(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2008-502341
(P2008-502341A)
(43)公表日　平成20年1月31日(2008.1.31)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	ZNAA	2G045
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B024
C12Q 1/02	(2006.01)	C12Q	1/02		4B063
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	45/00		4C084
A61P 3/04	(2006.01)	A61P	3/04		4C085

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 37 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2007-516074 (P2007-516074)
(86)(22)出願日　平成17年6月14日 (2005.6.14)
(85)翻訳文提出日　平成19年2月13日 (2007.2.13)
(86)国際出願番号　PCT/IB2005/002356
(87)国際公開番号　WO2005/123949
(87)国際公開日　平成17年12月29日 (2005.12.29)
(31)優先権主張番号　60/578,829
(32)優先日　平成16年6月14日 (2004.6.14)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　501358068
アンテグラジャン
ＩＮＴＥＧＲＡＧＥＮ
フランス国、エフ－９１０００　エヴリ、リュ・アンリ・デブリュエール　５、ジェノポール・カンピュス　１、ジェナヴェニール　８
(74)代理人　100078662
弁理士　津国　肇
(74)代理人　100113653
弁理士　束田　幸四郎
(74)代理人　100116919
弁理士　齋藤　房幸

最終頁に続く

(54)【発明の名称】電位型カリウムチャネルをコードするヒト肥満感受性遺伝子およびその使用

(57)【要約】
本発明は、肥満および関連疾患の診断、予防、治療、および治療活性薬物のスクリーニングに使用することができる、ヒト肥満感受性遺伝子の同定を開示している。より具体的には、本発明は、染色体１上のＫＣＮＡＢ２遺伝子およびある種のその対立遺伝子が肥満感受性に関与すること、および治療的介入の新規な標的であることを開示している。本発明は、ＫＣＮＡＢ２遺伝子中の特定の変異および発現産物、ならびにこれらの変異に基づく診断ツールおよびキットに関する。本発明は、低α蛋白血症、家族性複合型高脂血症、インスリン耐性症候群Ｘもしくは多代謝性疾患、冠動脈疾患、糖尿病、および異脂肪血症を含む冠動脈心疾患および代謝性疾患の検出、予防、治療かつ／または素因の診断に使用することができる。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
対象において肥満または関連代謝性疾患の存在もしくは素因を検出する方法であって、（ｉ）対象由来の試料を用意すること、および（ｉｉ）該試料においてＫＣＮＡＢ２遺伝子座における変化の存在を検出することを含む方法。
【請求項２】
対象において肥満または関連疾患からの保護を検出する方法であって、（ｉ）対象由来の試料を用意すること、および（ｉｉ）該試料においてＫＣＮＡＢ２遺伝子座における変化の存在を検出することを含む方法。
【請求項３】
肥満または関連代謝性疾患の治療に対する対象の応答を評価する方法であって、（ｉ）対象由来の試料を用意すること、および（ｉｉ）該試料においてＫＣＮＡＢ２遺伝子座における変化の存在を検出することを含む方法。
【請求項４】
対象において肥満または関連疾患の治療に対する有害作用を評価する方法であって、（ｉ）対象由来の試料を用意すること、および（ｉｉ）該試料においてＫＣＮＡＢ２遺伝子座における変化の存在を検出することを含む方法。
【請求項５】
対象由来の試料中のＫＣＮＡＢ２遺伝子座に変化において、肥満または関連疾患の素因を示す変化の存在を検出すること、ならびに肥満または関連疾患に対して予防的治療を施与することを含む、対象における肥満または関連疾患を予防する方法。
【請求項６】
ＫＣＮＡＢ２遺伝子座における変化の存在を、シーケンシング、選択的ハイブリッド形成、および／または選択的増幅によって検出する、請求項１～５のいずれか一項記載の方法。
【請求項７】
前記変化が、肥満に関連する一個もしくは数個のＳＮＰまたはＳＮＰのハプロタイプである、請求項１～５のいずれか一項記載の方法。
【請求項８】
肥満に関連する前記ハプロタイプが、ＳＮＰ２、ＳＮＰ１７、ＳＮＰ２３、ＳＮＰ３３、ＳＮＰ３４、ＳＮＰ３８、ＳＮＰ４２、ＳＮＰ４７、ＳＮＰ４９、ＳＮＰ５１、ＳＮＰ５３、およびＳＮＰ６９からなる群から選択される数個のＳＮＰを含む、請求項１～７のいずれか一項記載の方法。
【請求項９】
肥満に関連する前記ＳＮＰがＳＮＰ７またはＳＮＰ８である、請求項１～８のいずれか一項記載の方法。
【請求項１０】
肥満および関連疾患に生物学的に活性な化合物を選択する方法であって、試験化合物と、ＫＣＮＡＢ２ポリペプチド、またはその遺伝子もしくはそれらのフラグメントを接触させること、ならびに該試験化合物がＫＣＮＡＢ２ポリペプチド、またはその遺伝子もしくはそれらのフラグメントに結合する能力を決定することを含む方法。
【請求項１１】
肥満および関連疾患に生物学的に活性な化合物を選択する方法であって、ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドを発現する組換え宿主細胞と試験化合物を接触させること、および該試験化合物が該ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドに結合し、ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドの活性をモデュレーションする能力を決定することを含む方法。
【請求項１２】
肥満および関連疾患に生物学的に活性な化合物を選択する方法であって、試験化合物とＫＣＮＡＢ２遺伝子を接触させること、および該試験化合物が該ＫＣＮＡＢ２遺伝子の発現をモデュレーションする能力を決定することを含む方法。

【請求項１３】
肥満および関連疾患に生物学的に活性な化合物を選択する方法であって、ＫＣＮＡＢ２遺伝子プロモーターの制御下にあるレポーター遺伝子を有するレポーター構築体を含む組換え宿主細胞を試験化合物と接触させることおよびそのレポーター遺伝子の発現をモデュレーションする（例えば、刺激し、または減少させる）試験化合物を選択することを含む方法。
【請求項１４】
前記ＫＣＮＡＢ２遺伝子もしくはポリペプチド、またはそれらのフラグメントが、変化もしくは変異したＫＣＮＡＢ２遺伝子もしくはポリペプチド、または変化もしくは変異を含むそれらのフラグメントである、請求項１０～１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５】
前記モデュレーションが活性化である、請求項１０～１４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６】
前記モデュレーションが阻害である、請求項１０～１４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７】
対象において肥満または関連疾患を治療または予防するための医薬組成物の製造における、ＫＣＮＡＢ２アゴニストもしくはアンタゴニスト、ＫＣＮＡＢ２のアンチセンスもしくはＲＮＡｉ、ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドに特異的な抗体、またはそのフラグメントもしくは誘導体からなる群から選択される化合物の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、概括的に遺伝学および医学分野に関する。より具体的には、本発明は、肥満および関連疾患の診断、予防、治療、および治療活性薬物のスクリーニングに使用することができる、ヒト肥満感受性遺伝子の同定を開示している。より具体的には、本発明は、肥満感受性に関与し治療的介入の新規な標的である、染色体１上の電位型カリウムチャネル、シェーカー関連ファミリ、βメンバー２（ＫＣＮＡＢ２）遺伝子の特定の対立遺伝子を開示している。本発明は、ＫＣＮＡＢ２遺伝子中および発現産物中の特定の変異、ならびにこれらの変異に基づく診断ツールおよびキットに関する。本発明は、低α蛋白血症、家族性複合型高脂血症、インスリン耐性症候群Ｘもしくは多代謝性疾患、冠動脈疾患、糖尿病、および異脂肪血症を含む、冠動脈心疾患および代謝性疾患を検出し、予防し、かつ／または治療するための素因の診断に使用することができる。
【０００２】
背景技術
現在、現代先進諸国の全医療費の約３～８％は、肥満の直接費用によるものである（Wolf、1996）。ドイツでは、１９９５年、肥満および合併疾患に関連する（直接的および間接的）全費用は２１０億ドイツマルク（２９．４米国ドル）と推定された（Schneider、1996）。肥満有病率がさらに上昇しなくても、こうした費用は２０３０年までに５０％増加するであろう。
【０００３】
肥満は、健康を損ないかねないほど、脂肪組織中に異常にもしくは過剰に脂肪が蓄積する状態として単に定義されることが多い。根底にある疾患は、望ましくない正のエネルギーバランスおよび体重増加の過程である。腹部脂肪分布は、女性型（gynoid）脂肪分布よりも健康上高いリスクに関連付けられる。
【０００４】
肥満度指数　（ＢＭＩ，kg/m^2）によって、最も有用ではあるが、大雑把な母集団レベルでの肥満を測定することができる。これは、母集団内の肥満有病率および肥満に伴う危険性を推定するために使用することができる。しかし、ＢＭＩでは身体組成または身体脂肪分布は説明されない（ＷＨＯ、１９９８）。

【０００５】
【表１】

表１：BMIによる成人過体重分類(WHO、1998)

分類	BMI (kg/m²)	同時罹患の危険性
体重不足	< 18.5	低度（ただし、他の臨床問題の危険性は増大）
正常範囲	18.5 – 24.9	平均
過体重	≥ 25	
前肥満	25 – 29.9	増大
肥満クラスI	30 – 34.9	中程度
肥満クラスII	35 – 39.9	重度
肥満クラスIII	≥ 40	極めて重度

【０００６】
肥満および重度肥満の定義にはまた、カットオフとしてＢＭＩ８５および９５パーセンタイルを使用し肥満が定義されてきた。ＢＭＩパーセンタイルは幾つかの集団内で計算されており、ドイツ国民栄養調査に基づくドイツ人口についてのパーセンタイルが１９９４年（Hebebrandら、1994、1996）年以来入手することができる。様々な体重クラスのＷＨＯの分類は、成人に対してのみ適用することができ、小児および青年の肥満を定義するためにＢＭＩパーセンタイルを見ることは習慣になってきている。
【０００７】
近年の肥満有病率の上昇は、数カ国の医療システムの重大な関心事である。疾病管理予防センター（ＣＤＣ）の報告によれば、米国では過去２０年間、肥満が劇的に増加している。１９８５年、ほんの数州がＣＤＣ行動危険因子監視システム（ＢＲＦＳＳ）に参加し、肥満データを提供した。１９９１年、４州で肥満有病率１５～１９%が報告され、２０%以上の率が報告された州はなかった。２００２年、２０州で肥満有病率が１５～１９%であり、２９州でその率は２０～２４%であり、一つの州では２５%を超える率が報告されている。同様の傾向は、他のヨーロッパ、南アメリカ諸国で観察されている。
【０００８】
小児および青年は、この傾向から免れていない。それとは全く反対に、米国での上昇はかなりなものである。すなわち、１９６０年代～１９９０年には、６才～１７才で過体重および肥満が劇的に増加した。この増分は、カットオフとしてＢＭＩ８５パーセンタイル（１９６０年代に算出）を使用すると、４０%の相対的増加、９５パーセンタイルを使用すると１００%の相対的増加を意味する。１９８５年～１９９５年、極度の肥満に対し入院患者として治療したドイツ人小児および青年の横断的研究では、この１０年に渡り、平均ＢＭＩがほぼ2 kg/m²という有意な増加が報告されている。この極度群内では、この増分は最上部ＢＭＩ範囲中最も顕著であった。
【０００９】
肥満有病率のこの増加の根底にある機序は分かっていない。根底にある原因として一般に環境因子が挙げられている。本質的には、高いカロリー摂取および低い身体活動性レベルが考えられている。イギリスでは、肥満率の上昇は後者の機序に起因している。従って、この国では、過去２０年以内では平均カロリー摂取は多少減少したが、テレビを見て過ごす時間および世帯当たりの平均自動車数の増加に由来する間接的証拠が、関連原因要素として身体活動性のレベルの低下を示している。
【００１０】

以前には、遺伝要因は、寄与する原因として見なされていなかった。それとはまさに反対に、過去２０年以内に高い肥満率が観察されていることは、遺伝要因が原因であるはずがないことの証拠とみなされる。しかし、同類交配率の増加が、観察された現象への遺伝的寄与を非常によく構成し得ることが提案されている。この仮説は、肥満個人への非難がむしろ近年の社会現象を表し、それによって同類交配率の上昇が不変にもたらされたことを示唆する証拠に基づく。結果として、その子孫は肥満の根底にある付加的および非付加的遺伝要因を多く保持する。実際、極度の肥満小児および青年の親の間には極めて高率の（推定）同類交配が観察されている。

【００１１】

肥満に付随し、潜在的に生命にかかわる慢性的な健康問題は主として４つの領域に属する：１）高血圧症、慢性心疾患、脳卒中を含む心血管疾患、２）インスリン耐性、すなわち、インスリン非依存性糖尿病（ＮＩＤＤＭ）に伴う状態、３）ある種の癌、主として、ホルモン関連癌および大腸癌、ならびに４）胆のう疾患。肥満に付随する他の問題には、呼吸困難、慢性筋骨格問題、皮膚問題、不妊症が含まれる（ＷＨＯ、１９９８）。

【００１２】

これらの疾患を処置するために現在利用できる主な戦略には、食事制限、身体活動の増大、薬理学的および外科的手法が含まれる。成人では、保守的治療を利用する長期的体重減少は例外的である。典型的には、現在の薬理学的治療によって５～１５kgの体重減少が誘発されるが、投薬を中止すると再び体重が増加し始める。外科的治療は、比較的成功を収めており、極度の肥満患者および／または深刻な医学的合併症を有する患者のために用意されている。

【００１３】

近年、レプチン欠損変異が検出された１０才になる大層肥満な少女の治療が、組換えレプチンによって成功した。これは、病的な肥満の根底にある変異の検出から治療上の利益を得た最初の個人である。

【００１４】

ＢＭＩの遺伝率を推定するために双生児研究が数種実施されているが、その幾つかは１０００組を超える双生児を包含していた。結果には、大変一貫性があった。一卵性双生児間の内部相関は年齢および性別に依存せず典型的には０．６～０．８であった。一研究では、一卵性および二卵性双生児の相関は、双生児が離れて、または一緒に育てられているかに依存せず基本的に同じであった。ＢＭＩ遺伝率は０．７と推定され、変動の残りの３０％は非共有環境因子によって説明された。驚くべきことに、変動の大部分は共有環境因子では説明がつかなかった。高カロリーおよび低カロリー栄養を補給することによって、一卵性双生児メンバー間では同程度の体重増加または減少がみられ、エネルギー利用能の環境誘発変動が体重に及ぼす作用を遺伝要因が調節することを示している。過食および節食による代謝反応および身体脂肪分布の変化も遺伝子に制御されている（Hebebrandら概説、1998）。

【００１５】

養子のＢＭＩは、生物学的な彼らの親のＢＭＩと相関し、養親のＢＭＩとは相関しないことが大規模養子縁組研究から判明している。家族研究によれば、兄弟のＢＭＩ間の相関は０．２～０．４である。親－子孫の相関は通常わずかに低い。分離解析では、主要な劣性遺伝子効果が繰り返し示唆されている。こうした解析に基づき、標本サイズの計算は調和および不調和アプローチに基づいて実施した。予想に反して、調和兄弟ペアのアプローチは優秀であり、同じ威力を実現するのに必要とされた家族数は少ない。

【００１６】

極度の肥満若年指標患者に基づく家族研究では、非常に多くの家族において母もしくは父、または両者がＢＭＩ＞十分位数９０である。ＢＭＩ＞９５パーセンタイルの指標患者に基づくと、それぞれの家族の約２０％にはＢＭＩ＞９０パーセンタイルの兄弟がいる。

【００１７】

要するに、環境因子が、個人を多少肥満に発展しやすくする特定の遺伝子型と相互に作

用することは明らかである。さらに、主要な遺伝子が検出されているにも関わらず、そのような主要遺伝子から、ほんのわずかな影響しか持たない遺伝子にわたるまで範囲を考慮する必要がある。

【００１８】

１９９４年末のレプチン遺伝子の発見（Zhangら、1994）の後、食欲と体重調節の根底にある制御系を解明するための実際爆発的な科学的努力が続いている。現在、それは、最も急速に成長している生物医学分野である。この著しい発展によって大規模な分子遺伝的活動ももたらされ、この活動は全て、明白な臨床的関心のために基本的にヒト、げっ歯類、および他の哺乳動物における肥満に関連している（Hebebrandら、1998）。

【００１９】

この点において、その変異が現在公知の肥満一遺伝子形につながる多くの遺伝子が、げっ歯類でクローン化されている。これらの変異の全体的な結果は、現在分析中である。こうしたモデルによって、体重調節に関与する複合的制御系を理解する上での手掛かりが得られており、その最も良く知られているものにはレプチンおよびその受容体が含まれる。

【００２０】

マウスだけでなくブタにおいても、体重調節に関与している可能性が極めて高い量的形質座位（ＱＴＬ）が１５を超えて同定されている（Chagnonら、2003）。

【００２１】

ヒトでは、１９９７年までに肥満の非常に稀な４つの常染色体劣性形が記載されている。レプチン、レプチン受容体、プロホルモンコンバターゼ１、およびプロ－オピオメラノコルチン（ＰＯＭＣ）をコードする遺伝子の変異が、過食症に伴う初期発症型の巨大肥満を引き起こすことが示されている。異なる追加的な臨床異常（例えば赤毛、原発性無月経）および／または内分泌学的異常（例えば顕著に変化した血清レプチン濃度、ＡＣＴＨ分泌の欠如）は、それぞれの候補遺伝子が正確に特定された。一遺伝子的動物モデルおよびヒト一遺伝子形はどちらも、体重調節の根底にある複合系を理解する上での新たな手掛かりをもたらしている。

【００２２】

つい最近、肥満の第一常染色体優性形がヒトについて記載されている。メラノコルチン－４受容体遺伝子（ＭＣ４Ｒ）内で異なる２つの変異が、これらの変異体にヘテロ接合性である発端者において極度の肥満を招くことが観察された。前述の知見とは対照的に、これらの変異は、極度の肥満以外には単純明白な表現型異常に結びつかない（Vaisseら、1998、Yeoら、1998）。興味深いことに、両グループでは、比較的小規模での研究グループにおける系統だったスクリーニングによって変異が検出された（ｎ＝６３およびｎ＝４３）。

【００２３】

Hinneyら（1999）は、延べ４９２人の肥満小児および青年においてＭＣ４Ｒをスクリーニングした。合計では、ハプロ不全につながる異なる２つの変異を有する４人を検出した。一つは、Ｙｅｏらによって既に観察された変異（１９９８）と同一の変異であった。３人において検出された他方の変異は、受容体細胞外ドメインにおいて停止変異を誘発した。約１％の極度に肥満な個人は、ＭＣ４Ｒ中にハプロ不全変異を有している。ハプロ不全の２つの形態に加えて、Hinneyらは保存的および非保存的アミノ酸交換をもたらす追加の変異も検出した（１９９９）。興味深いことに、これらの変異は、主として肥満研究グループにおいて観察された。現在、これらの変異の機能的意味は分かっていない。

【００２４】

ＭＣ４Ｒ変異を有する個人を同定することは、可能な薬理学的介入に照らして興味深い。すなわち、全メラノコルチンのコア配列を表す副腎皮質刺激ホルモン$_{4-10}$（ＡＣＴＨ$_{4-10}$）の鼻腔内適用によって、健常対照群において体重、体脂肪量、血漿レプチン濃度が低下した。理論的にはその低い受容体密度と均衡する変異のキャリアが、この治療に対してどのように反応するのかという疑問を生ずる。

【００２５】

体重調節に特異的遺伝子が関与することは、遺伝子組換えマウスから得たデータによってさらに実証される。例えば、ＭＣ４Ｒ不完全マウスは初期発症肥満を生じる（Huszarら、1997）。

【００２６】

別のグループは、肥満または依存する表現型（ＢＭＩ、レプチン濃度、体脂肪量など）に関連したゲノムスキャンを実施している。この手法は、系統立てられ、モデル不要なために非常に有望と思われる。さらに、これは今まで例外的に好首尾なように見えた。すなわち、比較的小規模の研究グループを分析することによっても正の連鎖結果は得られている。より重要なことには、幾つかの知見が既に反復されている。少なくとも２つの別個のグループによって、以下の領域のそれぞれが同定されている：染色体１ｐ３２、染色体２ｐ２１、染色体６ｐ２１、染色体１０、および染色体２０ｑ１３（Chagnonら、2003）。

【００２７】

発明の概要

今回、本発明は、肥満および関連疾患の診断、予防、治療、および治療活性薬物のスクリーニングに使用することができる、ヒト肥満感受性遺伝子の同定を開示している。

【００２８】

本発明は、低α蛋白血症、家族性複合型高脂血症、インスリン耐性症候群Ｘもしくは多代謝性疾患、冠動脈疾患、糖尿病、および異脂肪血症を含む肥満、冠動脈心疾患および代謝性疾患から保護し、それらを検出し、予防し、かつ／または治療するための素因の診断に使用することができ、その方法は、対象由来の試料においてＫＣＮＡＢ２遺伝子もしくはポリペプチド中の変化の存在を検出することを含み、該変化の存在が肥満または関連疾患の存在または素因を示す。該変化の存在は肥満からの保護も示しうる。

【００２９】

本発明の特定の目的は、対象において肥満または関連疾患の存在もしくは素因を検出する方法であって、対象由来の試料においてＫＣＮＡＢ２遺伝子座における変化の存在を検出する方法であり、該変化の存在が肥満または関連疾患の存在もしくは素因を示す。

【００３０】

本発明のさらに特定の目的は、対象において肥満または関連疾患からの保護を検出する方法であって、対象由来の試料においてＫＣＮＡＢ２遺伝子座における変化の存在を検出する方法であり、該変化の存在が肥満または関連疾患からの保護を示す。

【００３１】

本発明のさらに特定の目的は、肥満または関連疾患の処置に対する対象の応答を評価する方法であって、対象由来の試料においてＫＣＮＡＢ２遺伝子座における変化の存在を検出する方法であり、該変化の存在が該処置に対する特定の応答を示す。

【００３２】

さらに本発明の特定の目的は、対象において肥満または関連疾患の処置に対する有害作用を評価する方法であって、対象由来の試料においてＫＣＮＡＢ２遺伝子座における変化の存在を検出する方法であり、該変化の存在が該治療に対する有害作用を示す。

【００３３】

本発明は、対象由来の試料中のＫＣＮＡＢ２遺伝子座において、肥満または関連疾患の素因を示す変化の存在を検出すること、ならびに肥満または関連疾患に対して予防的治療を施与することを含む、対象における肥満または関連疾患を予防する方法にも関する。

【００３４】

好ましい態様では、該変化は、肥満に関連する一個もしくは数個のＳＮＰまたはＳＮＰのハプロタイプである。より好ましくは、肥満に関連する該ハプロタイプは、ＳＮＰ２、ＳＮＰ１７、ＳＮＰ２３、ＳＮＰ３３、ＳＮＰ３４、ＳＮＰ３８、ＳＮＰ４２、ＳＮＰ４７、ＳＮＰ４９、ＳＮＰ５１、ＳＮＰ５３、およびＳＮＰ６９からなる群から選択される数個のＳＮＰを含むか、またはそれらからなる。よりさらに好ましくは、該ハプロタイプは表５に開示したハプロタイプから選択される。より好ましくは、肥満に関連する該ＳＮＰはＳＮＰ３３またはＳＮＰ３４でありうる。

【００３５】
ＫＣＮＡＢ２遺伝子座中の変化は、ハイブリッド形成アッセイ、シーケンシングアッセイ、マイクロシーケンシングアッセイ、または対立遺伝子特異的増幅アッセイを実施することによって決定するのが好ましい。
【００３６】
本発明の特定の局面は、ＫＣＮＡＢ２遺伝子を含むゲノム領域中の肥満に関連する少なくとも１個のＳＮＰもしくはハプロタイプ、またはそれらの組合せを特異的に検出するように設計されている、プライマー、プローブ、および／またはオリゴヌクレオチドを含む、物質の組成物中に存在する。肥満に関連する該ハプロタイプは、ＳＮＰ２、ＳＮＰ１７、ＳＮＰ２３、ＳＮＰ３３、ＳＮＰ３４、ＳＮＰ３８、ＳＮＰ４２、ＳＮＰ４７、ＳＮＰ４９、ＳＮＰ５１、ＳＮＰ５３、およびＳＮＰ６９からなる群から選択される数個のＳＮＰを含むか、またはそれらからなることがより好ましい。該ハプロタイプは、表５に開示したハプロタイプから選択されることがよりさらに好ましい。より好ましくは、肥満に関連する該ＳＮＰはＳＮＰ３３またはＳＮＰ３４でありうる。
【００３７】
本発明はまた、対象において、ＫＣＮＡＢ２の発現または活性を調節することによって肥満および／または関連疾患を処置する方法にある。そのような処置には、例えば、ＫＣＮＡＢ２ポリペプチド、（アンチセンス配列およびＫＣＮＡＢ２遺伝子座を指標したＲＮＡｉを含む）ＫＣＮＡＢ２　ＤＮＡ配列、抗ＫＣＮＡＢ２抗体、またはＫＣＮＡＢ２の発現または活性をモデュレーションする薬物が使用される。
【００３８】
本発明は、遺伝子治療や蛋白質交換療法、ならびにＫＣＮＡＢ２蛋白質模倣体および／または阻害剤の投与などによる前駆症状の処置または併用療法を含む、有害なＫＣＮＡＢ２遺伝子対立遺伝子を有する個人を処置する方法にも関する。
【００３９】
本発明の別の局面は、肥満または関連疾患に関与するＫＣＮＡＢ２遺伝子の対立遺伝子またはその遺伝子産物のモデュレーションまたはそれらへの結合に基づく、肥満または関連疾患を治療するための薬物のスクリーニングにある。
【００４０】
本発明の別の局面には、ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドフラグメントの特異的抗体、およびそのような抗体の誘導体、そのような抗体を分泌するハイブリドーマ、ならびにこれらの抗体を含む診断キットが含まれる。より好ましくは、該抗体は、ＫＣＮＡＢ２ポリペプチド、またはＫＣＮＡＢ２の活性をモデュレーションさせる変化を含むそのフラグメントに特異的である。
【００４１】
本発明はまた、ＫＣＮＡＢ２遺伝子、またはＫＣＮＡＢ２の活性をモデュレーションさせる変化を含むそのフラグメントに関係する。本発明は、ＫＣＮＡＢ２ポリペプチド、またはＫＣＮＡＢ２の活性をモデュレーションさせる変化を含むそのフラグメントにさらに関係する。
【００４２】
発明の詳細な説明
本発明は、ヒト肥満感受性遺伝子としてＫＣＮＡＢ２の同定を開示している。肥満の１６４家族に由来する様々な核酸試料を特定のGenome HIP法にかけた。この方法によって、肥満対象において変化している、該集団中の特定の家系同一（identical-by-descent）フラグメントが同定される。本発明者らは、ＩＢＤフラグメントをスクリーニングすることによって、染色体１ｐ３６．３（ＫＣＮＡＢ２）遺伝子上の電位型カリウムチャネル、シェーカー関連ファミリ、βメンバー２を肥満および関連表現型の候補として同定した。この遺伝子は、実際、臨界間隔中に存在し、肥満の遺伝子調節に一致する機能表現型を表す。ＫＣＮＡＢ２遺伝子のＳＮＰもヒト対象で肥満に相関するものとして同定された。ＫＣＮＡＢ２遺伝子に位置するＳＮＰ３３およびＳＮＰ３４は、肥満に関連することが判明し

た。ＳＮＰ２、ＳＮＰ１７、ＳＮＰ２３、ＳＮＰ３３、ＳＮＰ３４、ＳＮＰ３８、ＳＮＰ４２、ＳＮＰ４７、ＳＮＰ４９、ＳＮＰ５１、ＳＮＰ５３、およびＳＮＰ６９からなる群から選択される数個のＳＮＰを含む表５に開示したハプロタイプも肥満に関連するものとして同定されている。

【００４３】

従って、本発明は、肥満および関連疾患を診断し、予防し、治療し、かつ治療活性薬物をスクリーニングするために、ＫＣＮＡＢ２遺伝子および対応する発現産物を使用することを提案する。

【００４４】

定義

肥満および代謝性疾患：肥満は、健康を損ないかねないほど、脂肪組織中に異常にもしくは過剰に脂肪が蓄積するあらゆる状態として解釈される。より具体的には、関連疾患、疾病、または病態に低α蛋白血症、家族性複合型高脂血症、インスリン耐性症候群Ｘもしくは多代謝性疾患、冠動脈疾患、糖尿病、および異脂肪血症を含むあらゆる代謝性疾患が含まれる。本発明は、様々な対象、特に、成人、小児および胎児期のヒトを含むヒトに使用してよい。

【００４５】

本発明の脈絡の中では、ＫＣＮＡＢ２遺伝子座は、細胞もしくは生物中のＫＣＮＡＢ２配列または産物の全てをさし、ＫＣＮＡＢ２コード配列、ＫＣＮＡＢ２非コード配列（例えばイントロン）、転写および／または翻訳を制御するＫＣＮＡＢ２調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、ターミネーターなど）、ならびにＫＣＮＡＢ２　ＲＮＡ（例えばｍＲＮＡ）およびＫＣＮＡＢ２ポリペプチド（例えば、前タンパク質や成熟蛋白質）など、対応する発現産物の全てを含む。ＫＣＮＡＢ２遺伝子座は、ＫＣＮＡＢ２遺伝子に位置するＳＮＰと連鎖不平衡であるＳＮＰを含むＫＣＮＡＢ２遺伝子の周辺配列をさらに含む。例えば、ＫＣＮＡＢ２遺伝子座は、ＳＮＰ２、ＳＮＰ１７、ＳＮＰ２３、ＳＮＰ３８、ＳＮＰ４２、ＳＮＰ４７、ＳＮＰ４９、ＳＮＰ５１、およびＳＮＰ５３を含む周辺配列を含む。

【００４６】

本出願で使用する通り、用語「ＫＣＮＡＢ２遺伝子」は、ヒト染色体１ｐ３６．３上の電位型カリウムチャネル、シェーカー関連ファミリ、βメンバー２遺伝子、ならびにそれらの変異体、類似体、およびフラグメントを示し、肥満および代謝性疾患の感受性に関与するそれらの対立遺伝子（例えば生殖細胞系列変異）を含む。ＫＣＮＡＢ２遺伝子は、ＡＫＲ６Ａ５、ＫＣＮＡ２Ｂ、Ｈｋｖｂｅｔａ２、ＫＶＢＥＴＡ－２、Ｈｋｖｂｅｔａ２．１、およびＨｋｖｂｅｔａ２．２と表してもよい。

【００４７】

用語「遺伝子」は、ゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）、相補ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）、合成または半合成ＤＮＡ、および対応するＲＮＡの任意形態を含め、あらゆる種類のコーディング核酸を含むと解釈される。用語、遺伝子には、特に、ＫＣＮＡＢ２をコードする組換え核酸、すなわち、例えば配列を集合させ、切断し、連結し、または増幅することによって人工的に作出した自然に存在しない任意の核酸分子が含まれる。ＫＣＮＡＢ２遺伝子は、一本鎖などの他の形態も考えられるが、典型的には二本鎖である。ＫＣＮＡＢ２遺伝子は、ＤＮＡライブラリーをスクリーニングし、または様々な天然供給源から増幅するなど、様々な供給源から当技術分野で公知の様々な技術により得ることができる。組換え核酸は、化学合成、遺伝子工学、酵素技術、またはそれらの組合せを含む従来技術によって調製することができる。適当なＫＣＮＡＢ２遺伝子配列は、ＫＣＮＡＢ２（Ｈｓ．４４０４９７）、およびUnigene Representative Sequences ＮＭ＿００３６３６、ＮＭ＿１７２１３０についてはUnigene Clusterなど、遺伝子バンクに見出すことができる。ＫＣＮＡＢ２遺伝子の特定の例には、配列番号１および３が含まれる。

【００４８】

用語「ＫＣＮＡＢ２遺伝子」には、配列番号１および３あるいは先に記載した任意のコ

ード配列のあらゆる変異体、フラグメント、または類似体が含まれる。そのような変異体には、例えば、個人間の対立遺伝子の変異（例えば多型）による自然発生変異体、肥満に関係して変異した対立遺伝子、代替スプライシング形態などが含まれる。用語、変異体には、他の供給源または生物体に由来するＫＣＮＡＢ２遺伝子配列も含まれる。変異体は、配列番号１および３に実質上相同であることが好ましく、すなわち、配列番号１および３とのヌクレオチド配列同一性が少なくとも約６５％、典型的には少なくとも約７５％、好ましくは少なくとも約８５％、より好ましくは少なくとも約９５％を示す。ＫＣＮＡＢ２遺伝子の変異体および類似体には、厳密なハイブリッド形成条件下で、先に定義した配列とハイブリッド形成する核酸配列（またはその相補鎖）も含まれる。

【００４９】

典型的な厳密なハイブリッド形成条件には、３０℃を超える、好ましくは３５℃を超える、より好ましくは４２℃を超える温度、および／または約５００mM未満の、好ましくは２００mM未満の塩分が含まれる。ハイブリッド形成条件は、温度、塩分、および／またはＳＤＳやＳＳＣなど、他の試薬の濃度を変えることにより当業者が調節してよい。

【００５０】

ＫＣＮＡＢ２遺伝子のフラグメントは、上に開示した一つの配列の任意の部分の少なくとも約８連続ヌクレオチドを表し、好ましくは少なくとも約１５、より好ましくは少なくとも約２０ヌクレオチドであり、少なくとも３０ヌクレオチドがさらに好ましい。フラグメントには、可能なヌクレオチド長８～１００ヌクレオチドの全てが含まれ、ヌクレオチド長１５～１００が好ましく、２０～１００がより好ましい。

【００５１】

ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドは、上に開示したＫＣＮＡＢ２遺伝子によってコードされる任意の蛋白質またはポリペプチドを表す。用語「ポリペプチド」は、ひと続きのアミノ酸を含む任意の分子をさす。この用語には、ペプチドや蛋白質など、様々な長さの分子が含まれる。ポリペプチドは、グリコシル化および／またはアセチル化　ならびに／あるいは化学反応またはカップリングなどにより変化させてよく、一個または幾つかの非天然または合成アミノ酸を含みうる。ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドの具体例には、配列番号２（ＮＰ＿００３６２７）および配列番号４（ＮＰ＿７４２１２８）の全てもしくは一部、またはそれらの変異体が含まれる。

【００５２】

用語「処置に対する応答」は、処置効力をさし、それだけには限らないが、治療化合物を代謝する能力、プロドラッグを活性薬物に転換する能力、ならびに個人における薬物動態学（吸収、分布、除去）および薬物の（受容体関連）薬動力学が含まれる。

【００５３】

用語「処置に対する有害作用」は、薬物の主要薬理学的作用の拡大によりもたらされた治療有害作用、または特有の宿主因子と薬物との相互作用によりもたらされた特異体質有害反応をさす。「処置に対する副作用」には、それだけには限らないが、皮膚科学的、血液学的、肝臓病学的毒性などの有害反応が含まれ、さらに胃腸潰瘍形成、血小板機能障害、腎臓損傷、広汎性蕁麻疹、気管支収縮、低血圧症、およびショックが含まれる。

【００５４】

診断

次に、本発明は、対象でのＫＣＮＡＢ２遺伝子座のモニタリングに基づく診断方法を提供する。本発明の脈絡の中で、用語「診断」には、成人、小児、および出生前の初期、前駆症状期、および後期を含む様々な段階での検出、モニタリング、投薬、比較などが含まれる。典型的には、診断には最も適当な処置を決定するために、予後診断、発生の素因または危険の評価、対象の特徴付けなどが含まれる（薬－遺伝学）。

【００５５】

本発明は、個人が肥満または関連疾患を発生させる危険にさらされてかどうか、またはＫＣＮＡＢ２遺伝子座における変異または多型からもたらされた肥満または関連疾患にかかるかどうかを判定する診断法を提供する。本発明は、個人が治療剤に正の応答を示す可

能性が高いかどうか、または個人が治療剤に対して有害な副作用を生ずる危険があるかどうか判定する方法も提供する。

【００５６】

本発明の特定の目的は、対象において肥満または関連疾患の存在もしくは素因を検出する方法であって、対象由来の試料において該試料中のＫＣＮＡＢ２遺伝子座における変化の存在を検出することを含む方法にある。該変化の存在が、肥満または関連疾患の存在もしくは素因を示す。場合により、該方法は、対象由来の試料を用意する前工程を含む。好ましくは、該試料中のＫＣＮＡＢ２遺伝子座における変化の存在を、試料の遺伝子型を決定することによって検出する。

【００５７】

本発明のさらに特定の目的は、対象において肥満または関連疾患からの保護を検出する方法であって、対象由来の試料中のＫＣＮＡＢ２遺伝子座における変化の存在を検出することを含み、該変化の存在が肥満または関連疾患からの保護を示す、方法にある。

【００５８】

好ましい態様では、該変化は、肥満に関連する一個もしくは数個のＳＮＰまたはＳＮＰのハプロタイプである。肥満に関連する該ハプロタイプは、ＳＮＰ２、ＳＮＰ１７、ＳＮＰ２３、ＳＮＰ３３、ＳＮＰ３４、ＳＮＰ３８、ＳＮＰ４２、ＳＮＰ４７、ＳＮＰ４９、ＳＮＰ５１、ＳＮＰ５３、およびＳＮＰ６９からなる群から選択される数個のＳＮＰを含むか、またはそれらからなることがより好ましい。該ハプロタイプが、表５に開示したハプロタイプから選択されることがよりさらに好ましい。肥満に関連する該ＳＮＰが、ＳＮＰ３３またはＳＮＰ３４であってよいことがより好ましい。

【００５９】

本発明のさらに特定の目的は、肥満または関連疾患の処置に対する対象の応答を評価する方法であって、（ｉ）対象由来の試料を用意すること、および（ｉｉ）該試料中のＫＣＮＡＢ２遺伝子座における変化の存在を検出することを含む方法にある。

【００６０】

本発明のさらに特定の目的は、肥満または関連疾患の処置に対する対象の応答を評価する方法であって、対象由来の試料において該試料中のＫＣＮＡＢ２遺伝子座における変化の存在を検出することを含む方法にある。該変化の存在が、該処置に対する特定の応答を示す。該試料のＫＣＮＡＢ２遺伝子座の変化の存在は、試料の遺伝子型を決定することによって検出するのが好ましい。

【００６１】

さらに本発明の特定の目的は、肥満または関連疾患の処置に対する対象の有害作用を評価する方法であって、対象由来の試料において該試料中のＫＣＮＡＢ２遺伝子座における変化の存在を検出することを含む方法にある。該変化の存在が該処置に対する有害作用を示す。該試料中のＫＣＮＡＢ２遺伝子座における変化の存在は、試料の遺伝子型を決定することによって検出するのが好ましい。

【００６２】

好ましい態様では、該変化は、肥満に関連する一個もしくは数個のＳＮＰまたはＳＮＰのハプロタイプである。肥満に関連する該ハプロタイプは、ＳＮＰ２、ＳＮＰ１７、ＳＮＰ２３、ＳＮＰ３３、ＳＮＰ３４、ＳＮＰ３８、ＳＮＰ４２、ＳＮＰ４７、ＳＮＰ４９、ＳＮＰ５１、ＳＮＰ５３、およびＳＮＰ６９からなる群から選択される数個のＳＮＰを含むか、またはそれらからなるのがより好ましい。該ハプロタイプは、表５に開示したハプロタイプから選択されるのがよりさらに好ましい。肥満に関連する該ＳＮＰは、ＳＮＰ３３またはＳＮＰ３４でありうるのがより好ましい。

【００６３】

別の態様では、本発明は、対象において肥満または関連疾患を予防する方法であって、対象由来の試料中のＫＣＮＡＢ２遺伝子座において、肥満または関連疾患の素因を示す変化の存在を検出すること、および肥満または関連疾患に対して予防的処置を施与することを含む方法に関する。該予防的処置は、薬物の投与および／またはダイエットでありうる

。

【００６４】

処置もしくは薬物に対する応答、または処置もしくは薬物に対する副作用を分析し予測する診断学は、個人を特定の処置薬物で処置してよいかどうか判定するために使用してよい。例えば、その診断によって、特定の薬物での処置に個人が正に応答するという見込みが示されたならば、その薬物をその個人に投与してもよい。これに反して、診断によって、特定の薬物での処置に対して個人が負の応答を示す可能性が高いことが示されたならば、代替コースの処置を処方してよい。負の応答は、有効な応答が見られない、または有毒な副作用が存在するとして定義してよい。

【００６５】

臨床薬物トライアルは、ＫＣＮＡＢ２　ＳＮＰについて別の適用を示す。薬物応答または薬物に対する副作用を示す１個または複数のＫＣＮＡＢ２　ＳＮＰは、上記の方法を使用し同定することができる。その後、そのような薬剤の臨床試験における潜在的参加者をスクリーニングして、薬物に対して好ましい応答する可能性が最も高い個人を同定し、副作用を経験する可能性が高い者を除外しうる。つまり、研究で正に応答する可能性が低い個人を含めた結果として測定値を下げることなしに、かつ望ましくない安全性問題の危険にさらされることなく、薬物に正に応答する個人において薬物治療の有効性を測定することができる。

【００６６】

変化は、ＫＣＮＡＢ２　ｇＤＮＡ、ＲＮＡ、またはポリペプチドのレベルで決定することができる。場合によっては、検出は、ＫＣＮＡＢ２遺伝子の全てもしくは一部をシーケンシングすることによって、またはＫＣＮＡＢ２遺伝子の全てもしくは一部を選択的ハイブリッド形成することによって、または増幅することによって実施される。ＫＣＮＡＢ２遺伝子特異的増幅は、変化同定ことの前に実施するのがより好ましい。

【００６７】

ＫＣＮＡＢ２遺伝子座中の変化は、遺伝子座のコード領域および／または非コード領域中の単独でまたは様々に組合せられた任意の形態の変異、欠失、再配列、および／または挿入であってよい。変異は、より具体的には点変異を含む。欠失は、２個の残基から遺伝子もしくは遺伝子座全体までなど、遺伝子座のコード部分または非コード部分中の２個以上の残基の任意の領域を包含しうる。典型的な欠失は、小さな領域、例えばドメイン（イントロン）、反復配列または約５０未満の連続塩基対のフラグメントに作用するが、大きな欠失も生じうる。挿入は、遺伝子座のコード部分または非コード部分中に一個または幾つかの残基を加えることを包含しうる。典型的には、挿入は遺伝子座に１～５０塩基対を加えることを含みうる。再配列には配列の逆転が含まれる。ＫＣＮＡＢ２遺伝子座の変化によって、終止コドンの作成、フレームシフト変異、アミノ酸置換、特定のＲＮＡスプライシングもしくはプロセシング、産物の不安定性、切断型ポリペプチドの産生などがもたらされうる。変化によって、変化した機能、安定性、標的、または構造を有するＫＣＮＡＢ２ポリペプチドが産生されうる。変化はまた、蛋白質の発現を減少させ、または該産生を増大させうる。

【００６８】

本発明による方法の特定の態様では、ＫＣＮＡＢ２遺伝子座中の変化は、ＫＣＮＡＢ２遺伝子中または対応する発現産物の点変異、欠失、および挿入から選択され、点変異および欠失がより好ましい。変化は、ＫＣＮＡＢ２　ｇＤＮＡ、ＲＮＡ、またはポリペプチドレベルで決定することができる。

【００６９】

この点で、次に本発明は、ＫＣＮＡＢ２遺伝子中の２個のＳＮＰ、および肥満に関連する上記の２個のＳＮＰの一つによって特徴付けられるある種のハプロタイプを開示する。ＳＮＰを下表２に報告する。

【００７０】

【表２】

表２

染色体１のゲノム配列中のヌクレオチドの位置(Build34)	SNP の素性	dbSNP 配列	多型性	遺伝子座中の位置およびアミノ酸変化の種類	配列参照
4356069	SNP2	rs875806	G/C	KCNAB2 遺伝子座の 5’	配列番号 5
5054675	SNP17	得られず	G/A	KCNAB2 遺伝子座の 5’	配列番号 6
5634292	SNP23	rs1287635	T/C	KCNAB2 遺伝子座の 5’	配列番号 7
5863071	SNP33	rs3789529	A/G	イントロン	配列番号 8
5868108	SNP34	rs3747977	G/A	コーディング、同義	配列番号 9
6028263	SNP38	rs3747977	G/A	KCNAB2 遺伝子座の 3’	配列番号 10
6120760	SNP42	rs722333	A/G	KCNAB2 遺伝子座の 3’	配列番号 11
6272613	SNP47	rs3007434	G/A	KCNAB2 遺伝子座の 3’	配列番号 12
6354269	SNP49	rs731024	G/A	KCNAB2 遺伝子座の 3’	配列番号 13
6366970	SNP51	得られず	C/A	KCNAB2 遺伝子座の 3’	配列番号 14
6394452	SNP53	rs2076363	G/C	KCNAB2 遺伝子座の 3’	配列番号 15
7112026	SNP69	rs705681	T/C	KCNAB2 遺伝子座の 3’	配列番号 16

【００７１】

別法では、方法には、変化したＫＣＮＡＢ２　ＲＮＡの発現の存在を検出することが含まれる。変化したＲＮＡの発現には、変化したＲＮＡ配列の存在、変化したＲＮＡスプライシングもしくはプロセシングの存在、変化したＲＮＡ量の存在などが含まれる。これらは、例えば、ＫＣＮＡＢ２　ＲＮＡの全てもしくは一部のシーケンシング、あるいは該ＲＮＡの全てもしくは一部の選択的なハイブリッド形成または選択的な増幅を含む、当技術分野で公知の様々技術によって検出することができる。

【００７２】

さらに別法では、方法には、変化したＫＣＮＡＢ２ポリペプチドの発現の存在を検出することが含まれる。変化したＫＣＮＡＢ２ポリペプチドの発現には、変化したポリペプチ

ド配列の存在、変化したＫＣＮＡＢ２ポリペプチド量の存在、変化した組織分布の存在などが含まれる。これらは、例えば、シーケンシングおよび／または（抗体など）特異的リガンドへの結合を含む、当技術分野で公知の様々技術によって検出することができる。

【００７３】

上記のように、当技術分野で公知の様々技術を使用して、変化したＫＣＮＡＢ２遺伝子もしくはＲＮＡの発現もしくは配列を検出または数量化することができ、それらの技術にはシーケンシング、ハイブリッド形成、増幅、および／または（抗体など）特異的リガンドへの結合が含まれる。他の適当な方法には、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）、対立遺伝子特異的増幅、（ＤＮＡでは）サザンブロット法、（ＲＮＡでは）ノーザンブロット法、一本鎖構造解析（ＳＳＣＡ）、ＰＦＧＥ、蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリッド形成（ＦＩＳＨ）、ゲル泳動法、クランプ変性ゲル電気泳動、ヘテロ二本鎖分析、ＲＮａｓｅ保護、化学的ミスマッチ切断、ＥＬＩＳＡ、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、および免疫酵素アッセイ（ＩＥＭＡ）が含まれる。

【００７４】

これらの手法の幾つか（例えば、ＳＳＣＡやＣＧＧＥ）は、変化した配列の存在の結果として核酸の電気泳動による移動の変化に基づく。これらの技術によれば、変化した配列は、ゲル上で移動がシフトすることによって可視化される。次いで、フラグメントをシークエンスして変化を確認することができる。

【００７５】

他の幾つかの手法は、対象由来の核酸と、野生型または変化したＫＣＮＡＢ２遺伝子もしくはＲＮＡに特異的なプローブの間の特異的ハイブリッド形成に基づく。プローブは、懸濁させても、または基材に固定してもよい。典型的には、プローブは標識してハイブリッドの検出を促進させる。

【００７６】

ノーザンブロット法、ＥＬＩＳＡ、ＲＩＡなど、これらの手法の幾つかはポリペプチド配列または発現レベルを評価するのに特に適している。これらの後者の手法では、ポリペプチドに特異的なリガンド、より好ましくは特異的抗体を使用する必要がある。

【００７７】

特定の好ましい態様では、方法は対象由来の試料において、変化したＫＣＮＡＢ２遺伝子発現プロフィールの存在を検出することを含む。上記のように、これは、該試料中に存在する核酸をシーケンシングし、選択的にハイブリッド形成し、かつ／または選択的に増幅することによって実現することができるのがより好ましい。

【００７８】

シーケンシング

シーケンシングは、自動シーケンサを使用する、当技術分野で周知の技術を使用し実行することができる。シーケンシングは、完全ＫＣＮＡＢ２遺伝子で、またはより好ましくは、その特異的ドメインで、典型的には、有害な変異または他の変化を有することが分かっている、または推測されるドメインで実施してよい。

【００７９】

増幅

増幅は、核酸が複製を開始するのに役立つ相補的核酸配列間での特異的ハイブリッド形成に基づく。

【００８０】

増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）、鎖置換増幅法（ＳＤＡ）、核酸配列基礎増幅法（ＮＡＳＢＡ）など、当技術分野で公知の様々技術によって実施してよい。これらの技術は、市販の試薬およびプロトコルを使用して実施することができる。好ましい技術では、対立遺伝子特異的ＰＣＲまたはＰＣＲ－ＳＳＣＰが使用される。通常、増幅は、反応を開始するために、特異的核酸プライマーを使用する必要がある。

【００８１】

ＫＣＮＡＢ２遺伝子または遺伝子座から配列を増幅するのに有用な核酸プライマーは、該遺伝子座の標的領域に側置するＫＣＮＡＢ２遺伝子座の一部と特異的にハイブリッド形成することができ、該標的領域は、肥満または関連疾患を患う一定の対象では変化している。そのような標的領域の例を表２に示す。

【００８２】

表２に同定したＳＮＰを含むＫＣＮＡＢ２標的領域を増幅するために使用することができるプライマーは、配列番号１もしくは３の配列またはＫＣＮＡＢ２のゲノム配列に基づき設計してよい。

【００８３】

本発明のさらに特定の目的は、周辺領域を含むＫＣＮＡＢ２遺伝子または遺伝子座から配列を増幅するのに有用な核酸プライマー中に存在する。そのようなプライマーは、ＫＣＮＡＢ２遺伝子座中の核酸配列に相補し、特異的にハイブリッド形成することが好ましい。特定のプライマーは、該遺伝子座の標的領域に側置するＫＣＮＡＢ２遺伝子座の一部と特異的にハイブリッド形成することができ、該標的領域は肥満または関連疾患を患う一定の対象で変化している。

【００８４】

本発明は、肥満または関連疾患を患う一定の対象で変化しているＫＣＮＡＢ２コード配列の一部（例えば遺伝子やＲＮＡ）に相補し特異的にハイブリッド形成する核酸プライマーにも関する。この点において、本発明の特定のプライマーは、ＫＣＮＡＢ２遺伝子もしくはＲＮＡ中の変化した配列に特異的である。そのようなプライマーを使用することにより、増幅産物の検出によってＫＣＮＡＢ２遺伝子座中の変化の存在が示される。反対に、増幅産物が存在しないことは、特異的変化が試料中に存在しないことを示す。

【００８５】

本発明の典型的なプライマーは、約５～６０ヌクレオチド長の一本鎖核酸分子であり、約８～約２５ヌクレオチド長がより好ましい。この配列は、ＫＣＮＡＢ２遺伝子座の配列から直接得ることができる。高特異性を求めるには完全相補が好ましい。しかし、一定のミスマッチは許される。

【００８６】

本発明はまた、対象で肥満または関連疾患の存在もしくは素因を検出する方法、あるいは肥満または関連疾患の処置に対する対象の応答を評価する方法で、上記の核酸プライマーまたは一対の核酸プライマーを使用することに関する。

【００８７】

選択的ハイブリッド形成

ハイブリッド形成の検出法は、核酸配列変化を検出するのに役立つ相補的核酸配列間で特異的ハイブリッドが形成されることに基づく。

【００８８】

特定の検出技術には、野生型または変化したＫＣＮＡＢ２遺伝子もしくはＲＮＡに特異的な核酸プローブの使用、続いてハイブリッドの存在の検出が関与する。プローブは、懸濁させても、または（核酸アレイまたはチップ技術で）基材もしくは支持体に固定してもよい。典型的には、プローブは標識してハイブリッドの検出を促進する。

【００８９】

この点で、本発明の特定の態様は、対象由来の試料と、変化したＫＣＮＡＢ２遺伝子座に特異的な核酸プローブを接触させること、およびハイブリッドの形成を評価することを含む。特定の好ましい態様では、方法は、試料と、野生型ＫＣＮＡＢ２遺伝子座特異的なプローブおよびその様々な変化形のそれぞれ特異的なプローブのセットを同時に接触させることが含まれる。この態様では、試料中のＫＣＮＡＢ２遺伝子座中の様々な形態の変化の存在を直接検出することができる。さらに、様々な対象に由来する様々な試料は並行して処理してよい。

【００９０】

本発明の脈絡の中で、プローブは、ＫＣＮＡＢ２遺伝子もしくはＲＮＡ（の標的部分）

と相補し、特異的にハイブリッド形成することができるポリヌクレオチド配列であり、かつ肥満または代謝性疾患の素因となるか、またはそれらに関連するＫＣＮＡＢ２対立遺伝子に関与するポリヌクレオチド多型を検出するのに適しているポリヌクレオチド配列をさす。プローブは、ＫＣＮＡＢ２遺伝子、ＲＮＡ、もしくはその標的部分に完全に相補することが好ましい。典型的には、プローブは、８～１０００ヌクレオチド長の、例えば、１０～８００、より好ましくは１５～７００、典型的には２０～５００クレオチド長の一本鎖核酸を含む。より長いプローブを使用することもできることは理解されるものとする。本発明の好ましいプローブは、８～５００ヌクレオチド長の一本鎖核酸分子であり、この分子は変化を有するＫＣＮＡＢ２遺伝子もしくはＲＮＡ領域と特異的にハイブリッド形成することができる。

【００９１】

本発明の特定の態様は、変化した（例えば変異）ＫＣＮＡＢ２遺伝子もしくはＲＮＡに特異的な核酸プローブ、すなわち、該変化したＫＣＮＡＢ２遺伝子もしくはＲＮＡと特異的にハイブリッド形成し、該変化を有しないＫＣＮＡＢ２遺伝子もしくはＲＮＡとは基本的にハイブリッド形成しない核酸プローブである。特異性は、標的配列にハイブリッド形成すると特異的シグナルが発生し、このシグナルが非特異的にハイブリッド形成によって発生したシグナルと区別することができることを示す。本発明によるプローブを設計するには完全相補配列が好ましい。しかし、特異的シグナルが、非特異的ハイブリッド形成と識別しうる限り、一定のミスマッチが許されることは理解されるものとする。

【００９２】

そのようなプローブの特定の例は、上表２に示す点変異を有するＫＣＮＡＢ２遺伝子もしくはＲＮＡを含む、ゲノム領域の標的部分に相補する核酸配列である。より具体的には、プローブは、配列番号５～１６からなる群から選択される配列またはＳＮＰを含むそのフラグメントもしくはその相補的配列を含むことができる。

【００９３】

プローブの配列は、本出願において提供されるＫＣＮＡＢ２遺伝子およびＲＮＡの配列から得ることができる。ヌクレオチドの置換、およびプローブの化学的修飾を実施してよい。そのような化学的修飾を実施して、ハイブリッドの安定性を増大させ（例えば介入性基）てもよい、またはプローブを標識してもよい。標識の典型的な例には、それだけには限らないが、放射能、蛍光、発光、酵素標識などが含まれる。

【００９４】

本発明はまた、対象において肥満または関連疾患の存在もしくは素因を検出する方法、あるいは肥満または関連疾患の処置に対する対象の応答を評価する方法で、上記の核酸プローブを使用することに関する。

【００９５】

特異的リガンド結合

上記のように、ＫＣＮＡＢ２遺伝子座中の変化は、ＫＣＮＡＢ２ポリペプチド配列の変化または発現レベルをスクリーニングすることによっても検出しうる。この点で、本発明の特定の態様には、試料とＫＣＮＡＢ２ポリペプチドに特異的なリガンドを接触させること、および複合体の形成を決定することが含まれる。

【００９６】

特異的抗体など、様々な種類のリガンドを使用してよい。特定の態様では、試料をＫＣＮＡＢ２ポリペプチドに特異的抗体と接触させ、免疫複合体の形成を決定する。ＥＬＩＳＡ、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、免疫酵素アッセイ（ＩＥＭＡ）など、免疫複合体を検出する様々な方法を使用することができる。

【００９７】

本発明の脈絡の中で、抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、および実質上同じ抗原特異性を有するそのフラグメントもしくは誘導体を表す。フラグメントには、Ｆａｂ、Ｆａｂ'２、ＣＤＲ領域などが含まれる。誘導体には、一本鎖抗体、ヒト型化抗体、多機能性抗体などが含まれる。

【００９８】
ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドに特異的な抗体は、ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドに選択的に結合する抗体、すなわち、ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドまたはそのエピトープ含有フラグメントに対して誘起された抗体を表す。他の抗原との非特異的結合も生じうるが、標的ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドへの結合がより高い親和性で生じ、非特異的結合と確実に区別することができる。
【００９９】
特定の態様では、方法には、対象由来の試料と、ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドの変化形に特異的な抗体（でコートした支持体）を接触させること、および免疫複合体の存在を決定することが含まれる。特定の態様では、試料は、野生型やその様々な変化形など、ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドの異なる形態に特異的な様々な抗体（でコートした支持体）と同時に、または並行して、または順次接触させてよい。
【０１００】
本発明は、対象における肥満または関連疾患の存在もしくは素因を検出する方法、あるいは肥満または関連疾患の処置に対する対象の応答を評価する方法で、リガンド、好ましくは、上記のように抗体、そのフラグメントもしくは誘導体を使用することにも関する。
【０１０１】
本発明は、対象由来の試料で、ＫＣＮＡＢ２遺伝子もしくはポリペプチド中の、ＫＣＮＡＢ２遺伝子もしくはポリペプチドの発現中の、および／またはＫＣＮＡＢ２活性中の変化の存在を検出するための産物および試薬を含む診断キットにも関する。本発明による該診断キットは、任意のプライマー、任意のプライマー対、任意の核酸プローブ、および／または任意のリガンド、好ましくは本発明に記載した抗体を含む。本発明による該診断キットは、ハイブリッド形成、増幅または抗原－抗体免疫反応を実施するための試薬および／またはプロトコルをさらに含むことができる。
【０１０２】
診断方法は、インビトロで、エクスビボで、またはインビボで実施することができ、インビトロまたはエクスビボが好ましい。方法では、ＫＣＮＡＢ２遺伝子座の状態を評価するために対象由来の試料を使用される。試料は、核酸またはポリペプチドを含む、対象由来の任意の生物試料でよい。そのような試料の例には、流体、組織、細胞試料、器官、生検試料などが含まれる。最も好ましい試料は、血液、血漿、唾液、尿、精液などである。出生前診断は、例えば、胎児細胞や胎盤細胞を試験することによって実施しうる。従来技術により試料を採取し、診断のために直接使用しても、または貯蔵してもよい。試料は、試験用に核酸またはポリペプチドに利用能を付与または向上させるため、この方法を実施する前に処理してよい。処理には、例えば、溶解（例えば、機械的、物理的、化学的など）や遠心分離などが含まれる。さらに、核酸および／またはポリペプチドは、従来技術によって予備単離または濃縮し、および／または複合性を低減しうる。核酸およびポリペプチドは、そのフラグメントを産生するための酵素または他の化学的または物理的処理によって処理してもよい。特許請求する方法の高い感度を考慮すると、ごく微量の試料でもアッセイの実施には十分である。
【０１０３】
示すように、試料は、変化したＫＣＮＡＢ２遺伝子座の存在を評価するために、プローブ、プライマー、またはリガンドなどの試薬と接触させるのが好ましい。接触は、プレート、チューブ、ウェル、ガラスなど任意の適当な器具で実施してよい。具体的態様では、核酸アレイや特異的リガンドアレイなど、試薬でコートした基材で接触を実施する。基材は、ガラス、プラスチック、ナイロン、紙、金属、ポリマーなどを含む任意の支持体など、固形または半固形基材でよい。基材は、様々な形態および大きさでよく、例えば、スライド、メンブレン、ビーズ、カラム、ゲルなどでよい。接触は、試薬と、試料の核酸またはポリペプチドの間で複合体が形成されるのに適当な任意の条件下で行ってよい。
【０１０４】
試料中の変化したＫＣＮＡＢ２ポリペプチド、ＲＮＡ、もしくはＤＮＡの知見は、対象

における、変化したＫＣＮＡＢ２遺伝子座の存在を示し、肥満または代謝性疾患の存在、素因、または進行段階に相関してよい。

【０１０５】

例えば、生殖系列ＫＣＮＡＢ２変異を有する個人は、肥満または代謝性疾患に発展する危険性が高い。対象において、変化したＫＣＮＡＢ２遺伝子座の存在を決定することによって、より有効でありカスタマイズされた適切な治療的介入の設計が可能になる。さらに、前駆症状レベルでのこの決定によって、施用すべき予防治療計画がもたらされる。

【０１０６】

連鎖不平衡

一度、第１のＳＮＰが対象のゲノム領域、より具体的にはＫＣＮＡＢ２遺伝子座で同定されたならば、当技術分野の通常の技術を有する専門家は、この第１のＳＮＰと連鎖不平衡の追加のＳＮＰを容易に同定することができる。実際、肥満または関連代謝性疾患に関連する第１のＳＮＰと連鎖不平衡の任意のＳＮＰはこの形質と関係する。従って、所与のＳＮＰと肥満または関連代謝性疾患との間の関連性が実証された後は、この形質に関連する別のＳＮＰの発見は、この特定の領域でＳＮＰ密度を増大させるために非常に重要なものとなりうる。

【０１０７】

所与のＳＮＰと連鎖不平衡の追加のＳＮＰを同定するには（ａ）複数の個人に由来する第１のＳＮＰを含むか、またはそれを囲むゲノム領域に由来するフラグメントを増幅すること、（ｂ）該第１のＳＮＰを収容するか、または囲むゲノム領域中に第２ＳＮＰを同定すること、（ｃ）該第１のＳＮＰと第２ＳＮＰの連鎖不平衡の分析を行うこと、および（ｄ）該第１のマーカーと連鎖不平衡である該第２ＳＮＰを選択することが関与する。こと（ｂ）および（ｃ）を含むサブコンビネーションも企図される。

【０１０８】

ＳＮＰを同定し、連鎖不平衡分析を実施する方法は、過度の実験をせずとも公知の方法を使用することによって、当業者が行うことができる。

【０１０９】

本発明による方法では、より具体的には本発明による診断方法では、連鎖不平衡なこれらのＳＮＰを使用することもできる。

【０１１０】

例えば、クローン病の連鎖遺伝子座が、染色体５ｑ３１上の１８ｃＭにわたる大きい領域にマッピングされている（Riouxら、2000および2001）。マイクロサテライトマーカーの高密度マップおよび全領域にわたるＳＮＰを使用して、連鎖不平衡（ＬＤ）の有力な証拠が見出された。本発明者らはＬＤの証拠を見出し、超高密度ＳＮＰマップを開発し、このマップから選択したマーカーを高い密度で採取する研究を行った。ＴＤＴを使用し、多遺伝子座の分析によって、それぞれ独立に関連する多数のＳＮＰによって特徴付けられた単一共通リスクハプロタイプを決定した。これらのＳＮＰは、リスクハプロタイプに特有であり、その情報内容は互いにほぼ完全なＬＤであるという点で本質的に同一であった。これらのＳＮＰの同等の特性が、遺伝的証拠のみを基準として、この領域内で原因となる変異を同定することを不可能なものにしている。

【０１１１】

原因となる変異

肥満または関連代謝性疾患の原因であるＫＣＮＡＢ２遺伝子中の変異は、肥満または関連代謝性疾患を示す患者からのＫＣＮＡＢ２遺伝子の配列と対照個人を比較することによって同定しうる。ＫＣＮＡＢ２のＳＮＰと肥満または関連代謝性疾患の同定された関連性に基づき、同定した遺伝子座を変異を求めてスキャンすることができる。好ましい態様では、ＫＣＮＡＢ２遺伝子のエクソンやスプライス部位などの機能領域、プロモーターおよび他の調節領域などを変異を求めてスキャンする。好ましくは、肥満または関連代謝性疾患を示す患者は、肥満または関連代謝性疾患に関連すると思われる変異を有し、対照個人は肥満または関連代謝性疾患に関連する変異または対立遺伝子を有しない。肥満または関

連代謝性疾患を示す患者は、対照個人より高い頻度で肥満または関連代謝性疾患に関連すると思われる変異を有することも可能であると思われる。

【０１１２】

そのような変異を検出するために使用される方法は、一般的に、肥満または関連代謝性疾患を示す患者および対照個人からのＫＣＮＡＢ２遺伝子のＤＮＡ試料から、肥満または関連代謝性疾患に関連するＳＮＰもしくは一群のＳＮＰを含むＫＣＮＡＢ２遺伝子領域を増幅するステップ、増幅領域をシーケンシングするステップ、肥満または関連代謝性疾患を示す患者および対照個人からのＫＣＮＡＢ２遺伝子のＤＮＡ配列の比較するステップ、肥満または関連代謝性疾患を示す患者に特異的な変異を決定するステップを含む。

【０１１３】

従って、過度の実験をせずに公知の方法を使用することによって、ＫＣＮＡＢ２遺伝子中の原因となる変異の同定を当業者は行うことができる。

【０１１４】

例えば、常法を使用することによって、以下の実施例では原因となる変異が同定された。

【０１１５】

Hugotら（2001）は、ポジショナルクローニング法を適用して、既にクローン病への感受性との関わりが判明していた染色体１６領域において、クローン病にかかりやすい遺伝子変異体を同定した。潜在的な感受性位置をつき止めるために、遺伝子座２６マイクロサテライトマーカーの遺伝子型を決定し、伝達不平衡試験を使用してクローン病との関連性を試験した。境界の有意な関連性が、マイクロサテライトマーカーＤ１６Ｓ１３６の一対立遺伝子間に見出された。さらに１１個のＳＮＰが周辺領域から選択され、数個のＳＮＰが有意な関連性を示した。この領域からのＳＮＰ５～８は、ＮＯＤ２／ＣＡＲＤ１５遺伝子の単一エクソン中に存在することが判明し非同義変異体と思われた。本発明者らは、これに促進されて５０人のＣＤ患者のこの遺伝子の完全コード配列をシーケンスした。さらに２個の非同義変異（ＳＮＰ１２およびＳＮＰ１３）が見出された。ＳＮＰ１３は、家系伝達不平衡試験を使用し、最も有意に関連（$p = 6 \times 10^{-6}$）した。別の独立した研究では、４人の対照と比較して１２人の患者個人に由来するこの遺伝子のコード領域をシーケンシングすることによって同じ変異体が見出されている（Oguraら、２００１）。１－ｂｐの挿入に対応する、ＳＮＰ１３の稀な対立遺伝子は、ＮＯＤ２／ＣＡＲＤ１５蛋白質を切断すると予想された。この対立遺伝子も正常な健康な個人中に存在し、とはいえ頻度は対照と比較して著しく低い。

【０１１６】

同様に、Lesageら（2002）は、コード領域を系統立ててシーケンシングすることによって、１６６人の孤発性および２８７人の家族事例、１５９人の潰瘍性大腸炎（ＵＣ）患者を含む、ＣＤである４５３人患者のＣＡＲＤ１５、および１０３人の健常対照群対象の変異分析を実施した。同定された６７個の配列変動のうち、ＣＤ患者の９個の対立遺伝子頻度は＞５%であった。そのうちの６個は多型とみなされ、３個（ＳＮＰ１２－Ｒ７０２Ｗ、ＳＮＰ８－Ｇ９０８Ｒ、およびＳＮＰ１３－１００７ｆｓ）はＣＤ感受性に独立に関連することが確認された。潜在的疾病誘発変異（ＤＣＭ）として見なされたのは２７個の稀な追加変異であった。３個の主要な変異体（Ｒ７０２Ｗ、Ｇ９０８Ｒ、および１００７ｆｓ）は、全ＣＤ変異のそれぞれ３２%、１８%、および３１%を示し、それに対して２７個の稀な変異の全てはＤＣＭの１９%を示した。合計で、変異の９３%がその遺伝子の遠位第３に位置した。ＵＣに関連しては変異は見つからなかった。それに反して、ＣＤ患者の５０%が少なくとも１個のＤＣＭを有し、二重の変異を有する１７%を含む。

【０１１７】

薬物スクリーニング

本発明は、新規な標的、および薬物候補もしくはリードをスクリーニングする方法も提供する。方法は、結合アッセイおよび／または機能アッセイを含み、インビトロ、細胞系、動物などで実施してよい。

【０１１８】
本発明の特定の目的は、生物学的活性化合物を選択する方法であって、試験化合物と、本発明によるＫＣＮＡＢ２遺伝子もしくはポリペプチドをインビトロで接触させること、ならびに該試験化合物が該ＫＣＮＡＢ２遺伝子もしくはポリペプチドに結合する能力を決定することを含む方法にある。該遺伝子またはポリペプチドに結合することは、化合物が該標的の活性をモデュレーションする能力、すなわち、対象で肥満または代謝性疾患につながる経路に作用する能力に関する指標を示す。好ましい態様では、方法は、試験化合物と、本発明によるＫＣＮＡＢ２ポリペプチドまたはそのフラグメントをインビトロで接触させること、ならびに該試験化合物が該ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドまたはフラグメントに結合する能力を決定することを含む。フラグメントはＫＣＮＡＢ２ポリペプチドの結合部位を含むのが好ましい。好ましくは、該ＫＣＮＡＢ２遺伝子もしくはポリペプチド、またはそのフラグメントは、変化もしくは変異したＫＣＮＡＢ２遺伝子もしくはポリペプチド、または変化もしくは変異を含むそれらのフラグメントである。
【０１１９】
本発明の特定の目的は、肥満および関連疾患に活性な化合物を選択する方法であって、試験化合物と、本発明によるＫＣＮＡＢ２ポリペプチドまたは結合部位を含むそのフラグメントをインビトロで接触させること、ならびに該試験化合物が該ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドまたはそのフラグメントに結合する能力を決定することを含む方法にある。好ましくは、該ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドまたはそのフラグメントは、変化もしくは変異したＫＣＮＡＢ２ポリペプチド、または変化もしくは変異を含むそのフラグメントである。
【０１２０】
さらに特定の態様では、方法は、本発明によるＫＣＮＡＢ２ポリペプチドを発現する組換え宿主細胞と試験化合物を接触させること、および該試験化合物が該ＫＣＮＡＢ２に結合し、ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドの活性をモデュレーションする能力を決定することを含む。好ましくは、該ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドまたはそのフラグメントは、変化もしくは変異したＫＣＮＡＢ２ポリペプチド、または変化もしくは変異を含むそのフラグメントである。
【０１２１】
結合の決定は、試験化合物の標識化、標識した参照リガンドとの競合など、様々な技術によって実施してよい。
【０１２２】
本発明の別の目的は、生物学的活性化合物を選択する方法であって、試験化合物と本発明によるＫＣＮＡＢ２ポリペプチドをインビトロで接触させること、ならびに該試験化合物が該ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドの活性をモデュレーションする能力を決定することを含む方法にある。好ましくは、該ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドまたはそのフラグメントは、変化もしくは変異したＫＣＮＡＢ２ポリペプチド、または変化もしくは変異を含むそのフラグメントである。
【０１２３】
本発明のさらなる目的は、生物学的活性化合物を選択する方法であって、試験化合物と本発明によるＫＣＮＡＢ２遺伝子をインビトロで接触させること、および該試験化合物が該ＫＣＮＡＢ２遺伝子の発現をモデュレーションする能力を決定することを含む方法にある。好ましくは、該ＫＣＮＡＢ２遺伝子またはそのフラグメントは、変化もしくは変異したＫＣＮＡＢ２遺伝子、または変化もしくは変異を含むそのフラグメントである。
【０１２４】
他の態様では、本発明は、活性化合物、特に、肥満または代謝性疾患に活性な化合物をスクリーニングし、選択し、または同定する方法であって、ＫＣＮＡＢ２遺伝子プロモーターの制御下にレポーター遺伝子を含むレポーター構築体を含む組換え宿主細胞を試験化合物と接触させること、およびそのレポーター遺伝子の発現をモデュレーションする（例えば、刺激し、または減少させる）試験化合物を選択することを含む方法に関する。好ましくは、該ＫＣＮＡＢ２遺伝子プロモーターまたはそのフラグメントは、変化もしくは変

異したＫＣＮＡＢ２遺伝子プロモーター、または変化もしくは変異を含むそのフラグメントである。

【０１２５】

スクリーニング法の特定の態様ではモデュレーションは阻害である。スクリーニング法の他の特定の態様ではモデュレーションは活性化である。

【０１２６】

上のスクリーニングアッセイは、プレート、チューブ、ディッシュ、フラスコなど、任意の適当な器具で実施してよい。典型的には、マルチウェルプレートでアッセイを実施する。数種の試験化合物を並行してアッセイすることができる。さらに、試験化合物は様々な起源、性質、および組成であってよい。試験化合物は、任意の有機または無機物質、例えば、脂質、ペプチド、ポリペプチド、核酸、小分子などであってよく、単離されていても、または他の物質との混合物であってもよい。化合物は、例えば、産物のコンビナトリアルライブラリーの全てもしくは一部でよい。

【０１２７】

医薬組成物、治療

本発明のさらなる目的は、（ｉ）上記のように、ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドまたはそのフラグメント、ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドをコードする核酸またはそのフラグメント、ベクターまたは組換え宿主細胞、ならびに（ｉｉ）薬学的に許容される担体またはビヒクルを含む医薬組成物である。

【０１２８】

本発明は、対象において肥満または関連疾患を治療または予防する方法であって、該対象に機能性（例えば野生型）ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドまたはそれをコードする核酸を投与することを含む方法に関する。

【０１２９】

本発明の他の態様は、対象において肥満または関連疾患を治療または予防する方法であって、該対象に本発明によるＫＣＮＡＢ２遺伝子もしくは蛋白質の発現もしくは活性をモデュレーションし、好ましくは、活性化し、または模倣する化合物を投与することを含む方法にある。該化合物は、ＫＣＮＡＢ２アゴニストもしくはアンタゴニスト、ＫＣＮＡＢ２のアンチセンスもしくはＲＮＡｉ、本発明によるＫＣＮＡＢ２ポリペプチドに特異的な抗体、またはそのフラグメントもしくは誘導体であってよい。方法の特定の態様ではモデュレーションは阻害である。方法の他の特定の態様では、モデュレーションは活性化である。

【０１３０】

本発明は、概括的に、対象において、肥満または関連代謝性疾患を治療または予防する医薬組成物の製造における、機能性ＫＣＮＡＢ２ポリペプチド、それをコードする核酸、または本発明によるＫＣＮＡＢ２遺伝子もしくは蛋白質の発現または活性をモデュレーションする化合物の使用にも関する。該化合物は、ＫＣＮＡＢ２アゴニストもしくはアンタゴニスト、ＫＣＮＡＢ２のアンチセンスもしくはＲＮＡｉ、本発明によるＫＣＮＡＢ２ポリペプチドに特異的な抗体、またはそのフラグメントもしくは誘導体であってよい。方法の特定の態様ではモデュレーションは阻害である。方法の他の特定の態様ではモデュレーションは活性化である。

【０１３１】

本発明は、肥満（および関連疾患）とＫＣＮＡＢ２遺伝子座の間の相関を実証する。従って、本発明は、治療的介入の新規な標的を提供する。様々な手法が、対象で、特に変化したＫＣＮＡＢ２遺伝子座を有する対象で、ＫＣＮＡＢ２活性または機能を回復またはモデュレーションするために企図することができる。野生型機能をそのような対象に供給することは、病原性細胞または生物体で、肥満および関連疾患の表現型発現を抑制すると予測される。そのような機能の供給は、遺伝子または蛋白質療法によって、またはＫＣＮＡＢ２ポリペプチド活性をモデュレーションするか、または模倣する化合物（例えば上記スクリーニングアッセイで同定されたアゴニスト）の投与によって実現することができる。

【０１３２】
上記のように、野生型ＫＣＮＡＢ２遺伝子またはその機能部分は、ベクターを使用し、それを必要とする対象の細胞に導入してよい。ベクターは、ウイルスベクターまたはプラスミドでよい。遺伝子は、裸ＤＮＡとして導入してもよい。この遺伝子は、レシピエント宿主細胞のゲノム中に統合し、または染色体外に残すために提供することができる。組込みは、無作為に、または相同組換えなどによって正確に所定の部位に生じさせうる。特に、ＫＣＮＡＢ２遺伝子の機能コピーは、細胞中の変化したバージョンを相同組換えによって置換するために挿入してよい。それ以上の技術には、遺伝銃、リポソーム介在形質移入、カチオン性脂質介在形質移入などが含まれる。遺伝子治療は、直接遺伝子注入、あるいは機能性ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドを発現している、エクスビボで調製し遺伝子変化させた細胞を投与することによって実現してよい。

【０１３３】
ＫＣＮＡＢ２活性（例えば、ペプチド、薬物、ＫＣＮＡＢ２アゴニスト、または有機化合物）を有する他の分子を使用して、対象で機能性ＫＣＮＡＢ２活性を回復するか、または細胞で有害な表現型を抑制することもできる。

【０１３４】
細胞中の機能性ＫＣＮＡＢ２遺伝子機能の修復を使用して、肥満または代謝性疾患の発生を予防するか、または該疾病の進行を減少させてもよい。

【０１３５】
そのような処置によって、細胞、特に有害な対立遺伝子を有するような細胞の肥満表現型を抑制しうる。

【０１３６】
本発明の別の局面および利点は、以下の実験の節に開示し、この節は例示的なものとみなされ、本出願の本発明の範囲を制限するものではない。

【０１３７】
遺伝子、ベクター、組換え細胞およびポリペプチド
本発明の別の局面は、診断、治療またはスクリーニングで使用するための新規な産物に存在する。これらの産物には、ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドをコードする核酸分子もしくはそのフラグメント、それを含むベクター、組換え宿主細胞および発現されたポリペプチドが含まれる。

【０１３８】
より具体的には、本発明は、変化もしくは変異したＫＣＮＡＢ２遺伝子、または該変化もしくは変異を含むそのフラグメントに関する。本発明は、変化もしくは変異したＫＣＮＡＢ２ポリペプチド、または該変化もしくは変異を含むそのフラグメントをコードする核酸分子にも関する。該変化もしくは変異は、ＫＣＮＡＢ２活性を変化させる。変化した活性は増大または減少であってもよい。本発明は、さらに、変化もしくは変異したＫＣＮＡＢ２遺伝子、または該変化もしくは変異を含むそのフラグメントまたは変化もしくは変異したＫＣＮＡＢ２ポリペプチド、または該変化もしくは変異を含むそのフラグメントをコードする核酸分子を含むベクター、組換え宿主細胞、および発現されたポリペプチドに関係する。

【０１３９】
本発明のさらなる目的は、本発明によるＫＣＮＡＢ２ポリペプチドをコードする核酸を含むベクターである。ベクターは、クローニングベクター、またはより好ましくは発現ベクター、すなわち、要求にかなう宿主細胞中で該ベクターからＫＣＮＡＢ２ポリペプチドの発現を引き起こす調節配列を含むベクターでよい。

【０１４０】
これらのベクターを使用して、例えば、ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドをインビトロで、エクスビボでまたはインビボで発現し、トランスジェニックもしくは「ノックアウト」非ヒト動物を作出し、核酸を増幅し、アンチセンスＲＮＡを発現することができる。

【０１４１】

典型的には、本発明のベクターは、調節配列、例えば、プロモーター、ｐｏｌｙＡなどに動作可能に連結した、本発明によるＫＣＮＡＢ２コード配列を含む。用語「動作可能に連結」は、コード配列および調節配列が機能的に関連し、その結果調節配列がコード配列の発現（例えば転写）を引き起こすことを示している。ベクターには、さらに、一個または幾つかの複製起点および／または選択マーカーを含めてよい。プロモーター領域は、コード配列に関して相同または異種であり、インビボでの使用を含め、任意の適当な宿主細胞中で遍在的、構成的、調節した、かつ／または組織特異的な発現をもたらしうる。プロモーターの例には、細菌性プロモーター（Ｔ７、ｐＴＡＣ、Ｔｒｐプロモーターなど）、ウイルスプロモーター（ＬＴＲ、ＴＫ、ＣＭＶ－ＩＥなど）、哺乳動物遺伝子プロモーター（アルブミン、ＰＧＫなど）などが含まれる。

【０１４２】

ベクターは、プラスミド、ウイルス、コスミド、ファージ、ＢＡＣ、ＹＡＣなどでよい。プラスミドベクターは、pBluescript、ｐＵＣ、ｐＢＲなど、市販のベクターから調製しうる。ウイルスベクターは、当技術分野で公知の組換えＤＮＡ技術によりバキュロウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、ＡＡＶなどから生成してよい。

【０１４３】

この点で、本発明の特定の目的は、先に定義した、ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドをコードする組換えウイルスにある。組換えウイルスは、複製欠損型が好ましく、Ｅ１－および／またはＥ４－欠損アデノウイルス、Ｇａｇ－、ｐｏｌ－および／またはｅｎｖ－欠損レトロウイルスおよびＲｅｐ－および／またはＣａｐ－欠損ＡＡＶから選択されるのがさらにいっそう好ましい。そのような組換えウイルスは、形質移入パッケージング細胞、またはヘルパープラスミドまたはウイルス用いた一時的形質移入などの当技術分野で公知の技術によって生成しうる。ウイルスパッケージング細胞の典型的な例には、ＰＡ３１７細胞、ＰｓｉＣＲＩＰ細胞、ＧＰｅｎｖ＋細胞、２９３細胞などが含まれる。そのような複製欠損型組換えウイルスを生成するための詳細なプロトコルは、例えば、Ｗ０９５／１４７８５、ＷＯ９６／２２３７８、ＵＳ５，８８２，８７７、ＵＳ６，０１３，５１６、ＵＳ４，８６１，７１９、ＵＳ５，２７８，０５６，およびＷ０９４／１９４７８に見出すことができる。

【０１４４】

本発明のさらに別の目的は、組換えＫＣＮＡＢ２遺伝子または先に定義したベクターを含む組換え宿主細胞にある。適当な宿主細胞には、それだけには限らないが、原核細胞（細菌など）および真核細胞（酵母細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞など）が含まれる。具体例には、大腸菌、クルイベロミセスもしくはサッカロミセス酵母、哺乳動物細胞系統（例えば、ベロ細胞、ＣＨＯ細胞、３Ｔ３細胞、ＣＯＳ細胞など）および初代または樹立された哺乳動物細胞培養（例えば、線維芽細胞、胚細胞、上皮細胞、神経細胞、脂肪細胞から生成）が含まれる。

【０１４５】

本発明は、本発明によるＫＣＮＡＢ２ポリペプチドを発現する組換え宿主細胞を産生する方法であって、（ｉ）上記のように、要求にかなう宿主細胞に組換え核酸またはベクターをインビトロまたはエクスビボで導入すること、（ｉｉ）インビトロまたはエクスビボで得られた組換え宿主細胞を培養すること、および（ｉｉｉ）場合により、ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドを発現する細胞を選択することを含む方法にも関する。

【０１４６】

以下に記述するように、そのような組換え宿主細胞を使用して、ＫＣＮＡＢ２ポリペプチドを産生し、活性分子をスクリーニングすることができる。そのような細胞をモデル系として使用して、肥満および代謝性疾患を研究することもできる。これらの細胞は、任意の適当な培養器具（プレート、フラスコ、ディッシュ、チューブ、ポウチなど）に入れたＤＭＥＭ、ＲＰＭＩ、ＨＡＭなどの適当な培地で維持することができる。

【０１４７】

実施例

１．ヒト染色体１上の肥満感受性座位の同定
Ａ．染色体１感受性遺伝子を同定するためのGenome HIPプラットフォーム
Genome HIPプラットフォームを利用して肥満感受性遺伝子の迅速な同定が可能になった。
【０１４８】
手短に言えば、この技術は血縁個人らのＤＮＡから形成した対からなる。各ＤＮＡには、同定を可能にする特異的標識をマークする。次いで、ハイブリッドを２個のＤＮＡ間で形成する。次いで、マルチこと手順で２個のＤＮＡから家系同一的（ＩＢＤ）フラグメントを全て選択する特定の工程（ＷＯ００／５３８０２）を適用する。次いで、残余のＩＢＤ濃縮ＤＮＡは、ＢＡＣクローン由来ＤＮＡマイクロアレイに対してスコアし、染色体上のＩＢＤ画分の位置決めが可能になる。
【０１４９】
多くの異なる家族に対しこの方法を行い、各家族の各対のＩＢＤ画分マトリックスがもたらされる。次いで、統計分析により、試験した全家族間に共有する最小ＩＢＤ領域を計算する。有意な結果（ｐ値）は、正の領域と当該形質（ここでは肥満）の連鎖を証明する。結合間隔は、有意なＰ値を示す２個の最も遠いクローンによって区切ることができる。
【０１５０】
本発明の研究では、（肥満度指数＞９０パーセンタイルで定義した）巨大な肥満に一致するドイツ起源の１６４家族（１７８人は独立兄弟対）をGenome HIP法にかけた。次いで、得られたＩＢＤ濃縮ＤＮＡ画分をＣｙ５蛍光色素で標識し、平均間隔が１．２メガ塩基対の全ヒトゲノムを包含する２２６３ＢＡＣクローンからなるＤＮＡアレイに対してハイブリッド形成する。Ｃｙ３で標識した非選択ＤＮＡを使用してシグナル値を規準化し、各クローンの割合をコンピュータで出した。次いで、割合結果のクラスター形成を実施して、各クローンおよび対のＩＢＤ状態を決定する。
【０１５１】
この手法を適用することによって、染色体１上の領域（塩基４１２６９８７～７００７６９０）に約３メガ塩基にわたる数個のＢＡＣクローン（ＢＡＣＡ１３ＺＨ１０、ＢＡＣＡ１７ＺＦ０７およびＢＡＣＡ１５ＺＤ０５）が同定され、それにより肥満との連鎖の有意な証拠（$p < 2.5 \times 10^{-5}$）が示された。
【０１５２】
表３：ＫＣＮＡＢ２遺伝子座中の染色体１の連鎖結果：示されるものは、連鎖の証拠が認められる、３ＢＡＣクローンに対応する領域である。クローンの開始および停止位置は、この染色体（ｐ－ｔｅｒ）の開始であるＮＣＢＩ　Ｂｕｉｌｄ３４配列に基づくそれらのゲノム位置に対応する。
【０１５３】
【表３】

表３

ヒト遺伝子	クローン	開始	停止	情報対の比率	ｐ値
1	BACA13ZH10		4 126 987	0.92	2.50E-06
1	BACA17ZF07	6 589 325	6 686 208	0.94	8.00E-11
1	BACA15ZD05	6 817 039	7 007 690	0.93	3.80E-10

【０１５４】
Ｂ．染色体１上の肥満感受性遺伝子の同定
連結した染色体領域中の前述の３メガ塩基をスクリーニングすることによって、本発明

者らは、肥満および関連表現型の候補として電位型カリウムチャネル、シェーカー関連ファミリ、βメンバー２（ＫＣＮＡＢ２）遺伝子を同定した。この遺伝子は、実際臨界間隔中に存在し、前述のクローンによって区切られた連鎖の証拠を有する。

【０１５５】

ＫＣＮＡＢ２遺伝子は、ＮＰ＿００３６２７（ｍＲＮＡ　ＮＭ＿００３６３６　３．１７kb）に対して予想された３６７－アミノ酸ポリペプチドをコードし、ゲノム配列５９．９kbに広がる。その遺伝子によってコードされている蛋白質は、カリウムチャンネル、電位型、シェーカー－関連サブファミリのメンバーである。このメンバーはβサブユニットの一つであり、このユニットは機能性Ｋｖ－αサブユニット関連する補助蛋白質である。このメンバーは、ＫＣＮＡ４遺伝子産物（Ｋｖ１．４αサブユニット）の機能性特性を変化させる。この遺伝子の代替スプライシングによって、異なるアイソフォーム（ＮＰ＿７４２１２８）をコードする他の転写変異体（ＮＭ＿１７２１３０）がもたらされる。

【０１５６】

電位型カリウム（Ｋｖ）経路は、機能上および構造上の観点から、電位型イオンチャンネルの最も複雑なクラスを表す。その多様な機能には、神経伝達物質放出、心拍数、インスリン分泌、ニューロンの興奮、上皮電解液輸送、平滑筋収縮、および細胞量の調節が含まれる。

【０１５７】

近年の究明によって、Ｋｖ経路が、β細胞電気活性およびインスリン分泌の調節の活性な参加者であることが示唆されている（MacDonaldおよびWheeler、2003）。β細胞Ｋｖ経路は、Ｇ蛋白質共役型ＧＬＰ－１受容体の標的でありグルコース代謝からのシグナル、インスリン分泌の制御に生理学的に関連するであろう経路である。

【０１５８】

Ｋｖ１．３－欠損マウス（Ｋｖ１．３（-／-））を検査することによって、体重調節における、Ｋｖｌ．３の以前認識されていなかった役割が判明した。Ｋｖ１．３（-／-）マウス体重は対照の同腹仔より著しく軽かった（Xuら、2003）。さらに、ノックアウトマウスは、高脂肪食餌を置いた時、食餌誘発性肥満から保護され、同腹仔の対照よりも体重が極めて軽かった。

【０１５９】

MacDanielら（２００１）は、腸間膜動脈平滑筋（ＭＡＳＭＣ）およびラットのＫＣＮＡＢ２によってコードされるＫｖｂｅｔａ２．１を含む、多Ｋｖチャンネルα－およびβ－サブユニッを機能的に発現する腸上皮細胞中で、４－アミノピリジン（４－ＡＰ）、Ｋｖ－チャンネル阻害薬の細胞外適用による、Ｋ＋チャンネル遮断の摂食障害効果を報告した。

【０１６０】

セレトニントランスポータ（Baumannetal、2000）の阻害に加えて、摂食障害薬物、フェンフルラミンおよびデクセンフルラミンは、血管平滑筋細胞中のＫｖチャンネル活性を低減させることが実証されている（Huら、1998、Michelakisら、1999、Wangら、1997）。これらの観察からＭＡＳＭＣ中のＫｖ経路の活性は、栄養分輸送を制御することによってエネルギー摂取を調節すると際に重要な役割を果たしうることが示唆される。

【０１６１】

総合すると、本出願において、連鎖の結果は、染色体１上の肥満に関連する遺伝子変化の臨界間隔にヒトＫＣＮＡＢ２遺伝子を同定し、電位型カリウム（Ｋｖ）経路の活性の関与を提供し、本発明者らはＫＣＮＡＢ２遺伝子またはその調節配列中の変化（例えば、変異および／または多型）が、ヒト肥満の発生の一因となり、診断または治療的介入の新規な標的を表しうると結論付ける。

【０１６２】

２．関連性研究

連鎖研究に利用してきた同じ家族をまた利用して、伝達不平衡試験（ＴＤＴ）を使用し、当該特異的表現型（ここでは肥満）と、遺伝子マーカー対立遺伝子または特異的マーカ

ー対立遺伝子を含むハプロタイプの間の関連性に関して試験した。ＴＤＴは、試験した試料の集団の階層化問題に非感受性であり、強力な関連性試験である。手短に言えば、ヘテロ接合性親から対立遺伝子をそれらの影響が及ぶ子孫へ分離する試験を行う。伝達されていない対立遺伝子と比較した影響を受ける子孫に伝達された対立遺伝子割合を任意の分配で推定される比率と比較する。推定値を超えた有意で過剰な対立遺伝子伝達は、研究した肥満表現型を有するそれぞれの対立遺伝子またはハプロタイプの関連性の証拠である。

【０１６３】

この分析の結果は、ＫＣＮＡＢ２遺伝子の一定の対立遺伝子は積極的に肥満に関連し、従って疾病への感受性を増大させるかもしれないことを示している。試験集団では、ＳＮＰ３３の対立遺伝子ＧおよびＳＮＰ３４の対立遺伝子Ａは、ＴＤＴで決定した時肥満と相関する（ＳＮＰ３３ではＬＲＳ＝５．２６６、ｐ＝０．０２１７５およびＳＮＰ３４ではＬＲＳ＝７．０１４、ｐ＝０．００８０８７）。他方で、ＳＮＰ３３の対立遺伝子ＡおよびＳＮＰ３４の対立遺伝子Ｇは著しく肥満個人に伝達されない。このことは、この対立遺伝子が疾病から保護に役立つことを示しているかもしれない。

【０１６４】

対立遺伝子の肥満個人への伝達の一例を表４に示す。

【０１６５】

【表４】

表４

SNP	対立遺伝子	対立遺伝子の肥満個人への伝達頻度	対立遺伝子の肥満個人へ伝達されない頻度	オッズ比	ｐ値
SNP33	A	0.5804	0.6784	1	0.02175
SNP33	G	0.4196	0.3216	1.53	0.02175
SNP34	G	0.5878	0.6985	1	0.008087
SNP34	A	0.4122	0.3015	1.63	0.008087

【０１６６】

さらに、全ＳＮＰ相を同定するために、ＳＮＰ２、ＳＮＰ１７、ＳＮＰ２３、ＳＮＰ３４、ＳＮＰ３８、ＳＮＰ４２、ＳＮＰ４７、ＳＮＰ４９、ＳＮＰ５３およびＳＮＰ６９についてハプロタイプを構築した。

【０１６７】

この分析の結果によって、全てＳＮＰ３４の対立遺伝子Ａの存在によって特徴付けられるあるハプロタイプが強く肥満に関連することが示された。試験した集団では、ＳＮＰ３４の対立遺伝子Ａを有するハプロタイプは、強く肥満に相関するが（ＳＮＰ２－ＳＮＰ３４－ＳＮＰ３８のＧ－Ａ－Ａではｐ＝０．０００４７６８、ＳＮＰ３４－ＳＮＰ４２－ＳＮＰ５１のＡ－Ａ－Ｃではｐ＝０．００５８８、ＳＮＰ３４－ＳＮＰ４７－ＳＮＰ４９のＡ－Ｇ－Ｇではｐ＝０．００３０４５およびＳＮＰ３４－ＳＮＰ５３－ＳＮＰ６９のＧ－Ｃ－Ｃではｐ＝０．００５２３５、それぞれ、ＴＤＴによって決定）、一方、対立遺伝子Ａを欠く一定のハプロタイプは肥満対象へ優先的に伝達されない（それぞれ、ＳＮＰ２－ＳＮＰ３４－ＳＮＰ３８のＧ－Ｇ－Ｇではｐ＝０．０１３９３、ＳＮＰ２－ＳＮＰ３４－ＳＮＰ３８のＣ－Ｇ－Ａではｐ＝０．０１６８４、ＳＮＰ１７－ＳＮＰ２３－ＳＮＰ３４のＡ－Ｔ－Ｇではｐ＝２．３４ｅ－０６、ＳＮＰ３４－ＳＮＰ４２－ＳＮＰ５１のＧ－Ｇ－Ｃではｐ＝０．０３３９１、ＳＮＰ３４－ＳＮＰ４７－ＳＮＰ４９のＧ－Ａ－Ａではｐ＝０．０２０２６、およびＳＮＰ３４－ＳＮＰ５３－ＳＮＰ６９のＡ－Ｇ－Ｔではｐ＝０．０００８８７３）。ＳＮＰ３４に対立遺伝子Ａの代わりに対立遺伝子Ｇを有するハプロ

タイプは、肥満対象では示されないことの有意な証拠を示している。

【０１６８】

ＳＮＰ３４の肥満個人への優先的に伝達および非伝達をするハプロタイプの例を表５に示す。

【０１６９】

【表５】

表５

ハプロタイプを構築するために使用されたＳＮＰ	ハプロタイプ	肥満個人へハプロタイプが伝達される頻度	肥満個人へハプロタイプが伝達されない頻度	オッズ比	ｐ値
SNP2-**SNP34**-SNP38	G-**G**-G	0.1219	0.2171	1.0	0.01393
SNP2-**SNP34**-SNP38	G-**A**-A	0.2284	0.1128	3.605	0.0004768
SNP2-**SNP34**-SNP38	C-**G**-A	0.1019	0.1816	0.9993	0.01684
SNP17-SNP23-**SNP34**	A-T-**G**	0.1297	0.3137	0.3876	2.34e-06
SNP34-SNP42-SNP51	**G**-G-C	0.03669	0.08217	0.5977	0.03391
SNP34-SNP42-SNP51	**A**-A-C	0.2222	0.1195	2.489	0.00588
SNP34-SNP47-SNP49	**G**-A-A	0.01247	0.0341	0.4484	0.02026
SNP34-SNP47-SNP49	**A**-G-G	0.2869	0.1773	1.985	0.003045
SNP34-SNP53-SNP69	**G**-C-C	0.1339	0.2508	0.8193	0.0008873
SNP34-SNP53-SNP69	**A**-G-T	0.07859	0.02371	5.086	0.005235

【０１７０】

【表６】

参考文献

Baumann MH, Ayestas MA, Dersch CM et al (2000) Serotonin transporters, serotonin release, and the mechanism of fenfluramine neurotoxicity. Ann N Y Acad Sci 914:172-86

Chagnon YC, Rankinen T, Snyder EE et al. (2003) The human obesity gene map: The 2002 update. Obes Res. 11(3):313-367.

Hebebrand J, Hescker H, Himmelmann GW, Schäfer H, Remschmidt H (1994) Percentiles for the body mass index based on data of the German national nutrition survey and a review of relevant factors with an influence on body weight. Aktuelle Ernahrungsmedizin 19: 259-265.

Hebebrand J, Himmelmann GW, Hescker H, Schäfer H, Remschmidt H (1996) Use of percentiles for the body mass index in anorexia nervosa : diagnostic, epidemiological and therapeutic considerations. Int J Eat Dis 19: 359-369.

Hebebrand J, Hinney A, Roth H et al. (1998) Genetische Aspekte der Adipositas. In:J Wechsler (ed) *Adipositas*. Ex Libris Roche. Blackwell Verlag: 105-118.

Hinney A, Schmidt A, Nottebom K, et al. (1999) Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. J. Clin Endocrinol Metab. Apr; 84(4):1483-1486.

Hu S, Wang S, Gibson J et al (1998) Inhibition of delayed rectifier K+ channels by dexfenfluramine (Redux). J Pharmacol Exp Ther. 287(2):480-6.

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H et al. (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature 411(6837):599-603.

Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, et al. (1997) Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. Cell 88:131-141.

Lander E and Kruglyak L (1995) Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. Nat Genet, 11(3):241-247.

Lesage S, Zouali H, Cezard Jpet al. (2002) CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. Am J Hum Genet. 70(4):845-857.

MacDonald PE and Wheeler MB (2003) Voltage-ependent K+ channels in pancreatic beta cells: Role, regulation and potential as therapeutic target. Diabetologia 46:1046-1062.

Michelakis ED, Weir EK, Nelson DP et al (1999) Dexfenfluramine elevates systemic blood pressure by inhibiting potassium currents in vascular smooth muscle cells. J Pharmacol Exp Ther. 291(3):1143-9.

Rioux JD, Daly MJ, Silverberg MS et al. (2001) Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. Nat Genet 29(2): 223-228.

Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ (2000) Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. Am J Hum Genet 66(6):1863-1870.

Schneider R (1996) Relevanz und Kosten der Adipositas in Deutschland. Ernährungs-Umschau 43:369-374.

Vaisse C, Clément K, Guy-Grand B et al (1998) A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. Nat Genet 20:113-114.

Wang J, Juhaszova M, Rubin LJ et al (1997) Hypoxia inhibits gene expression of voltage-gated K+ channel alpha subunits in pulmonary artery smooth muscle cells. J Clin Invest. 100(9):2347-53.

WHO (1998) Preventing and managing the global epidemic. WHO, Geneva.

Yeo GS, Farooqi IS, Aminian S, et al (1998) A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. Nat Genet 20:111-112.

Wolf AM, Colditz GA (1996) Social and economic effects of body weight in the United States. Am J Clin Nutr 63(3 Suppl):466S-469S.

Xu J, Koni PA, Wang P et al (2003) The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates energy homeostasis and body weight. Hum Mol Genet 12(5):551-9.

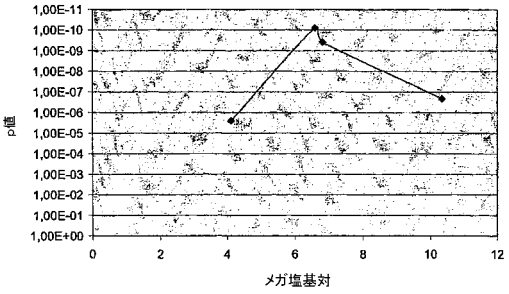
Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 372: 425-432.

【図面の簡単な説明】

【０１７１】

【図１】ゲノムハイブリッド同定プロファイリング（Genome HIP）を使用する高密度マッピングである。　全ヒトゲノムを表し、クローン間の平均間隔が１．２メガ塩基対である合計２２６３ＢＡＣクローンをGenome HIPを使用して連鎖について試験した。Ｘ軸上の各点はクローンに対応する。説明しやすいように数個のクローンをそのライブラリー名によって示す（例えばＢＡＣＡ１７ＺＦ０７）。　連鎖の極めて有意な証拠をクローンＢＡＣＡ１７ＺＦ０７（ｐ値８．０×１０$^{-11}$）およびＢＡＣＡ１５ＺＤ０５（ｐ値３．８×１０$^{-10}$）について算出した。連鎖の有意な証拠をクローンＢＡＣＡ１３ＺＨ１０およびＢＡＣＡ１３ＺＨ１１（それぞれｐ値２．５×１０^{6}および２．１×１０$^{-7}$）について算出した。全連鎖領域は、ヒト染色体１上の４１２６９８７塩基対から始まり７００７６９０塩基対までの領域を包含している。　LanderおよびKruglyak（１９９５）が提案したように、有意な連鎖の有意レベルに対応するｐ値２×１０$^{-5}$を全ゲノムスクリーンの有意レベルとして使用した。

【図１】



【配列表】
2008502341000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
.../IB2005/002356

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12Q1/68

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)
C12Q

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, PAJ, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/035755 A (INCYTE CORPORATION; HAFALIA, APRIL, J.A; KHARE, REENA; LAL, PREETI, G;) 29 April 2004 (2004-04-29) claim 20 sequence 68 page 38, lines 19-22 page 51, lines 1,2 page 54, lines 17-19 page 56, line 20 page 58, lines 17-23 page 58, lines 33,34 page 67, lines 28,29 page 68, lines 22-26 page 73, line 32 - page 74, line 2 page 75, line 24 page 74, lines 10-12 page 77, lines 24,25 -/--	1-17

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in 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 document 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	Date of mailing of the international search report
12 December 2005	23/12/2005

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Helliot, B

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
/IB2005/002356

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 682 888 B1 (LORING JEANNE F ET AL) 27 January 2004 (2004-01-27) sequence 869 page 10, lines 18-23 claims 4-25	1-17
X	WO 02/28999 A (GENE LOGIC, INC; BEAZER-BARCLAY, YASMIN; WEISSMAN, SHERMAN, M; YAMAGA,) 11 April 2002 (2002-04-11) sequence 61 column 5, lines 18-30 claims 1,8-16	1-17
X	WO 01/66800 A (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH; CARGILL, MICHELE; IRELAND) 13 September 2001 (2001-09-13) page 4, lines 24-26 page 18, lines 24-30 page 19, lines 8-10 page 38, paragraph 4-6	1-17

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2005/002356

Box 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. [X] Claims Nos.: 1-4,6-9
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 5-9 are directed to a method for preventing obesity or an associated disorder in a subject, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [X] 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:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

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 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:

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

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 additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 5-9 are directed to a method for preventing obesity or an associated disorder in a subject, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.1

Claims Nos.: 1-4,6-9

Present claims 1-4 relate to methods which encompass the step of "providing a sample from the subject". Claims 1-4 relate, thus, to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv) PCT.

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: -

Claim 9 relates to the method of any one of claims 1-8, wherein said SNP associated with obesity is SNP7 or SNP8. However, present claim 9 lacks clarity in the sense of Art. 6 PCT because the present application is silent as to any SNP7 and SNP8 and because the only haplotype associated with obesity comprises several SNPs selected in the group consisting of SNP2, SNP17, SNP23, SNP33, SNP34, SNP38, SNP42, SNP47, SNP49, SNP51, SNP53 and SNP69 and more preferably of SNP33 and SNP34 (see p. 14, l. 23-28).
Thus, present claim 9 has been searched insofar as it refers to the SNP33 and SNP34.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be

International Application No. PCT/IB2005/002356

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
/IB2005/002356

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004035755 A	29-04-2004	AU 2003279980 A1	04-05-2004
US 6682888 B1	27-01-2004	US 2005130171 A1	16-06-2005
WO 0228999 A	11-04-2002	AU 2126502 A	15-04-2002
WO 0166800 A	13-09-2001	AU 4548901 A	17-09-2001

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*48/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		４Ｃ０８６
Ａ６１Ｋ	*31/7105*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7105		
Ａ６１Ｋ	*39/395*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｄ	
Ｇ０１Ｎ	*33/15*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	
Ｇ０１Ｎ	*33/50*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/15	Ｚ	
			Ｇ０１Ｎ	33/50	Ｚ	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 フィリッピ，アン
フランス国、エフ－７７３１０ サン・ファルゴー・ポンティエリー、レジダンス・デュ・プリユール ８
(72)発明者 ルソー，フランシス
フランス国、エフ－９１６００ サヴィニェ・スール・オルジェ、リュ・テオフィル・ゴーティエ １１
(72)発明者 ロシュマン，エルケ
ドイツ国、８９１７９ バイマーシュテッテン、シラーシュトラーセ １１

Ｆターム(参考) 2G045 AA40 BB20 CB01 DA13 DA36
4B024 AA11 CA01 CA11 DA02 EA04 GA11 HA14
4B063 QA05 QA13 QA17 QA18 QA19 QQ08 QQ13 QQ42 QQ52 QQ79
QR08 QR32 QR48 QR56 QR62 QR69 QR77 QR80 QS25 QS34
QX02
4C084 AA13 AA17 NA14 ZA702
4C085 AA13 AA14 DD61 EE01
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA70