

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第6524351号
(P6524351)

(45) 発行日 令和1年6月5日 (2019. 6. 5)

(24) 登録日 令和1年5月10日 (2019. 5. 10)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 33/15 (2006. 01)	GO 1 N 33/15 Z
GO 1 N 33/50 (2006. 01)	GO 1 N 33/50 Z
C 1 2 N 15/113 (2010. 01)	C 1 2 N 15/113 Z N A Z
A 6 1 K 31/7088 (2006. 01)	A 6 1 K 31/7088

請求項の数 2 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-523725 (P2018-523725)	(73) 特許権者 314000442
(86) (22) 出願日 平成28年7月26日 (2016. 7. 26)	高麗大学校産学協力団
(65) 公表番号 特表2018-522947 (P2018-522947A)	KOREA UNIVERSITY RE
(43) 公表日 平成30年8月16日 (2018. 8. 16)	SEARCH AND BUSINESS
(86) 国際出願番号 PCT/KR2016/008131	FOUNDATION
(87) 国際公開番号 W02017/023001	大韓民国 O 2 8 4 1 ソウル ソンブク
(87) 国際公開日 平成29年2月9日 (2017. 2. 9)	ク アナムロ 1 4 5
審査請求日 平成30年1月24日 (2018. 1. 24)	1 4 5, Anam-ro Seongb
(31) 優先権主張番号 10-2015-0108944	uk-gu Seoul O 2 8 4 1,
(32) 優先日 平成27年7月31日 (2015. 7. 31)	Republic of Korea
(33) 優先権主張国 韓国 (KR)	(74) 代理人 100108453
	弁理士 村山 靖彦
	(74) 代理人 100110364
	弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非アルコール性脂肪肝調節因子 1 4 - 3 - 3 タンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 4 - 3 - 3 β タンパク質を P P A R γ ₂ タンパク質と共に候補物質と人体外で接触させ、前記候補物質による P P A R γ ₂ タンパク質に対する 1 4 - 3 - 3 β タンパク質の結合変化を測定することを含む、非アルコール性脂肪肝の予防または治療用医薬のスクリーニング方法であって、前記候補物質が 1 4 - 3 - 3 β タンパク質の P P A R γ ₂ タンパク質との結合を下向き調節するとき、非アルコール性脂肪肝の予防または治療効果を有する医薬であると判別する、方法。

【請求項 2】

前記候補物質による P P A R γ ₂ タンパク質に対する 1 4 - 3 - 3 β タンパク質の結合変化の測定が、P P A R γ ₂ の S e r 2 7 3 残基に対する 1 4 - 3 - 3 β タンパク質の結合変化を測定することによって行われる、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、非アルコール性脂肪肝調節因子 1 4 - 3 - 3 タンパク質に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

非アルコール性脂肪肝 (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease : N A F L D) は、代表的な肝臓疾患であって、肝の炎症と損傷を誘発する。

非アルコール性脂肪肝が悪化すると、非アルコール性脂肪肝炎（Non-Alcoholic Steatohepatitis：NAS）に発展し、その症状としては、硬変症と線維症が現れる。最近の報告によると、脂肪肝患者の肝でペルオキシソーム増殖剤活性化レセプター（peroxisome proliferator activated receptor；PPAR） γ_2 という転写因子が過発現および活性化していると知られていた。また、PPAR γ_2 の活性化によって肝の脂質代謝に関与する多様なターゲットタンパク質の発現が誘導される。このような転写因子の活性に関与する14-3-3というタンパク質は、7種類のイソ型タンパク質（ α/β 、 ϵ 、 η 、 γ 、 τ/θ 、 δ/ζ 、および σ ）として存在する。14-3-3のタンパク質は、転写因子のリン酸化の部分に結合して転写者の活性を調節すると知られており、代謝関連転写因子の調節にも関与する。よって、本発明者らは、脂肪肝の発病および調節において14-3-3タンパク質の役割を調査した結果、14-3-3 β と14-3-3 γ は、PPAR γ_2 の調節因子であって、脂肪代謝過程で重要な役割をするタンパク質であり、非アルコール性脂肪肝の治療のための標的として用いられることを糾明し、本発明を完成した。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】米国特許第4, 816, 576号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0004】

本発明の目的は、非アルコール性脂肪肝の予防または治療用医薬の開発のための14-3-3 β および14-3-3 γ の用途を提供することにある。

しかし、本発明が達成しようとする技術的課題は、以上で言及した課題に限定されず、言及されない他の課題は、下記の記載から当業者に明確に理解され得る。

【課題を解決するための手段】

【0005】

前記目的を達成するために、本発明は、14-3-3 β 遺伝子に対する阻害剤を含み、前記阻害剤は、14-3-3 β 遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA、miRNA、またはこれらを含むベクターである非アルコール性脂肪肝の予防または治療用医薬組成物を提供する。

30

【0006】

また、本発明は、14-3-3 γ 遺伝子または14-3-3 γ タンパク質を含む非アルコール性脂肪肝の予防または治療用医薬組成物を提供する。

【0007】

また、本発明は、脂肪肝が疑われる患者の試料から14-3-3 β および／または14-3-3 γ 遺伝子のmRNAまたはそのタンパク質の水準を測定するためのプローブを含む非アルコール性脂肪肝診断用組成物を提供する。

【0008】

また、本発明は、14-3-3 β または14-3-3 γ 遺伝子またはタンパク質を含む細胞を候補物質と人体外で接触させ、前記候補物質による前記遺伝子またはタンパク質の発現量の変化を測定することを含む非アルコール性脂肪肝の予防または治療用医薬のスクリーニング方法を提供する。

40

【0009】

また、本発明は、14-3-3 β タンパク質および／または14-3-3 γ タンパク質をPPAR γ_2 タンパク質と共に候補物質と接触させ、前記候補物質によるPPAR γ_2 に対する14-3-3 β タンパク質および／または14-3-3 γ タンパク質の結合変化を測定することを含む非アルコール性脂肪肝の予防または治療用医薬のスクリーニング方法を提供する。

【発明の効果】

50

【0010】

本発明によると、14-3-3の二つのイソ型タンパク質である14-3-3 β と14-3-3 γ が、それぞれ異なる調節因子であり、PPAR γ_2 の転写活性を調節する。14-3-3 β は、PPAR γ_2 と結合してPPAR γ_2 の転写活性を増加させるのに対し、14-3-3 γ は、PPAR γ_2 の転写活性を減少させる役割をする。したがって、14-3-3 β と14-3-3 γ は、PPAR γ_2 の調節因子であって、脂肪代謝過程で重要な役割をするタンパク質であり、非アルコール性脂肪肝の予防または治療のための標的として用いられる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

10

【図1a】図1Aは、14-3-3イソ型タンパク質の過発現によるPPAR γ_2 の転写活性を確認した結果である。

【図1b】図1Bは、14-3-3 β の発現量の変化によるPPAR γ_2 の転写活性を確認した結果である。

【図1c】図1Cは、14-3-3 γ の発現量の変化によるPPAR γ_2 の転写活性を確認した結果である。

【図1d】図1Dは、14-3-3 β の発現抑制によるPPAR γ_2 の転写活性を確認した結果である。

【図1e】図1Eは、14-3-3 γ の発現抑制によるPPAR γ_2 の転写活性を確認した結果である。

20

【図2】図2は、PPAR γ_2 リガンドであるピオグリタゾン処理によるPPAR γ_2 との結合力を確認した図であり、図2のAは、PPAR γ_2 と14-3-3 β との間の結合力を確認した結果であり、図2のBは、PPAR γ_2 と14-3-3 γ との間の結合力を確認した結果である。

【図3a】図3Aは、PPAR γ_2 のドメイン位置および欠失突然変異を確認した結果である。

【図3b】図3Bは、GST-プルダウンアッセイを利用してPPAR γ_2 の欠失突然変異と14-3-3 β との間の結合を確認した結果である。

【図3c】図3Cは、GST-プルダウンアッセイを利用してPPAR γ_2 の欠失突然変異と14-3-3 γ との間の結合を確認した結果である。

30

【図4a】図4Aは、PPAR γ_2 のS112AおよびS273A突然変異と14-3-3 β との間の結合を確認した結果である。

【図4b】図4Bは、PPAR γ_2 のS112AおよびS273A突然変異と14-3-3 γ との間の結合を確認した結果である。

【図4c】図4Cは、PPAR γ_2 のS273A突然変異と14-3-3 β との間の結合によるPPAR γ_2 の転写活性を確認した結果である。

【図4d】図4Dは、PPAR γ_2 のS273A突然変異と14-3-3 γ との間の結合によるPPAR γ_2 の転写活性を確認した結果である。

【図5】図5は、14-3-3 γ または14-3-3 β の過発現によるPPAR γ_2 との結合を確認した図であり、図5のAは、14-3-3 γ の過発現による14-3-3 β とPPAR γ_2 との間の結合を確認した結果であり、図5のBは、14-3-3 β の過発現による14-3-3 γ とPPAR γ_2 との間の結合を確認した結果である。

40

【図6a】図6Aは、オレイン酸の処理によるHepG2細胞におけるPPAR γ_2 、14-3-3 β 、および14-3-3 γ の発現を確認した結果である。

【図6b】図6Bは、オレイン酸の処理によるマウス初代肝細胞(primary mouse hepatocytes)におけるPPAR γ_2 、14-3-3 β 、および14-3-3 γ の発現を確認した結果である。

【図6c】図6Cは、オレイン酸の処理によるHepG2細胞におけるターゲット遺伝子の発現を確認した結果である。

【図6d】図6Dは、オレイン酸の処理によるマウス初代肝細胞におけるターゲット遺伝

50

子の発現を確認した結果である。

【図7a】図7Aは、HepG2細胞で、14-3-3βと14-3-3γの発現によるターゲット遺伝子の発現を確認した結果である。

【図7b】図7Bは、マウス初代肝細胞で、14-3-3βと14-3-3γの発現によるターゲット遺伝子の発現を確認した結果である。

【図7c】図7Cは、クロマチン免疫沈降法（ChIP assay）を利用して14-3-3βと14-3-3γ発現によるFAT/CD36プロモーターとの結合を確認した結果である。

【図7d】図7Dは、14-3-3βと14-3-3γの発現による14-3-3βと14-3-3γの発現によるSRBP-1cタンパク質の発現を確認した結果である。

10

【図8】図8は、オレイン酸の処理によるPPAR γ_2 との結合および14-3-3βと14-3-3γの過発現によるPPAR-RXR複合体の形成有無を確認した図であり、図8のAは、オレイン酸の処理によるPPAR γ_2 と14-3-3βとの間の結合を確認した結果；図8のBは、オレイン酸の処理によるPPAR γ_2 と14-3-3γとの間の結合を確認した結果であり、図8のCは、14-3-3βと14-3-3γの過発現によるPPAR-RXR複合体の形成有無を確認した結果である。

【図9】図9は、マウス初代肝細胞とHepG2細胞で、オレイン酸の処理、14-3-3βと14-3-3γの過発現または発現抑制による脂肪蓄積の変化を確認した図であり、図9のAは、オレイン酸の処理による脂肪蓄積の変化を確認した結果であり、図9のBは、14-3-3βと14-3-3γの過発現による脂肪蓄積の変化を確認した結果であり、図9のCは、14-3-3βと14-3-3γの発現抑制による脂肪蓄積の変化を確認した結果である。

20

【図10】図10は、マウス初代肝細胞とHepG2細胞で、14-3-3βと14-3-3γの過発現または発現抑制によるトリグリセリド蓄積の変化を確認した図であり、図10のAは、14-3-3βと14-3-3γの過発現によるトリグリセリド蓄積の変化を確認した結果であり、図10のBは、14-3-3βと14-3-3γの発現抑制によるトリグリセリド蓄積の変化を確認した結果である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

以下、本発明の構成を具体的に説明する。

30

【0013】

本発明者らは、14-3-3の二つのイソ型タンパク質である14-3-3βと14-3-3γが、それぞれ異なる調節因子であって、PPAR γ_2 の転写活性を調節することを発見した。14-3-3βは、PPAR γ_2 と結合してPPAR γ_2 の転写活性を増加させるのに対し、14-3-3γは、PPAR γ_2 の転写活性を減少させる役割をした。PPAR γ_2 がNAFLDで重要な役割をするので、14-3-3βと14-3-3γが脂肪蓄積に及ぼす影響を与えるのかを調査するために、14-3-3βと14-3-3γを肝細胞に過発現させた。その結果、14-3-3βが過発現した場合は、脂肪代謝に参与するPPAR γ_2 の標的遺伝子の発現が増加し、脂肪蓄積を強化させたが、14-3-3γが過発現した場合は、PPAR γ_2 の標的遺伝子の発現と脂肪蓄積が抑制された。すなわち、14-3-3βと14-3-3γは、PPAR γ_2 の調節因子であって、脂肪代謝過程で重要な役割をするタンパク質であり、NAFLD治療のための標的タンパク質として用いられることを糾明した。

40

【0014】

よって、本発明者らは、脂肪肝の予防または治療用医薬組成物の製造のための14-3-3βと14-3-3γの用途を提供する。

【0015】

より具体的に、本発明は、14-3-3β遺伝子に対する阻害剤を含む脂肪肝の予防または治療用医薬組成物、脂肪肝の予防または治療用医薬の製造のための前記阻害剤の用途、前記阻害剤を対象体に投与することを含む脂肪肝の予防または治療方法を提供する。

50

【0016】

本発明において、脂肪代謝に関与するPPAR γ ₂の転写活性を調節するターゲットとして用いられる14-3-3 β は、14-3-3 β 遺伝子を意味したり、14-3-3 β タンパク質を意味するものと解釈される。したがって、14-3-3 β に対する阻害剤は、14-3-3 β 遺伝子および14-3-3 β タンパク質に対する阻害剤を全部含むものと解釈される。

【0017】

前記14-3-3 β タンパク質、前記14-3-3 β 遺伝子などには、これらと実質的に同じ活性を有するこれらの変異体または断片が含まれるものと解釈される。

【0018】

一具体例において、14-3-3 β 遺伝子に対する阻害剤は、前記遺伝子の発現を阻害して、14-3-3 β タンパク質の発現阻害によるPPAR γ ₂との結合を遮断する阻害剤であってもよい。14-3-3 β 遺伝子は、これをコードするDNAまたはこれから転写されるmRNAであってもよい。したがって、前記遺伝子に対する阻害剤は、遺伝子自体に結合して転写を妨害したり、遺伝子から転写されたmRNAに結合してmRNAの解読を妨害する阻害剤であってもよい。

【0019】

一具体例において、14-3-3 β 遺伝子に対する阻害剤は、14-3-3 β 遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA、miRNA、またはこれらを含むベクターであってもよい。このようなアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA、miRNAまたはこれらを含むベクターは、当業界に公知になった方法を利用して製作し得る。本発明において、前記「ベクター」は、ポリペプチドを暗号化するゲノム内に挿入された外部DNAを含む遺伝子作製物をいう。本発明に関連したベクターは、前記遺伝子を阻害する核酸配列がゲノム内に挿入されたベクターであって、これらのベクターは、DNAベクター、プラスミドベクター、コスミドベクター、バクテリオファージベクター、酵母ベクター、またはウイルスベクターが例示できる。

【0020】

一具体例において、14-3-3 β タンパク質に対する阻害剤は、14-3-3 β タンパク質と結合して14-3-3 β タンパク質とPPAR γ ₂との結合を遮断する阻害剤であってもよい。例えば、このような阻害剤は、14-3-3 β タンパク質と結合するペプチドまたは化合物などであってもよい。このような阻害剤は、タンパク質の構造分析などの下記に例示されたスクリーニング方法を用いて選定され得、当業界に公知になった方法を利用して設計され得る。一具体例において、前記阻害剤は、14-3-3 β タンパク質に対するポリクロナール抗体またはモノクロナール抗体であってもよい。このようなポリクロナール抗体またはモノクロナール抗体は、当業界に公知になった抗体の製作方法を利用して製作し得る。

【0021】

14-3-3 γ が過発現すると、PPAR γ ₂の標的遺伝子の発現と脂肪蓄積が抑制されるので、14-3-3 γ 遺伝子または14-3-3 γ タンパク質は、それ自体でも非アルコール性脂肪肝の予防または治療用医薬組成物の有効成分として使用し得る。

【0022】

したがって、本発明は、14-3-3 γ 遺伝子を含む非アルコール性脂肪肝の予防または治療用医薬組成物を提供する。

【0023】

医薬組成物の有効成分として含まれる遺伝子は、遺伝子自体または当該遺伝子を含むベクターの形態で医薬組成物内に含まれ得る。ベクターに対する定義は、前述した通りであり、これらのベクターの類型と製造方法は、当業界によく知られている。

【0024】

また、本発明は、14-3-3 γ タンパク質を含む非アルコール性脂肪肝の予防または治療用医薬組成物を提供する。

10

20

30

40

50

【0025】

本発明の非アルコール性脂肪肝の予防または治療用組成物は、天然型または組み換え14-3-3 γ と、これらと実質的に同等の生理活性を有する14-3-3 γ タンパク質を含むことができる。前記実質的に同等の生理活性を有するタンパク質には、天然型／組み換え14-3-3 γ とその機能的同等物（functional equivalent）および機能的誘導体（functional derivative）が含まれる。

【0026】

前記「機能的同等物」には、天然型タンパク質のアミノ酸のうち一部または全部が置換されたり、アミノ酸の一部が欠失または付加されたアミノ酸配列変形体であって、天然型14-3-3 γ と実質的に同等の生理活性を有するものをいう。

10

【0027】

「機能的誘導体」は、前記14-3-3 γ タンパク質の物理化学的性質を増加または減少させるための変形を加えたタンパク質であって、天然型14-3-3 γ と実質的に同等の生理活性を有するものを意味する。

【0028】

本発明の14-3-3 γ タンパク質の由来は、特に限定されないが、好ましくは脊椎動物、好ましくはヒト、マウス、ラットなどに由来するタンパク質であってもよい。

【0029】

一具体例によると、本発明に使用された14-3-3 γ は、公知の配列から当業者に公知になった遺伝工学的な方法で製造し得る。

20

【0030】

天然型の14-3-3 γ を遺伝子組み換え方法によりタンパク質を製造する場合、大腸菌（E.

coli）や昆虫細胞を利用するよりも哺乳動物細胞を利用する場合が、タンパク質の活性度や溶解性の観点から天然型のものと類似すると認められる。

【0031】

前記組み換え14-3-3 γ タンパク質は、通常のカラムクロマトグラフィー方法などを利用して分離し得る。また、タンパク質の精製程度は、ソジウムドデシルサルフェートポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-polyacrylamide gel electrophoresis（PAGE））などで確認し得る。

30

【0032】

本発明の医薬組成物は、有効成分の他に、薬剤学的に好適であり、生理学的に許容される添加剤を使用して製造され得、前記添加剤としては、賦形剤、崩解剤、甘味剤、結合剤、被覆剤、膨張剤、潤滑剤、滑沢剤または香味剤などの可溶化剤が使用できる。

【0033】

本発明の医薬組成物は、投与のために、有効成分の他に、さらに薬剤学的に許容可能な担体を1種以上含んで医薬組成物で好ましく製剤化し得る。

【0034】

液状溶液で製剤化される組成物において許容可能な薬剤学的担体としては、滅菌および生体に適合したものであって、食塩水、滅菌水、リンガー液、緩衝食塩水、アルブミン注射溶液、デキストロース溶液、マルトデキストリン溶液、グリセロール、エタノールおよびこれらの成分のうち2成分以上を混合して使用でき、必要に応じて抗酸化剤、緩衝液、静菌剤など他の通常の添加剤を添加し得る。

40

【0035】

また、希釈剤、分散剤、界面活性剤、結合剤および潤滑剤をさらに添加して、水溶液、懸濁液、乳濁液などのような注射用剤形、丸薬、カプセル、顆粒または錠剤で製剤化し得る。ひいては、当該分野の適切な方法としてRemington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PAに開示されている方法を利用して各疾患に応じてまたは成分に応じて好ましく製剤化し得る。

50

【0036】

本発明の医薬組成物の薬剤製剤の形態は、顆粒剤、散剤、被覆錠剤、錠剤、カプセル剤、坐剤、シロップ、汁、懸濁剤、乳剤、点滴剤または注射可能な液剤および活性化合物の徐放性製剤などになり得る。

【0037】

本発明の医薬組成物は、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、胸骨内、経皮、鼻側内、吸入、局所、直腸、経口、眼球内または皮内経路を介して通常的方式で投与し得る。

【0038】

本発明の医薬組成物の有効成分の有効量は、疾患の予防または治療、または骨成長の誘導効果を達成するのに要求される量を意味する。したがって、疾患の種類、疾患の重症度、組成物に含有された有効成分および他の成分の種類および含量、剤形の種類および患者の年齢、体重、一般の健康状態、性別および食餌、投与時間、投与経路および組成物の分泌率、治療期間、同時使用される薬物を含めて多様な因子によって調節され得る。これに限定されるものではないが、例えば、成人の場合、1日1回～数回投与時に、本発明の阻害剤は、1日1回～数回投与時に、化合物の場合、 $0.1 \text{ ng/kg} \sim 10 \text{ g/kg}$ 、ポリペプチド、タンパク質または抗体の場合、 $0.1 \text{ ng/kg} \sim 10 \text{ g/kg}$ 、アンチセンスオリゴヌクレオチド、 siRNA 、 shRNA 、 miRNA の場合、 $0.01 \text{ ng/kg} \sim 10 \text{ g/kg}$ の容量で投与し得る。

【0039】

本発明において、「対象体」は、ヒト、オランウータン、チンパンジー、マウス、ラット、犬、牛、鶏、豚、ヤギ、羊などを含むが、これらの例に限定されるものではない。

【0040】

また、本発明は、非アルコール性脂肪肝が疑われる患者の試料から $14-3-3\beta$ および/または $14-3-3\gamma$ 遺伝子の mRNA またはそのタンパク質の水準を測定することによって、非アルコール性脂肪肝の発病の可能性に対する情報を提供する方法に関する。

【0041】

具体的に、本発明は、非アルコール性脂肪肝が疑われる患者の試料から $14-3-3\beta$ 遺伝子の mRNA またはそのタンパク質の水準を測定するためのプローブを含む非アルコール性脂肪肝診断用組成物を提供する。

【0042】

また、本発明は、非アルコール性脂肪肝が疑われる患者の試料から $14-3-3\gamma$ 遺伝子の mRNA またはそのタンパク質の水準を測定するためのプローブを含む非アルコール性脂肪肝診断用組成物を提供する。

【0043】

一具体例において、前記遺伝子の mRNA の水準を測定するためのプローブは、前記 mRNA に対する核酸プローブまたはプライマーであってもよい。

【0044】

前記核酸プローブは、自然のまたは変形されたモノマーまたは連鎖（ linkages ）の線状オリゴマーを意味し、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含み、ターゲットヌクレオチド配列に特異的にハイブリダイズすることができ、自然的に存在したり、または人為的に合成されたものをいう。本発明によるプローブは、一本鎖であってもよく、好ましくはオリゴデオキシリボヌクレオチドであってもよい。本発明のプローブは、自然 dNMP （すなわち、 dAMP 、 dGMP 、 dCMP および dTMP ）、ヌクレオチド類似体または誘導体を含むことができる。また、本発明のプローブは、リボヌクレオチドも含むことができる。例えば、本発明のプローブは、骨格変形されたヌクレオチド、例えば、ペプチド核酸（ PNA ）、ホスホロチオエート DNA 、ホスホロジチオエート DNA 、ホスホロジアミデート DNA 、アミドー連結された DNA 、 MMI ー連結された DNA 、 $2'-\text{O}$ ーメチル RNA 、アルファー DNA およびメチルホスホナート DNA 、糖変形されたヌクレオチド、例えば、 $2'-\text{O}$ ーメチル RNA 、 $2'-\text{フルオロRNA}$ 、 $2'-\text{アミノRNA}$ 、 $2'-\text{O}$ ーアルキル DNA 、 $2'-\text{O}$ ーアリル DNA 、 $2'-\text{O}$

10

20

30

40

50

ーアルキニルDNA、ヘキソースDNA、ピラノシルRNAおよびアンヒドロヘキシトールDNA、および塩基変形を有するヌクレオチド、例えば、C-5置換されたピリミジン（置換基はフルオロー、ブロモー、クロロー、ヨードー、メチルー、エチルー、ビニルー、ホルミルー、エチジルー、プロピニルー、アルキニルー、チアゾリルー、イミダゾリルー、ピリジルー含む）、C-7置換基を有する7-デアザプリン（置換基はフルオロー、ブロモー、クロロー、ヨードー、メチルー、エチルー、ビニルー、ホルミルー、アルキニルー、アルケニルー、チアゾリルー、イミダゾリルー、ピリジルー）、イノシンおよびアミノプリンを含むことができる。

【0045】

前記プライマーは、好適な温度および好適な緩衝液内で好適な条件（すなわち、4種の異なるヌクレオシドトリホスフェートおよび重合反応酵素）下に鋳型ー指示DNA合成の開始点として作用し得る一本鎖オリゴヌクレオチドを意味する。プライマーの好適な長さは、多様な要素、例えば、温度とプライマーの用途に応じて変化があり得る。また、プライマーの配列は、鋳型の一部配列と完全に相補的な配列を有する必要はなく、鋳型とハイブリダイズしてプライマー固有の作用をすることができる範囲内で十分な相補性を有すれば十分である。したがって、本発明におけるプライマーは、鋳型である遺伝子のヌクレオチド配列に完全に相補的な配列を有する必要はなく、この遺伝子配列にハイブリダイズしてプライマー作用をすることができる範囲内で十分な相補性を有すれば十分である。また、本発明によるプライマーは、遺伝子の増幅反応に用いられることが好ましい。前記増幅反応は、核酸分子を増幅する反応を言い、このような遺伝子の増幅反応については、当業界によく知られており、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、転写仲介増幅（TMA）、核酸塩基配列基盤増幅（NASBA）などが含まれ得る。

【0046】

一具体例において、前記タンパク質の水準を測定するためのプローブは、前記タンパク質に対する抗体であってもよい。

【0047】

抗体は、ポリクロナール抗体、モノクロナール抗体、ヒト抗体およびヒト化抗体、またはこれらの断片が使用できる。

【0048】

前記抗体断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂およびFv断片；ジアボディ；線状抗体；一本鎖抗体分子；および抗体断片から形成された多重特異性抗体などが含まれる。

【0049】

抗体をパペインで分解すると、2個の同じ抗原結合断片、すなわち単一抗原結合部位がある各「Fab」断片、およびその残りである「Fc」断片が生成される。ペプシンを処理すると、2個の抗原結合部位があり、依然として抗原に交差結合し得るF(ab')₂断片が生成される。Fvは、完全な抗原認識および結合部位を含む最小の抗体断片である。この部位は、一つの重鎖および一つの軽鎖の可変領域の二量体で構成され、非共有結合で堅固に結合されている。

【0050】

ポリクロナール抗体の製造方法は、当業者に公知になっている。ポリクロナール抗体は、哺乳動物に1回以上免疫化剤を注入し、必要な場合、免疫補強剤と共に注入して製造し得る。通常、免疫化剤および（または）免疫補強剤は、哺乳動物に皮下注射または腹腔内注射で数回注入される。免疫化剤は、本発明のタンパク質またはその融合タンパク質であってもよい。免疫化される哺乳動物に免疫原性があるものと公知になったタンパク質と共に免疫化剤を注射することが効果的である。

【0051】

本発明によるモノクロナール抗体は、文献（Kohler et al., Nature, 256:495（1975））に記載されたハイブリッドマ方法で製造したり、また

10

20

30

40

50

は組み換えDNA方法（例えば、米国特許第4,816,576号参照）で製造し得る。また、モノクローナル抗体は、例えば、文献（Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) および Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)）に記載された技術を利用してファージ抗体ライブラリーから単離し得る。

【0052】

本発明におけるモノクローナル抗体は、具体的に、目的とする活性を発揮するのであれば、重鎖および（または）軽鎖の一部が特定の種に由来する抗体または特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体の相当する配列と同一であるか、相同性があるが、鎖の残りは、他の種に由来する抗体または他の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体またはそのような抗体の断片と同一であるか、相同性がある「キメラ」抗体を含む。

10

【0053】

非ヒト（例えば、ネズミ科動物）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンから誘導された最小の配列を含むキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはその断片（例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂または抗体の他の抗原結合配列）である。多くの場合、ヒト化抗体は、レセプターの相補性決定領域（CDR）の残基を所望の特異性、親和度および能力を有するネズミ、マウスまたはウサギのようなヒト以外の種（ドナー抗体）のCDR残基で置換させたヒト免疫グロブリン（レセプター抗体）を含む。いくつかの場合に、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、相当する非ヒト残基により置換される。また、ヒト化抗体は、受容体抗体、または導入されるCDRまたはフレームワークの配列で発見されない残基を含むことができる。一般的に、ヒト化抗体は、一つ以上、一般的に二つ以上の可変ドメインを実質的に全部含み、ここで、すべてのまたは実質的にすべてのCDR領域は、非ヒト免疫グロブリンの領域に対応し、すべてのまたは実質的にすべてのFR領域は、ヒト免疫グロブリン配列の領域に該当する。また、ヒト化抗体は、免疫グロブリン不変領域（Fc）の少なくとも一部、一般的にヒト免疫グロブリン領域の一部を含む。

20

【0054】

本発明の非アルコール性脂肪肝診断用組成物は、キットの形態で含まれ得る。

【0055】

前記キットは、14-3-3βまたは14-3-3γ遺伝子の発現水準またはタンパク質の量を測定できるプライマー、プローブまたは抗体を含むことができ、これらの定義は、前述した通りである。

30

【0056】

前記キットがPCR増幅過程に適用される場合、選択的に、PCRの増幅に必要な試薬、例えば、緩衝液、DNAポリメラーゼ（例えば、Thermus aquaticus (Taq)、Thermus thermophilus (Tth)、Thermus filiformis、Thermis flavus、Thermococcus litoralisまたはPyrococcus furiosus (Pfu) から取得した熱安定性DNAポリメラーゼ）、DNAポリメラーゼ補助因子およびdNTPsを含むことができ、前記キットが免疫分析に適用される場合、本発明のキットは、選択的に二次抗体および標識の基質を含むことができる。ひいては、本発明によるキットは、前述した試薬成分を含む多数の別途パッケージングまたはコンパートメントで製作され得る。

40

【0057】

また、本発明の非アルコール性脂肪肝診断用組成物は、マイクロアレイの形態で含まれ得る。

【0058】

本発明のマイクロアレイにおいて、前記14-3-3βまたは14-3-3γタンパク質またはこれを暗号化する遺伝子の発現水準を測定し得るプライマー、プローブまたは抗体は、ハイブリダイゼーションアレイ要素（hybridizable array element）として用いられ、基質（substrate）上に固定化される。好まし

50

い基質は、好適な堅固性または半堅固性支持体であって、例えば、膜、フィルター、チップ、スライド、ウェーハ、ファイバー、磁性ビーズまたは非磁性ビーズ、ゲル、チュービング、プレート、高分子、微小粒子および毛細管を含むことができる。前記ハイブリダイゼーションアレイ要素は、前記基質上に配列されて固定化され、このような固定化は、化学的結合方法またはUVのような共有結合的方法により行われ得る。例えば、前記ハイブリダイゼーションアレイ要素は、エポキシ化合物またはアルデヒド基を含むように変形したガラスの表面に結合され得、また、ポリリジンコーティングの表面でUVにより結合され得る。また、前記ハイブリダイゼーションアレイ要素は、リンカー（例えば、エチレングリコールオリゴマーおよびジアミン）を介して基質に結合され得る。

【0059】

一方、本発明のマイクロアレイに適用される試料が核酸である場合には、標識され得、マイクロアレイ上のアレイ要素とハイブリダイズされ得る。ハイブリダイゼーションの条件は多様であり、ハイブリダイゼーション程度の検出および分析は、標識物質によって多様に実施され得る。

【0060】

また、本発明は、前記14-3-3 β または14-3-3 γ 遺伝子の発現水準またはその発現タンパク質の水準を測定する方法を用いて非アルコール性脂肪肝を診断するのに必要な情報を提供する方法を提供するが、より具体的に、前記方法は、（a）非アルコール性脂肪肝が疑われる患者の生物学的試料から14-3-3 β または14-3-3 γ 遺伝子の発現水準またはその発現タンパク質の量を測定する段階と、（b）正常対照群試料から前記遺伝子の発現水準またはその発現タンパク質の量を測定して、前記（a）段階の測定結果と比較する段階とを含むことができる。

【0061】

前記で遺伝子の発現水準またはタンパク質の量を測定する方法は、公知の技術を利用して生物学的試料からmRNAまたはタンパク質を分離する公知の工程を含んで行われ得る。

【0062】

前記生物学的試料は、非アルコール性脂肪肝の発生または進行の程度に応じた前記遺伝子の発現水準またはタンパク質の水準が正常対照群とは異なる、生体から採取された試料を言い、前記試料としては、例えば、これに限定されるものではないが、組織、細胞、血液、血清、血しょう、唾液および尿などが含まれ得る。

【0063】

前記遺伝子の発現水準の測定は、好ましくはmRNAの水準を測定することであり、mRNAの水準を測定する方法としては、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、RNA-seq保護分析法、ノーザンブロットおよびDNAチップなどがあるが、これに限らない。

【0064】

前記タンパク質の水準の測定は、抗体を利用できるが、このような場合、生物学的試料内の前記タンパク質とこれに特異的な抗体は、結合物、すなわち抗原-抗体複合体を形成し、抗原-抗体複合体の形成量は、検出ラベルのシグナルのサイズを通じて定量的に測定し得る。このような検出ラベルは、酵素、蛍光物質、リガンド、発光物質、微小粒子、レドックス分子および放射線同位元素よりなるグループの中から選択することができ、これに限定されるものではない。タンパク質の水準を測定するための分析方法としては、これに限定されるものではないが、ウェスタンブロット、ELISA、放射線免疫分析、放射線免疫拡散法、オクタロニー免疫拡散法、ロケット免疫電気泳動、組織免疫染色、免疫沈殿分析法、補体固定分析法、FACS、タンパク質チップなどがある。

【0065】

したがって、本発明は、前記のような検出方法を通じて、対照群のmRNAの発現量またはタンパク質の量と非アルコール性脂肪肝が疑われる患者におけるmRNAの発現量またはタンパク質の量が確認でき、前記発現量の程度を対照群と比較することによって、非

10

20

30

40

50

アルコール性脂肪肝の発病有無、進行段階などを診断し得る。

【0066】

また、本発明による前記非アルコール性脂肪肝の診断のための情報提供方法は、本発明による14-3-3β遺伝子の発現水準またはその発現タンパク質の量が正常対照群の試料に比べて増加した場合、非アルコール性脂肪肝が誘発されたり、発病可能性が高いものと判断し得る。逆に、14-3-3γの遺伝子の発現水準またはその発現タンパク質の量が正常対照群の試料に比べて減少した場合、非アルコール性脂肪肝が誘発されたり、発病の可能性が高いものと判断し得る。

【0067】

また、本発明は、14-3-3βまたは14-3-3γの遺伝子またはタンパク質を含む細胞を候補物質と人体外で接触させ、前記候補物質による前記遺伝子またはタンパク質の発現量の変化を測定することを含む脂肪肝の予防または治療用医薬のスクリーニング方法を提供する。

【0068】

例えば、前記候補物質が14-3-3β遺伝子またはタンパク質の発現を下向き調節するとき、脂肪肝の予防または治療用医薬であると判別し得る。または、前記候補物質が14-3-3γ遺伝子またはタンパク質の発現を上向き調節するとき、脂肪肝の予防または治療用医薬であると判別し得る。

【0069】

また、本発明は、14-3-3βタンパク質および／または14-3-3γタンパク質をPPARγ₂タンパク質と共に候補物質と接触させ、前記候補物質によるPPARγ₂に対する14-3-3βタンパク質および／または14-3-3γタンパク質の結合変化を測定することを含む脂肪肝の予防または治療用医薬のスクリーニング方法を提供する。

【0070】

一具体例において、前記候補物質によるPPARγ₂に対する14-3-3βタンパク質および／または14-3-3γタンパク質の結合変化の測定は、PPARγ₂のSer273残基に対する14-3-3βタンパク質および／または14-3-3γタンパク質の結合変化を測定することによって行われ得る。

【0071】

前記候補物質は、通常の選定方式によって14-3-3βおよび／または14-3-3γ遺伝子塩基配列でmRNA、タンパク質への転写、翻訳を促進したり抑制する物質または14-3-3βおよび／または14-3-3γの機能または活性を増進したり抑制する医薬としての可能性を有するものと推定されたり、または無作為に選ばれた個別的な核酸、タンパク質、ペプチド、その他抽出物または天然物、化合物などになり得る。

【0072】

それ以後、候補物質が処理された細胞で前記遺伝子の発現量、タンパク質の量またはタンパク質の活性を測定し得、測定の結果、前記遺伝子の発現量、タンパク質の量またはタンパク質の活性が増加または減少することが測定されると、前記候補物質は、脂肪肝を予防または治療し得る物質であると判断できる。

【0073】

前記で遺伝子の発現量、タンパク質の量またはタンパク質の活性を測定する方法は、当業界に公知になった多様な方法を用いて行われるが、例えば、これに限定されるものではないが、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(reverse transcriptase-polymerase chain reaction)、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(real time-polymerase chain reaction)、ウェスタンブロット、ノーザンブロット、ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)、放射免疫分析(RIA:radioimmunoassay)、放射免疫拡散法(radioimmunodiffusion)および免疫沈殿分析法(immunoprecipitation assay)などを利用して行うことができる。

10

20

30

40

50

【0074】

本発明のスクリーニング方法を用いて得た、14-3-3βおよび／または14-3-3γ遺伝子の発現を阻害／増進させたり、タンパク質の機能を阻害／増進させる活性を示す候補物質が脂肪肝の予防または治療用医薬の候補物質になり得る。

【0075】

このような脂肪肝の予防または治療用医薬の候補物質は、今後の脂肪肝治療剤の開発過程でリード化合物 (leading compound) として作用するようになり、リード化合物が14-3-3βおよび／または14-3-3γ遺伝子またはそれから発現するタンパク質の機能を促進または抑制効果を示すことができるように、その構造を変形させ、最適化することによって、新しい脂肪肝治療剤を開発し得る。

10

【0076】

以下、本発明を実施例により詳細に説明する。但し、下記実施例は、本発明を例示するものに過ぎず、本発明の内容が下記実施例に限定されるわけではない。

【実施例】

【0077】

<実験材料>

ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium、DMEM)、199培地 (M199)、ウシ胎児血清 (fetal bovine serum、FBS)、ペニシリン、ストレプトマイシン、Opti-MEMは、Invitrogen (Carlsbad、CA) で購入した。

20

【0078】

si-14-3-3βおよびsi-14-3-3γ siRNA、抗-PPARγ、抗-GFP、抗-GST、抗-Flag、抗-p-Cdk5 (Tyr15)、抗-Cdk5および抗-HA、抗-SREBP-1c抗体、ロスコビチンは、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz、CA、USA) で購入し、抗-p-PPARγ₂ (Ser273) 抗体は、Rockland immunochemicals Inc. (Limerick、PA、USA) で購入した。

【0079】

E-fect ion plus reagentは、Lugen Sci. (Seoul、South Korea) で購入した。

30

【0080】

ルシフェラーゼ分析システムは、Promega Co. (Madison、WI、USA) で購入した。

【0081】

ピオグリタゾンとオレイン酸は、Sigma (St. Louis、MO、USA) で購入した。

【0082】

トリグリセリド分析システムは、Cayman Chemical (Ann Arbor、MI、USA) で購入した。

【0083】

40

<実施例1> PPARγ₂ の転写活性を調節する14-3-3βと14-3-3γの確認

PPARγ₂ の転写活性は、肝疾患関連タンパク質の発現に重要な役割をする。したがってPPARγ₂ により調節されるαP2プロモーターを利用してPPARγ₂ の転写活性を測定し、7種類の14-3-3タンパク質の役割を確認した。このために、HEK-293T細胞を12-ウェルプレートに各ウェル当たり1×10⁵細胞を播種 (seeding) した後、0.5μgのαP2プロモーター構造物と14-3-3イソ型タンパク質 (α、β、γ、δ、ε、ζ、η、θ) (0.5μg) またはsi-14-3-3βおよびsi-14-3-3γ siRNA (5nMと10nM、Santa Cruz) をE-fect ion plus reagent (Lugen) を利用してトランスフェクシ

50

ョンした。DNAとE-f e c t i o n p l u s r e a g e n tの比率は、1：2で使用し、方法は、製造社のマニュアルに沿って行った。トランスフェクションした後、ピオグリタゾン（p i o g l i t a z o n；P i o、S a n t a C r u z）10 μ Mを24時間処理し、当該細胞を氷冷PBSで洗浄およびレポータライシスバッファー（P r o m e g a、M a d i s o n、W I）でウェル当たり80 μ Lを使用して細胞を溶解させた後、10,000 $\times$ gに4 $^{\circ}$ Cで10分間遠心分離して上澄み液を収集し、ルシフェラーゼ活性を測定した。機器は、ルミノメーター20/20ⁿ（T u r n e r B i o s y s t e m s、S u n n y v a l e、C A）を使用した。標準化（N o r m a l i z a t i o n）のために、p S V 4 0 - β -ガラクトシダーゼを共トランスフェクション（c o t r a n s f e c t e d）した。収集した上澄み液は、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定し、ルシフェラーゼ活性を補正して、値をグラフで示した。このために β -ガラクトシダーゼ酵素分析システム（P r o m e g a、M a d i s o n、W I）を使用し、DU530分光光度計（B e c k m a n I n s t r u m e n t s、P a l o A l t o、C A）を使用して分析した。

10

【0084】

a P 2プロモーター活性の測定の結果、14-3-3 β は、P P A R γ ₂の転写活性を増加させ、14-3-3 γ は、P P A R γ ₂の転写活性を減少させることを確認した。しかし、他の5種類のイソ型タンパク質では、変化がなかった（図1A）。

【0085】

P P A R γ ₂の転写活性に14-3-3 β と14-3-3 γ が関与するか否かを正確に確認するために、14-3-3 β と14-3-3 γ を濃度別に過発現して測定した結果、14-3-3 β の場合、濃度依存的にP P A R γ ₂の転写活性が増加した（図1B）。しかし、14-3-3 γ の場合、濃度依存的にP P A R γ ₂の転写活性を減少させた（図1C）。

20

【0086】

これに対し、s i - 14-3-3 β を利用して14-3-3 β の発現を抑制する場合、P P A R γ ₂の転写活性が減少し（図1D）、14-3-3 γ の発現を抑制する場合、P P A R γ ₂の転写活性が増加した（図1E）。

【0087】

したがって、本実験の結果によると、14-3-3 β は、P P A R γ ₂の転写活性を増加させることに関与し、14-3-3 γ は、P P A R γ ₂の転写活性を抑制する役割をし、互いに反対に調節する遺伝子であると判断される。

30

【0088】

<実施例2> 14-3-3 β と14-3-3 γ のP P A R γ ₂との結合の確認

転写活性の実験の結果、14-3-3 β と14-3-3 γ がP P A R γ ₂の転写活性を調節することから見て、14-3-3 β と14-3-3 γ がP P A R γ ₂と結合し得ると認められる。

【0089】

したがって、G S T-プルダウンアッセイを行って、14-3-3 β と14-3-3 γ がP P A R γ ₂と結合するか否かを確認した。

40

【0090】

このために、H E K - 2 9 3 T細胞を100mmのプレートに各ウェル当たり2 $\times$ 10⁶細胞を播種した後、M y c - P P A R γ ₂ DNA（4 μ g）とm G S T - 14-3-3 β （4 μ g）またはm G S T - 14-3-3 γ （4 μ g）をE-f e c t i o n p l u s r e a g e n t（L u g e n）を利用してトランスフェクションした。DNAとE-f e c t i o n p l u s r e a g e n tの比率は、1：2で使用し、方法は、製造社のマニュアルに沿って行った。トランスフェクションした後、ピオグリタゾン（P i o、S a n t a C r u z）10 μ Mを24時間処理し、当該細胞を氷冷PBSで洗浄およびライシスバッファー（150mMのN a C l、1mMのE D T A、1%のノニデットP - 40、5%のグリセロール、25mMのトリス-H C l、p H 7.5、プロテアーゼ阻

50

害剤入り)でウェル当たり500 μ Lを使用して細胞を溶解させた後、10,000 $\times$ gに4 $^{\circ}$ Cで10分間遠心分離して、タンパク質を抽出した後、1000 μ gのタンパク質をグルタチオンセファロース4Bビーズ(GE Healthcare、Buckinghamshire、UK)20 μ Lと6時間反応させた後、ビーズを1mLの氷冷PBSで洗浄する過程を5回繰り返して行い、ビーズを100 $^{\circ}$ Cで10分間沸かした後、10%のSDS-PAGEゲルで分離して、ウェスタンブロットを行った。GST抗体(Santa Cruz)とMyc抗体(自己生産)は、1:3000の比率で使用した。各タンパク質を検出するために、West Pico ECL(Thermo scientific、Rockford、IL)を使用して暗室で確認した。

【0091】

その結果、PPAR γ_2 と14-3-3 β との結合が、PPAR γ_2 リガンドであるピオグリタゾンの処理時にさらに強くなった(図2A)。14-3-3 β とは反対に、PPAR γ_2 と14-3-3 γ との結合は減少した(図2B)。このような結果は、PPAR γ_2 の活性化が進行する場合、14-3-3 β との結合が増加し、14-3-3 γ との結合は減少して、このような二つのタンパク質によりPPAR γ_2 の転写活性を調節して、ターゲット遺伝子の発現を調節するものと判断された。

【0092】

<実施例3>14-3-3 β と14-3-3 γ がPPAR γ_2 と結合するドメインの確認

PPAR γ_2 タンパク質は、活性化関数1(activation function 1; AF-1、アミノ酸1-138)、DNA結合ドメイン(DBD、アミノ酸139-203)、ヒンジ領域(アミノ酸204-310)、活性化関数2(activation function 2; AF-2、アミノ酸311-505)ドメインからなると報告されたことがある(図3A)。したがって、PPAR γ_2 のいかなるドメインの部分に14-3-3 β と14-3-3 γ が結合するのかを確認するために、GST-プルダウンアッセイを進めた。

【0093】

HEK-293T細胞を100mmのプレートに各ウェル当たり 2×10^6 細胞を播種した後、Flag-PPAR γ_2 (1-505)DNA(4 μ g)、Flag-PPAR γ_2 (1-310)DNA(4 μ g)、Flag-PPAR γ_2 (139-505)DNA(4 μ g)とmGST-14-3-3 β (4 μ g)またはmGST-14-3-3 γ (4 μ g)をEfection plus reagent(Lugen)を利用してトランスフェクションした。Flag-PPAR γ_2 (1-310)DNA、Flag-PPAR γ_2 (139-505)DNAは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を通じて増幅したDNA断片をXhoIとApaI制限酵素を利用してpCMV-3Tag-1ベクターにクローニングした。DNAとEfection plus reagentの比率は、1:2で使用し、方法は、製造社のマニュアルに沿って行った。当該細胞を氷冷PBSで洗浄およびライシスバッファー(150mMのNaCl、1mMのEDTA、1%のノニデットP-40、5%のグリセロール、25mMのトリス-HCl、pH7.5、プロテアーゼ阻害剤入り)でウェル当たり500 μ Lを使用して細胞を溶解させた後、10,000 $\times$ gに4 $^{\circ}$ Cで10分間遠心分離して、タンパク質を抽出した後、1000 μ gのタンパク質をグルタチオンセファロース4Bビーズ(GE Healthcare、Buckinghamshire、UK)20 μ Lと6時間反応させた後、ビーズを1mLの氷冷PBSで洗浄する過程を5回繰り返して行い、ビーズを100 $^{\circ}$ Cで10分間沸かした後、10%のSDS-PAGEゲルで分離して、ウェスタンブロットを行った。GST抗体(Santa Cruz)とFlag抗体(Santa Cruz)は、1:3000の比率で使用した。各タンパク質を検出するために、West Pico ECL(Thermo scientific、Rockford、IL)を使用して暗室で確認した。

【0094】

PPAR γ_2 遺伝子の野生型および二つの欠失突然変異と14-3-3 β または14-3-3 γ の結合を確認した結果、PPAR γ_2 (1-310) 欠失突然変異とPPAR γ_2 (139-505) 欠失突然変異で14-3-3 β (図3B)と14-3-3 γ (図3C)が結合した。このような結果は、14-3-3 β と14-3-3 γ は、PPAR γ_2 のDBDまたはヒンジ領域と結合することを意味する。

【0095】

<実施例4> 14-3-3 β と14-3-3 γ が結合するPPAR γ_2 の残基の確認

14-3-3タンパク質は、ターゲットタンパク質のリン酸化した残基に結合すると知られている。PPAR γ_2 の活性に関連したリン酸化残基は、セリン112とセリン273であると知られている。これにより、セリン112とセリン273残基がリン酸化しないPPAR γ_2 の突然変異(PPAR γ_2 のS112AとS273A)を製作して、14-3-3タンパク質との結合をGST-プルダウンアッセイを通じて確認した。

【0096】

HEK-293T細胞を100mmのプレートに各ウェル当たり 2×10^6 細胞を播種した後、Flag-PPAR γ_2 (WT) DNA (4 μ g)、Flag-PPAR γ_2 (S112A) DNA (4 μ g)、Flag-PPAR γ_2 (S273A) DNA (4 μ g)とmGST-14-3-3 β (4 μ g)またはmGST-14-3-3 γ (4 μ g)をEfection plus reagent (Lugen)を利用してトランスフェクションした。Flag-PPAR γ_2 (S112A) DNA、Flag-PPAR γ_2 (S273A) DNAは、ポリマーゼ連鎖反応(PCR)を通じて増幅したDNA断片をFlag-tagged vectorにクローニングした。DNAとEfection plus reagentの比率は、1:2で使用し、方法は、製造社のマニュアルに沿って行った。当該細胞を氷冷PBSで洗浄およびライシスバッファー(150mMのNaCl、1mMのEDTA、1%のノニデットP-40、5%のグリセロール、25mMのトリス-HCl、pH7.5、プロテアーゼ阻害剤入り)でウェル当たり500 μ Lを使用して細胞を溶解させた後、10,000 $\times$ gに4℃で10分間遠心分離して、タンパク質を抽出した後、1000 μ gのタンパク質をグルタチオンセファロース4Bビーズ(GE Healthcare、Buckinghamshire、UK)20 μ Lと6時間反応させた後、ビーズを1mLの氷冷PBSで洗浄する過程を5回繰り返して行い、ビーズを100℃で10分間沸かした後、10%のSDS-PAGEゲルで分離して、ウェスタンブロットを行った。GST抗体(Santa Cruz)とFlag抗体(Santa Cruz)は、1:3000の比率で使用した。各タンパク質を検出するために、West Pico ECL(Thermo scientific、Rockford、IL)を使用して暗室で確認した。

【0097】

また、HEK-293T細胞を12-ウェルプレートに各ウェル当たり 1×10^5 細胞を播種した後、aP2プロモーター構造物(0.5 μ g)とFlag-PPAR γ_2 (S112A) DNA (0.5 μ g)またはFlag-PPAR γ_2 (S273A) DNA (0.5 μ g)とmGST-14-3-3 β DNA (0.5 μ g)またはmGST-14-3-3 γ DNA (0.5 μ g)をEfection plus reagent (Lugen)を利用してトランスフェクションした。DNAとEfection plus reagentの比率は、1:2で使用し、方法は、製造社のマニュアルに沿って行った。当該細胞を氷冷PBSで洗浄およびレポータライシスバッファー(Promega、Madison、WI)でウェル当たり80 μ Lを使用して細胞を溶解させた後、10,000 $\times$ gに4℃で10分間遠心分離して、上澄み液を収集し、ルシフェラーゼ活性を測定した。機器は、ルミノメーター20/20ⁿ(Turner Biosystems、Sunnyvale、CA)を使用した。標準化のために、pSV40- β -ガラクトシダーゼを共トランスフェクションした。収集された上澄み液は、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定してルシフェラーゼ活性を補正し、値をグラフで示した。このために β -ガラクトシダーゼ酵素分析システム(Promega、Madison、WI)が使用され、

DU530分光光度計 (Beckman Instruments、Palo Alto、CA) を使用して分析した。

【0098】

その結果、PPAR γ_2 のS273A突然変異で14-3-3 β と14-3-3 γ の結合がいずれも抑制された (図4Aと図4B)。また、14-3-3 β の過発現に伴って増加したPPAR γ_2 の転写活性が、PPAR γ_2 のS273A突然変異の場合、転写活性に変化がなかった (図4C)。また、14-3-3 γ の過発現時に減少したPPAR γ_2 の転写活性が、PPAR γ_2 のS273A突然変異の場合、転写活性に変化がなかった (図4D)。したがって、PPAR γ_2 のセリン273残基に14-3-3 β と14-3-3 γ が結合して、PPAR γ_2 の転写活性を調節することが確認された。

10

【0099】

<実施例5> 14-3-3 β と14-3-3 γ のPPAR γ_2 との競争的結合の確認

以前の実験結果を通じて14-3-3 β と14-3-3 γ がリン酸化したPPAR γ_2 のセリン273残基に結合することを確認したのであり、同じ残基における結合は、二つのタンパク質が競争的に結合すると判断された。したがって、PPAR γ_2 との結合で14-3-3 β と14-3-3 γ が競争的な結合をするか否かを確認するために、GST-プルダウンアッセイを進めた。

【0100】

HEK-293T細胞を100mmのプレートに各ウェル当たり 2×10^6 細胞を播種した後、mGST-PPAR γ_2 DNA (4 μ g)とGFP-14-3-3 β DNA (4 μ g)またはGFP-14-3-3 γ DNA (4 μ g)およびHA-14-3-3 β DNA (2と4 μ g)またはHA-14-3-3 γ DNA (2と4 μ g)をEfecti-
on plus reagent (Lugen)を利用してトランスフェクションした。DNAとEfecti-
on plus reagentの比率は、1:2で使用し、方法は、製造社のマニュアルに沿って行った。トランスフェクションした後、ピオグリタゾン (Pio, Santa Cruz) 10 μ Mを24時間処理し、当該細胞を氷冷PBSで洗浄およびライシスバッファー (150mMのNaCl、1mMのEDTA、1%のノニデットP-40、5%のグリセロール、25mMのトリス-HCl、pH7.5、プロテアーゼ阻害剤入り)でウェル当たり500 μ Lを使用して細胞を溶解させた後、10,000 $\times$ gに4 $^{\circ}$ Cで10分間遠心分離して、タンパク質を抽出した後、1000 μ g
のタンパク質をグルタチオンセファロース4Bビーズ (GE Healthcare、Buckinghamshire、UK) 20 μ Lと6時間反応させた後、ビーズを1mLの氷冷PBSで洗浄する過程を5回繰り返して行い、ビーズを100 $^{\circ}$ Cで10分間沸かした後、10%のSDS-PAGEゲルで分離して、ウェスタンブロットでそれぞれ (GST、GFP、HA: Santa Cruz)の抗体を使用してタンパク質を確認し、すべての抗体は、1:3000の比率で使用した。

20

30

【0101】

その結果、14-3-3 γ の発現量が増加するに伴って、14-3-3 β とPPAR γ_2 の結合が減少し (図5A)、14-3-3 β の発現量が増加するに伴って、14-3-3 γ とPPAR γ_2 の結合が減少した (図5B)。これは、14-3-3 β と14-3-3 γ は、リン酸化したPPAR γ_2 のセリン273残基に競争的に結合することを示す。

40

【0102】

<実施例6> オレイン酸によるPPAR γ_2 の発現増加およびPPAR γ_2 のターゲット遺伝子の発現調節

肥満マウスの肝でPPAR γ_2 の発現および活性度が増加しており、そのターゲット遺伝子の発現が増加していると知られている。In vitro実験でこのような肥満環境を作るために、脂肪酸の一種類であるオレイン酸 (OA) を処理して、PPAR γ_2 および14-3-3 β と14-3-3 γ のmRNAの発現量を確認した。

【0103】

HepG2とマウス初代肝細胞を6-ウェルプレートに各ウェル当たり 4×10^5 細胞

50

を播種した後、オレイン酸 (OA) 200 μ M を72時間処理した。mRNA の抽出は、当該細胞を Trizol (Invitrogen) でウェル当たり1mL を使用して細胞を溶解させた後、クロロホルム 200 μ L を添加してよく混ぜた後、常温に5分間放置して12,000 $\times$ g に4 $^{\circ}$ C で15分間遠心分離して、上清液 (supernatant) をイソプロパノール 500 μ L と混ぜた後、10分間氷上に置き、12,000 $\times$ g に4 $^{\circ}$ C で15分間遠心分離して、上清液を除去し、ペレットをジエチルピロカルボン酸 (DEPC) 処理された3次蒸留水で溶かした。2 μ g のmRNA を Superscript First Strand cDNA Synthesis Kit (Bioneer、Daejeon、South Korea) を利用してcDNA を合成し、これを鋳型としてヒトのPPAR γ_2 、14-3-3 β 、14-3-3 γ 、SREBP-1c、SCD-1、ACC、FABP、FAT/CD36、 β -アクチン特異的なプライマーを利用してポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を通じて増幅し、マウスのPPAR γ_2 、14-3-3 β 、14-3-3 γ 、SREBP-1c、FAT/CD36、GAPDH特異的なプライマーを利用してリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (real-time PCR) を通じて増幅した。 β -アクチンとGAPDHは、各細胞のmRNA を同一量で比較したものであるかを把握できる対照群として使用した。

【0104】

オレイン酸濃度依存的にPPAR γ_2 のmRNA の発現が増加した。しかし、14-3-3 β と14-3-3 γ のmRNA の発現量には変化がなかった (図6A と図6B)。また、オレイン酸濃度依存的にPPAR γ_2 ターゲット遺伝子である脂肪代謝関連遺伝子のmRNA 発現も増加した (図6C と図6D)。本実験の結果、オレイン酸は、PPAR γ_2 とPPAR γ_2 のターゲット遺伝子の発現を増加させ、14-3-3 β と14-3-3 γ の発現には影響がなかった。この結果から14-3-3 β と14-3-3 γ の発現よりは、活性化したPPAR γ_2 のリン酸化残基に14-3-3 β と14-3-3 γ の結合による転写活性の調節が重要であると判断された。

【0105】

<実施例7>オレイン酸によるPPAR γ_2 のターゲット遺伝子の発現調節で14-3-3 β と14-3-3 γ の役割

HepG2細胞を6-ウェルプレートに各ウェル当たり4 $\times$ 10⁵細胞を播種した後、GFP-14-3-3 β DNA (4 μ g) またはGFP-14-3-3 γ DNA (4 μ g) を Efection plus reagent (Lugen) を利用してトランスフェクションした。DNA と Efection plus reagent の比率は、1:2 で使用し、方法は、製造社のマニュアルに沿って行った。トランスフェクションした後、オレイン酸 (OA) 200 μ M を72時間処理し、mRNA の抽出は、当該細胞を Trizol (Invitrogen) でウェル当たり1mL を使用して細胞を溶解させた後、クロロホルム 200 μ L を添加してよく混ぜた後、常温に5分間置き、12,000 $\times$ g に4 $^{\circ}$ C で15分間遠心分離して、上清液をイソプロパノール 500 μ L と混ぜた後、10分間氷に置き、12,000 $\times$ g に4 $^{\circ}$ C で15分間遠心分離して、上清液を除去し、ペレットをジエチルピロカルボン酸 (DEPC) 処理された3次蒸留水で溶かした。2 μ g のmRNA を Superscript First Strand cDNA Synthesis Kit (Bioneer、Daejeon、South Korea) を利用してcDNA を合成し、これを鋳型としてヒトのPPAR γ_2 (配列番号1、2)、14-3-3 β (配列番号3、4)、14-3-3 γ (配列番号5、6)、SREBP-1c、FAT/CD36、 β -アクチン特異的なプライマーを利用してポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を通じて増幅し、マウスのSREBP-1c、FAT/CD36、GAPDH特異的なプライマーを利用してリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応を通じて増幅した。 β -アクチンとGAPDHは、各細胞のmRNA を同一量で比較したものであるかを把握できる対照群として使用した。

【0106】

また、クロマチン免疫沈降分析法 (chromatin immunoprecipitation)

tation; ChIP) は、HepG2細胞を100mmのプレートに各ウェル当たり 4×10^6 細胞を播種した後、Flag-PPAR γ 2 DNA (4 μ g) とmGST-14-3-3 β DNA (4 μ g) またはmGST-14-3-3 γ DNA (4 μ g) およびsi-14-3-3 β (20 μ M、Santa Cruz) またはsi-14-3-3 γ (20 μ M、Santa Cruz) をElectroporation plus reagent (Lugen) を利用してトランスフェクションした。DNAとElectroporation plus reagentの比率は、1:2で使用し、方法は、製造社のマニュアルに沿って行った。当該細胞を0.75%のホルムアルデヒドを15分間常温で処理した後、グリシンを添加し、氷冷PBSで細胞をかき取り、1,000 $\times$ gに4 $^{\circ}$ Cで3分間遠心分離して、上清液を除去し、ペレットをFALCONライシスバッファー (50mMのHEPES、150mMのNaCl、2mMのEDTA pH8.0、1%のTriton-X100、0.1%のナデオキシコレート) 400 μ Lで溶解した後、超音波破碎機 (sonicator) を利用して高電圧、30秒破碎-30秒休息の条件で10分ずつ2回繰り返して破碎した。抗-Flag抗体 (Santa Cruz) を利用してDNA-タンパク質複合体を免疫沈降させた後、FAT/CD36プロモーター特異的なプライマーを利用してポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を通じて増幅した。

10

【0107】

また、HepG2細胞を6-ウェルプレートに各ウェル当たり 5×10^5 細胞を播種した後、HA-14-3-3 β DNA (1 μ g) またはHA-14-3-3 γ DNA (1 μ g) をElectroporation plus reagent (Lugen) を利用してトランスフェクションした。DNAとElectroporation plus reagentの比率は、1:2で使用し、方法は、製造社のマニュアルに沿って行った。トランスフェクションした後、オレイン酸 (OA) 200 μ Mを72時間処理し、当該細胞を氷冷PBSで洗浄およびライシスバッファー (150mMのNaCl、1mMのEDTA、1%のノニデットP-40、5%のグリセロール、25mMのトリス-HCl、pH7.5、プロテアーゼ阻害剤入り) でウェル当たり80 μ Lを使用して細胞を溶解させた後、10,000 $\times$ gに4 $^{\circ}$ Cで10分間遠心分離して、タンパク質を抽出した後、30 μ gのタンパク質を10%のSDS-PAGEゲルで分離して、ウェスタンブロットでそれぞれ (HA、SREBP-1c: Santa Cruz) の抗体を使用してタンパク質を確認し、すべての抗体は、1:3000の比率で使用した。

20

30

【0108】

オレイン酸により増加したsterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) と脂肪酸トランスロカゼ (Fatty acid translocase; FAT) /CD36のmRNAの発現が、14-3-3 β の過発現によりさらに増加した。しかし、14-3-3 γ の過発現時にSREBP-1cとFAT/CD36のmRNAの発現が減少した (図7Aおよび図7B)。

【0109】

また、クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) を利用してFAT/CD36プロモーターに存在するPPAR γ 2の結合サイトと知られているPPRE (PPAR response element) を利用してPPAR γ 2の結合および14-3-3 β と14-3-3 γ の発現による結合力を確認した。その結果、FAT/CD36プロモーターへのPPAR γ 2の結合が14-3-3 β の過発現では増加し、14-3-3 γ の過発現時にその結合が抑制された (図7C、上段)。

40

【0110】

しかし、14-3-3 β の発現を抑制する場合、PPAR γ 2と14-3-3 β の結合が減少し、14-3-3 γ の発現抑制時に結合力が増加することを確認した (図7C、下段)。

この結果は、CD36遺伝子の発現を調節するためにプロモーター地域に結合するPPAR γ 2が14-3-3 β により増加し、14-3-3 γ により減少することが分かる。

50

【0111】

このようなPPAR γ_2 のターゲット遺伝子のmRNAの発現調節が、タンパク質の発現においても同一に示されるかを確認するために、SREBP-1cタンパク質の発現量をウェスタンブロット方法で確認した。実験の結果、14-3-3 β の過発現によりSREBP-1cのタンパク質の発現が増加し、14-3-3 γ の過発現により減少することを確認した(図7D)。

【0112】

したがって、前記実験の結果から、脂肪酸の刺激によりPPAR γ_2 の発現および活性化が増加し、増加したPPAR γ_2 の転写活性を14-3-3 β と14-3-3 γ が互いに反対に調節することを確認した。

10

【0113】

<実施例8> PPAR γ_2 の活性化による14-3-3 β と14-3-3 γ との結合
HEK-293T細胞を100mmのプレートに各ウェル当たり 2×10^6 細胞を播種した後、mGST-PPAR γ_2 DNA (4 μ g)とHA-14-3-3 β DNA (4 μ g)またはHA-14-3-3 γ DNA (4 μ g)をE-fect ion plus reagent (Lugen)を利用してトランスフェクションした。DNAとE-fect ion plus reagentの比率は、1:2で使用し、方法は、製造社のマニュアルに沿って行った。トランスフェクションした後、オレイン酸(OA)200 μ Mを72時間処理し、当該細胞を氷冷PBSで洗浄およびライシスバッファー(150mMのNaCl、1mMのEDTA、1%のノニデットP-40、5%のグリセロール、25mMのトリス-HCl、pH7.5、プロテアーゼ阻害剤入り)でウェル当たり500 μ Lを使用して細胞を溶解させた後、10,000 $\times$ gに4℃で10分間遠心分離してタンパク質を抽出した後、1000 μ gのタンパク質をグルタチオンセファロース4Bビーズ(GE Healthcare、Buckinghamshire、UK)20 μ Lと6時間反応させた後、ビーズを1mLの氷冷PBSで洗浄する過程を5回繰り返して行い、ビーズを100℃で10分間沸かした後、10%のSDS-PAGEゲルで分離して、ウェスタンブロットでそれぞれ(GST、HA: Santa Cruz)の抗体を使用してタンパク質を確認したのであり、すべての抗体は、1:3000の比率で使用した。

20

【0114】

オレイン酸の処理時にPPAR γ_2 と14-3-3 β の結合が増加するが(図8A)、14-3-3 γ との結合は減少した(図8B)。現在までに知られている報告によると、PPAR-RXR複合体は、代謝調節および代謝関連遺伝子の発現に重要な役割をすることが知られている。したがって、PPARとRXRの複合体の形成において14-3-3 β と14-3-3 γ の過発現が影響を及ぼすか否かを確認した結果、PPAR γ_2 -RXR α の複合体の形成には影響を与えなかった(図8C)。すなわち、オレイン酸により活性が増加したPPAR γ_2 は、14-3-3 β との結合が増加し、14-3-3 γ との結合は減少し、PPAR γ_2 とRXR α の複合体の形成には関与しなかった。

30

【0115】

<実施例9> オレイン酸の処理による肝細胞の脂肪蓄積で14-3-3 β と14-3-3 γ の役割

40

HepG2細胞とマウス初代肝細胞を6-ウェルプレートに各ウェル当たり 4×10^5 細胞を播種した後、GFP-14-3-3 β DNA (1 μ g)またはGFP-14-3-3 γ DNA (1 μ g)およびsi-14-3-3 β (10 μ M、Santa Cruz)またはsi-14-3-3 γ (10 μ M、Santa Cruz)をE-fect ion plus reagent (Lugen)を利用してトランスフェクションした。DNAとE-fect ion plus reagentの比率は、1:2で使用し、方法は、製造社のマニュアルに沿って行った。トランスフェクションした後、オレイン酸(OA)200 μ Mを72時間処理し、当該細胞を氷冷PBSで洗浄した後、4%のパラホルムアルデヒドを利用して細胞を固定し、6時間室温で0.35%のオイルレッドO溶液で細胞を染色した。染色された細胞を1mLのイソプロパノールで脱色して、550nmの

50

波長でDU530分光光度計 (Beckman Instruments、Palo Alto、CA) を使用して分析した。

【0116】

オレイン酸の濃度依存的処理の結果、マウス初代肝細胞とHepG2細胞で脂肪蓄積が増加した (図9A)。14-3-3 β の過発現は、オレイン酸による脂肪蓄積を増加させ、14-3-3 γ の過発現は、脂肪蓄積を減少させた (図9B)。また、si-14-3-3 β を通じて14-3-3 β の発現を抑制する場合、脂肪蓄積が減少し、14-3-3 γ の発現抑制時に脂肪蓄積が増加した (図9C)。

【0117】

本実験の結果は、オレイン酸により増加したPPAR γ_2 の活性を14-3-3 β がさらに増加させて脂肪蓄積が増加し、14-3-3 γ は、PPAR γ_2 の活性を減少させて脂肪蓄積を減少させることを証明する。

10

【0118】

<実施例10>トリグリセリドの蓄積における14-3-3 β と14-3-3 γ の役割
トリグリセリド (中性脂肪) は、脂肪酸の一形態であり、これは、脂肪量の指標として用いられる。トリグリセリドを測定して生化学的な脂質検査を進めた。

【0119】

HepG2細胞とマウス初代肝細胞を6-ウェルプレートに各ウェル当たり 4×10^5 細胞を播種した後、GFP-14-3-3 β DNA (1 μ g) またはGFP-14-3-3 γ DNA (1 μ g) およびsi-14-3-3 β (10 μ M、Santa Cruz) またはsi-14-3-3 γ (10 μ M、Santa Cruz) をElectroporation plus reagent (Lugen) を利用してトランスフェクションした。DNAとElectroporation plus reagentの比率は、1:2で使用し、方法は、製造社のマニュアルに沿って行った。トランスフェクションした後、オレイン酸 (OA) 200 μ Mを72時間処理し、triglyceride colorimetric assay kit (Cayman Chemical) を利用してトリグリセリド量を測定した。当該細胞を氷冷PBSで洗浄した後、standard diluent assay reagentで細胞をかき取り、超音波破砕機で20回繰り返して細胞を破砕した後、酵素緩衝液 (enzyme buffer solution) と15分間反応させた後、550nmの波長でELISAリーダー (Bio-Rad Laboratories、Inc) を利用して測定した。

20

30

【0120】

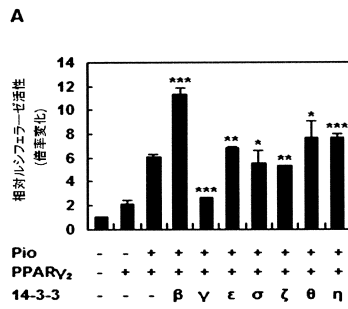
脂肪蓄積の結果と同様に、マウス初代肝細胞オレイン酸の処理時にトリグリセリドの蓄積が増加し、14-3-3 β の過発現によりトリグリセリドの蓄積がさらに増加し、14-3-3 γ の過発現は、トリグリセリドの蓄積を減少させた (図10A)。また、14-3-3 β の発現の抑制は、トリグリセリドの蓄積を減少させたのであり、14-3-3 γ の発現の抑制は、蓄積を増加させた (図10B)。

【0121】

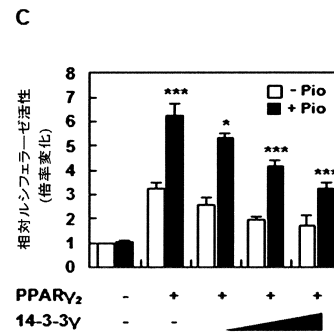
前記すべての結果に基づいて総合してみると、14-3-3 β と14-3-3 γ は、PPAR γ_2 のような残基に結合して、相異にPPAR γ_2 の活性を調節し、その調節は、互いに競争的に作用することが分かる。基礎条件では、PPAR γ_2 のS273残基に14-3-3 β と14-3-3 γ の結合が均衡を成す基礎代謝維持をし、脂肪酸が多い条件では、PPAR γ_2 のS273残基に対する14-3-3 β の結合が増加して、脂肪蓄積が増加し、これにより、非アルコール性脂肪肝に発展すると予想される。したがって、14-3-3 β と14-3-3 γ の発現量の調節を通じてPPAR γ_2 の活性を調節することによって、非アルコール性脂肪肝を予防または治療できると期待される。

40

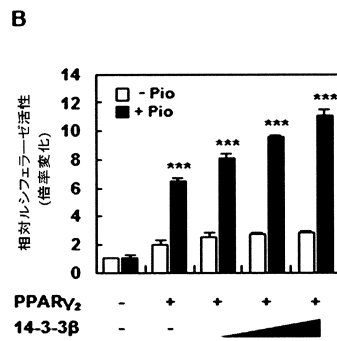
【図 1 a】



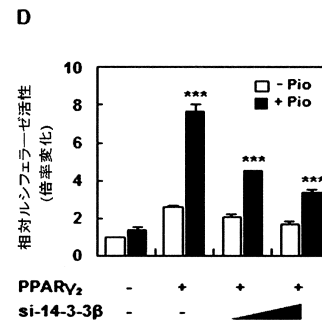
【図 1 c】



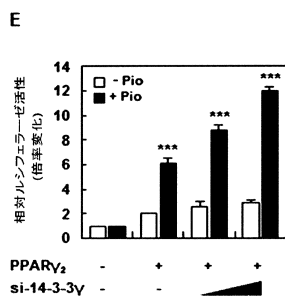
【図 1 b】



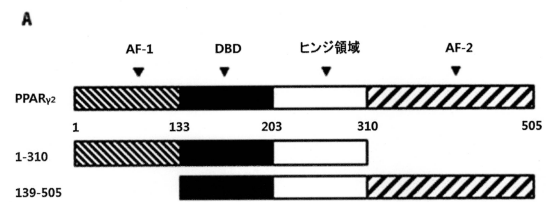
【図 1 d】



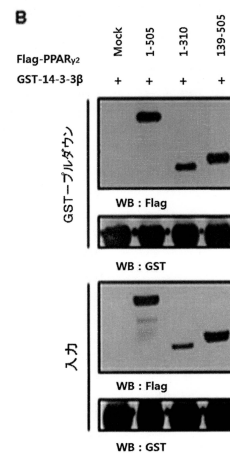
【図 1 e】



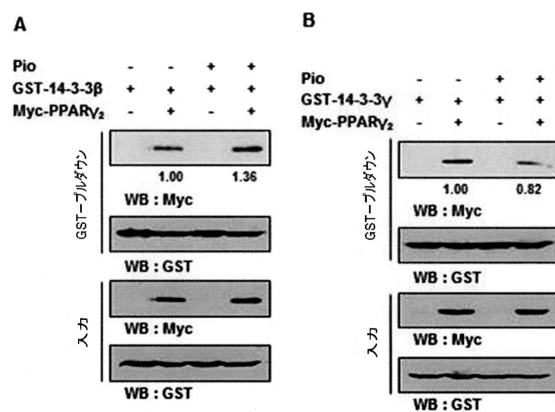
【図 3 a】



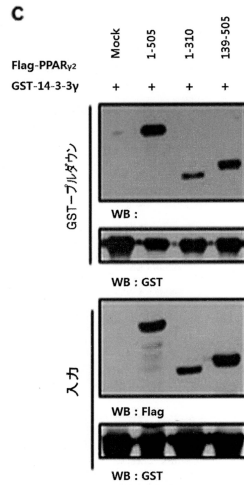
【図 3 b】



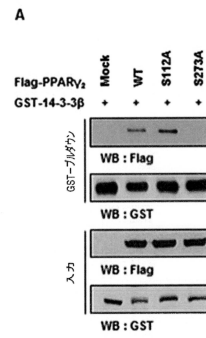
【図 2】



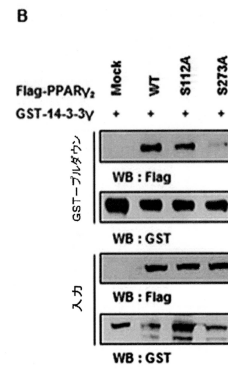
【図 3 c】



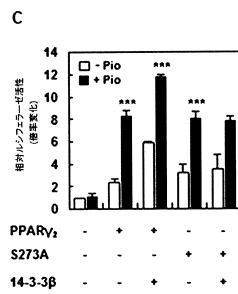
【図 4 a】



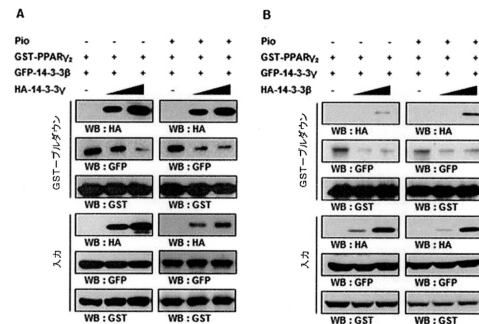
【図 4 b】



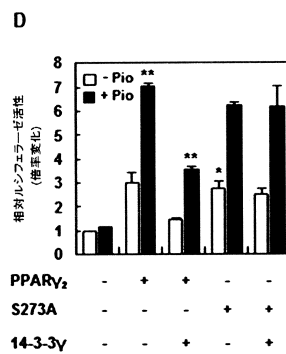
【図 4 c】



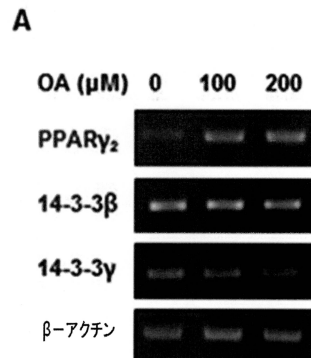
【図 5】



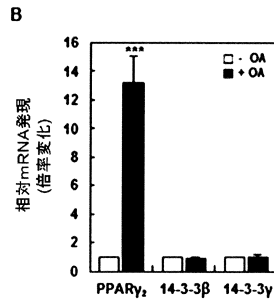
【図 4 d】



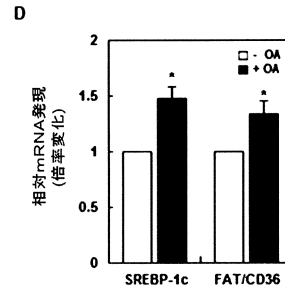
【図 6 a】



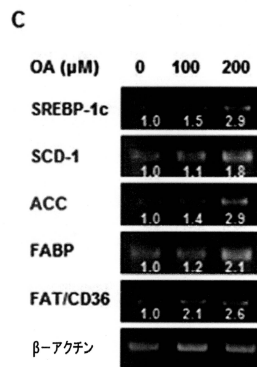
【図 6 b】



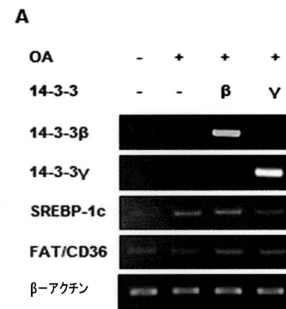
【図 6 d】



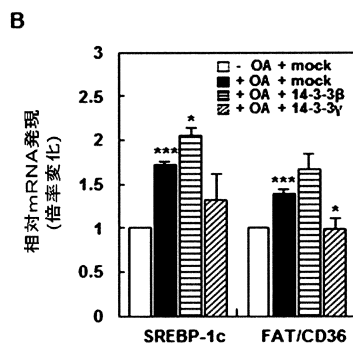
【図 6 c】



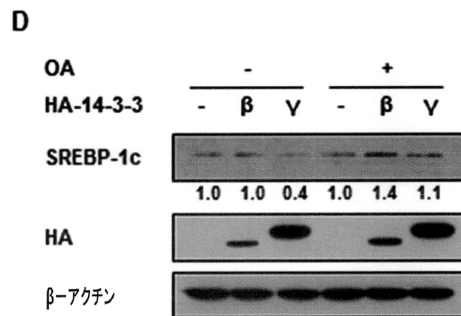
【図 7 a】



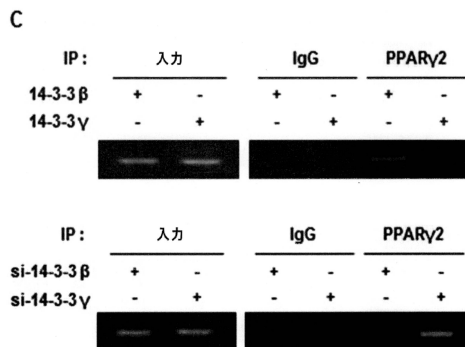
【図 7 b】



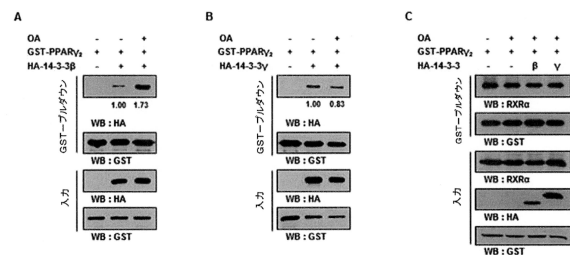
【図 7 d】



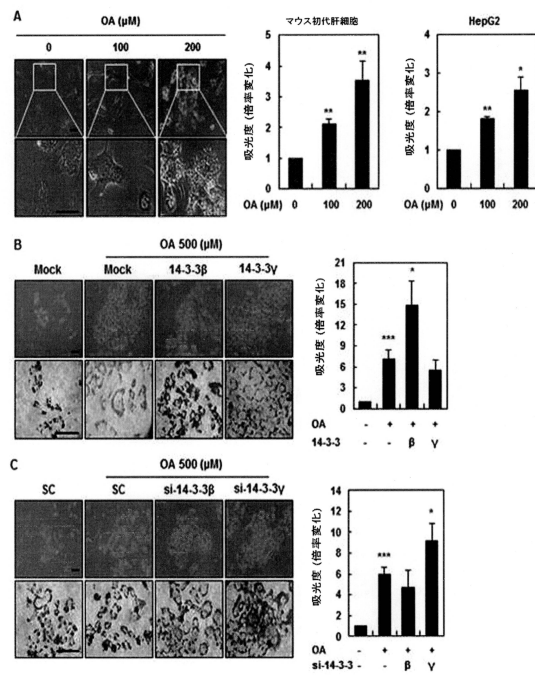
【図 7 c】



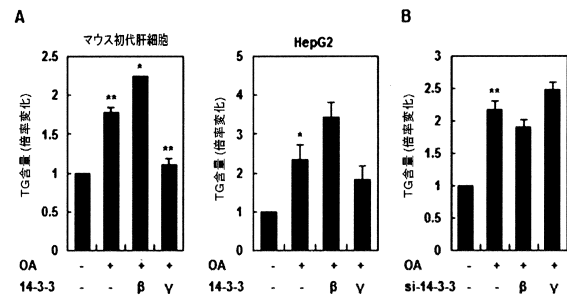
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【配列表】

0006524351000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 1/16 (2006.01) A 6 1 P 1/16
A 6 1 P 3/06 (2006.01) A 6 1 P 3/06

(74)代理人 100133400
弁理士 阿部 達彦

(72)発明者 ジェサン・コ
大韓民国・ソウル・07324・ヨンドゥンポグ・ヨイドンロー・3ーギル・10・101ー2
401・(ヨイドードン・ヨイド・シ・アパート)

(72)発明者 ソダム・パク
大韓民国・チョルラプクード・55085・チョンジューシ・ワンサング・ガンビョンロー・9
8・104ー1101・(サムチョンードン・1ーガ・シニル・ガンビョン・アパート)

審査官 常見 優

(56)参考文献 Thesis for the Digree of Master of Science, 2013.02, pp. i-63
Acta Pharmacologica Sinica, 2014, Vol. 35, No. 10, pp. 1285-1292

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G 0 1 N 3 3 / 0 0 - 3 3 / 1 5
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 3 / 4 4
A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)