は、配列番号:2(もしくは配列番号:4)で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含み、かつ配列番号:2(もしくは配列番号:4)で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質である。

ここで「活性」とは、mRNA前駆体の3'末端プロセッシング活性(切断因子I (CFI)_m)

活性)である。また、「実質的に同質」とは、例えば生理学的に、あるいは薬理学的にみて、その性質が定性的に同じであることを意味する。したがって、CFI_m 活性が同等であることが好ましいが、これらの活性の程度(例、約0.01～約100倍、好ましくは約0.1～約10倍、より好ましくは0.5～2倍)や、タンパク質の分子量などの量的要素は異なっているいてもよい。

CFI_m 活性の測定は、自体公知の方法に準じて行うことができるが、例えば、Rueggerら(Mol. Cell., 1巻, 243-253頁, 1998年)に記載の方法等に従って行うことができる。

[0017] また、本発明におけるCPSF5として、例えば、(i)配列番号:2で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(例えば1～50個程度、好ましくは1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5、4、3もしくは2)個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii)配列番号:2で表されるアミノ酸配列に1または2個以上(例えば1～50個程度、好ましくは1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5、4、3もしくは2)個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii)配列番号:2で表されるアミノ酸配列に1または2個以上(例えば1～50個程度、好ましくは1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5、4、3もしくは2)個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv)配列番号:2で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(例えば1～50個程度、好ましくは1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5、4、3もしくは2)個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(v)それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。同様に、本発明におけるCPSF6として、例えば、(i)配列番号:4で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(例えば1～100個程度、好ましくは1～50個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5、4、3もしくは2)個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii)配列番号:4で表されるアミノ酸配列に1または2個以上(例えば1～100個程度、好ましくは1～50個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5、4、3もしくは2)個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii)配列番号:4で表されるアミノ酸配列に1または2個以上(例えば1～100個程度、好ましくは1～50個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1

～5、4、3もしくは2)個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv)配列番号:4で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(例えば1～100個程度、好ましくは1～50個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5、4、3もしくは2)個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(v)それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質なども含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置は、mRNA前駆体の3'末端プロセッシング活性(CFI_m 活性)が保持される限り、特に限定されない。

[0018] CPSF5タンパク質の好ましい例としては、例えば、配列番号:2で表されるアミノ酸配列からなるヒトCPSF5(RefSeq Accession No. NP_008937.1)、あるいは他の哺乳動物におけるそれらのホモログ(例えば、GenBankにRefSeq Accession No. NP_080899.1として登録されているマウスホモログ)、さらにはそれらの天然のアレル変異体などがあげられる。また、CPSF6タンパク質の好ましい例としては、例えば、配列番号:4で表されるアミノ酸配列からなるヒトCPSF6(RefSeq Accession No. NP_008938.1)、あるいは他の哺乳動物におけるそれらのホモログ(例えば、GenBankにRefSeq Accession No. NP_001013409.1として登録されているマウスホモログ)、さらにはそれらの天然のアレル変異体などがあげられる。

[0019] 本発明において「CPSF5(もしくはCPSF6)タンパク質の発現を阻害する物質」とは、CPSF5(もしくはCPSF6)遺伝子の転写レベル、転写後調節のレベル、蛋白質への翻訳レベル、翻訳後修飾のレベル等のいかなる段階で作用するものであってもよい。従って、CPSF5(もしくはCPSF6)タンパク質の発現を阻害する物質としては、例えば、該遺伝子の転写を阻害する物質、初期転写産物からmRNAへのプロセッシングを阻害する物質、mRNAの細胞質への輸送を阻害する物質、mRNAの分解を促進する物質、mRNAからタンパク質への翻訳を阻害する物質、CPSF5(もしくはCPSF6)ポリペプチドの翻訳後修飾を阻害する物質などが含まれる。いずれの段階で作用するものであっても好ましく用いることができるが、CPSF5もしくはCPSF6タンパク質の産生を直接的に阻害するという意味では、mRNAからタンパク質への翻訳を阻害する物質が好ましい。

[0020] CPSF5もしくはCPSF6のmRNAからタンパク質への翻訳を特異的に阻害し得る物質として、好ましくは、これらのmRNAの塩基配列と相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含む核酸が挙げられる。

CPSF5もしくはCPSF6のmRNAの塩基配列と実質的に相補的な塩基配列とは、インスリン抵抗性の病態を呈し、あるいは将来インスリン抵抗性となるリスクが高いと予測される哺乳動物体内の生理的条件下において、該mRNAの標的配列に結合してその翻訳を阻害し得る程度の相補性を有する塩基配列を意味し、具体的には、例えば、該mRNAの塩基配列と完全相補的な塩基配列（すなわち、mRNAの相補鎖の塩基配列）と、オーバーラップする領域に関して、約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列である。

本発明における「塩基配列の相同性」は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool)を用い、以下の条件（期待値=10；ギャップを許す；フィルタリング=ON；マッチスコア=1；ミスマッチスコア=-3）にて計算することができる。塩基配列の相同性を決定するための他のアルゴリズムとしては、例えば、Karlinら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5877 (1993)に記載のアルゴリズム[該アルゴリズムはNBLASTおよびXBLASTプログラム(version 2.0)に組み込まれている(Altschulら, Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402 (1997))]、Needlemanら, J. Mol. Biol., 48: 444-453 (1970)に記載のアルゴリズム[該アルゴリズムはGCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラムに組み込まれている]、MyersおよびMiller, CABIOS, 4: 11-17 (1988)に記載のアルゴリズム[該アルゴリズムはCGC配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム(version 2.0)に組み込まれている]、Pearsonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444-2448 (1988)に記載のアルゴリズム[該アルゴリズムはGCGソフトウェアパッケージ中のFASTAプログラムに組み込まれている]等が挙げられ、それらも同様に好ましく用いられ得る。

[0021] より具体的には、CPSF5のmRNAの塩基配列と相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列としては、(a)配列番号: 1で表される塩基配列または(b)該塩基配列とハイストリ

ンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、配列番号:2で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードする配列と、相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列が挙げられる。また、CPSF6のmRNAの塩基配列と相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列としては、(a)配列番号:3で表される塩基配列または(b)該塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、配列番号:4で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードする配列と、相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列が挙げられる。ここで「実質的に同質の活性」とは前記と同義である。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～約40mM、好ましくは約19～約20mMで、温度が約50～約70℃、好ましくは約60～約65℃の条件をいう。特に、ナトリウム塩濃度が約19mMで温度が約65℃の場合が好ましい。

[0022] CPSF5のmRNAは、好ましくは、配列番号:1に示される塩基配列を含むヒトCPSF5 mRNA (RefSeq Accession No. NM_007006.2)、あるいは他の哺乳動物におけるそれらのホモログ (例えば、GenBankにRefSeq Accession No. NM_026623.3として登録されているマウスホモログ)、さらにはそれらの天然のアレル変異体である。また、CPSF6のmRNAは、好ましくは、配列番号:3に示される塩基配列を含むヒトCPSF6 mRNA (RefSeq Accession No. NM_007007.1)、あるいは他の哺乳動物におけるそれらのホモログ (例えば、GenBankにRefSeq Accession No. NM_001013391.1として登録されているマウスホモログ)、さらにはそれらの天然のアレル変異体である。

[0023] 「CPSF5もしくはCPSF6のmRNAの塩基配列と相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列の一部」とは、CPSF5もしくはCPSF6のmRNAに特異的に結合することができ、且つ該mRNAからのタンパク質の翻訳を阻害し得るものであれば、その長さや位置に特に制限はないが、配列特異性の面から、標的配列に相補的もしくは実質的に相補的な部分を少なくとも10塩基以上、好ましくは約15塩基以上、より好ましくは約20塩基以上含むものである。

[0024] 具体的には、CPSF5もしくはCPSF6のmRNAの塩基配列と相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含む核酸として、以下の(a)～(c)のいずれかの

ものが好ましく例示される。

(a) CPSF5もしくはCPSF6のmRNAに対するアンチセンス核酸

(b) CPSF5もしくはCPSF6のmRNAに対するsiRNA

(c) CPSF5もしくはCPSF6のmRNAに対するsiRNAを生成し得る核酸

[0025] (a) CPSF5もしくはCPSF6のmRNAに対するアンチセンス核酸

本発明における「CPSF5もしくはCPSF6のmRNAに対するアンチセンス核酸」とは、該mRNAの塩基配列と相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含む核酸であって、標的mRNAと特異的かつ安定した二重鎖を形成して結合することにより、タンパク質合成を抑制する機能を有するものである。

アンチセンス核酸は、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシリボヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリリボヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販のタンパク質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、二本鎖DNA、一本鎖DNA、二本鎖RNA、一本鎖RNA、DNA:RNAハイブリッドであってもよく、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えばタンパク質（例、ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど）や糖（例、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 α アノマー型の核酸など）であ

ってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。このような修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオシドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、またはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

[0026] 上記の通り、アンチセンス核酸はDNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよい。アンチセンス核酸がDNAの場合、標的RNAとアンチセンスDNAとによって形成されるRNA:DNAハイブリッドは、内在性RNase Hに認識されて標的RNAの選択的な分解を引き起こすことができる。したがって、RNase Hによる分解を指向するアンチセンスDNAの場合、標的配列は、mRNA中の配列だけでなく、CPSF5もしくはCPSF6遺伝子の初期翻訳産物におけるイントロン領域の配列であってもよい。例えば、ヒトの場合、CPSF5遺伝子は第16番染色体の16q13領域、CPSF6遺伝子は第12番染色体の12q15領域にそれぞれ存在するので、これらの領域のゲノム配列と、配列番号:1で表されるヒトCPSF5 cDNA塩基配列および配列番号:3で表されるヒトCPSF6 cDNA塩基配列とをBLAST、FASTA等のホモロジー検索プログラムを用いて比較して、イントロン配列を決定することができる。

[0027] 本発明のアンチセンス核酸の標的領域は、該アンチセンス核酸がハイブリダイズすることにより、結果としてCPSF5もしくはCPSF6タンパク質への翻訳が阻害されるものであればその長さに特に制限はなく、これらタンパク質をコードするmRNAの全配列であっても部分配列であってもよく、短いもので約10塩基程度、長いものでmRNAもしくは初期転写産物の全配列が挙げられる。合成の容易さや抗原性、細胞内移行性の問題等を考慮すれば、約10～約40塩基、特に約15～約30塩基からなるオリゴヌクレオチドが好ましいが、それに限定されない。具体的には、CPSF5およびCPSF6遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6一ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端パルンドローム領域または3'端ヘアピンループなどが、アンチセンス核酸の好ましい標的領域と

して選択しうるが、それらに限定されない。

[0028] さらに、本発明のアンチセンス核酸は、CPSF5もしくはCPSF6のmRNAや初期転写産物とハイブリダイズしてタンパク質への翻訳を阻害するだけでなく、二本鎖DNAであるこれらの遺伝子と結合して三重鎖(トリプレックス)を形成し、RNAへの転写を阻害し得るもの(アンチジーン)であってもよい。

[0029] アンチセンス核酸を構成するヌクレオチド分子は、天然型のDNAもしくはRNAでもよいが、安定性(化学的および/または対酵素)や比活性(RNAとの親和性)を向上させるために、種々の化学修飾を含むことができる。例えば、ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンス核酸を構成する各ヌクレオチドのリン酸残基(ホスフェート)を、例えば、ホスホロチオエート(PS)、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾リン酸残基に置換することができる。また、各ヌクレオチドの糖(リボース)の2'位の水酸基を、-OR(Rは、例えば CH_3 (2'-O-Me)、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ (2'-O-MOE)、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $\text{CH}_2\text{CONHCH}_3$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ 等を示す)に置換してもよい。さらに、塩基部分(ピリミジン、プリン)に化学修飾を施してもよく、例えば、ピリミジン塩基の5位へのメチル基やカチオン性官能基の導入、あるいは2位のカルボニル基のチオカルボニルへの置換などが挙げられる。

[0030] RNAの糖部のコンフォーメーションはC2'-endo(S型)とC3'-endo(N型)の2つが支配的であり、一本鎖RNAではこの両者の平衡として存在するが、二本鎖を形成するとN型に固定される。したがって、標的RNAに対して強い結合能を付与するために、2'酸素と4'炭素を架橋することにより、糖部のコンフォーメーションをN型に固定したRNA誘導体であるBNA(LNA)(Imanishi, T. et al., Chem. Commun., 1653-9, 2002; Jepsen, J.S. et al., Oligonucleotides, 14, 130-46, 2004)やENA(Morita, K. et al., Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 22, 1619-21, 2003)もまた、好ましく用いられ得る。

[0031] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、CPSF5およびCPSF6のcDNA配列もしくはゲノミックDNA配列に基づいてmRNAもしくは初期転写産物の標的配列を決定し、市販のDNA/RNA自動合成機(アプライド・バイオシステムズ社、ベックマン社等)を用いて、これに相補的な配列を合成することにより調製することができる。また、上記した各種修飾を含むアンチセンス核酸も、いずれも自体公知の手法により、化学的に

合成することができる。

[0032] (b) CPSF5もしくはCPSF6のmRNAに対するsiRNA

本明細書においては、CPSF5もしくはCPSF6のmRNAに相補的なオリゴRNAとその相補鎖とからなる二本鎖RNA、いわゆるsiRNAもまた、CPSF5もしくはCPSF6のmRNAの塩基配列と相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含む核酸に包含されるものとして定義される。短い二本鎖RNAを細胞内に導入するとそのRNAに相補的なmRNAが分解される、いわゆるRNA干渉(RNAi)と呼ばれる現象は、以前から線虫、昆虫、植物等で知られていたが、この現象が動物細胞でも広く起こることが確認されて以来[Nature, 411(6836): 494-498 (2001)]、リボザイムの代替技術として汎用されている。siRNAは標的となるmRNAの塩基配列情報に基づいて、市販のソフトウェア(例:RNAi Designer; Invitrogen)を用いて適宜設計することができる。具体的には、後述の実施例において使用されるsiRNA等が本発明のsiRNAとして好ましく例示され得るが、それらに限定されない。

[0033] siRNAを構成するリボヌクレオシド分子もまた、安定性、比活性などを向上させるために、上記のアンチセンス核酸の場合と同様の修飾を受けていてもよい。但し、siRNAの場合、天然型RNA中のすべてのリボヌクレオシド分子を修飾型で置換すると、RNAi活性が失われる場合があるので、RISC複合体が機能できる最小限の修飾ヌクレオシドの導入が必要である。

[0034] siRNAは、mRNA上の標的配列のセンス鎖及びアンチセンス鎖をDNA/RNA自動合成機でそれぞれ合成し、適当なアニーリング緩衝液中、約90～約95℃で約1分程度変性させた後、約30～約70℃で約1～約8時間アニーリングさせることにより調製することができる。また、siRNAの前駆体となるショートヘアピンRNA(shRNA)を合成し、これをダイサー(dicer)を用いて切断することにより調製することもできる。

[0035] (c) CPSF5もしくはCPSF6のmRNAに対するsiRNAを生成し得る核酸

本明細書においては、生体内で上記のCPSF5もしくはCPSF6のmRNAに対するsiRNAを生成し得るようにデザインされた核酸もまた、CPSF5もしくはCPSF6のmRNAの塩基配列と相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含む核酸に包含されるものとして定義される。そのような核酸としては、上記したshRNAやそれを

発現するように構築された発現ベクターなどが挙げられる。shRNAは、mRNA上の標的配列のセンス鎖およびアンチセンス鎖を適当なループ構造を形成する長さ(例えば15から25塩基程度)のスペーサー配列を間に挿入して連結した塩基配列を含むオリゴRNAをデザインし、これをDNA/RNA自動合成機で合成することにより調製することができる。shRNAの発現カセットを含む発現ベクターは、上記shRNAをコードする二本鎖DNAを常法により作製した後、適当な発現ベクター中に挿入することにより調製することができる。shRNAの発現ベクターとしては、U6やH1などのPol III系プロモーターを有するものが用いられ得る。この場合、該発現ベクターを導入された動物細胞内で転写されたshRNAは、自身でループを形成した後に、内在の酵素ダイサー(dicer)などによってプロセッシングされることにより成熟siRNAが形成される。

- [0036] CPSF5もしくはCPSF6のmRNAの塩基配列と相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含む核酸の他の好ましい例としては、該mRNAをコード領域の内部で特異的に切断し得るリボザイムが挙げられる。「リボザイム」とは、狭義には、核酸を切断する酵素活性を有するRNAをいうが、本明細書では配列特異的な核酸切断活性を有する限りDNAをも包含する概念として用いるものとする。リボザイムとして最も汎用性の高いものとしては、ウイロイドやウイルソイド等の感染性RNAに見られるセルフスプライシングRNAがあり、ハンマーヘッド型やヘアピン型等が知られている。ハンマーヘッド型は約40塩基程度で酵素活性を発揮し、ハンマーヘッド構造をとる部分に隣接する両端の数塩基ずつ(合わせて約10塩基程度)をmRNAの所望の切断部位と相補的な配列にすることにより、標的mRNAのみを特異的に切断することが可能である。このタイプのリボザイムは、RNAのみを基質とするので、ゲノムDNAを攻撃することがないというさらなる利点を有する。CPSF5およびCPSF6 mRNAが自身で二本鎖構造をとる場合には、RNAヘリカーゼと特異的に結合し得るウイルス核酸由来のRNAモチーフを連結したハイブリッドリボザイムを用いることにより、標的配列を一本鎖にすることができる[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98(10): 5572-5577 (2001)]。さらに、リボザイムを、それをコードするDNAを含む発現ベクターの形態で使用する場合には、転写産物の細胞質への移行を促進するために、tRNAを改変した配列をさらに連結したハイブリッドリボザイムとすることもできる[Nucleic Acids Res., 29(13): 2780-2

788 (2001)]。

[0037] CPSF5もしくはCPSF6のmRNAの塩基配列と相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含む核酸は、リポソーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療に適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例、ホスホリピド、コレステロールなど）などの疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例、コレステリルクロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端または5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端または5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

[0038] これらの核酸のCPSF5（もしくはCPSF6）タンパク質発現阻害活性は、CPSF5（もしくはCPSF6）遺伝子を導入した形質転換体、生体内や生体外のCPSF5（もしくはCPSF6）遺伝子発現系、または生体内や生体外のCPSF5（もしくはCPSF6）タンパク質翻訳系を用いて調べることができる。

[0039] 本発明におけるCPSF5（もしくはCPSF6）タンパク質の発現を阻害する物質は、上記のようなCPSF5もしくはCPSF6のmRNAの塩基配列と相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含む核酸に限定されず、CPSF5（もしくはCPSF6）タンパク質の産生を直接的または間接的に阻害する限り、低分子化合物などの他の物質であってもよい。そのような物質は、例えば、後述する本発明のスクリーニング方法により取得することができる。

[0040] 本発明において「CPSF5（もしくはCPSF6）タンパク質の活性を阻害する物質」とは、いったん機能的に産生されたCPSF5（もしくはCPSF6）タンパク質が、mRNA前駆体の3'末端プロセッシング活性（CFI 活性）を発揮するのを阻害する限りいかなるものでも

よく、例えば、CPSF5とCPSF6との複合体形成を阻害する物質や、CPSF5、CPSF6もしくは該複合体のmRNA結合能を阻害する物質、CPSF5やCPSF6の核移行を阻害する物質等が挙げられる。

[0041] 具体的には、CPSF5(もしくはCPSF6)タンパク質の活性を阻害する物質として、例えば、CPSF5もしくはCPSF6タンパク質に対する抗体が挙げられる。該抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであつてもよい。これらの抗体は、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。抗体のアイソタイプは特に限定されないが、好ましくはIgG、IgMまたはIgA、特に好ましくはIgGが挙げられる。また、該抗体は、標的抗原を特異的に認識し結合するための相補性決定領域(CDR)を少なくとも有するものであれば特に制限はなく、完全抗体分子の他、例えばFab、Fab'、F(ab')₂等のフラグメント、scFv、scFv-Fc、ミニボディー、ダイアボディー等の遺伝子工学的に作製されたコンジュゲート分子、あるいはポリエチレングリコール(PEG)等のタンパク質安定化作用を有する分子等で修飾されたそれらの誘導体などであってもよい。

好ましい一実施態様において、CPSF5もしくはCPSF6タンパク質に対する抗体はヒトを投与対象とする医薬品として使用されることから、該抗体(好ましくはモノクローナル抗体)はヒトに投与した場合に抗原性を示す危険性が低減された抗体、具体的には、完全ヒト抗体、ヒト化抗体、マウスーヒトキメラ抗体などであり、特に好ましくは完全ヒト抗体である。ヒト化抗体およびキメラ抗体は、常法に従って遺伝子工学的に作製することができる。また、完全ヒト抗体は、ヒトーヒト(もしくはマウス)ハイブリドーマより製造することも可能ではあるが、大量の抗体を安定に且つ低コストで提供するためには、ヒト抗体産生マウスやファージディスプレイ法を用いて製造することが望ましい。

[0042] CPSF5およびCPSF6はCFI_m複合体を形成し、mRNA前駆体の3'末端におけるプロセッシングにおいて中心的な役割を担っているので、CPSF5(もしくはCPSF6)タンパク質の活性を阻害する物質は、細胞内移行性、核移行性に優れた物質であることが望ましい。したがって、CPSF5(もしくはCPSF6)タンパク質の活性を阻害するより好ましい物質は、Lipinski's Ruleに見合った低分子化合物である。そのような化合物は、例えば、後述する本発明のスクリーニング法を用いて取得することができる。

[0043] 本発明のCPSF5もしくはCPSF6の発現もしくは活性を阻害する物質は、インスリン刺激した時の糖新生を抑制するため、インスリン抵抗性の病態改善に有用である。しかも該物質は、Dex/8CPT刺激による糖産生には影響しないので、乳酸アシドーシス等の毒性を発現する危険性が低いというさらなる有利な効果を奏する。

したがって、CPSF5もしくはCPSF6の発現もしくは活性を阻害する物質を含有する医薬は、例えばインスリン抵抗性改善剤、(肝臓などにおける)糖新生阻害剤などとして、例えば糖代謝異常が関与する疾患、脂質代謝異常が関連する疾患の予防および／または治療剤などとして使用することができる。

[0044] (1) アンチセンス核酸、siRNA、その前駆体核酸を含有する医薬

CPSF5もしくはCPSF6遺伝子の転写産物に相補的に結合し、該転写産物からのタンパク質の翻訳を抑制することができる本発明のアンチセンス核酸や、CPSF5もしくはCPSF6遺伝子の転写産物における相同な(もしくは相補的な)塩基配列を標的として該転写産物を切断し得るsiRNA(もしくはリボザイム)、さらに該siRNAの前駆体であるshRNAなど(以下、包括的に「本発明の核酸」という場合がある)は、生体内におけるCPSF5もしくはCPSF6タンパク質の機能や作用を抑制し、肝臓などにおける糖新生作用を阻害することができるので、例えばインスリン抵抗性改善剤、糖新生阻害剤などとして、例えば糖代謝異常が関連する疾患[例、糖尿病(好ましくはII型糖尿病)、糖尿病性合併症(例、神経障害、腎症、網膜症等)、耐糖能異常、肥満症、メタボリックシンドローム等]、脂質代謝異常が関連する疾患[例、動脈硬化、高血圧、高脂血症(特に高トリグリセリド血症等)、脂肪肝、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)、突然心臓死、非致死性心筋梗塞、安静狭心症・労作狭心症、心血管疾患(例、狭心症の不安定化等)、脳血管障害(例、脳血栓、脳塞栓、脳出血、クモ膜下出血、一過性脳虚血発作等)等]の予防・治療剤として使用することができる。

本発明の核酸を含有する医薬は低毒性であり、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは非ヒト哺乳動物(例、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して経口的または非経口的(例、血管内投与、皮下投与など)に投与することができる。

[0045] 本発明の核酸を上記のインスリン抵抗性改善剤、糖および／または脂質代謝異常

が関連する疾患の予防・治療剤などとして使用する場合、自体公知の方法に従って製剤化し、投与することができる。即ち、本発明の核酸を、単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当な哺乳動物細胞用の発現ベクターに機能可能な態様で挿入した後、常套手段に従って製剤化することができる。該核酸は、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与することができる。あるいは、エアロゾル化して吸入剤として気管内に局所投与することもできる。

さらに、体内動態の改良、半減期の長期化、細胞内取り込み効率の改善を目的に、前記核酸を単独またはリポソームなどの担体とともに製剤(注射剤)化し、静脈、皮下等に投与してもよい。

[0046] 本発明の核酸は、それ自体を投与してもよいし、または適当な医薬組成物として投与してもよい。投与に用いられる医薬組成物としては、本発明の核酸と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものであってよい。このような医薬組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

[0047] 非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤等が用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤等の剤形を包含しても良い。このような注射剤は、公知の方法に従って調製できる。注射剤の調製方法としては、例えば、上記本発明の核酸を通常注射剤に用いられる無菌の水性液、または油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製できる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液等が用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例、エタノール)、ポリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、HCO-50 (polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等を併用してもよい。調製された注射液は、適当なアンプルに充填されることが好ましい。直腸投与に用いられる坐剤は、上記核酸を通常坐薬用基剤に混合することによって調製されてもよい。

- [0048] 経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤(糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む)、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤(ソフトカプセル剤を含む)、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等が挙げられる。このような組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有していても良い。錠剤用の担体、賦形剤としては、例えば、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムが用いられる。
- [0049] 上記の非経口用または経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。このような投薬単位の剤形としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤(アンプル)、坐剤が挙げられる。本発明の核酸は、例えば、投薬単位剤形当たり通常5～500mg、とりわけ注射剤では5～100mg、その他の剤形では10～250mg含有されていることが好ましい。
- [0050] 本発明の核酸を含有する上記医薬の投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の糖尿病の治療・予防のために使用する場合には、本発明の核酸を1回量として、通常0.01～20mg/kg体重程度、好ましくは0.1～10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1～5mg/kg体重程度を、1日1～5回程度、好ましくは1日1～3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。
- [0051] なお前記した各組成物は、本発明の核酸との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。
- [0052] さらに、本発明の核酸は、他の薬剤、例えば、インスリン抵抗性改善薬(例、トログリタゾン、ビオグリタゾン等のチアドリジン誘導体等)、血糖降下薬(例、トルブタミド、グリコピラミド、アセトヘキサミド等のスルホニルウレア薬、グリミジン、グリブゾール等のスルホンアミド薬、メトフォルミン、ブフォルミン等のビグアナイド薬等)、アルドース還元酵素阻害薬(例、エパルレストアット等)、 α -グルコシダーゼ阻害薬(例、ボグリボース、アカルボース等)ソマトメジンC製剤(例、メカセルミン等)などの抗糖尿病薬;中枢性抗肥満薬(例、デキスフェンフルラミン、フェンフルラミン、フェンテルミン等)、MCH受容体拮抗薬(例、SB-568849、SNAP-7941等)、ニューロペプチドY拮抗薬(例、CP

-422935等)、カンナビノイド受容体拮抗薬(例、SR-141716、SR-147778等)、グレリン拮抗薬、レプチン、 β 3アゴニストなどの抗肥満薬などと併用してもよい。本発明の核酸および上記薬剤は、同時または異なった時間に患者に投与すればよい。

[0053] (2) CPSF5もしくはCPSF6に対する抗体、CPSF5もしくはCPSF6の発現または活性を阻害する低分子化合物等を含有する医薬

CPSF5もしくはCPSF6に対する抗体や、CPSF5もしくはCPSF6の発現または活性を阻害する低分子化合物は、CPSF5もしくはCPSF6タンパク質の産生または活性を阻害、あるいはCPSF5およびCPSF6の相互作用(複合体形成)を阻害することができる。したがって、これらの物質は、生体内におけるCPSF5もしくはCPSF6タンパク質の機能や作用を抑制し、肝臓などにおける糖新生作用を阻害することができ、例えばインスリン抵抗性改善剤、糖新生阻害剤などとして、例えば糖代謝異常が関連する疾患〔例、糖尿病(好ましくはII型糖尿病)、糖尿病性合併症(例、神経障害、腎症、網膜症等)、耐糖能異常、肥満症、メタボリックシンドローム等〕、脂質代謝異常が関連する疾患〔例、動脈硬化、高血圧、高脂血症(特に高トリグリセリド血症等)、脂肪肝、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)、突然心臓死、非致死性心筋梗塞、安静狭心症・労作狭心症、心血管疾患(例、狭心症の不安定化等)、脳血管障害(例、脳血栓、脳塞栓、脳出血、クモ膜下出血、一過性脳虚血発作等)等〕の予防・治療剤として使用することができる。

上記の抗体や低分子化合物を含有する医薬は低毒性であり、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物(例、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して経口的または非経口的(例、血管内投与、皮下投与など)に投与することができる。

[0054] 上記の抗体や低分子化合物は、それ自体を投与してもよいし、または適当な医薬組成物として投与してもよい。投与に用いられる医薬組成物としては、上記の抗体もしくは低分子化合物またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものであってもよい。このような医薬組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

[0055] 非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤等が用いられ、注射

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

[0056] 経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤(糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む)、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤(ソフトカプセル剤を含む)、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等が挙げられる。このような組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有していても良い。錠剤用の担体、賦形剤としては、例えば、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムが用いられる。

[0057] 上記の非経口用または経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。このような投薬単位の剤形としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤(アンプル)、坐剤が挙げられる。抗体や低分子化合物は、投薬単位剤形当たり通常5～500mg、とりわけ注射剤では5～100mg、その他の剤形では10～250mg含有されていることが好ましい。

[0058] 上記の抗体もしくは低分子化合物またはその塩を含有する上記医薬の投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の糖尿病の治療・予防のために使用する場合には、抗体もしくは低分子化合物を1回量として、通常0.01～20mg/kg体重程度、好ましくは0.1～10mg/kg体重程度、さらに好ま

しくは0.1～5mg/kg体重程度を、1日1～5回程度、好ましくは1日1～3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

[0059] 上記の抗体もしくは低分子化合物またはその塩は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記抗体もしくは低分子化合物またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与(例、血管内注射、皮下注射など)に適する剤形として提供される。

なお前記した各組成物は、上記抗体や低分子化合物との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

さらに、上記の抗体もしくは低分子化合物は、本発明の核酸を含有する医薬において前記したと同様の他の薬剤と併用してもよい。上記の抗体もしくは低分子化合物とそれらの他の薬剤とは、同時または異なった時間に患者に投与すればよい。

[0060] (3) 疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

上述の通り、CPSF5および／またはCPSF6の発現および／または活性を阻害すると、インスリン刺激したときの肝臓などにおける糖新生作用が阻害される。従って、CPSF5もしくはCPSF6タンパク質の発現および／または活性を阻害する化合物またはその塩は、例えばインスリン抵抗性改善剤、糖新生阻害剤などとして、例えば糖代謝異常が関連する疾患[例、糖尿病(好ましくはII型糖尿病)、糖尿病性合併症(例、神経障害、腎症、網膜症等)、耐糖能異常、肥満症、メタボリックシンドローム等]、脂質代謝異常が関連する疾患[例、動脈硬化、高血圧、高脂血症(特に高トリグリセリド血症等)、脂肪肝、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)、突然心臓死、非致死性心筋梗塞、安静狭心症・労作狭心症、心血管疾患(例、狭心症の不安定化等)、脳血管障害(例、脳血栓、脳塞栓、脳出血、クモ膜下出血、一過性脳虚血発作等)等]の予防・治療剤として使用することができる。

したがって、CPSF5および／またはCPSF6タンパク質あるいはその部分ペプチドを産生する細胞は、該タンパク質(遺伝子)の発現量および／または活性を指標とする

ことにより、インスリン抵抗性改善作用を有する物質のスクリーニングのためのツールとして用いることができる。

[0061] CPSF5もしくはCPSF6タンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする場合、該スクリーニング方法は、CPSF5および／またはCPSF6タンパク質を産生する能力を有する細胞を、試験化合物の存在下および非存在下に培養し、両条件下におけるCPSF5および／またはCPSF6タンパク質の活性を比較することを含む。

[0062] 上記のスクリーニング方法において用いられるCPSF5および／またはCPSF6タンパク質を産生する能力を有する細胞としては、それらを生来発現しているヒトもしくは他の哺乳動物細胞またはそれを含む生体試料(例、血液、組織、臓器等)であれば特に制限はないが、インスリン低感受性の細胞株(例、後述の実施例の方法に従って樹立され得るラット肝臓由来のインスリン低感受性細胞株)等が好ましく挙げられる。非ヒト動物由来の血液、組織、臓器等の場合は、それらを生体から単離して培養してもよいし、あるいは生体自体に試験化合物を投与し、一定時間経過後にそれら生体試料を単離してもよい。

また、CPSF5および／またはCPSF6タンパク質またはその部分ペプチドを産生する能力を有する細胞としては、公知慣用の遺伝子工学的手法により作製された各種の形質転換体が例示される。宿主としては、例えば、H4IIE-C3細胞、HepG2細胞、HEK293細胞、COS7細胞、CHO細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。

[0063] 具体的には、CPSF5またはその部分ペプチドをコードするDNA(即ち、配列番号:1で表される塩基配列もしくは該塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ配列番号:2で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質と同質の活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA)、および／またはCPSF6またはその部分ペプチドをコードするDNA(即ち、配列番号:3で表される塩基配列もしくは該塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ配列番号:4で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質と同質の活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA)を、適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結して宿主動物細胞に導入することにより調製することができる。

CPSF5またはその部分ペプチドをコードするDNAおよびCPSF6またはその部分ペプチドをコードするDNAは、例えば、配列番号:1および配列番号:3で表される塩基配列に基づいて、適当なオリゴヌクレオチドをプローブもしくはプライマーとして合成し、前記したCPSF5およびCPSF6を産生する細胞・組織由来のcDNAもしくはcDNAライブラリーから、ハイブリダイゼーション法やPCR法を用いてクローニングすることができる。ハイブリダイゼーションは、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 第2版 (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、ハイブリダイゼーションは、該ライブラリーに添付された使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

- [0064] DNAの塩基配列は、公知のキット、例えば、MutanTM-super Express Km (宝酒造(株))、MutanTM-K (宝酒造(株))等を用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って変換することができる。
- [0065] クローン化されたDNAは、目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化するか、リンカーを付加した後に、使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することができる。
- [0066] 発現ベクターとしては、動物細胞発現プラスミド (例: pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neo) ; λ ファージなどのバクテリオファージ; レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルスなどの動物ウイルスベクターなどが用いられる。プロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV (サイトメガロウイルス) プロモーター、RSV (ラウス肉腫ウイルス) プロモーター、MoMuLV (モロニーマウス白血病ウイルス) LTR、HSV-TK (単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ) プロモーターなどが用いられる。なかでも、CMVプロモーター、SR α プロモーターなどが好ましい。

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

[0067] CPSF5をコードするDNAとCPSF6をコードするDNAの両方を宿主動物細胞に導入する場合、これらのDNAは同一ベクター上にジシストロニックに挿入されてもよいし、IRES配列を用いてモノシストロニックに挿入されてもよい。あるいは、これらのDNAは別個の発現ベクターにそれぞれ挿入され、コトランスフェクションにより宿主細胞に導入されてもよい。

[0068] 上記したCPSF5および／またはCPSF6をコードするDNAを含む発現ベクターで宿主を形質転換することにより、CPSF5および／またはCPSF6発現細胞を製造することができる。

宿主としては、哺乳動物細胞、例えば、HepG2細胞、HEK293細胞、HeLa細胞、ヒトFL細胞、サルCOS-7細胞、サルVero細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞(以下、CHO細胞と略記)、dhfr遺伝子欠損CHO細胞(以下、CHO(dhfr⁻)細胞と略記)、マウスL細胞、マウスAtT-20細胞、マウスミエローマ細胞、ラットH4IIE-C3細胞、ラットGH3細胞などが用いられ得る。

[0069] 形質転換は、リン酸カルシウム共沈殿法、PEG法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リポフェクション法などにより行うことができる。例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコル、263-267 (1995)(秀潤社発行)、ヴィロロジー(Virology), 52巻, 456 (1973)に記載の方法を用いることができる。

[0070] 上記のようにして得られる形質転換細胞や生来CPSF5およびCPSF6タンパク質を産生する能力を有する哺乳動物細胞または該細胞を含む組織・臓器は、例えば、約5

～20%の胎仔牛血清を含む最小必須培地(MEM) [Science, 122巻,501(1952)], ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM) [Virology, 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199巻, 519(1967)], 199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73巻, 1(1950)]などの培地中で培養することができる。培地のpHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30～40℃で行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

- [0071] 試験化合物としては、例えばタンパク質、ペプチド、抗体、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などが挙げられ、これらの物質は新規なものであってもよいし、公知のものであってもよい。
- [0072] 試験化合物の上記細胞との接触は、例えば、上記の培地や各種緩衝液(例えば、HEPES緩衝液、リン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水、トリス塩酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、酢酸緩衝液など)の中に試験化合物を添加して、細胞を一定時間インキュベートすることにより実施することができる。添加される試験化合物の濃度は化合物の種類(溶解度、毒性等)により異なるが、例えば、約0.1nM～約100nMの範囲で適宜選択される。インキュベート時間としては、例えば、約10分～約24時間が挙げられる。
- [0073] CPSF5およびCPSF6タンパク質を産生する細胞が、非ヒト哺乳動物個体の形態で提供される場合、該動物個体の状態は特に制限されないが、例えば、db/dbマウス、ob/obマウス、KKAyマウス、Zucker fattyラット等の肥満および／または糖尿病モデル動物であってもよい。使用される動物の飼育条件に特に制限はないが、SPFグレード以上の環境下で飼育されたものであることが好ましい。試験化合物の該細胞との接触は、該動物個体への試験化合物の投与によって行われる。投与経路は特に制限されないが、例えば、静脈内投与、動脈内投与、皮下投与、皮内投与、腹腔内投与、経口投与、気道内投与、直腸投与等が挙げられる。投与量も特に制限はないが、例えば、1回量として約0.5～20 mg/kgを、1日1～5回、好ましくは1日1～3回、1～14日間投与することができる。
- [0074] 上記のスクリーニング方法におけるCPSF5および／またはCPSF6活性の測定は、例えば、標識したRNAプローブとの結合などを指標にして測定することができ、例えば、Rueseggerら(1998年、上述)に記載の方法等に従って行うことができるが、それに限

定されない。活性測定のための被験試料としては、CPSF5および／またはCPSF6タンパク質を産生する細胞が細胞培養、組織、臓器培養の形態で提供される場合は該培養物の抽出液が、該細胞がそれを含む非ヒト哺乳動物個体として提供される場合は、該個体から分離した細胞、組織、臓器の抽出物、例えば、肝臓、脂肪組織、骨格筋、あるいはそれらの組織切片等のホモジネートなどが挙げられる。

[0075] 例えば、上記のスクリーニング方法において、試験化合物の存在下におけるCPSF5および／またはCPSF6タンパク質の活性が、試験化合物の非存在下における活性に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害された場合に、該試験化合物またはその塩を、CPSF5および／またはCPSF6タンパク質の活性阻害物質、従って、インスリン抵抗性改善作用を有する物質の候補として選択することができる。

[0076] 本発明はまた、CPSF5および／またはCPSF6タンパク質を産生する能力を有する細胞における該タンパク質（遺伝子）の発現を、試験化合物の存在下と非存在下で比較することを特徴とする、インスリン抵抗性改善作用を有する物質のスクリーニング方法を提供する。本方法において用いられる細胞、試験化合物の種類、試験化合物と細胞との接触の態様などは、上記したCPSF5および／またはCPSF6タンパク質の活性を指標とする方法と同様である。

[0077] CPSF5およびCPSF6の発現量は、前記したCPSF5またはCPSF6をコードするDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る核酸、即ち、配列番号:1(配列番号:3)で表される塩基配列もしくはそれと相補的な塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る核酸(以下、「本発明の検出用核酸」という場合がある)を用いて、CPSF5またはCPSF6のmRNAを検出することにより、RNAレベルで測定することができる。あるいは、該発現量は、前記したCPSF5に対する抗体またはCPSF6に対する抗体(以下、「本発明の検出用抗体」という場合がある)を用いて、これらのタンパク質を検出することにより、タンパク質レベルで測定することもできる。

従って、より具体的には、本発明は、

(a) CPSF5および／またはCPSF6タンパク質を産生する能力を有する細胞を試験化合物の存在下および非存在下に培養し、両条件下における該タンパク質をコードす

るmRNAの量を、本発明の検出用核酸を用いて測定、比較することを特徴とする、インスリン抵抗性改善物質のスクリーニング方法、および

(b) CPSF5および／またはCPSF6タンパク質を産生する能力を有する細胞を試験化合物の存在下および非存在下に培養し、両条件下における該タンパク質の量を、本発明の検出用抗体を用いて測定、比較することを特徴とする、インスリン抵抗性改善物質のスクリーニング方法を提供する。

[0078] 例えば、CPSF5および／またはCPSF6のmRNA量またはタンパク質量の測定は、具体的には以下のようにして行うことができる。

(i) 正常あるいは疾患(例えば、糖尿病、肥満、高血圧、高脂血症など)モデル非ヒト哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して、薬剤(例えば、インスリン、cAMP、グルコース等)などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器(例えば、肝臓、脂肪組織、骨格筋等)、あるいは臓器から単離した組織または細胞を得る。

得られた細胞に含まれるCPSF5および／またはCPSF6のmRNAは、例えば、通常の方法により細胞等からmRNAを抽出し、例えば、RT-PCRなどの手法を用いることにより定量することができ、あるいは自体公知のノーザンブロット解析により定量することもできる。一方、CPSF5およびCPSF6タンパク質量は、ウェスタンブロット解析や以下に詳述する各種イムノアッセイ法を用いて定量することができる。

(ii) CPSF5および／またはCPSF6タンパク質をコードするポリヌクレオチドを導入した形質転換体を上記の方法に従って作製し、該形質転換体に含まれるCPSF5および／またはCPSF6タンパク質あるいはそれをコードするmRNAを、上記(i)と同様にして定量、解析することができる。

[0079] CPSF5および／またはCPSF6の発現量を変化させる物質のスクリーニングは、

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤などを与える一定時間前(30分前～24時間前、好ましくは30分前～12時間前、より好ましくは1時間前～6時間前)もしくは一定時間後(30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後)、または薬剤などと同時に試験化合物を投与し、投与から一定時間が経過した後(30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時

間後～24時間後)、該動物から単離した細胞に含まれるCPSF5をコードするmRNA量および／またはCPSF6をコードするmRNA量、あるいはCPSF5タンパク質量および／またはCPSF6タンパク質量を定量、解析することにより、あるいは

(ii) 形質転換体を常法に従って培養する際に試験化合物を培地もしくは緩衝液中に添加し、一定時間インキュベート後(1日後～7日後、好ましくは1日後～3日後、より好ましくは2日後～3日後)、該形質転換体に含まれるCPSF5をコードするmRNA量および／またはCPSF6をコードするmRNA量、あるいはCPSF5タンパク質量および／またはCPSF6タンパク質量を定量、解析することにより行うことができる。

[0080] 上記(b)のスクリーニング方法におけるCPSF5およびCPSF6タンパク質の量の測定は、具体的には、例えば、

(i) 本発明の検出用抗体と、試料液および標識化されたCPSF5もしくはCPSF6タンパク質とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化されたタンパク質を検出することにより試料液中のCPSF5もしくはCPSF6タンパク質を定量する方法、

(ii) 試料液と、担体上に不溶化した本発明の検出用抗体および標識化された別の本発明の検出用抗体とを、同時あるいは連続的に反応させた後、不溶化担体上の標識剤の量(活性)を測定することにより、試料液中のCPSF5もしくはCPSF6タンパク質を定量する方法等が挙げられる。

上記(ii)の定量法においては、2種の抗体はCPSF5もしくはCPSF6タンパク質の異なる部分を認識するものであることが望ましい。例えば、一方の抗体が該2タンパク質のN端部を認識する抗体であれば、他方の抗体として該タンパク質のC端部と反応するものを用いることができる。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{32}\text{P}]$ 、 $[^{33}\text{P}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネート、シアニン蛍光色素などが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、

ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-（ストレプト）アビジン系を用いることもできる。

[0081] 本発明の検出用抗体を用いるCPSF5およびCPSF6タンパク質の定量法は、特に制限されるべきものではなく、試料液中の抗原量に対応した、抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられる。感度、特異性の点で、例えば、後述するサンドイッチ法を用いるのが好ましい。

[0082] 抗原あるいは抗体の不溶化にあたっては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化・固定化するのに用いられる化学結合を用いてもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。

[0083] サンドイッチ法においては不溶化した本発明の検出用抗体に試料液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明の検出用抗体を反応させ（2次反応）た後、不溶化担体上の標識剤の量もしくは活性を測定することにより、試料液中のCPSF5もしくはCPSF6タンパク質を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序で行っても、また、同時に行ってもよいし、時間をずらして行ってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相化抗体あるいは標識化抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

[0084] 本発明の検出用抗体は、サンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどにも用いることができる。

競合法では、試料液中のCPSF5もしくはCPSF6タンパク質と標識したCPSF5もしくはCPSF6タンパク質とを抗体に対して競合的に反応させた後、未反応の標識抗原（F）と、抗体と結合した標識抗原（B）とを分離（B/F分離）、B、Fいずれかの標識量を測定することにより、試料液中のCPSF5もしくはCPSF6タンパク質を定量する。本反応

法には、抗体として可溶性抗体を用い、ポリエチレングリコールや前記抗体(1次抗体)に対する2次抗体などを用いてB/F分離を行う液相法、および、1次抗体として固相化抗体を用いるか(直接法)、あるいは1次抗体は可溶性のものを用い、2次抗体として固相化抗体を用いる(間接法)固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、試料液中のCPSF5もしくはCPSF6タンパク質と固相化したCPSF5もしくはCPSF6タンパク質とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後、固相と液相を分離するか、あるいは試料液中のCPSF5もしくはCPSF6タンパク質と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化したCPSF5もしくはCPSF6タンパク質を加えて未反応の標識化抗体を固相に結合させた後、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し試料液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。試料液中のCPSF5もしくはCPSF6タンパク質の量がわずかであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

[0085] これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の方法、操作法に当業者の通常技術的配慮を加えてCPSF5およびCPSF6タンパク質の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical T

echniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の検出用抗体を用いることによって、細胞におけるCPSF5およびCPSF6タンパク質の量を感度よく定量することができる。

[0086] 例えば、上記(a)および(b)のスクリーニング法において、試験化合物の存在下におけるCPSF5および／またはCPSF6の発現量(mRNA量またはタンパク質量)が、試験化合物の非存在下における場合に比べて、約20%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上阻害された場合、該試験化合物またはその塩を、CPSF5および／またはCPSF6タンパク質の発現阻害物質、従って、インスリン抵抗性改善作用を有する物質の候補として選択することができる。

[0087] 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる、CPSF5の発現および／または活性阻害物質ならびにCPSF6の発現および／または活性阻害物質(遊離体であっても塩の形態であってもよい)は、例えばインスリン抵抗性改善剤、糖新生阻害剤などとして、例えば糖代謝異常が関連する疾患[例、糖尿病(好ましくはII型糖尿病)、糖尿病性合併症(例、神経障害、腎症、網膜症等)、耐糖能異常、肥満症、メタボリックシンドローム等]、脂質代謝異常が関連する疾患[例、動脈硬化、高血圧、高脂血症(特に高トリグリセリド血症等)、脂肪肝、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)、突然心臓死、非致死性心筋梗塞、安静狭心症・労作狭心症、心血管疾患(例、狭心症の不安定化等)、脳血管障害(例、脳血栓、脳塞栓、脳出血、クモ膜下出血、一過性脳虚血発作等)等]の予防・治療剤として使用することができる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる物質を上述の予防・治療剤として使用する場合、上記CPSF5(もしくはCPSF6)の発現および／または活性を阻害する低分子化合物と同様に製剤化することができ、同様の投与経路および投与量で、ヒトまたは哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど)に対して、経口的にまたは非経口的に投与することができる。

[0088] 本明細書において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略

号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	:デオキシリボ核酸
cDNA	:相補的デオキシリボ核酸
A	:アデニン
T	:チミン
G	:グアニン
C	:シトシン
RNA	:リボ核酸
mRNA	:メッセンジャーリボ核酸
dATP	:デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	:デオキシチミジン三リン酸
dGTP	:デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	:デオキシシチジン三リン酸
ATP	:アデノシン三リン酸
EDTA	:エチレンジアミン四酢酸
SDS	:ドデシル硫酸ナトリウム
Gly	:グリシン
Ala	:アラニン
Val	:バリン
Leu	:ロイシン
Ile	:イソロイシン
Ser	:セリン
Thr	:スレオニン
Cys	:システイン
Met	:メチオニン
Glu	:グルタミン酸
Asp	:アスパラギン酸

Lys	: リジン
Arg	: アルギニン
His	: ヒスチジン
Phe	: フェニルアラニン
Tyr	: チロシン
Trp	: トリプトファン
Pro	: プロリン
Asn	: アスパラギン
Gln	: グルタミン
pGlu	: ピログルタミン酸
Sec	: セレノシステイン (selenocysteine)

[0089] 本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

[配列番号:1]

CPSF5をコードするcDNAの塩基配列を示す。

[配列番号:2]

CPSF5のアミノ酸配列を示す。

[配列番号:3]

CPSF6をコードするcDNAの塩基配列を示す。

[配列番号:4]

CPSF6のアミノ酸配列を示す。

[配列番号:5]

CPSF5に対するsiRNA、CPSF5-1の標的配列の塩基配列を示す。

[配列番号:6]

CPSF5に対するsiRNA、CPSF5-1のセンス鎖の塩基配列を示す。

[配列番号:7]

CPSF5に対するsiRNA、CPSF5-1のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

[配列番号:8]

CPSF6に対するsiRNA、CPSF6-1の標的配列の塩基配列を示す。

〔配列番号:9〕

CPSF6に対するsiRNA、CPSF6-1のセンス鎖の塩基配列を示す。

〔配列番号:10〕

CPSF6に対するsiRNA、CPSF6-1のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

〔配列番号:11〕

CPSF5に対するsiRNA、CPSF5-2の標的配列の塩基配列を示す。

〔配列番号:12〕

CPSF5に対するsiRNA、CPSF5-2のセンス鎖の塩基配列を示す。

〔配列番号:13〕

CPSF5に対するsiRNA、CPSF5-2のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

〔配列番号:14〕

CPSF5に対するsiRNA、CPSF5-3の標的配列の塩基配列を示す。

〔配列番号:15〕

CPSF5に対するsiRNA、CPSF5-3のセンス鎖の塩基配列を示す。

〔配列番号:16〕

CPSF5に対するsiRNA、CPSF5-3のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

〔配列番号:17〕

CPSF5に対するsiRNA、CPSF5-4の標的配列の塩基配列を示す。

〔配列番号:18〕

CPSF5に対するsiRNA、CPSF5-4のセンス鎖の塩基配列を示す。

〔配列番号:19〕

CPSF5に対するsiRNA、CPSF5-4のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

〔配列番号:20〕

CPSF6に対するsiRNA、CPSF6-2の標的配列の塩基配列を示す。

〔配列番号:21〕

CPSF6に対するsiRNA、CPSF6-2のセンス鎖の塩基配列を示す。

〔配列番号:22〕

CPSF6に対するsiRNA、CPSF6-2のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

〔配列番号:23〕

CPSF6に対するsiRNA、CPSF6-3の標的配列の塩基配列を示す。

〔配列番号:24〕

CPSF6に対するsiRNA、CPSF6-3のセンス鎖の塩基配列を示す。

〔配列番号:25〕

CPSF6に対するsiRNA、CPSF6-3のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

〔配列番号:26〕

CPSF6に対するsiRNA、CPSF6-4の標的配列の塩基配列を示す。

〔配列番号:27〕

CPSF6に対するsiRNA、CPSF6-4のセンス鎖の塩基配列を示す。

〔配列番号:28〕

CPSF6に対するsiRNA、CPSF6-4のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

〔配列番号:29〕

CPSF5に対するセンスプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号:30〕

CPSF5に対するアンチセンスプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号:31〕

CPSF5に対するプローブの塩基配列を示す。

〔配列番号:32〕

CPSF6に対するセンスプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号:33〕

CPSF6に対するアンチセンスプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号:34〕

CPSF6に対するプローブの塩基配列を示す。

〔配列番号:35〕

β -アクチンに対するセンスプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号:36〕

β -アクチンに対するアンチセンスプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号:37]

β -アクチンに対するプローブの塩基配列を示す。

実施例

[0090] 以下において、実施例および参考例により本発明をより具体的にするが、この発明はこれらに限定されるものではない。

[0091] 実施例1

(1)ラット肝臓癌細胞株H4IIE-C3のクローン株H4IIE-C3-No.75, 76株の選択

ラット肝臓癌細胞株H4IIE-C3株(大日本製薬)から限界希釈法により分離したクローンとしてH4IIE-C3-No.75細胞およびH4IIE-C3-No.76細胞を取得した。これらのクローンについて、インスリン刺激による糖産生抑制作用の評価を以下のように行った。

H4IIE-C3-No.75細胞およびH4IIE-C3-No.76細胞を、1型コラーゲンコートされた24wellプレート(日本ベクトンディッキンソン社)に 5×10^5 cells/wellの濃度になるようにそれぞれ播種した。増殖培地(Dulbecco Modified Essential Medium F12(DMEM/F12)+10%(Fetal Bovine Serum (FBS))中で48時間H4IIE-C3-No.75細胞またはH4IIE-C3-No.76細胞を培養後、無血清培地(DMEM)に交換し、さらに24時間後インスリンを添加したグルコース産生バッファー(GPB: 20mM 乳酸ナトリウム、1mM ピルビン酸ナトリウム、および15mM HEPES (pH7.5)を含むフェノールレッド不含、グルコース不含DMEM)に交換して1時間インキュベートした。さらにデキサメタゾン(Dex) 500nMおよび8-(4-CHLOROPHENYLTHIO)-ADENOSINE 3':5'-CYCLIC MONOPHOSPHATE SODIUM SALT(8CPT)、(Calbiochem社) 100 μ Mを添加後、翌日培養上清を回収した。得られた培養上清中のグルコース濃度をAmplex red Glucose oxidase assayキット(Molecular Probes社)を用いて測定した。最終的にラット肝臓癌細胞株H4IIE-C3由来株として取得したインスリン抵抗性株H4IIE-C3-No.75のインスリンのDex/8CPT刺激糖産生抑制作用のED₅₀値は330nM、およびインスリン感受性株 H4IIE-C3-No.76のED₅₀値は60nMであった(図1)。

[0092] (2)RNA関連因子のsiRNAのライブラリー作成

C.elegansにおいて全ゲノムを対象としたsiRNAを用いたスクリーニングによりRNA干

渉効果に重要な役割を果たすと報告されている遺伝子90個 (Science 308巻, 1164頁, 2005年)の哺乳類ホモログ、既知のRISC関連因子、RNAヘリカーゼおよびRNA結合タンパクなどをRNA関連因子の候補として選択し、RNA関連因子として図2に示す。図2記載のラット型271遺伝子のsiRNAをAmbion社およびQiagen社から購入し、RNA関連因子ライブラリーとした。

[0093] (3) H4IIE-C3-No.75株を用いたスクリーニング系の設定

上記で得られたインスリン抵抗性株H4IIE-C3-No.75株に、上記RNA関連因子ライブラリーのsiRNA 271個をそれぞれエレクトロポレーション法により導入した。エレクトロポレーションにはNucleofector II (amaxes社)を用い、試薬はNucleofector T、プログラムはT-27 (amaxes社)を使用した。細胞数は 4×10^6 cells/キュベットとした。20 μ M siRNAを16 μ l/キュベット使用した。エレクトロポレーション後48時間増殖培地で培養後、無血清培地で24時間インキュベートした。さらにPhosphate Buffered Saline (PBS)で二回洗浄しGPBに交換した後、終濃度100nMインスリン刺激およびDex/8CPT刺激を24時間行った後、培養上清を回収し、Amplex red Glucose oxidase assayキット (Molecular Probes)を用いて糖濃度を測定した。無刺激の場合、Dex/8CPT刺激をしてインスリン無刺激の場合、Dex/8CPT刺激に加えインスリンで刺激した場合の各糖濃度を測定し、インスリン無刺激時よりもインスリン刺激時に強く糖産生を抑制させるsiRNAをスクリーニングし、CPSF5に対するsiRNA (CPSF5-1) およびCPSF6に対するsiRNA (CPSF6-1)を選択した。

a) CPSF5-1

標的配列: 5'-CCGTATATTCCTGCACATATA-3' (配列番号: 5)

センス鎖: 5'-r(GUAUAUCCUGCACAUAUA)dTdT-3' (配列番号: 6)

アンチセンス鎖: 5'-r(UAUAUGUGCAGGAAUAUAC)dGdG-3' (配列番号: 7)

b) CPSF6-1

標的配列: 5'-TAGATGTAGTGTGTAATAAA-3' (配列番号: 8)

センス鎖: 5'-r(GAUGUAGUGUUGUAAUAAA)dTdT-3' (配列番号: 9)

アンチセンス鎖: 5'-r(UUUAUUACAACACUACAUC)dTdT-3' (配列番号: 10)

[0094] (4) CPSF5に対するsiRNAおよびCPSF6に対するsiRNAの糖産生評価

CPSF5およびCPSF6に対して、それぞれ以下のような複数のsiRNAを用いてインスリン刺激時の糖産生の抑制に対する効果を調べた。その結果図3の上段に示すように、複数のsiRNA、具体的にはCPSF5-1、2、3、4およびCPSF6-1、2、3、4によってインスリン刺激時の糖産生を抑制させる効果が確認できた。

i) CPSF5に対するsiRNA

a) CPSF5-1

標的配列: 5'-CCGTATATTCCTGCACATATA-3' (配列番号: 5)

センス鎖: 5'-r(GUAUAUUCCUGCACAUUA)dTdT-3' (配列番号: 6)

アンチセンス鎖: 5'-r(UAUAUGUGCAGGAAUAUAC)dGdG-3' (配列番号: 7)

b) CPSF5-2

標的配列: 5'-CTGGTTCAGCTTCAAGAGAAA-3' (配列番号: 11)

センス鎖: 5'-r(GGUUCAGCUUCAAGAGAAA)dTdT-3' (配列番号: 12)

アンチセンス鎖: 5'-r(UUUCUCUUGAAGGUGAACC)dAdG-3' (配列番号: 13)

c) CPSF5-3

標的配列: 5'-CGGGAGGAATTTGATAAGATT-3' (配列番号: 14)

センス鎖: 5'-r(GGAGGAAUUUGAUAAGAUU)dTdT-3' (配列番号: 15)

アンチセンス鎖: 5'-r(AAUCUUAUCAAUUCUCC)dCdG-3' (配列番号: 16)

d) CPSF5-4

標的配列: 5'-CCAGGAGAAGATGAAGTTGAA-3' (配列番号: 17)

センス鎖: 5'-r(AGGAGAAGAUGAAGUUGAA)dTdT-3' (配列番号: 18)

アンチセンス鎖: 5'-r(UUCAACUUCAUCUUCUCCU)dGdG-3' (配列番号: 19)

ii) CPSF6に対するsiRNA

a) CPSF6-1

標的配列: 5'-TAGATGTAGTGTGTAATAAA-3' (配列番号: 8)

センス鎖: 5'-r(GAUGUAGUGUUGUAAUAAA)dTdT-3' (配列番号: 9)

アンチセンス鎖: 5'-r(UUUAUUACAACACUACAUC)dTdA-3' (配列番号: 10)

b) CPSF6-2

標的配列: 5'-CACGGTCAGAATCCTGTTGTA-3' (配列番号: 20)

センス鎖: 5'-r(CGGUCAGAAUCCUGUUGUA)dTdT-3' (配列番号: 21)

アンチセンス鎖: 5'-r(UACAACAGGAUUCUGACCG)dTdT-3' (配列番号: 22)

c) CPSF6-3

標的配列: 5'-ATCGGGCAAATGGACAATCAA-3' (配列番号: 23)

センス鎖: 5'-r(CGGGCAAUUGGACAAUCAA)dTdT-3' (配列番号: 24)

アンチセンス鎖: 5'-r(UUGAUUGUCCAUUUGCCCG)dAdT-3' (配列番号: 25)

d) CPSF6-4

標的配列: 5'-AACGTGCAATATGCAAATAAT-3' (配列番号: 26)

センス鎖: 5'-r(CGUGCAAUAUGCAAUAAU)dTdT-3' (配列番号: 27)

アンチセンス鎖: 5'-r(AUUAUUUGCAUAUUGCACG)dTdT-3' (配列番号: 28)

[0095] (5) CPSF5およびCPSF6のmRNAノックダウンのTaqman解析

上記のsiRNAを(3)の方法に従い導入した細胞H4IIE-C3-No.75株から抽出したRNA中のCPSF5、CPSF6および β -アクチンのmRNA量をTaqmanPCR法により測定した。TaqmanPCR法は、以下のプライマーおよびプローブを用い、ABI社の定法に従った。結果は図3の下段に示すものであった。

i) CPSF5に対する

センスプライマー: 5'-ACCGTTGTTTGAAGTGTACGACA-3' (配列番号: 29)

アンチセンスプライマー: 5'-CCTGCTCAGCAGCTGAGGA-3' (配列番号: 30)

プローブ: 5'-FAM-TCCGGGATACGGACCCATCATTCTAGT-TAMURA-3' (配列番号: 31)

ii) CPSF6に対する

センスプライマー: 5'-AGCTTGTGATTTTGCTGAATGG-3' (配列番号: 32)

アンチセンスプライマー: 5'-TTTTTTGACCCCTAACACATTGAA-3' (配列番号: 33)

プローブ: 5'-FAM-ATGTAAACGTGTAAAACTGAAATCTGACAGAGCAATC-TAMURA-3' (配列番号: 34)

iii) β -アクチンに対する

センスプライマー: 5'-TCCTGGCCTCACTGTCCAC-3' (配列番号: 35)

アンチセンスプライマー: 5'-GGGCCGGACTCATCGTACT-3' (配列番号:36)

プローブ: 5'-FAM-TTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCA-TAMURA-3' (配列番号:37)

- [0096] CPSF5およびCPSF6はsiRNAを導入することにより、Dex/8CPT刺激による糖産生に大きく影響せず、Dex/8CPT刺激およびインスリン刺激を行った時に糖産生の抑制を増強する、すなわちインスリン抵抗性を回復させる作用が認められた。

このインスリン抵抗性を回復させる作用は、それぞれのsiRNAを用いて実験した時の標的となる遺伝子のノックダウン効率と相関していた。例えば、siRNA、CPSF6-4は糖産生抑制効果が少ないが、それはsiRNAによるCPSF6遺伝子のノックダウン効果が少ないことに起因すると考えられる。同じ遺伝子に対する複数のsiRNAが同様の作用を示したことから、この作用がsiRNAのオフターゲット効果によるものではないこと、すなわち、この効果がCPSF5およびCPSF6遺伝子のノックダウン効果によるものであることが示された(図3)。これより、CPSF5およびCPSF6の発現または機能を阻害することにより、インスリン抵抗性の改善、糖尿病の予防・治療が可能であることが示された。

産業上の利用可能性

- [0097] CPSF5の発現もしくは活性を阻害する物質およびCPSF6の発現もしくは活性を阻害する物質は、インスリン刺激した時の糖新生を抑制する一方、Dex/8CPT刺激による糖産生には影響しない。このことは、該物質は、乳酸アシドーシス等の毒性を発現することなく、インスリン抵抗性を改善し得ることを示している。従って、該物質は、安全かつ有効な抗糖尿病薬などとして有用である。

- [0098] mRNA前駆体の3'末端におけるプロセッシング部位が一つの遺伝子で複数存在する例が多数知られているが(Genome Biol. 6,R100 (2005))、CPSF5に対するsiRNAを用いてCPSF5遺伝子をノックダウンすると、3'-UTRに複数の切断部位を有する遺伝子のmRNAではその切断位置が5'側にシフトし、結果として3'-UTRの短いmRNAができることが報告されている(Nucleic Acids Res. 34,6264 (2006))。3'-UTRに切断部位が一箇所しかない遺伝子の場合には、CPSF5をノックダウンしても3'-UTRの長さは変わらないので、CPSF5は、ある特定の遺伝子について、mRNA前駆体の3'-UTRの長さ決定に寄与すると言える。

一方、microRNA (21-23塩基対からなるnon-coding RNA)は遺伝子のmRNAの3'-UTRに存在する特定の配列を認識することにより、その遺伝子の翻訳を抑制することが知られている。microRNAによる制御を受けている遺伝子に関してmRNAの3'-UTRの長さが短くなることによりその認識配列が失われてしまうと、その遺伝子のmicroRNAによる翻訳抑制を受けなくなるため、そのタンパク質の発現量は増加する可能性がある。

これらのことから、CPSF5の発現または活性を阻害する物質は、あるインスリン感受性増強作用を示す遺伝子の3'-UTRの長さを短くすることにより、糖尿病の病態において、ある種のmicroRNAによる特定の遺伝子の翻訳抑制を解除し、結果として特定のタンパク質を増大させることによってインスリン感受性を増強し、抗糖尿病作用を発揮している可能性がある。CPSF6についても同じCFI_m複合体の構成成分であるため同様の可能性が示唆される。

このように、CPSF5およびCPSF6は、一般にmRNA前駆体の3'末端におけるプロセシングを担ってはいるが、その発現または活性阻害による影響は、特定の遺伝子発現に限局されることから、CPSF5もしくはCPSF6の発現または活性を阻害する物質は低毒性であり、インスリン感受性増強作用を示す特定の遺伝子の発現増強に選択的に作用し得ると考えられる。

[0099] 本発明を好ましい態様を強調して説明してきたが、好ましい態様が変更され得ることは当業者にとって自明であろう。本発明は、本発明が本明細書に詳細に記載された以外の方法で実施され得ることを意図する。したがって、本発明は添付の「請求の範囲」の精神および範囲に包含されるすべての変更を含むものである。

本出願は、日本で出願された特願2007-039947(出願日：平成19年2月20日)を基礎としており、そこに開示される内容は本明細書にすべて包含されるものである。また、ここで述べられた特許および特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載された内容は、ここに引用されたことによって、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

請求の範囲

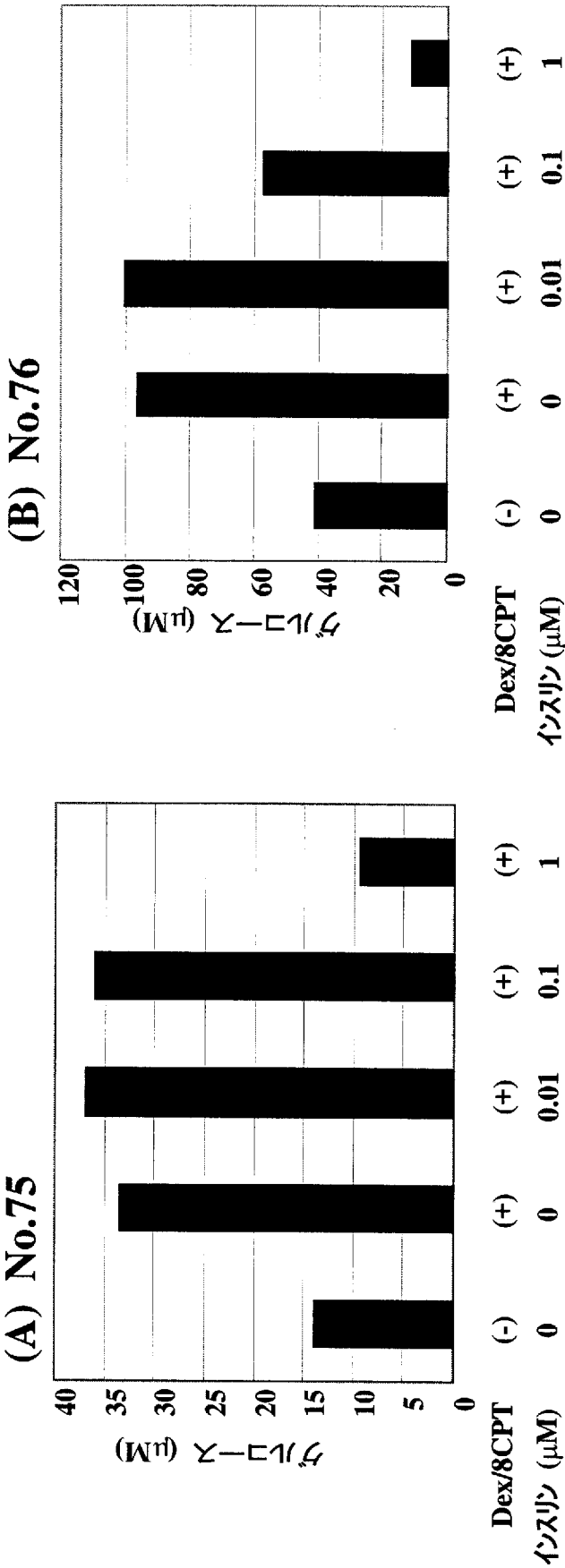
- [1] 配列番号:2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現もしくは活性を阻害する物質、および／または配列番号:4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現もしくは活性を阻害する物質を含有してなるインスリン抵抗性改善剤。
- [2] 配列番号:2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現を阻害する物質、および／または配列番号:4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現を阻害する物質が、以下の(a)～(c)のいずれかである、請求項1記載の剤。
- (a) 各タンパク質をコードする核酸に対するアンチセンス核酸
 - (b) 各タンパク質をコードするRNAに対するsiRNA
 - (c) 各タンパク質をコードするRNAに対するsiRNAを生成し得る核酸
- [3] 糖新生阻害作用を有するものである、請求項1記載の剤。
- [4] 糖代謝異常が関与する疾患の予防・治療剤である、請求項1記載の剤。
- [5] 配列番号:2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現もしくは活性を阻害する物質、および／または配列番号:4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現もしくは活性を阻害する物質の有効量を動物に投与することによる、該動物におけるインスリン抵抗性の改善方法。
- [6] インスリン抵抗性改善剤の製造のための、配列番号:2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現を阻害する物質、および／または配列番号:4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現を阻害する物質の使用。
- [7] インスリン抵抗性改善物質のスクリーニング方法であって、以下の(a)および／または(b):
- (a) 配列番号:2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質またはその部分ペプチド
 - (b) 配列番号:4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列

を含むタンパク質またはその部分ペプチド

を産生する細胞を試験化合物に接触させ、前記(a)のタンパク質またはその部分ペプチドおよび／または前記(b)のタンパク質またはその部分ペプチドの発現量あるいは活性を測定することを含む方法。

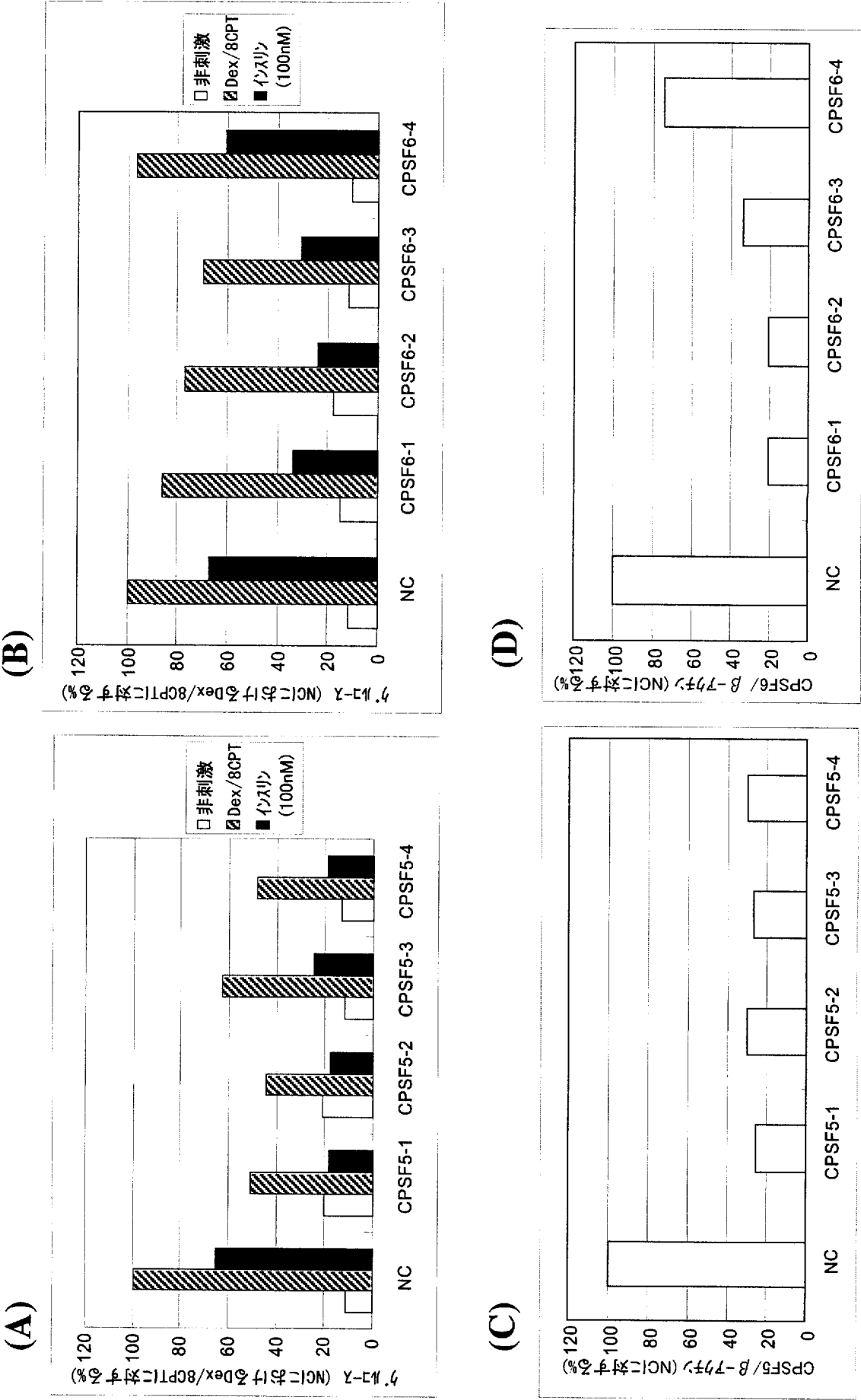
- [8] インスリン抵抗性改善物質が糖新生阻害作用を有するものである、請求項7記載の方法。
- [9] インスリン抵抗性改善物質が糖代謝異常が関与する疾患を予防・治療し得るものである、請求項7記載の方法。

[図1]



1	1384D82	31	DAZAP1	61	DXH35	91	ERAL1	121	ILF3	151	NCOA6IP	181	RAE1	211	RPL28	241	SFRS12
2	ABCB9	32	DDX1	62	DXH36	92	EWSR1	122	IMP2	152	NOL3	182	RALY	212	RPL29	242	SFRS3
3	ACO1	33	DDX10	63	DXH37	93	EXOSC7	123	IMP3	153	NOL4	183	RANBP2	213	RPL3	243	SIN3A
4	ACO2	34	DDX17	64	DXH38	94	EXOSC9	124	IREB2	154	NOL5A	184	RBBP4	214	RPL34	244	SKP1A
5	ADARB1	35	DDX21	65	DXH40	95	FBL	125	KHDRBS1	155	NOL6	185	RBM14	215	RPL35A	245	SNRP70
6	AKAP1	36	DDX21B	66	DXH57	96	FMRI	126	KHDRBS3	156	NOVA1	186	RBM3	216	RPL3L	246	SNRPB2
7	AKT1	37	DDX23	67	DXH8	97	FMR2	127	KHSRP	157	NOVA2	187	RBM5	217	RPL4	247	SNRPG
8	APOBEC1	38	DDX24	68	DXH9	98	FUSIP1	128	KPNA4	158	NPM1	188	RBM6	218	RPL5	248	SPATA7
9	APOBEC2	39	DDX25	69	DXCER1	99	FXR1	129	LRPPRC	159	NSEP1	189	RBM9	219	RPL6	249	SRP14
10	ATP6V1C1	40	DDX27	70	DKC1	100	FXR2	130	LSM5	160	NUP54	190	RBMS1	220	RPL7	250	SRP68
11	BCCIP	41	DDX28	71	DKFZP564C186	101	G3BP2	131	MAP2K4	161	NXF1	191	RBMS2	221	RPL9	251	SUPV3L1
12	BMS1L	42	DDX2B	72	DKFZP586J0619	102	GRSF1	132	MAP3K4	162	PABPN1	192	RBMX	222	RPLP1	252	SURF6
13	BRD4	43	DDX31	73	DRB1	103	HAS3	133	MBD5	163	PAIP1	193	ROC1	223	RPLP2	253	SYNCRIP
14	C19ORF2	44	DDX3X	74	DROSHA	104	HDAC1	134	MDC1	164	PAPOLA	194	RCL1	224	RPN1	254	TARBP2
15	C21ORF66	45	DDX4	75	DSCLR1L2	105	HNRPA0	135	MFAP1	165	PCBP3	195	RDBP	225	RPP14	255	TCEB3
16	C6ORF93	46	DDX41	76	DUSP11	106	HNRPA1	136	MGC16733	166	PCBP4	196	RENT1	226	RPS10	256	TCERG1
17	CDC40	47	DDX42	77	EED	107	HNRPA2B1	137	MK167IP	167	PHF22	197	RNASE1	227	RPS12	257	TCF7L2
18	CENPE	48	DDX46	78	EIF2AK4	108	HNRPA3	138	MLL3	168	PIPPIN	198	RNASEH1	228	RPS17	258	TD44
19	CIRBP	49	DDX49	79	EIF2B3	109	HNRPAB	139	MLLT10	169	POLR3D	199	RNASEL	229	RPS19	259	TEP1
20	Clock	50	DDX5	80	EIF2C1	110	HNRPC	140	MOV10L1	170	POLR3E	200	ROD1	230	RPS2	260	TIAL1
21	COL3A1	51	DDX52	81	EIF2C2	111	HNRPD	141	MRVL12	171	POP4	201	RPL12	231	RPS27	261	TNPO1
22	CPSF2	52	DDX55	82	EIF2C3	112	HNRPH3	142	MRPL23	172	PPARGC1A	202	RPL13	232	RPS3	262	TOP2A
23	CPSF5	53	DDX56	83	EIF2C4	113	HNRL	143	MRPL24	173	PPARGC1B	203	RPL14	233	RPS5	263	TRIM2
24	CPSF6	54	DDX58	84	EIF2S1	114	HNRPV	144	MRPL3	174	PPIE	204	RPL17	234	RPS9	264	UBCE2I
25	CSE1L	55	DDX6	85	EIF2S2	115	HNRPUL1	145	MSI1	175	PPP1R8	205	RPL18	235	RTCD1	265	UHMK1
26	CSNK2B	56	DXH15	86	EIF4B	116	HRB	146	MYH13	176	PPP2R1A	206	RPL18A	236	RUVBL1	266	USP24
27	GSTF1	57	DXH16	87	EIF4E	117	HSA9761	147	NAP1L1	177	PSMA1	207	RPL19	237	RUVBL2	267	WBSOR1
28	GSTF2T	58	DXH29	88	EIF4G1	118	HSPA1A	148	NCBP1	178	PSMA6	208	RPL21</				

[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/052767

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K45/00(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P3/00(2006.01)i, A61P3/04(2006.01)i, A61P3/06(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P9/04(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i,
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)

A61K45/00, A61K31/7105, A61K48/00, A61P1/16, A61P3/00, A61P3/04, A61P3/06, A61P3/10, A61P9/04, A61P9/10, A61P9/12, A61P13/12, A61P25/00, A61P27/02, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2008
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOBAYASHI, T. et al, Changes in aortic endothelial gene expressions and relaxation responses following chronic short-term insulin treatment in diabetic rats, Atherosclerosis, 2006, Vol.185, No.1, p.47-57	1-4, 6-9
A	US 2007/0031841 A1 (LIEW, Choong-Chin), 08 February, 2007 (08.02.07), & US 2004/0014059 A1 & US 2004/0248170 A1 & US 2006/0134635 A1 & US 2005/0191637 A1 & US 2005/0196762 A1 & US 2005/0196763 A1 & US 2005/0196764 A1 & US 2005/0208505 A1	1-4, 6-9
A	WO 2006/014755 A2 (WYETH), 09 February, 2006 (09.02.06), & WO 2006/014755 A3 & US 2006/0073496 A1 & EP 1784509 A2	1-4, 6-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21 March, 2008 (21.03.08)

Date of mailing of the international search report
01 April, 2008 (01.04.08)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/052767

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/076939 A2 (UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH FOUNDATION), 25 August, 2005 (25.08.05), & WO 2005/076939 A3 & US 2007/0082350 A1	1-4, 6-9
A	WO 2005/118865 A2 (ST. JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL), 15 December, 2005 (15.12.05), & WO 2005/118865 A3	1-4, 6-9
A	WO 2006/082390 A1 (THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY OF GLASGOW), 10 August, 2006 (10.08.06), & EP 1846573 A1	1-4, 6-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/052767

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(International Patent Classification (IPC))

A61P9/12(2006.01)i, A61P13/12(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i,
A61P27/02(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i,
G01N33/50(2006.01)i

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/052767

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 5
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 5 pertains to methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

The inventions of claims 7-9 relate to a method for the screening of a substance capable of ameliorating insulin resistance. However, the mere relationship between a screening method and a product produced by the screening method is not sufficient to comply with the requirement of unity of invention ("PCT INTERNATIONAL SEARCH AND PRELIMINARY EXAMINATION GUIDELINES PCT/GL/ISPE/1" (as in force from March 25, 2004), Chapter 10, Unity of Invention, Paragraph 10.58, Case 38 (see <http://www.wipo.int/pct/en/texts/pdf/ispe.pdf>)). Therefore, there is no common matter that can be regarded as a special technical feature in the meaning within PCT Rule 13.2, second sentence, among these
(continued to extra sheet)

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

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/052767

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

inventions, and there is found no technical relationship in the meaning within PCT Rule 13 among these different inventions.

Consequently, there is no technical relationship involving one or more of the same or corresponding technical features among these inventions, and it cannot be considered that these inventions are so related as to form single general inventive concept.

<Subject of search>

Claims 1 and 6 relate to an ameliorating agent for insulin resistance, which comprises a compound defined by a desired property "a substance capable of inhibiting the expression or activity of a protein comprising a specific amino acid sequence" as an active ingredient. Claims 1 and 6 include all of the compound having the property. However, among these compounds, those which are supported by the description in the meaning within PCT Article 6 and disclosed in the meaning within PCT Article 5 are limited to an extremely small part of the compounds as claimed.

Even though the common technical knowledge at the time of filing the present application is taken into the consideration, it is impossible to specify the scope of the compound having the property. Thus, claims 1 and 6 do not comply with the requirement of clearness under PCT Article 6, too.

Such being the case, the search was made on the relationship between CPSF5 and CPSF6 and insulin resistance. With regard to claims 2-4 and 7-9, the search was made completely.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. 特別ページ参照

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K45/00, A61K31/7105, A61K48/00, A61P1/16, A61P3/00, A61P3/04, A61P3/06, A61P3/10, A61P9/04, A61P9/10, A61P9/12, A61P13/12, A61P25/00, A61P27/02, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 8 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 8 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 8 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (STN), C Aplus (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	KOBAYASHI, T. et al, Changes in aortic endothelial gene expressions and relaxation responses following chronic short-term insulin treatment in diabetic rats, Atherosclerosis, 2006, Vol.185, No.1, p.47-57	1-4, 6-9
A	US 2007/0031841 A1 (LIEW, Choong-Chin) 2007.02.08 & US 2004/0014059 A1 & US 2004/0248170 A1 & US 2006/0134635 A1 & US 2005/0191637 A1 & US 2005/0196762 A1 & US 2005/0196763 A1 & US 2005/0196764 A1 & US 2005/0208505 A1	1-4, 6-9

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 1 . 0 3 . 2 0 0 8

国際調査報告の発送日

0 1 . 0 4 . 2 0 0 8

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

松浦 安紀子

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

4 C

3 3 3 6

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 2006/014755 A2 (WYETH) 2006.02.09 & WO 2006/014755 A3 & US 2006/0073496 A1 & EP 1784509 A2	1-4, 6-9
A	WO 2005/076939 A2 (UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH FOUNDATION) 2005.08.25 & WO 2005/076939 A3 & US 2007/0082350 A1	1-4, 6-9
A	WO 2005/118865 A2 (ST. JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL) 2005.12.15 & WO 2005/118865 A3	1-4, 6-9
A	WO 2006/082390 A1 (THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY OF GLASGOW) 2006.08.10 & EP 1846573 A1	1-4, 6-9

発明の属する分野の分類

A61K45/00(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P3/00(2006.01)i, A61P3/04(2006.01)i, A61P3/06(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P9/04(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P9/12(2006.01)i, A61P13/12(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P27/02(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

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

1. ☒ 請求の範囲 5 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 5 は治療による人体の処置方法に関するものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

請求の範囲7-9に係る発明は、インスリン抵抗性改善物質のスクリーニング方法の発明であるが、スクリーニング方法であることとスクリーニングによって得られたものであるという関係だけでは発明の単一性を満たすのに十分ではない（「PCT国際調査及び予備審査のためのガイドライン PCT/GL/ISPE/1」2004年3月25日施行、第10章単一性10.58事例38(<http://www.wipo.int/pct/en/texts/pdf/ispe.pdf> 参照)）から、これらの発明には、PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる共通の事項が存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則13の意味における技術的な関連を見いだすことはできない。

よって、これらの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係がないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

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

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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

＜調査の対象について＞

請求の範囲 1、6 は、特定のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現もしくは活性を阻害する物質という所望の性質により定義された化合物を有効成分とするインスリン抵抗性改善剤に関するものである。そして、請求の範囲 1、6 は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、P C T 6 条の意味において明細書に裏付けられ、また、P C T 5 条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分にすぎないものと認められる。

また、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲 1、6 は、P C T 6 条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は、C P S F 5 及び C P S F 6 とインスリン抵抗性との関係について行った。また、請求の範囲 2－4、7－9 については、完全な調査を行った。