

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 10 月 16 日(16.10.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/168153 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/077 (2010.01) *C12Q 1/02* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/060222
- (22) 国際出願日: 2014 年 4 月 8 日(08.04.2014)
- (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 2013-081113 2013 年 4 月 9 日(09.04.2013) JP
特願 2013-081114 2013 年 4 月 9 日(09.04.2013) JP
特願 2014-060555 2014 年 3 月 24 日(24.03.2014) JP
特願 2014-060556 2014 年 3 月 24 日(24.03.2014) JP
- (71) 出願人: 花王株式会社 (KAO CORPORATION)
[JP/JP]; 〒1038210 東京都中央区日本橋茅場町一丁目 1 4 番 1 0 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 陳 シュ(CHIN, Shu); 〒3213497 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内 Tochigi (JP). 下豊留 玲(SHIMOTOYODOME, Akira); 〒3213497 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内 Tochigi (JP). 大崎紀子(OSAKI, Noriko); 〒3213497 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内 Tochigi (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT

OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 8 号 沢の鶴人形町ビル Tokyo (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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: METHOD FOR CONTROLLING EXPRESSION OF GIP RECEPTOR

(54) 発明の名称: G I P 受容体の発現制御方法

(57) Abstract: To provide a system enabling efficient expression of a GIP receptor in an adipocyte, and a method for using said expression system. A method for enhancing expression of a GIP receptor in an adipocyte, including a step for activating HIF α in the adipocyte.

(57) 要約: 脂肪細胞において G I P 受容体を効率よく発現できる系、及び当該発現系の利用法の提供。
脂肪細胞において H I F α を活性化する工程を含む、脂肪細胞における G I P 受容体の発現増強方法。



WO 2014/168153 A1

明 細 書

発明の名称： G I P 受容体の発現制御方法

技術分野

[0001] 本発明は、脂肪細胞における G I P 受容体の発現制御及びその利用に関する。

背景技術

[0002] 消化管ホルモンの1つである G I P (g l u c o s e - d e p e n d e n t i n s u l i n o t r o p i c p o l y p e p t i d e) は、グルコース依存的に膵臓 β 細胞からインスリン分泌を促進し、血糖値の調節に寄与するインクレチンとして知られている。

[0003] 一方で、G I P はインクレチン作用以外に、脂肪組織、骨、神経細胞において様々な膵外作用を有することが報告されている（非特許文献1）。中でも、G I P と肥満の関連性が示唆されており、脂肪組織に対する G I P の作用は特に着目されている。すなわち、脂肪細胞には G I P 受容体（G I P R）が発現し、G I P R 欠損マウスにおいて高脂肪食負荷による肥満が認められないことが報告され（非特許文献2）、また、脂肪組織に対する G I P の作用として、L P L (l i p o p r o t e i n l i p a s e) 活性化を介した脂肪酸取り込みの促進（非特許文献3）、A k t を介した糖取り込みの亢進（非特許文献4）、脂肪蓄積亢進（非特許文献5）、炎症性の亢進（非特許文献6）等が報告されている。

[0004] したがって、脂肪細胞における G I P 受容体の発現や機能の解析を進めることは、肥満や炎症のメカニズム解明や受容体分子を標的とした抗肥満物質や抗炎症物質の開発につながり、重要である。

上記非特許文献6では、アデノウィスルベクターを用い、G I P 受容体を強制高発現させた脂肪細胞において、インターロイキン6（I L 6）の発現・産生が促進し、炎症反応が亢進することが開示されているが、アデノウィスルベクターを用い G I P 受容体を強制高発現させる系は、操作が煩雑であ

り、また非生理的であることから、受容体機能の解明やスクリーニング系として使用することには適さない。

[0005] 〔非特許文献1〕 Seino Y et al. GIP and GLP-1, the two incretin hormones: Similarities and differences. Journal of Diabetes Investigation (2010), 1, pp.8-23

〔非特許文献2〕 Yip RG. et al. Functional GIP receptors are present on adipocytes. Endocrinology (1998), 139(9), pp.4004-4007

〔非特許文献3〕 Miyawaki et al. Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. Nat Med. (2002), 8(7), pp.738-742

〔非特許文献4〕 Song DH et al. Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Enhances Adipocyte Development and Glucose Uptake in Part Through Akt Activation. Gastroenterology (2007), 133(6), pp.1796-1805

〔非特許文献5〕 Kim SJ et al. Activation of Lipoprotein Lipase by Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide in Adipocytes. JBC (2007), 282(12), pp. 8557-8567

〔非特許文献6〕 Nie Y et al. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide impairs insulin signaling via inducing adipocyte inflammation in glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor-overexpressing adipocytes. FASEB Journal (2012), 26(6), pp. 2383-2393

発明の概要

[0006] 本発明は、以下の1) - 4)に係るものである。

1) 脂肪細胞においてHIF α を活性化する工程を含む、脂肪細胞におけるGIP受容体の発現増強方法。

2) 脂肪細胞においてHIF α を活性化する工程を含む、脂肪細胞におけるGIP受容体の機能解析方法。

3) 脂肪細胞においてHIF α を活性化する工程を含む、GIP受容体発現制御物質のスクリーニング方法。

4) 脂肪細胞においてHIF α を活性化する工程を含む、GIP受容体親和性物質のスクリーニング方法。

図面の簡単な説明

[0007] [図1]低酸素環境下（擬似低酸素環境）でのGIP受容体の発現変化を示すグラフ。

[図2]低酸素環境下（低酸素培養）でのGIP受容体の発現変化を示すグラフ。

[図3]低酸素環境下（低酸素培養）でのGIP受容体の発現に及ぼすHIF α 発現抑制の影響を示すグラフ。左：GIP受容体の発現、右：HIF α の発現

[図4]接触法による、脂肪細胞（3T3-L1）とマクロファージ（Raw264）の共培養法（A）、及び対照培養法（B）を示す模式図。

[図5]マクロファージ共培養による脂肪細胞におけるGIP受容体の発現変化を示すグラフ。

[図6]マクロファージ共培養条件下における、GIPによるIL6遺伝子発現促進を示すグラフ。

[図7]マクロファージ共培養条件下における、GIPによるIL6分泌促進を示すグラフ。

[図8]マクロファージ共培養条件下でのGIP受容体の発現に及ぼすHIF α 発現抑制の影響を示すグラフ。左：GIP受容体の発現、右：HIF α の発現

[図9]マクロファージ共培養系を用いた、GIP受容体阻害剤によるIL6分泌抑制を示すグラフ。

[図10]マクロファージ共培養系を用いた、GIP受容体阻害剤によるIL6分泌抑制を示すグラフ。

[図11]3T3-L1細胞の分化に伴うGIP受容体の遺伝子発現を示すグラフ。

発明を実施するための形態

[0008] 本発明は、脂肪細胞においてG I P受容体を効率よく発現できる系、及び当該発現系の利用法を提供するものである。

[0009] 本発明らは、脂肪細胞におけるG I P受容体の発現について検討したところ、低酸素応答因子として知られているH I F α (Hypoxia-inducible factor 1 α) を活性化することにより、G I P受容体の発現が高まり且つ維持されることを見出した。

[0010] 本発明によれば、脂肪細胞におけるG I P受容体の発現を、アデノウイルスベクター等を用い、強発現させるような面倒な手間を掛けずに効率よく行うことができる。したがって、脂肪細胞におけるG I P受容体の発現解析や機能解析を容易に行うことができ、これにより肥満や炎症のメカニズム解明や受容体分子を標的とした抗肥満物質や抗炎症物質等の探索が容易となる。

[0011] 本発明において、G I P受容体 (G I P R) の発現は、脂肪細胞においてH I F α を活性化する工程を含むことによって行われる。

ここで、「脂肪細胞」は、脂肪細胞の性質（例えば、脂肪細胞特有の細胞内代謝を行い、脂肪滴を多量に蓄積する）をもち、G I P受容体を発現し得る細胞であればよく、ヒトやラットの初代培養細胞等の培養脂肪細胞の他、前駆脂肪細胞から分化誘導された細胞でもよい。前駆脂肪細胞としては、脂肪細胞に分化する能力を有する線維芽細胞として広く当該研究領域で使用されている3 T 3 - L 1細胞 (Journal of Biological Chemistry (1996), 271 (5), pp.2365-2368)、O b 1 7 7 1 (Biochemical and Biophysical Research Communications (1997), 238(2), pp.606-611) 等が挙げられる。各種の動物に由来する脂肪前駆細胞は市販されており、適当な販社から購入することができる。例えばマウス由来の3 T 3 - L 1細胞、3 T 3 - F 4 4 2 A細胞はD Sファーマバイオメディカル株式会社等から購入することができる。

[0012] 前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化誘導は、公知の方法により前駆脂肪細胞に分化誘導刺激を加えることで行うことができる。例えば、3 T 3 - L 1細胞を脂肪細胞に誘導する場合、ウシ胎児血清 (F B S)、I n s u l i n、I B M X (3-I s o b u t y l - 1 - m e t h y l x a n t h i n e)、D

ex (Dexamethasone) を含む脂肪細胞分化誘導カクテル等により当該前駆脂肪細胞の分化誘導を行うことができる (Wu Z. et al., Genes & Dev. (1992), 9, pp.2350-2363等)。

[0013] 前駆脂肪細胞から脂肪細胞へ分化誘導する場合、参考例 1 に示すように、3T3-L1 細胞の場合、GIP 受容体は分化初期及び成熟期において 2 相性の発現を示し、その発現量は成熟期 (分化誘導後 6 日目頃) において顕著に増加する。したがって、前駆脂肪細胞を分化誘導して用いる場合は、成熟期以降の細胞を用いるのが好ましく、例えば 3T3-L1 細胞であれば分化誘導後 6 日目以降、例えば 6～16 日目の細胞を用いるのが好ましい。

[0014] 「HIF α 」とは、細胞に対する酸素供給が不足状態に陥った際に誘導されるタンパク質であり、転写因子として機能する低酸素応答因子 (Hypoxia Inducible Factor、HIF) の α サブユニットである。本発明は、脂肪細胞において、当該HIF α を活性化する工程を含むものである。

[0015] ここで、HIF α の活性化とは、HIF α の分解を抑制し安定化すること、転写機能を活性化すること、HIF α の発現を亢進させること等が含まれる。

通常酸素環境下では、HIF α はプロリン水酸化酵素 (PHD) によって水酸化修飾を受け、水酸化修飾されたHIF α はユビキチン化され、プロテアソームで恒常的に分解されている。一方、低酸素条件下では、PHDは不活性化されていることから、HIF α の水酸化は抑制され、HIF α は安定化する (実験医学 2012 Vol.30 No.8, (5), 代謝、発生、免疫で動き出す低酸素応答システム)。したがって、本発明のHIF α を活性化する手段 (工程) としては、細胞を低酸素状態に置くことがその一態様として挙げられる。また別の態様として、HIF α 活性化剤を培地に添加すること (Yun, Z et al., Developmental Cell, (2002), Vol.2, 331-341、Hanson, ES et al., JBC (2003), Vol. 278, 40337-40342他) が挙げられる。

[0016] 細胞を低酸素状態に置く手段としては、例えば、細胞を低酸素環境下で培養することが挙げられる。

ここで、「低酸素環境下」とは、酸素が少ない環境下（「低酸素雰囲気下」）を意味し、「低酸素」とは、常酸素濃度（21%）を下回る酸素濃度をいう。低酸素環境下における酸素の濃度は、好ましくは10%以下、より好ましくは5%以下、更に好ましくは2%以下である。培養に供する細胞の生存を維持するため、最小限度の酸素濃度は必要である。斯かる観点から、酸素濃度は0.01%以上、好ましくは0.1%以上、より好ましくは0.5%以上、更に好ましくは1%以上とするのがよい。また、好適な酸素濃度は、0.01~10%、0.1~10%、0.5~10%、1~10%、0.01~5%、0.1~5%、0.5~5%、1~5%、0.01~2%、0.1~2%、0.5~2%、1~2%等である。

[0017] 低酸素雰囲気は、例えば、低酸素培養キット（BIONIX（スギヤマゲン））等を用いて、酸素濃度を上記の範囲に調節することにより実現できる。

[0018] HIF α 活性化剤としては、HIF α の分解を抑制し安定化させる、HIF α の転写活性機能を亢進させる及びHIF α の発現を誘導する、という機能を少なくとも一つ以上有する化合物又は因子が挙げられる。

斯かるHIF α 活性化剤は、夫々HIF α と相互作用する化合物、HIF α に結合する化合物、HIF α を修飾する化合物、或いはHIF α と相互作用する因子（例えば、HIF α が基質となる酵素）の何れであっても良い。化合物としては、ポリヌクレオチドやポリペプチド、抗体、他のタンパク質、炭水化物、脂肪、脂質、有機及び無機物質（例えば、小分子等）の何れでもよいが、小分子化合物が好ましい。

[0019] HIF α 活性化剤としては、例えば、2価のコバルトイオンやニッケルイオン、マンガンイオン、鉄のキレーターであるデフェロキサミンメシル酸塩（DFO）、オーフェナントロリン、ヒドロキシピリジノン等が挙げられる。

[0020] 斯かるHIF α 活性化剤の添加量は、HIF α の安定化或いは転写活性を亢進させる量であれば特に限定されない。

例えば、コバルトイオン、ニッケルイオン、マンガンイオンを用いる場合は、 $25\ \mu\text{M}$ ～ $200\ \mu\text{M}$ 、DFO、オーフェナントロリン、ヒドロキシピリジノンを用いる場合は、 $10\ \mu\text{M}$ ～ $200\ \mu\text{M}$ が好ましい。

[0021] 上記HIF α を活性化する工程において行われる脂肪細胞の培養は、培地として、任意の液体培養培地、好ましくは哺乳動物細胞用培地を使用できる。細胞培養培地としては、例えば、イーグル培地のような最小必須培地(MEM)、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)、RPMI 1640培地、199培地を用いることができる(H. Sakaue et al., Mol. Endocrinol. 11, 1552 (2004); Miki et al., Mol. Cell. Biol. (2001), 21, 2521; H. Sakaue et al., Genes & Dev. (2002), 16, 908を参照)。

[0022] これらの培地には、GIP受容体の発現に影響を与えない範囲で、適宜添加剤を添加することができる。

[0023] 培養の温度は 30°C ～ 40°C 、好ましくは 35°C ～ 37°C である。培地のpH値は、一般に6～8、好ましくはpH7～7.5である。

また、培養期間は、例えば1時間以上、48時間以下であり、好ましくは、4時間以上、24時間以下である。より好ましくは8時間以上、16時間以下である。

[0024] 培養後、培養物から脂肪細胞を回収する。回収方法は特に限定されないが、例えば、トリプシンを用いることが出来る。また、RNAを回収する際は、RNeasy mini 50 (QIAGEN) 付属のLysis Bufferを用いることが出来る。

[0025] 後記実施例に示すように、HIF α の活性化剤を添加して脂肪細胞を培養すると、脂肪細胞におけるGIP受容体の発現量が増加し、且つその発現は維持される(実施例1)。

また、脂肪細胞を低酸素環境下で培養すると、脂肪細胞におけるGIP受容体の発現量が増加し、且つその発現は維持され(実施例2)、この場合において、HIF α の発現を抑制すると、脂肪細胞におけるGIP受容体の発現量が抑制される(実施例3)。

したがって、脂肪細胞においてH I F α を活性化させる培養系は、脂肪細胞におけるG I P受容体の発現増強のために使用できる。また、脂肪細胞においてH I F α を活性化させる培養系は、G I P受容体の機能を解析するため、G I P受容体発現制御物質又はG I P受容体親和性物質をスクリーニングするために使用できる。

[0026] また、H I F α を活性化する手段（工程）の更なる別の態様として、脂肪細胞をマクロファージと共培養することが挙げられる。

本発明らは、脂肪細胞をマクロファージと共培養すると、脂肪細胞におけるG I P受容体の発現量が増加し、且つその発現は維持されることを見出した（実施例4）。そして、斯かる脂肪細胞とマクロファージの共培養によって誘導されるG I P受容体の発現は、H I F 1 α の制御下にあることが確認され（実施例5）、脂肪細胞とマクロファージの共培養系は、H I F α を活性化する手段となり得ると考えられる。

したがって、脂肪細胞とマクロファージの共培養系もまた、脂肪細胞におけるG I P受容体の発現増強のために使用できる。また、脂肪細胞とマクロファージの共培養系は、G I P受容体の機能を解析するため、G I P受容体発現制御物質又はG I P受容体親和性物質をスクリーニングするために使用できる。

[0027] ここで、マクロファージとしては、単球に由来するものであればよく、生物種は特に限定されず、例えばマウス、ラット、ヒト等の何れでもよい。好適には、例えば、マクロファージ様細胞として公知のRAW264細胞、RAW264.7細胞、腹腔マクロファージ（primary macrophages）等が挙げられる。

RAW264細胞、RAW264.7細胞は、DSファーマバイオメディカル株式会社等から購入可能である。また、腹腔マクロファージは、公知の調製方法、例えば、チオグリコネート含有液をマウスの腹腔内に投与し、2〜4日後に腹腔内を洗浄し、その洗浄液からマクロファージを回収することにより得ることができる。

[0028] マクロファージと脂肪細胞の共培養は、脂肪細胞とマクロファージが相互に接触する方法（接触法）、或いは脂肪細胞とマクロファージが同じ培養系に存在するが物質の行き来が可能な隔壁により隔てられ、細胞自体を物理的に接触させない方法（非接触法）の何れでもよい。非接触法としては、例えば、通常の細胞培養に用いられるカルチャーインサート等のフィルターを用いて両細胞を隔てて培養するトランスウェル法が挙げられ、本発明においては、マクロファージと脂肪細胞を個々に回収し、それぞれの遺伝子発現の解析を行うこと、また、接触による両細胞間での相互作用を回避する点から当該非接触法を用いるのが好ましい。

トランスウェル法において、フィルターの孔径は、 $0.1\mu\text{m}$ 以上、好ましくは $0.4\mu\text{m}$ 以上で、 $3\mu\text{m}$ 以下、好ましくは $1\mu\text{m}$ 以下である。このようなフィルターとしては、BD Falcon セルカルチャーインサート等を挙げることができる。脂肪細胞とマクロファージのどちらをフィルター上に培養しても構わないが、マクロファージをフィルター上で培養するのが好ましい。

[0029] 培養培地としては、任意の液体培養培地、好ましくは哺乳動物細胞用培地を使用できる。細胞培養培地としては、例えば、イーグル培地のような最小必須培地(MEM)、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)、RPMI 1640培地、199培地を用いることができる。(H. Sakaue et al., Mol. Endocrinol. (2004), 11, 1552.; Miki et al., Mol. Cell. Biol. (2001), 21, 2521.; H. Sakaue et al., Genes & Dev. (2002), 16, 908.を参照)

[0030] これらの培地には、GIP受容体の発現に影響を与えない範囲で、適宜添加剤を添加することができる。

[0031] 共培養の温度は $30^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $35^{\circ}\text{C}\sim 37^{\circ}\text{C}$ である。培地のpH値は、一般に $6\sim 8$ 、好ましくは $\text{pH } 7\sim 7.5$ である。

共培養は、通常、約5%の CO_2 雰囲気下で行われ、共培養期間は、例えば1時間以上、48時間以下であり、好ましくは、16時間以上、24時間以下である。

[0032] また、共培養開始時の脂肪細胞とマクロファージの細胞数の割合は、特に

限定されないが、例えば、50 : 1 ~ 1 : 1 であり、好ましくは20 : 1 ~ 1 : 1 であり、より好ましくは5 : 1 ~ 2 : 1 である。

[0033] 共培養後、共培養物から脂肪細胞を回収する。回収方法は特に限定されないが、例えば、トリプシンを用いることが出来る。また、RNAを回収する際は、RNeasy mini 50 (QIAGEN) 付属のLysis Bufferを用いることが出来る。

[0034] 本明細書において、GIP受容体の発現増強とは、脂肪細胞においてGIP受容体の存在量及び／又は産生量が増加することを意味する。当該GIP受容体の存在量又は産生量は、例えばGIP受容体遺伝子の発現量として測定でき、遺伝子発現量の測定は、公知の方法によりRNAを抽出し、cDNA合成後、定量的リアルタイムPCR法等を用いることにより行うことができる。

[0035] GIP受容体の機能としては、GIP受容体を介して引き起こされる各種細胞刺激活性や、糖取り込み促進作用、脂肪蓄積促進作用、脂肪分解抑制作用等が挙げられる。細胞刺激活性としては、例えば、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、細胞内タンパク質のリン酸化、炎症性サイトカイン（インターロイキン6（IL6）、TNF α 、MCP-1、PAI1）の産生等が挙げられる。

[0036] また、GIP受容体発現制御物質とは、脂肪細胞においてGIP受容体の発現量を増加又は減少させる物質を意味する。GIP受容体の発現量は、例えばGIP受容体遺伝子の発現量として測定できる。

[0037] また、GIP受容体親和性物質としては、GIP受容体に結合して受容体を活性化する物質、GIP受容体に結合するが受容体を活性化しない物質等が挙げられる。受容体活性としては、GIP受容体を介した細胞刺激活性、例えば、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、細胞内タンパク質のリン酸化、IL6、TNF α の産生等が挙げられる。

[0038] 脂肪細胞においてHIF α を活性化する工程を含むGIP受容体発現制御物質のスクリーニング方法は、具体的には以下の工程（a）～（c）を含む

ものである。

(a) 脂肪細胞を低酸素環境下で培養する工程、又は培地に H I F α 活性化剤を添加して脂肪細胞を培養する工程

(b) 被験物質を前記培養系に接触させる工程

(c) 工程 (b) において被験物質を接触させた場合における G I P 受容体の発現レベルと、被験物質を接触させない場合における G I P 受容体の発現レベルとを比較する工程

[0039] 工程 (a) の培養は、前記したとおりである。工程 (b) 被験物質の接触は、被験物質を共培養系へ、1 時間～24 時間程度接触させることが好ましい。工程 (c) では、G I P 受容体の発現レベルが評価されるが、当該 G I P 受容体発現レベルは、例えば G I P 受容体遺伝子の発現量を測定することにより行うことができる。発現レベルの比較は、例えば、有意差の有無に基づいて行われる。比較の結果、被験物質の非存在下に対して被験物質の存在下で、G I P 受容体発現レベルの抑制が確認できれば、その被験物質は G I P 受容体発現抑制物質となり得る。

[0040] また、脂肪細胞において H I F α を活性化する工程を含む G I P 受容体親和性物質のスクリーニング方法は、具体的には、例えば、以下の工程 (d) ～(f) を含むものである。

(d) 脂肪細胞を低酸素環境下で培養する工程、又は培地に H I F α 活性化剤を添加して脂肪細胞を培養する工程

(e) 被験物質及び G I P を前記培養系に接触させる工程

(f) 工程 (e) において被験物質の存在下で G I P を培養系へ接触させた場合における受容体活性と、被験物質の非存在下で G I P を培養系へ接触させた場合における受容体活性とを比較する工程

[0041] 工程 (d) の培養は、前記したとおりである。工程 (e) 被験物質及び G I P の添加は、培養系へ、1 時間～24 時間分程度接触させることが好ましい。工程 (f) では、被験物質及び G I P の存在下における受容体活性が測定される。同時に該受容体活性を、被験物質の非存在下の活性と比較する。

受容体活性の比較は、例えば、有意差の有無に基づいて行われる。比較の結果、被験物質の非存在下に対して被験物質の存在下で、活性の促進が確認できれば、その被験物質はG I P受容体作動物質、活性の抑制が確認できれば、その被験物質はG I P受容体阻害物質となり得る。

[0042] また、脂肪細胞とマクロファージの共培養を用いたG I P受容体発現制御物質のスクリーニング方法は、具体的には以下の工程（h）～（j）を含むものである。

（h）脂肪細胞をマクロファージと共培養する工程

（i）被験物質を前記共培養系に接触させる工程

（j）工程（i）において被験物質を接触させた場合におけるG I P受容体の発現レベルと、被験物質を接触させない場合におけるG I P受容体の発現レベルとを比較する工程

[0043] 工程（h）の共培養は、前記したとおりである。工程（i）被験物質の接触は、被験物質を共培養系へ、1時間～24時間程度接触させることが好ましい。工程（j）では、G I P受容体の発現レベルが評価されるが、当該G I P受容体発現レベルは、例えばG I P受容体遺伝子の発現量を測定することにより行うことができる。発現レベルの比較は、例えば、有意差の有無に基づいて行われる。比較の結果、被験物質の非存在下に対して被験物質の存在下で、G I P受容体発現レベルの抑制が確認できれば、その被験物質はG I P受容体発現抑制物質となり得る。

[0044] また脂肪細胞とマクロファージの共培養を用いたG I P受容体親和性物質のスクリーニング方法は、具体的には、例えば、以下の工程（k）～（m）を含むものである。

（k）脂肪細胞をマクロファージと共培養する工程

（l）被験物質及びG I Pを前記共培養系に接触させる工程

（m）工程（l）において被験物質の存在下でG I Pを共培養系へ接触させた場合における受容体活性と、被験物質の非存在下でG I Pを共培養系へ接触させた場合における受容体活性とを比較する工程

[0045] 工程（k）の共培養は、前記したとおりである。工程（l）被験物質及びGIPの添加は、共培養系へ、1時間～24時間程度接触させることが好ましい。工程（m）では、被験物質及びGIPの存在下における受容体活性が測定される。同時に該受容体活性を、被験物質の非存在下の活性と比較する。受容体活性の比較は、例えば、有意差の有無に基づいて行われる。比較の結果、被験物質の非存在下に対して被験物質の存在下で、活性の促進が確認できれば、その被験物質はGIP受容体作動物質、活性の抑制が確認できれば、その被験物質はGIP受容体阻害物質となり得る。

[0046] 上述した実施形態に関し、本発明においては以下の態様が開示される。

<1>脂肪細胞においてHIF α を活性化する工程を含む、脂肪細胞におけるGIP受容体の発現増強方法。

<2>脂肪細胞においてHIF α を活性化する工程を含む、脂肪細胞におけるGIP受容体の機能解析方法。

<3>脂肪細胞においてHIF α を活性化する工程を含む、GIP受容体発現制御物質のスクリーニング方法。

<4>脂肪細胞においてHIF α を活性化する工程を含む、GIP受容体親和性物質のスクリーニング方法。

<5>HIF α を活性化する工程が、低酸素環境下での培養である、<1>～<4>のいずれかの方法。

<6>HIF α を活性化する工程が、HIF α 活性化剤を培地に添加する培養である、<1>～<4>のいずれかの方法。

<7>HIF α を活性化する工程が、脂肪細胞とマクロファージの共培養である、<1>～<4>のいずれかの方法。

<8>以下の工程（a）～（c）を含む、<3>の方法。

（a）脂肪細胞を低酸素環境下で培養する工程、又は培地にHIF α 活性化剤を添加して脂肪細胞を培養する工程

（b）被験物質を前記培養系に接触させる工程

（c）工程（b）において被験物質を接触させた場合におけるGIP受容

体の発現レベルと、被験物質を接触させない場合におけるG I P受容体の発現レベルとを比較する工程

<9>以下の工程(d)～(f)を含む、<4>の方法。

(d) 脂肪細胞を低酸素環境下で培養する工程、又は培地にH I F α 活性化剤を添加して脂肪細胞を培養する工程

(e) 被験物質及びG I Pを前記培養系に接触させる工程

(f) 工程(e)において被験物質の存在下でG I Pを培養系へ接触させた場合における受容体活性と、被験物質の非存在下でG I Pを培養系へ接触させた場合における受容体活性とを比較する工程

<10>以下の工程(h)～(j)を含む、<3>の方法。

(h) 脂肪細胞をマクロファージと共培養する工程

(i) 被験物質を前記共培養系に接触させる工程

(j) 工程(i)において被験物質を接触させた場合におけるG I P受容体の発現レベルと、被験物質を接触させない場合におけるG I P受容体の発現レベルとを比較する工程

<11>以下の工程(k)～(m)を含む、<4>の方法。

(k) 脂肪細胞をマクロファージと共培養する工程

(l) 被験物質及びG I Pを前記共培養系に接触させる工程

(m) 工程(l)において被験物質の存在下でG I Pを共培養系へ接触させた場合における受容体活性と、被験物質の非存在下でG I Pを共培養系へ接触させた場合における受容体活性とを比較する工程

<12>脂肪細胞が、3 T 3 - L 1細胞、3 T 3 - F 4 4 2 A細胞及びO b 1 7 7 1細胞から選ばれる前駆脂肪細胞から分化誘導された細胞である、<1>～<11>のいずれかの方法。

<13>脂肪細胞として、3 T 3 - L 1細胞を分化誘導後、6～16日目の細胞を用いる<1>～<12>のいずれかの方法。

<14>H I F α 活性化剤が、好ましくは2価のコバルトイオン、ニッケルイオン、マンガニオン及びデフェロキサミンメシル酸塩、O - フェナント

ロリン、ヒドロキシピリジノンから選ばれる一種以上である、＜6＞、＜8＞及び＜9＞のいずれかの方法。

＜15＞マクロファージが、RAW264細胞、RAW264.7細胞又は腹腔マクロファージである、＜7＞、＜10＞及び＜11＞のいずれかの方法。

実施例

[0047] 実施例1 低酸素環境下でのGIPRの発現(1)

(1) 分化誘導

3T3-L1 (DS ファーマバイオメディカル株式会社)をDMEM培地(10%FBS, High glucose, Sigma)にて37℃、5%CO₂存在下で継代培養した後、24well plateに1×10⁵ cells/well、若しくは6well plateに1×10⁶ cells/wellで播種した。2日後、Insulin (Sigma) : 10 µg/ml, IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine, Sigma) : 0.5 mM, Dex (Dexamethasone, Sigma) : 1 µMを含む上記DMEM培地に交換し、分化誘導を開始した。更に2日後Insulin : 5 µg/mlを含むDMEM培地に交換し、2日間培養した。その後、DMEM培地にて2日毎に培地交換をし、分化誘導開始から合計6日間培養した。

[0048] (2) 低酸素環境下での培養

分化誘導後6日目の3T3-L1に、HIFα活性化剤である塩化コバルトII (CoCl₂, Wako)、又はデフェロキサミンメシル酸塩 (DFO, Sigma) (50, 100, 200 nM)を含む培地で培養した。24時間後、以下の方法により、3T3-L1におけるGIPRの遺伝子発現レベルの測定を行った。

[0049] (3) 遺伝子発現量の測定

培養後の3T3-L1より、RNeasy mini 50 (QIAGEN)を用いてRNAを抽出した。cDNA合成(High capacit

y RNA-to-cDNA Kit, Applied Biosystems) 後、定量的リアルタイムPCR (Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイムPCRシステム) により遺伝子の発現定量を行い、内部標準として36B4を用い、各遺伝子の発現量を補正した。なお、プライマーはApplied BiosystemsのTaqman Gene Expression assaysのGIP受容体(Mm01316344__m1)、36B4(Mm00725448__s1)を用いた。

[0050] (4) 結果

その結果、図1に示すように、CoCl₂又はDFO (50, 100, 200 nM) 濃度依存的にGIPRの発現が亢進した。

[0051] 実施例2 低酸素培養によるGIPR発現 (2)

実施例1と同様の方法により3T3-L1を分化誘導し、分化誘導後6日目の3T3-L1をBIONIX (スギヤマゲン) 低酸素培養キットを用いて、脱酸素剤により酸素濃度を2%以下に維持し、37℃、5%CO₂インキュベータにて培養した。また、対照培養としては、低酸素状態としない同実験系で行った。24時間後、実施例1と同様に、3T3-L1におけるGIPRの遺伝子発現レベルの測定を行った。

その結果、図2に示すように、低酸素状態である2%O₂により、GIPRの発現が亢進した。

[0052] 実施例3 HIF1 α siRNAがGIPRの発現に及ぼす影響

(1) siRNAの導入

分化誘導後6日目の3T3-L1に対し、Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を用いてnegative control siRNA (Silencer(R) Select Negative Control #1 siRNA; Applied Biosystems)、あるいはHIF1 α に対するsiRNA (FlexiTube GeneSolution GS15251 for HIF1 α

; Qiagen) の導入を行った。これらの操作は添付のプロトコルに従い、Reverse Transfection法で行った。なお、各ウェルへの細胞播種数は 5×10^4 / well (24ウェルプレート) とし、siRNA濃度は10 nMとした。

[0053] (2) HIF1 α siRNAがGIPRの発現に及ぼす影響

HIF1 α に対するsiRNAを用いて、GIPRの発現に及ぼす影響を検討した。その結果、HIF1 α を70% Knock down (KD) した条件において、実施例2と同様の方法で低酸素培養した。その結果、低酸素培養(2% O₂)によって増強されるGIPRの発現が著明に低下した(図3)。これらの結果から、低酸素によって誘導されるGIPRはHIF1 α の制御下にあることが示唆された。

[0054] 実施例4 (1) 脂肪細胞とマクロファージの共培養によるGIPRの発現

3T3-L1 (DS ファーマバイオメディカル株式会社) をDMEM培地(10% FBS, High glucose, Sigma) にて37℃、5% CO₂存在下で継代培養した後、24 well plateに 1×10^5 cells / well、若しくは6 well plateに 1×10^6 cells / wellで播種した。2日後、Insulin (Sigma) : 10 μ g / ml, IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthine, Sigma) : 0.5 mM, Dex (Dexamethasone, Sigma) : 1 μ Mを含む上記DMEM培地に交換し、分化誘導を開始した。更に2日後Insulin : 5 μ g / mlを含むDMEM培地に交換し、2日間培養した。その後、DMEM培地にて2日毎に培地交換をし、分化誘導開始から合計6日間培養した。

マクロファージ様細胞(Raw264, DS ファーマバイオメディカル株式会社) をDMEM培地(10% FBS, High glucose, Sigma) にて37℃、5% CO₂存在下で継代培養した後、0.4 μ m孔を有する多孔質膜からなる24 well plate、若しくは6 well plate用トランスウェルインサート(BDファルコン) に $1 \times 10^4 \sim 1$

$\times 10^5$ cells/well で播種し、24時間培養した。

分化誘導後6日目の3T3-L1と上記24時間培養したRaw264を図4(A)に示すようにトランスウェルを用いた非接触法により共培養を行った。24時間共培養後、下層ウェルの3T3-L1を採取し、下記(2)の方法で、GIPRの遺伝子発現レベルの測定を行った。なお、対照培養法として、図4(B)に示すように、3T3-L1とRaw264をそれぞれ単独で培養し、同様に遺伝子発現レベルの測定を行った。

[0055] (2) 遺伝子発現量の測定

共培養した3T3-L1より、RNeasy mini 50 (QIAGEN) を用いてRNAを抽出した。cDNA合成 (High capacity RNA-to-cDNA Kit, Applied Biosystems) 後、定量的リアルタイムPCR (Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイムPCRシステム) により遺伝子の発現定量を行い、内部標準として36B4を用い、各遺伝子の発現量を補正した。なお、プライマーはApplied BiosystemsのTaqman Gene Expression assaysのGIP受容体(Mm01316344__m1)、36B4(Mm00725448__s1)を用いた。

[0056] (3) 結果

図5に示すように、共培養により3T3-L1におけるGIPRの発現が亢進した。また、遺伝子発現亢進の程度は、Raw264の細胞数に依存した。

[0057] 実施例5 GIPRの機能解析

実施例4の方法により発現されたGIPRの機能をIL6の発現を指標として確認した。

(1) IL6 遺伝子発現量

実施例4と同様の方法により、3T3-L1とRaw264を24時間共培養した後、GIP、GIP+insulinを含む培地で刺激し、1, 3

、6時間後に下層ウェルの3T3-L1を採取し、cDNA合成(High capacity RNA-to-cDNA Kit, Applied Biosystems)後、定量的リアルタイムPCR(Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイムPCRシステム)により遺伝子の発現定量を行い、36B4による補正を行った。なお、プライマーはApplied BiosystemsのTaqman Gene Expression assaysのIL6(Mm00446190_m1)を用いた。その結果、図6に示すようにGIPはインスリン存在下、非存在下いずれにおいても刺激後1時間においてIL6の遺伝子発現を亢進した。

[0058] (2) IL6産生量

実施例4と同様の方法により、3T3-L1とRaw264を24時間共培養した後、GIP、GIP+insulinを含む培地で刺激し、3時間後に培養上清を回収し、市販の固相酵素免疫検定法(Mouse IL6 ELISA MAX, Biolegend)を用いて、上清中IL6の定量を行った。

その結果、図7に示すようにGIPによりIL6の産生が亢進した。また、インスリン共存下においても、GIP刺激によりIL6の産生が亢進した。

[0059] 実施例6 HIF1 α siRNAがGIPRの発現に及ぼす影響

(1) siRNAの導入

分化誘導後6日目の3T3-L1に対し、Lipofectamine RNAiMAX(Invitrogen)を用いてnegative control siRNA(Silencer(R) Select Negative Control #1 siRNA; Applied Biosystems)、あるいはHIF1 α に対するsiRNA(FlexiTube GeneSolution GS15251 for HIF1 α ; Qiagen)の導入を行った。これらの操作は添付のプロトコルに従

い、Revers Transfection法で行った。なお、各ウェルへの細胞播種数は 5×10^4 / well (24ウェルプレート)とし、siRNA濃度は10 nMとした。

[0060] (2) HIF1 α siRNAがGIPRの発現に及ぼす影響

HIF1 α に対するsiRNAを用いて、GIPRの発現に及ぼす影響を検討した。その結果、HIF1 α を70% Knock down (KD)した条件において、実施例4と同様の方法でマクロファージとの共培養した。その結果、マクロファージとの共培養 (■Co-culture) によって増強されるGIPRの発現が著明に低下した (図8)。これらの結果から、脂肪細胞とマクロファージの共培養によって誘導されるGIPRはHIF1 α の制御下にあることが示唆された。

[0061] 実施例7 GIP受容体阻害物質のIL6産生阻害作用

実施例4と同様の方法により、3T3-L1とRaw264を24時間共培養した後、GIPにより誘導される炎症性サイトカイン (IL6) の産生を抑制する物質として公知 (Timper, K et al. Glucose-dependent insulino tropic polypeptide induces cytokine expression, lipolysis, and insulin resistance in human adipocytes. Am J Physiol Endocrinol Metab (2013), 304, E1-E13) のH-89 (Cell Signaling Technology Japan) 20 nMを1時間前処理した後、GIP 100 nMを含む培地で刺激し、1時間後に下層ウェルの3T3-L1を採取し、IL6の遺伝子発現レベルの測定を行った。

その結果、図9に示すように、H-89により、GIPによるIL6の発現亢進が有意に阻害された。これより、本発明の共培養系は、H-89のようなGIP受容体阻害物質をスクリーニングするための系として有用であることが確認された。

[0062] 実施例8 GIP受容体親和性物質の評価

実施例7と同様の方法により、分化誘導後6日目の3T3-L1とRaw264を24時間共培養した後、実施例7で用いたH-89 (Cell S

ignaling Technology Japan) 20 nM、オウゴンエキス0.005%、ジンジャーエキス0.005%を添加した培地にて1 h前処理した後、GIP 100 nMを含む培地で刺激し、1 時間後に下層ウェルの3 T3-L1を採取し、IL6の遺伝子発現レベルの測定を行った。

その結果、図10に示すように、オウゴンエキス及びジンジャーエキスは、H-89と同様に、GIPによるIL6の発現亢進を有意に阻害した。また、結果は各剤を添加した刺激培地に対する相対値で示している。

したがって、オウゴンエキス及びジンジャーエキスは、GIP受容体阻害物質であると評価できる。

[0063] 参考例1

3 T3-L1を実施例1の方法に従い、分化誘導させ、分化誘導後0 min、30 min、2 h、4 h、8 h、24 h、2 day、3 day、4 day、6 day、8 day、12 day、16 dayにおいて上記方法によりRNA抽出、GIP受容体の遺伝子発現解析を行った。

その結果、3 T3-L1細胞の分化に伴い、GIP受容体は分化後2 h、6日目に2相性の発現を示すことが確認された（図11）。

請求の範囲

- [請求項1] 脂肪細胞においてH I F α を活性化する工程を含む、脂肪細胞におけるG I P受容体の発現増強方法。
- [請求項2] 脂肪細胞においてH I F α を活性化する工程を含む、脂肪細胞におけるG I P受容体の機能解析方法。
- [請求項3] 脂肪細胞においてH I F α を活性化する工程を含む、G I P受容体発現制御物質のスクリーニング方法。
- [請求項4] 脂肪細胞においてH I F α を活性化する工程を含む、G I P受容体親和性物質のスクリーニング方法。
- [請求項5] H I F α を活性化する工程が、低酸素環境下での培養である、請求項1～4の何れか1項記載の方法。
- [請求項6] H I F α を活性化する工程が、H I F α 活性化剤を培地に添加する培養である、請求項1～4の何れか1項記載の方法。
- [請求項7] H I F α を活性化する工程が、脂肪細胞とマクロファージの共培養である、請求項1～4の何れか1項記載の方法。
- [請求項8] 以下の工程（a）～（c）を含む、請求項3記載の方法。
（a）脂肪細胞を低酸素環境下で培養する工程、又は培地にH I F α 活性化剤を添加して脂肪細胞を培養する工程
（b）被験物質を前記培養系に接触させる工程
（c）工程（b）において被験物質を接触させた場合におけるG I P受容体の発現レベルと、被験物質を接触させない場合におけるG I P受容体の発現レベルとを比較する工程
- [請求項9] 以下の工程（d）～（f）を含む、請求項4記載の方法。
（d）脂肪細胞を低酸素環境下で培養する工程、又は培地にH I F α 活性化剤を添加して脂肪細胞を培養する工程
（e）被験物質及びG I Pを前記培養系に接触させる工程
（f）工程（e）において被験物質の存在下でG I Pを培養系へ接触させた場合における受容体活性と、被験物質の非存在下でG I Pを

培養系へ接触させた場合における受容体活性とを比較する工程

[請求項10]

以下の工程（h）～（j）を含む、請求項3記載の方法。

（h）脂肪細胞をマクロファージと共培養する工程

（i）被験物質を前記共培養系に接触させる工程

（j）工程（i）において被験物質を接触させた場合におけるG I P受容体の発現レベルと、被験物質を接触させない場合におけるG I P受容体の発現レベルとを比較する工程

[請求項11]

以下の工程（k）～（m）を含む、請求項4記載の方法。

（k）脂肪細胞をマクロファージと共培養する工程

（l）被験物質及びG I Pを前記共培養系に接触させる工程

（m）工程（l）において被験物質の存在下でG I Pを共培養系へ接触させた場合における受容体活性と、被験物質の非存在下でG I Pを共培養系へ接触させた場合における受容体活性とを比較する工程

[請求項12]

脂肪細胞が、3 T 3 - L 1 細胞、3 T 3 - F 4 4 2 A 細胞及びO b 1 7 7 1 細胞から選ばれる前駆脂肪細胞から分化誘導された細胞である、請求項1～11のいずれか1項記載の方法。

[請求項13]

脂肪細胞として、3 T 3 - L 1 細胞を分化誘導後、6～16日目の細胞を用いる請求項1～12のいずれか1項記載の方法。

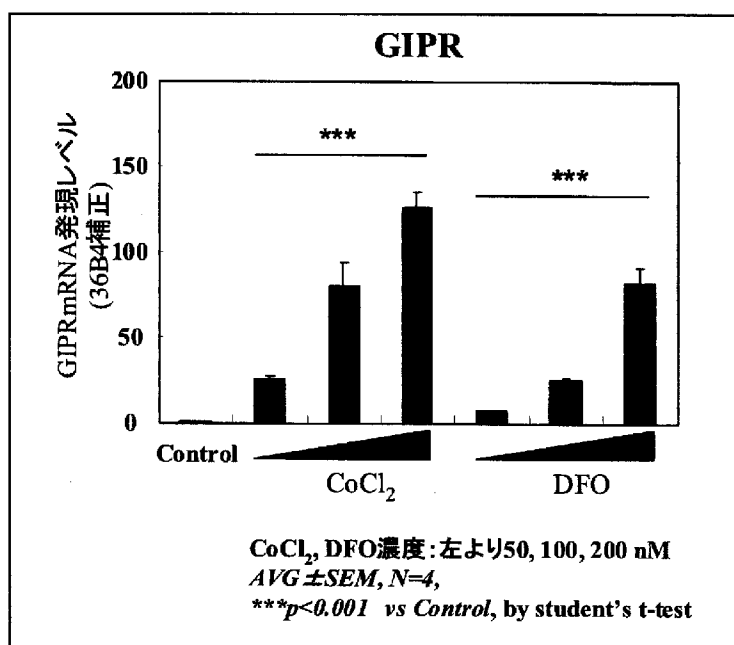
[請求項14]

H I F α 活性化剤が、2価のコバルトイオン、ニッケルイオン、マンガニオン及びデフェロキサミンメシル酸塩、オーフェナントロリン、ヒドロキシピリジノンから選ばれる1種以上である、請求項6、8及び9のいずれか1項記載の方法。

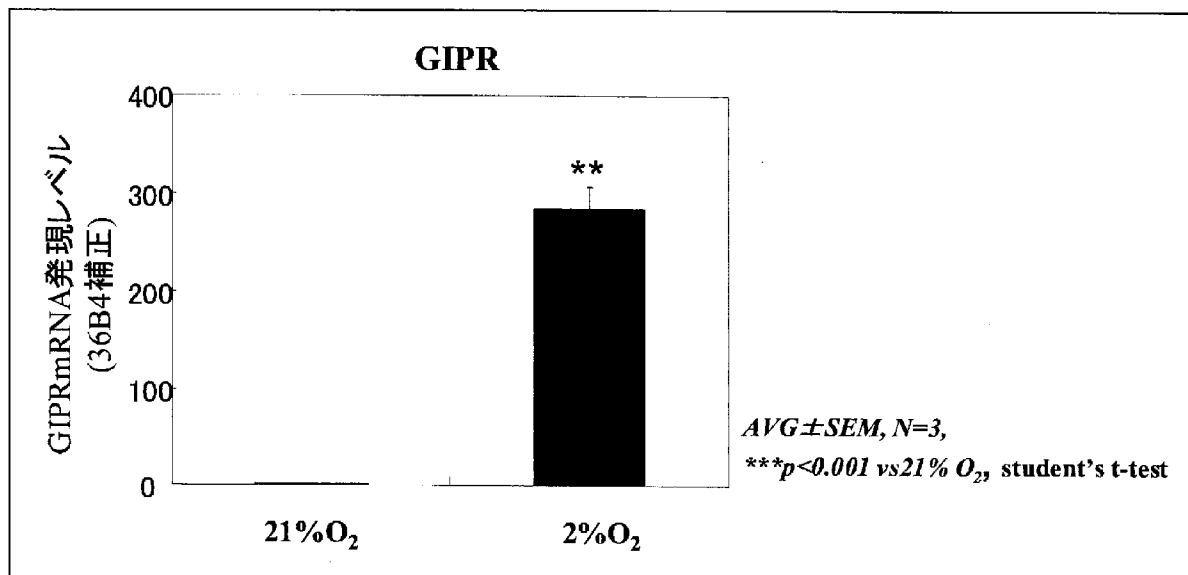
[請求項15]

マクロファージが、R A W 2 6 4 細胞、R A W 2 6 4 . 7 細胞又は腹腔マクロファージである、請求項7、10及び11のいずれか1項記載の方法。

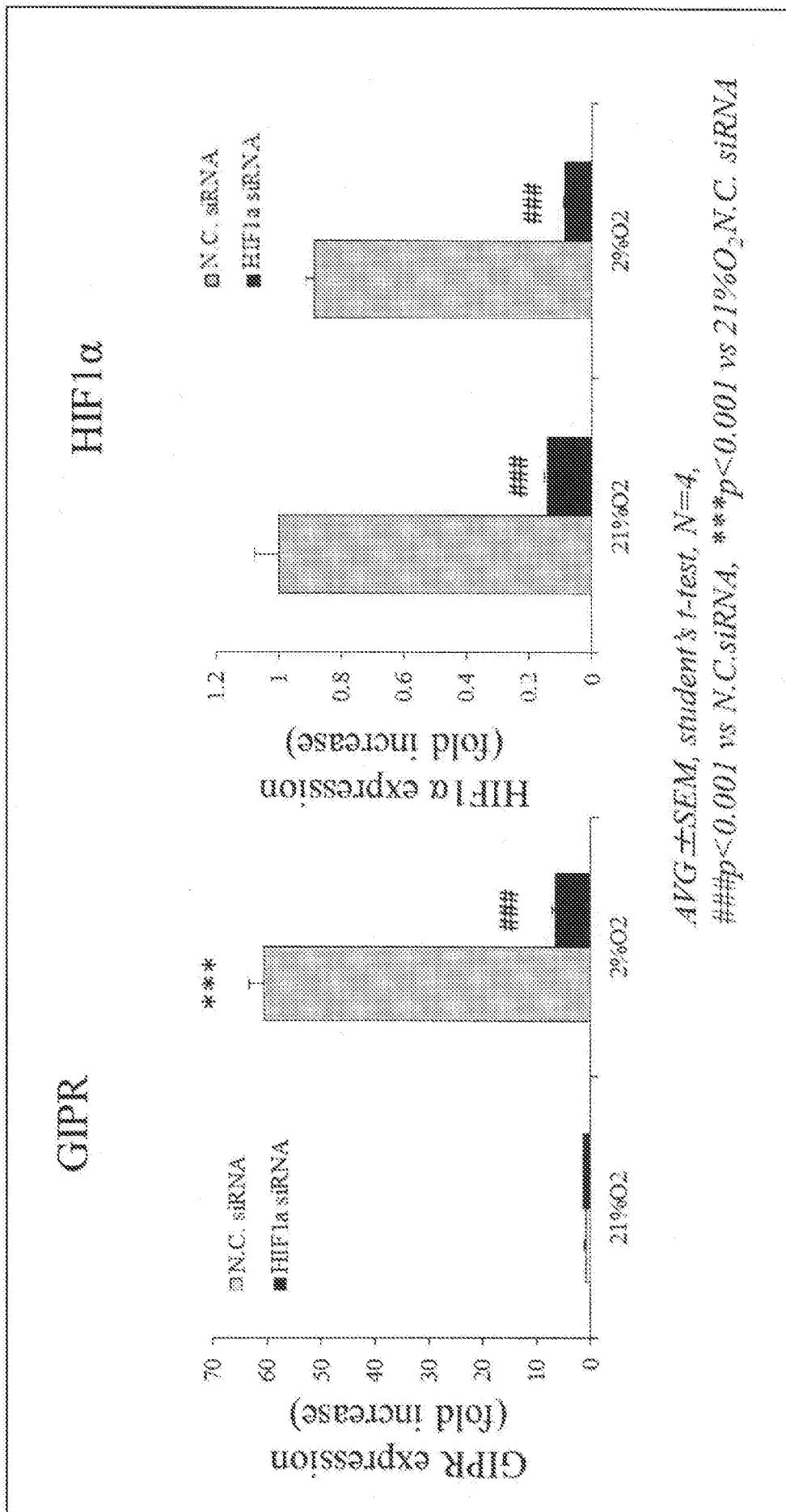
[図1]



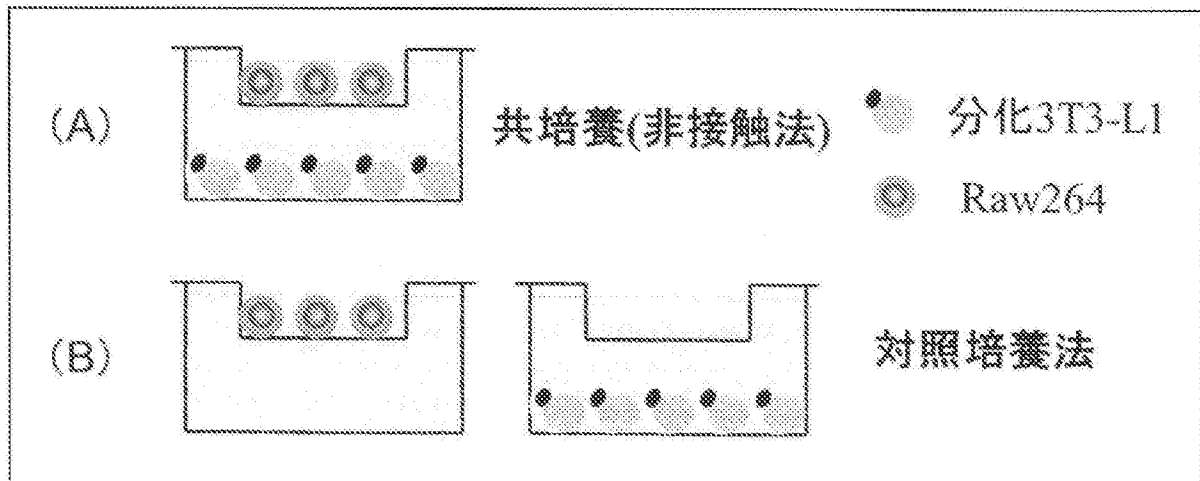
[図2]



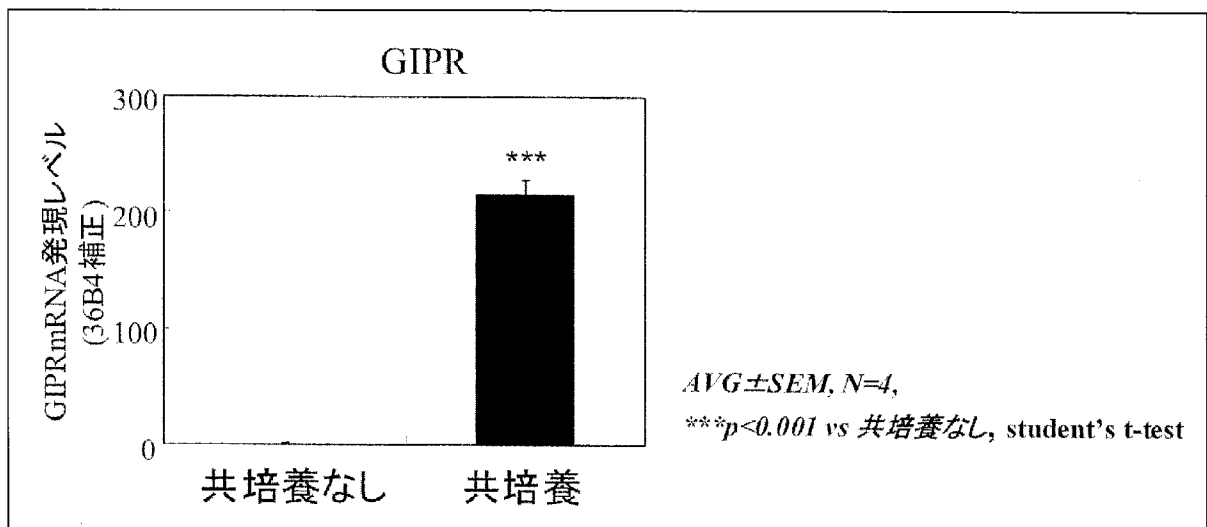
[図3]



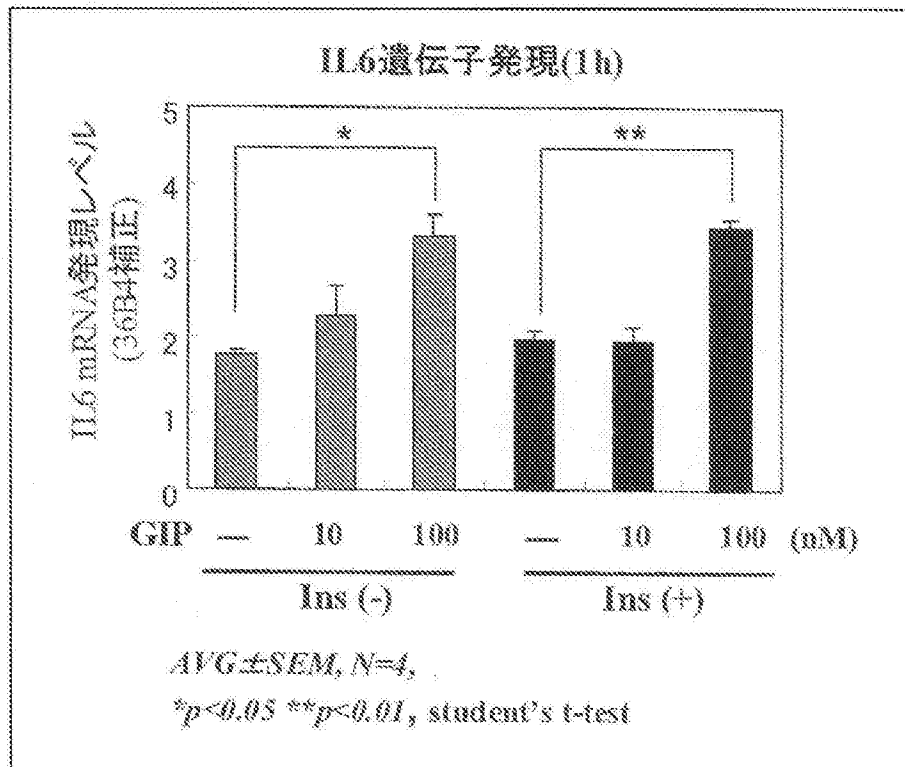
[図4]



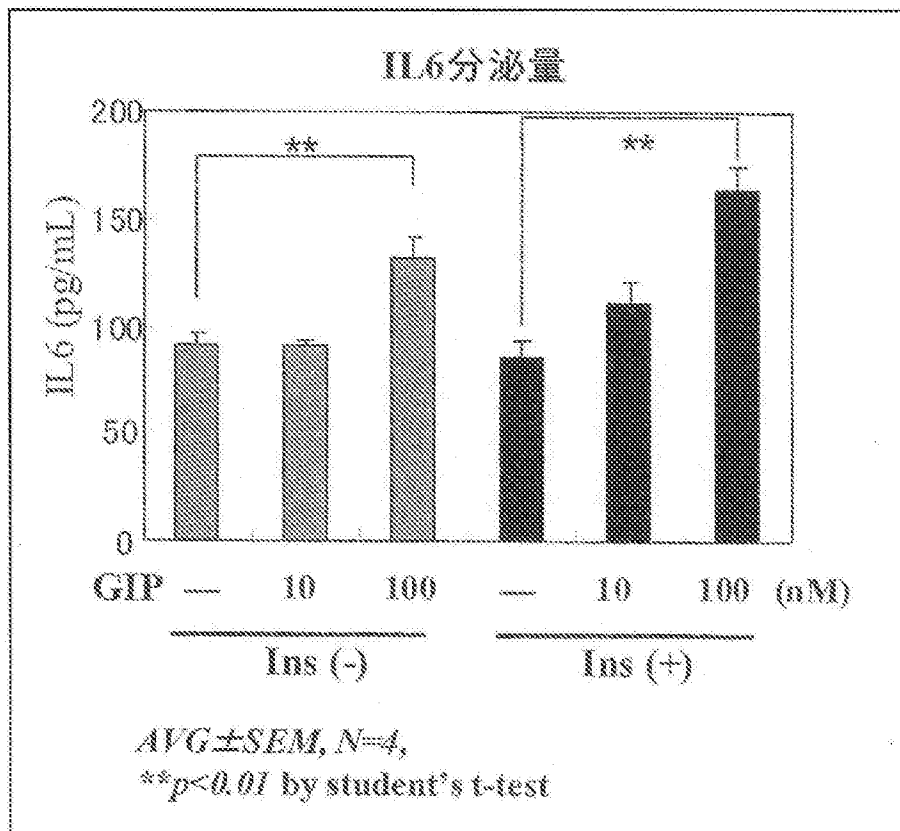
[図5]



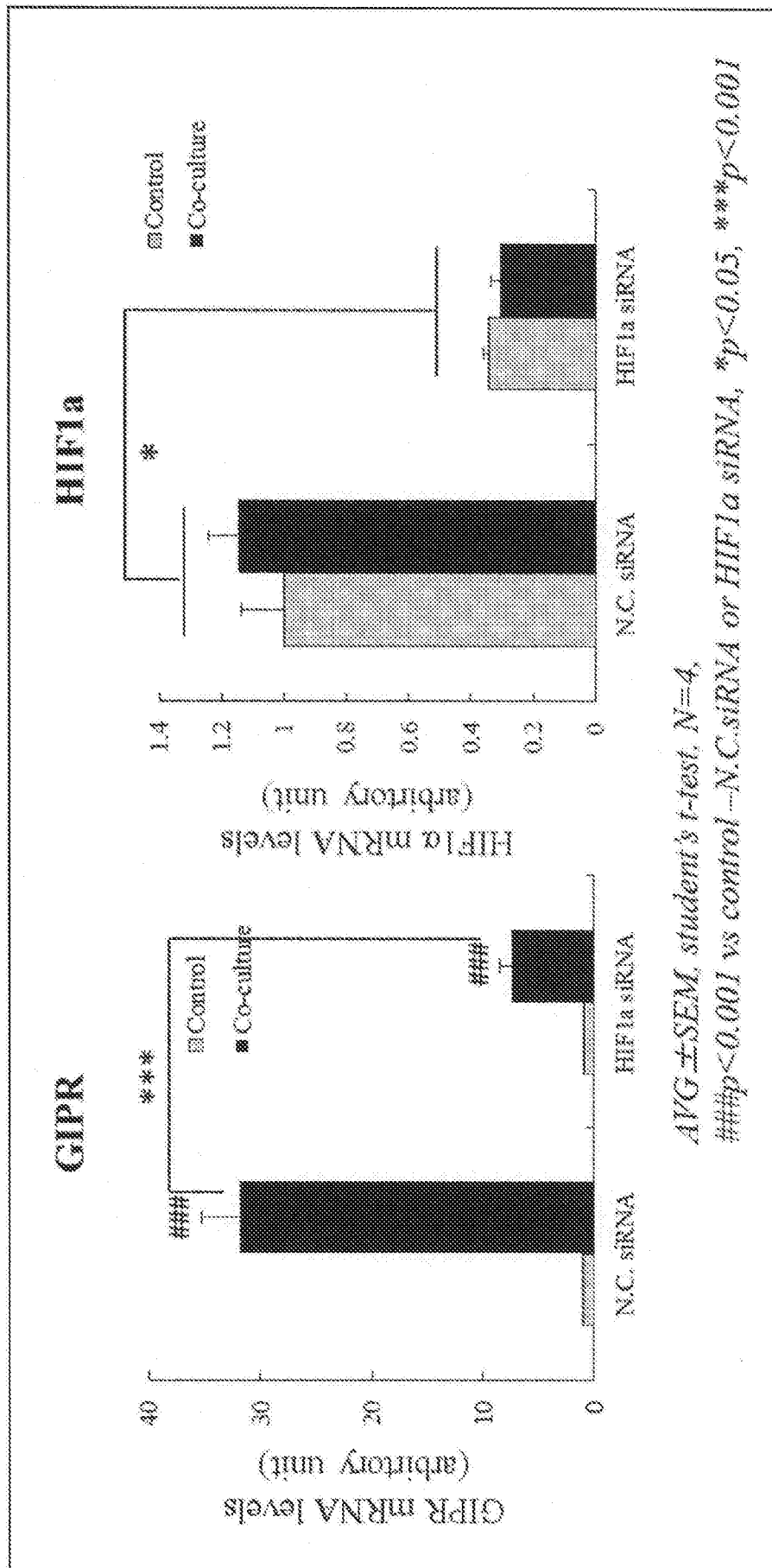
[図6]



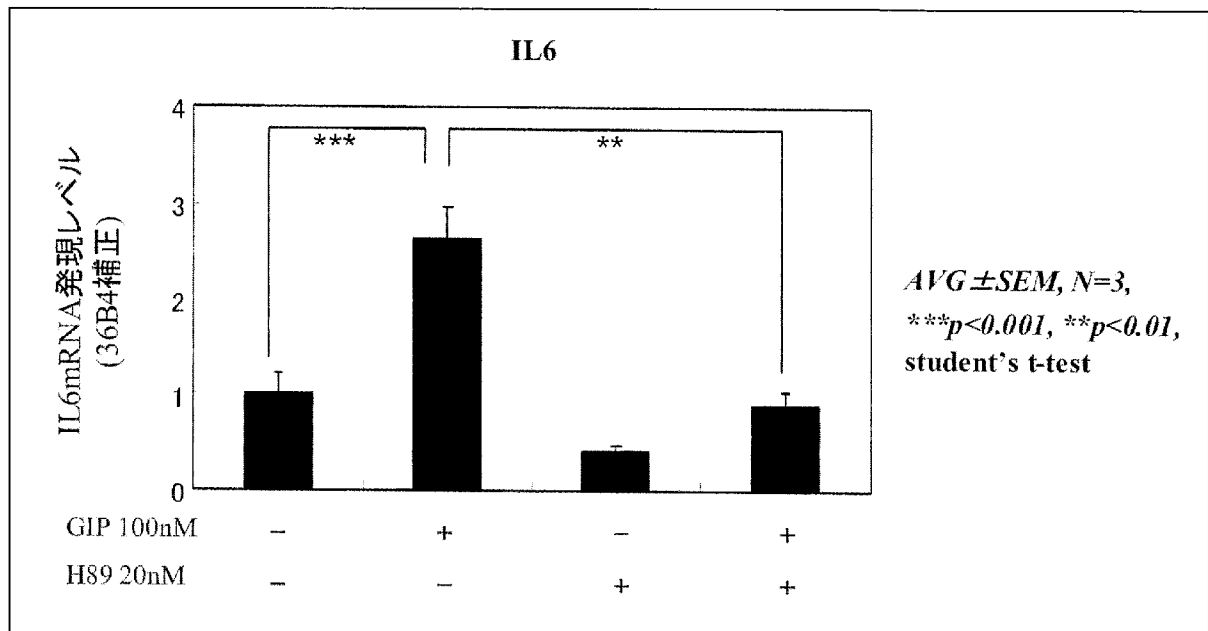
[図7]



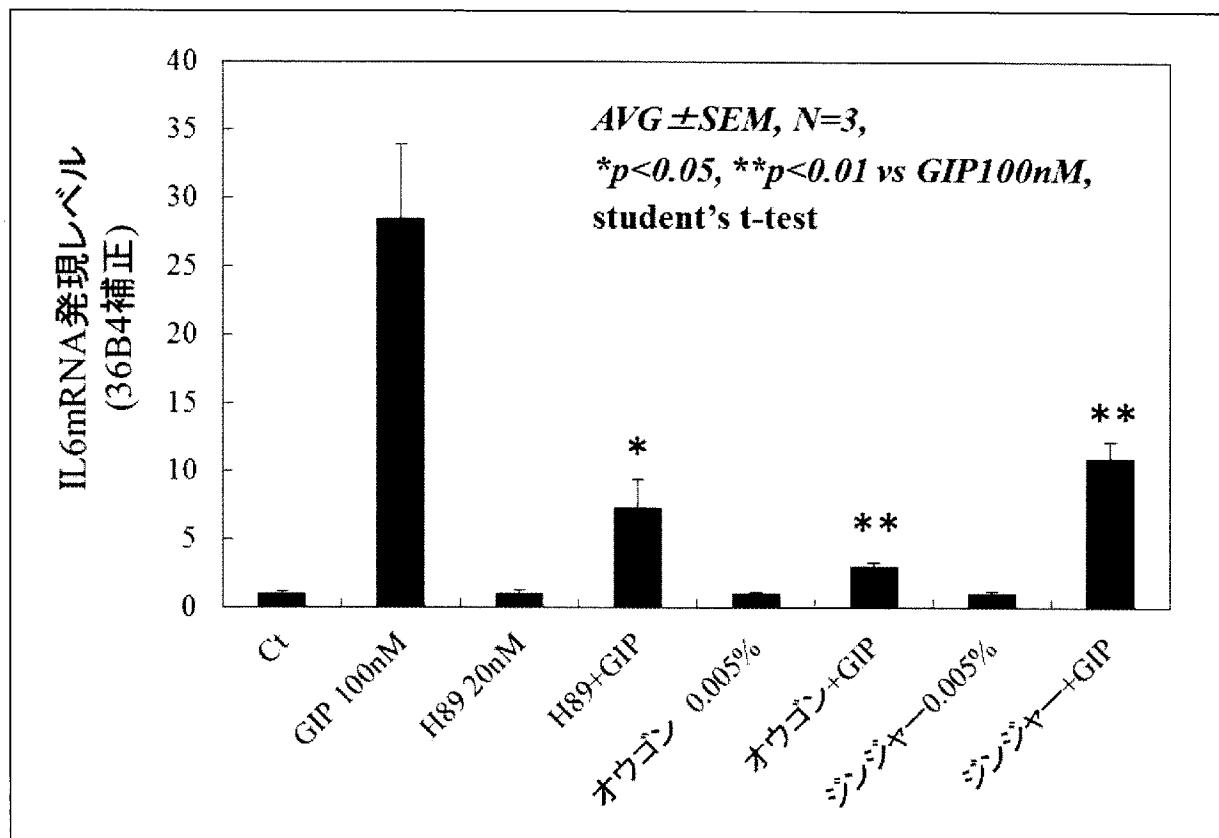
[図8]



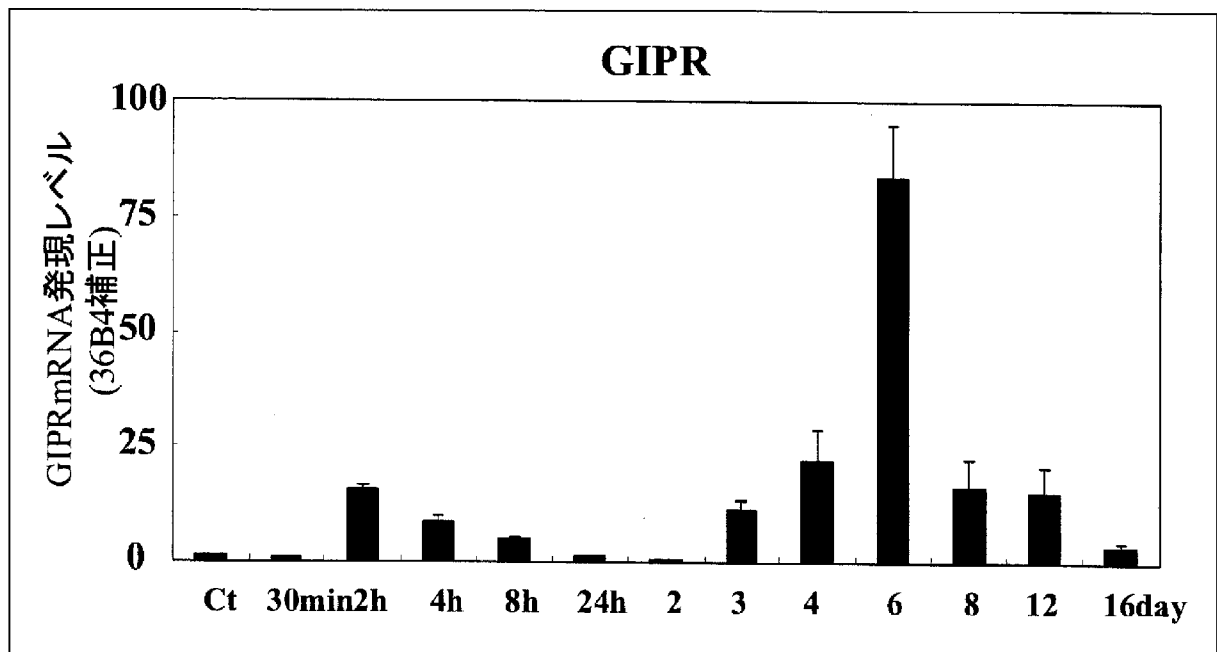
[図9]



[図10]



[図11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/060222

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/077(2010.01)i, C12Q1/02(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)

C12N5/077, C12Q1/02

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 1996-2014

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014

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

CAPplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X <u>A</u>	American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism, 2011.02.22, VOL. 300, NO. E877-E885, [online], <URL: http://ajpendo.physiology.org/content/300/5/E877 >	1-5, 8, 9, 12, 13 <u>6, 7, 10, 11, 14, 15</u>
X <u>A</u>	American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism, 2007.09.18, VOL. 293, NO. E1590-E1596, [online], <URL: http://ajpendo.physiology.org/content/293/6/E1590 >	1-6, 8, 9, 12-14 <u>7, 10, 11, 15</u>
X <u>A</u>	WO 2006/112418 A1 (Tokyo Medical and Dental University), 26 October 2006 (26.10.2006), paragraph [0009] & JP 4862160 B	1-4, 7, 10-13, 15 <u>5, 6, 8, 9, 14</u>



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

27 June, 2014 (27.06.14)

Date of mailing of the international search report

08 July, 2014 (08.07.14)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/060222

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Journal of Lipid Research, 2011.01.18, VOL. 52, p. 759-770, {online}, <URL: http://www.jlr.org/content/52/4/759 >	1-15
A	FEBS Letters, 2001.08.27, VOL. 505, ISSUE. 2, p. 269-274, [online], <URL: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579301028332 >]	1-15

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C12N5/077(2010.01)i, C12Q1/02(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C12N5/077, C12Q1/02			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014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） CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X	American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism, 2011.02.22, VOL. 300, NO. E877-E885, [online], <URL: http://ajpendo.physiology.org/content/300/5/E877>	1-5, 8, 9, 12, 13	
A		6, 7, 10, 11, 14, 15	
X	American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism, 2007.09.18, VOL. 293, NO. E1590-E1596, [online], <URL: http://ajpendo.physiology.org/content/293/6/E1590>	1-6, 8, 9, 12-14	
A		7, 10, 11, 15	
☒ 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 27.06.2014		国際調査報告の発送日 08.07.2014	
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100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） 水野 浩之 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 4862

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X <u>A</u>	WO 2006/112418 A1 (国立大学法人 東京医科歯科大学) 2006.10.26, 段落 [0009] & JP 4862160 B	1-4, 7, 10-13, 15 <u>5, 6, 8, 9, 14</u>
A	Journal of Lipid Research, 2011.01.18, VOL. 52, p. 759-770, {online}, <URL: http://www.jlr.org/content/52/4/759 >	1-15
A	FEBS Letters, 2001.08.27, VOL. 505, ISSUE. 2, p. 269-274, [online], <URL: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579301028332# >	1-15