(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2008-517931
(P2008-517931A)
(43)公表日　平成20年5月29日(2008.5.29)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 45/00	(2006.01)	A61K 45/00		2G045
A61K 38/00	(2006.01)	A61K 37/02	ZNA	4B018
A61P 43/00	(2006.01)	A61P 43/00	111	4B024
A61P 3/06	(2006.01)	A61P 3/06		4B063
A61P 9/00	(2006.01)	A61P 9/00		4C084

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 82 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2007-538078 (P2007-538078)
(86)(22)出願日　平成17年10月21日 (2005.10.21)
(85)翻訳文提出日　平成19年6月19日 (2007.6.19)
(86)国際出願番号　PCT/US2005/037952
(87)国際公開番号　WO2006/047312
(87)国際公開日　平成18年5月4日 (2006.5.4)
(31)優先権主張番号　60/621,488
(32)優先日　平成16年10月22日 (2004.10.22)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　502206795
ダナ－ファーバー　キャンサー　インスティチュート，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０２１１５　ボストン　ビンネイ　ストリート　４４
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】脂質関連疾患および障害を処置するための、ＰＧＣ－１βを調節するための方法および組成物

(57)【要約】
本発明は、ＰＧＣ－１βの発現または活性を調節することによって、脂質関連疾患および障害（例えば、高脂血症、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、心臓血管疾患、肥満症およびＩＩ型糖尿病）を処置するための方法ならびに脂質生合成、脂質輸送、血漿トリグリセリドレベルおよび／または血漿コレステロールレベルを調節するための方法を提供する。脂質関連疾患または障害を処置または予防することができる化合物を同定するための方法もまた記載される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
脂質関連疾患または障害を処置または予防するために被験体にＰＧＣ－１β調節因子を投与する工程を含む、該被験体において脂質関連疾患または障害を処置または予防するための方法。
【請求項２】
前記ＰＧＣ－１β調節因子が、ＰＧＣ－１βの発現または活性を減少させる、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記脂質関連疾患または障害が、高レベルのＶＬＤＬコレステロールまたはＬＤＬコレステロールによって示される、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記脂質関連疾患または障害が、高レベルのトリグリセリドによって示される、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
前記脂質関連疾患または障害が、高脂血症、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、心臓血管疾患、肥満症およびＩＩ型糖尿病からなる群から選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記被験体が、哺乳動物である、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
前記被験体が、ヒトである、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記被験体が、イヌ、ネコ、ウマ、ウシおよびヒツジからなる群から選択される、請求項６に記載の方法。
【請求項９】
前記調節因子が、薬学的に許容可能な製剤形態で投与される、請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
前記調節因子が低分子である、請求項１に記載の方法。
【請求項１１】
前記ＰＧＣ－１β調節因子がＰＧＣ－１βポリペプチド活性を調節することができる、請求項１に記載の方法。
【請求項１２】
前記調節因子が抗ＰＧＣ－１β抗体である、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記調節因子が、ペプチドまたはペプチド模倣物である、請求項１１に記載の方法。
【請求項１４】
前記調節因子が、ポリペプチドである、請求項１１に記載の方法。
【請求項１５】
前記調節因子が、配列番号２のアミノ酸配列またはそのフラグメントを含むＰＧＣ－１βポリペプチドである、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記調節因子が、配列番号２のアミノ酸配列に少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含むＰＧＣ－１βポリペプチドである、請求項１４に記載の方法。
【請求項１７】
前記調節因子が、配列番号２のアミノ酸配列からなるポリペプチドの天然に存在する対立遺伝子改変体であって、ここで該ポリペプチドは、６５℃、０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ中での１回以上の洗浄の前に４５℃、６×ＳＳＣで、配列番号１からなる核酸分子の相補体にハイブリダイズする核酸分子によってコードされる、請求項１４に記載の方法。

【請求項１８】
前記調節因子が、ＰＧＣ－１β核酸発現を調節することができる、請求項１に記載の方法。
【請求項１９】
前記調節因子が、アンチセンスＰＧＣ－１β核酸分子である、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記調節因子が、リボザイムである、請求項１８に記載の方法。
【請求項２１】
前記調節因子が、ＲＮＡ干渉物質である、請求項１８に記載の方法。
【請求項２２】
前記ＲＮＡ干渉物質が、ＰＧＣ－１βを標的化するｓｉＲＮＡ分子である、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
前記調節因子が、ＰＧＣ－１β核酸分子である、請求項１８に記載の方法。
【請求項２４】
前記ＰＧＣ－１β調節因子が、配列番号１のヌクレオチド配列またはそのフラグメントを含む、請求項１８に記載の方法。
【請求項２５】
前記ＰＧＣ－１β調節因子が、ＳＲＥＢＰ転写因子の発現または活性を調節する、請求項１に記載の方法。
【請求項２６】
前記ＰＧＣ－１β調節因子が、脂質生成遺伝子の発現または活性を調節する、請求項１に記載の方法。
【請求項２７】
前記脂質生成遺伝子が、ＦＡＳ、ＳＣＤ－１、ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼ、ＤＧＡＴおよびＧＰＡＴからなる群から選択される、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
前記ＰＧＣ－１β調節因子が、ＬＸＲα標的遺伝子の発現または活性を調節する、請求項１に記載の方法。
【請求項２９】
前記ＬＸＲβ標的遺伝子が、ＰＬＴＰ、ＡＢＣＡ１およびＡＢＣＧ１からなる群から選択される、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
脂質生合成を調節するために、細胞とＰＧＣ－１β調節因子とを接触させる工程を含む、該細胞において脂質生合成を調節する方法。
【請求項３１】
前記脂質生合成が、ＳＲＥＢＰ転写因子によって調節される、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
前記ＳＲＥＢＰ転写因子が、ＳＲＥＢＰ１ａ、ＳＲＥＢＰ１ｃおよびＳＲＥＢＰ２からなる群から選択される、請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
前記細胞が、肝細胞である、請求項３０に記載の方法。
【請求項３４】
前記脂質が、トリグリセリドおよびコレステロールの少なくとも１つである、請求項３０に記載の方法。
【請求項３５】
前記コレステロールが、ＶＬＤＬコレステロールまたはＬＤＬコレステロールである、請求項３４に記載の方法。

【請求項３６】
脂質輸送を調節するために、細胞とＰＧＣ－１β調節因子とを接触させる工程を含む、該細胞からの脂質輸送を調節する方法。
【請求項３７】
前記脂質輸送が、ＬＸＲαによって調節される、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
前記細胞が、肝細胞である、請求項３６に記載の方法。
【請求項３９】
前記脂質が、コレステロールまたはトリグリセリドである、請求項３６に記載の方法。
【請求項４０】
前記コレステロールが、ＶＬＤＬコレステロールまたはＬＤＬコレステロールである、請求項３９に記載の方法。
【請求項４１】
脂質生合成および脂質輸送を調節するために、細胞とＰＧＣ－１β調節因子とを接触させる工程を含む、該細胞における脂質生合成および脂質輸送を調節する方法。
【請求項４２】
脂質生合成および脂質輸送の少なくとも１つを調節するために、被験体にＰＧＣ－１β調節因子を投与する工程を含む、該被験体における脂質生合成および脂質輸送の少なくとも１つを調節する方法。
【請求項４３】
前記ＰＧＣ－１β調節因子が、ＳＲＥＢＰ転写因子に結合するＰＧＣ－１βの能力を調節する、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記ＳＲＥＢＰ転写因子が、ＳＲＥＢＰ１ａ、ＳＲＥＢＰ１ｃおよびＳＲＥＢＰ２からなる群から選択される、請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
前記ＰＧＣ－１β調節因子が、ＬＸＲαに結合するＰＧＣ－１βの能力を調節する、請求項４２に記載の方法。
【請求項４６】
前記脂質が、トリグリセリドおよびコレステロールの少なくとも１つである、請求項４２に記載の方法。
【請求項４７】
前記脂質生合成および／または前記脂質輸送が、肝臓内である、請求項４２に記載の方法。
【請求項４８】
血漿トリグリセリドレベルおよび血漿コレステロールレベルの少なくとも１つを調節するために、被験体にＰＧＣ－１β調節因子を投与する工程を含む、該被験体における血漿トリグリセリドレベルおよび血漿コレステロールレベルの少なくとも１つを調節する方法。
【請求項４９】
前記コレステロールが、ＶＬＤＬコレステロールまたはＬＤＬコレステロールである、請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
ＰＧＣ－１βの発現または活性を調節する化合物の能力をアッセイし、それによって脂質関連疾患または障害を処置または予防することができる化合物を同定する工程を含む、脂質関連疾患または障害を処置または予防することができる化合物を同定する方法。
【請求項５１】
ＰＧＣ－１βの発現または活性を調節する化合物の能力をアッセイし、それによって被験体における血漿トリグリセリドレベルおよび血漿コレステロールレベルの少なくとも１つを調節することができる化合物を同定する工程を含む、該被験体において血漿トリグリ

セリドレベルおよび血漿コレステロールレベルの少なくとも１つを調節することができる化合物を同定する方法。

【請求項５２】

ＰＧＣ－１βの発現または活性を調節する化合物の能力をアッセイし、それによって脂質生合成および脂質輸送の少なくとも１つを調節することができる化合物を同定する工程を含む、脂質生合成および脂質輸送の少なくとも１つを調節することができる化合物を同定する方法。

【請求項５３】

前記脂質生合成および／または輸送が、肝臓内において実施される、請求項５２に記載の方法。

【請求項５４】

前記脂質が、トリグリセリドおよびコレステロールの少なくとも１つである、請求項５２に記載の方法。

【請求項５５】

前記コレステロールが、ＶＬＤＬコレステロールまたはＬＤＬコレステロールである、請求項５２に記載の方法。

【請求項５６】

前記ＰＧＣ－１β核酸発現またはＰＧＣ－１βポリペプチド活性を調節する化合物の能力が、脂質生成遺伝子の発現または活性における調節を検出することによって測定される、請求項５０、５１または５２に記載の方法。

【請求項５７】

前記脂質生成遺伝子が、ＦＡＳ、ＳＣＤ－１、ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼ、ＤＧＡＴおよびＧＰＡＴからなる群から選択される、請求項５６に記載の方法。

【請求項５８】

ＰＧＣ－１β核酸発現またはＰＧＣ－１βポリペプチド活性を調節する化合物の能力が、ＳＲＥＢＰ転写因子の発現または活性における調節を検出することによって測定される、請求項５０、５１または５２に記載の方法。

【請求項５９】

前記ＳＲＥＢＰ転写因子が、ＳＲＥＢＰ１ａ、ＳＲＥＢＰ１ｃおよびＳＲＥＢＰ２からなる群から選択される、請求項５８に記載の方法。

【請求項６０】

ＰＧＣ－１βの発現または活性を調節する化合物の能力が、ＬＸＲαの発現または活性における調節を検出することによって測定される、請求項５０、５１または５２に記載の方法。

【請求項６１】

ＰＧＣ－１βの発現または活性を調節する化合物の能力が、コレステロールの血漿レベルおよびトリグリセリドの血漿レベルの少なくとも１つにおける調節を検出することによって測定される、請求項５０に記載の方法。

【請求項６２】

ＰＧＣ－１βの発現または活性を調節する化合物の能力が、コレステロールホメオスタシスの調節を検出することによって測定される、請求項５０に記載の方法。

【請求項６３】

前記化合物が、低分子である、請求項５０、５１または５２に記載の方法。

【請求項６４】

被験体における脂質関連疾患または障害を阻害するための試験化合物の効能を評価する方法であって、該方法は：

ａ）該被験体から得られ、そして該試験化合物の存在下で維持される第１サンプルにおけるＰＧＣ－１βの発現または活性のレベル；と

ｂ）該被験体から得られ、そして該試験化合物の非存在下で維持される第２サンプルにおけるＰＧＣ－１βの発現または活性のレベル

とを比較する工程を含み、
ここで、該第２サンプルと比較して該第１サンプルにおけるＰＧＣ－１βの発現または活性のほうが有意に低いレベルであるとき、該試験化合物は、脂質関連疾患または障害を阻害するために有効であることが示される、方法。
【請求項６５】
前記第１サンプルおよび前記第２サンプルが、前記被験体から得られた単一サンプルの一部である、請求項６４に記載の方法。
【請求項６６】
前記第１サンプルおよび前記第２サンプルが、前記被験体から得られた、貯蔵されたサンプルの一部である、請求項６４に記載の方法。
【請求項６７】
被験体において脂質関連疾患または障害を阻害するための治療の効能を評価する方法であって、該方法は：
ａ）該被験体への治療の少なくとも一部を提供する前に該被験体から得られた第１サンプルにおけるＰＧＣ－１βの発現または活性のレベルと
ｂ）該治療の一部の提供後の該被験体から得られた第２サンプルにおけるＰＧＣ－１βの発現または活性のレベル
とを比較する工程を含み、
ここで、該第２サンプルと比較して第１サンプルにおけるＰＧＣ－１βの発現または活性のほうが有意に低いレベルであるとき、該治療は、該被験体における脂質関連疾患または障害を阻害するために有効であることが示される、方法。
【請求項６８】
被験体の細胞または組織においてＰＧＣ－１βの発現または活性を検出する工程を含む、該被験体が脂質関連疾患もしくは障害に罹患しているか否かまたは脂質関連疾患もしくは障害を発症する危険性があるか否かを評価する方法であって、ここで、ＰＧＣ－１βの発現または活性の増加によって、該被験体が脂質関連疾患もしくは障害に罹患しているかまたは脂質関連疾患もしくは障害を発症する危険性のあることが示される、方法。
【請求項６９】
前記脂質関連疾患または障害が、高脂血症、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、心臓血管疾患、肥満症およびＩＩ型糖尿病からなる群から選択される、請求項６８に記載の方法。
【請求項７０】
前記細胞または組織が、肝臓から得られる、請求項６８に記載の方法。
【請求項７１】
細胞と食事成分を含むサンプルとを接触させる工程およびＰＧＣ－１βの発現または活性を測定し、それによって該食事成分を分類する工程を含む、該食事成分を分類する方法。
【請求項７２】
前記細胞が、肝細胞である、請求項７１に記載の方法。
【請求項７３】
ＰＧＣ－１βの発現または活性における増加が、高いアテローム発生潜在能力を有する脂肪酸の存在を示す、請求項７１に記載の方法。
【請求項７４】
前記脂肪酸が、飽和脂肪またはトランス脂肪である、請求項７３に記載の方法。
【請求項７５】
細胞とサンプルとを接触させる工程およびＰＧＣ－１βの発現または活性を測定し、それによって該サンプルにおけるアテローム生成的な脂肪酸の存在を検出する工程を含む、該サンプルにおけるアテローム生成的な脂肪酸の存在を検出する方法。
【請求項７６】
ＰＧＣ－１βの発現または活性における増加が、前記サンプルにおけるアテローム生成

的な脂肪酸の存在を示す、請求項７５に記載の方法。
【請求項７７】
前記脂肪酸が、飽和脂肪またはトランス脂肪である 、請求項７６に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【背景技術】
【０００１】
（政府の権利）
本発明は、米国国立衛生研究所の助成金番号５Ｒ０１ＤＫ５４４７７から授与された助成金によって少なくとも一部において支援を受けた。米国政府が、本発明における一定の権利を有し得る。
【０００２】
（発明の背景）
肥満症および２型糖尿病は、先進国における罹患率および死亡率の主な原因である心臓血管疾患を発症する高い危険性に関連する（Ｆｌｉｅｒ（２００４）Ｃｅｌｌ １１６，３３７－３５０；Ｒｅａｖｅｎ ｅｔ ａｌ．，（２００４）Ｒｅｃｅｎｔ Ｐｒｏｇ．Ｈｏｒｍ．Ｒｅｓ．５９，２０７－２２３；Ｚｉｍｍｅｔ ｅｔ ａｌ．，（２００１）Ｎａｔｕｒｅ ４１４，７８２－７８７）。アテローム性動脈硬化症を発症する素因は、高トリグリセリド血症ならびに高濃度の低密度リポタンパク質（ＬＤＬ）コレステロールおよび低レベルの高密度リポタンパク質（ＨＤＬ）コレステロールによって特徴付けられる、インスリン抵抗性状態における病原性異脂肪血症の結果であるらしい（Ｂｅｔｔｅｒｉｄｇｅ（１９９９）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ ２９ Ｓｕｐｐｌ．２，１２－１６；Ｇｏｌｄｂｅｒｇ（２００１）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．Ｍｅｔａｂ．８６，９６５－９７１）。遺伝学的および疫学的研究により、血漿ＬＤＬコレステロールが心臓血管疾患を発症する危険性と正の相関をするという抗しがたい証拠が提供されている（Ｂｒｅｓｌｏｗ（２０００）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｇｅｎｅｔ．３４，２３３－２５４；Ｓａｃｋｓ ａｎｄ Ｋａｔａｎ（２００２）Ａｍ．Ｊ．Ｍｅｄ．１１３ Ｓｕｐｐｌ．９Ｂ，１３Ｓ－２４Ｓ）。さらに、高血漿トリグリセリドレベルは、冠動脈心疾患に対する独立した危険因子であることが示されている。遺伝因子、環境の影響および重要にはその２つの相互作用すべてが心臓血管疾患の進行に寄与するが、飽和脂肪およびトランス脂肪の食事摂取が著しく血漿ＬＤＬコレステロールを増加させ、ＨＤＬコレステロールを減少させると現在では理解されている（Ｓａｃｋｓ ａｎｄ Ｋａｔａｎ（２００２）Ａｍ．Ｊ．Ｍｅｄ．１１３ Ｓｕｐｐｌ．９Ｂ，１３Ｓ－２４Ｓ；Ｓｐａｄｙ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｎｕｔｒ．１３，３５５－３８１）。実際は、飽和脂肪およびトランス脂肪の食事摂取は、コレステロール自体の摂取より大きな高脂血症の効果を有する。飽和脂肪およびトランス脂肪の食事摂取とアテローム生成的な脂質の特性とが強く関連しているにもかかわらず、これらの脂質から高コレステロールレベルへ誘導する代謝経路および基本メカニズムはこれまで不明である。
【０００３】
肝臓は、全身性脂質ホメオスタシスの維持において中心的役割を果たす。肝細胞は、アテローム生成的なＬＤＬ粒子に対する前駆体である、超低密度リポタンパク質（ＶＬＤＬ）の合成および分泌に関与する。ＶＬＤＬの役割は、末梢組織による貯蔵および利用に対する脂質、主にトリグリセリドを再分布することである。ヒトにおいて、肝臓は、デノボ脂質合成の主要な部位でもある。肝臓の脂質生合成は、主に遺伝子転写レベルで制御される（Ｇｉｒａｒｄ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｎｕｔｒ．１７，３２５－３５２；Ｈｅｌｌｅｒｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｎｕｔｒ １６，５２３－５５７）。ステロール応答エレメント結合タンパク質（ＳＲＥＢＰ）ファミリーにおけるいくつかの転写因子は、脂質生成遺伝子の転写活性化の重要な制御因子であることが示されている（Ｈｏｒｔｏｎ ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１０９，１１２５－１１３１）。すべてのＳＲＥＢＰアイソフォームは、小胞体膜において前駆体タンパク質として合成され、そしてタンパク質分解性切断の

２工程を経る（Ｂｒｏｗｎ ａｎｄ Ｇｏｌｄｓｔｅｉｎ（１９９７）Ｃｅｌｌ ８９，３３１－３４０）。これは、Ｎ末端の活性型の放出を誘導し、続いて核へ移動し、そして標的遺伝子の発現を刺激する。ＳＲＥＢＰ１ａおよびＳＲＥＢＰ１ｃアイソフォーム（ＡＤＤ１としても知られる）は、転写開始部位の別の使用による単一遺伝子に由来し、異なるアミノ末端を有する２つのタンパク質を生じる（Ｓｈｉｍｏｍｕｒａ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９９，８３８－８４５；Ｔｏｎｔｏｎｏｚ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏ．１３，４７５３－４７５９）；Ｙｏｋｏｙａｍａ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｃｅｌｌ ７５，１８７－１９７）。一方、ＳＲＥＢＰ２は、異なる遺伝子によってコードされる（Ｈｕａ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０，１１６０３－１１６０７）。ＳＲＥＢＰの活性は、いくつかのメカニズムによって制御される。例えば、ＳＲＥＢＰ１ｃ ｍＲＮＡは、インスリンによって脂肪細胞と肝臓との両方において高い誘導性であり（Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１０１，１－９；Ｓｈｉｍｏｍｕｒａ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９６，１３６５６－１３６６１）、他方では、細胞におけるＳＲＥＢＰ２のタンパク質分解性プロセシングは、ステロール欠乏に応答して刺激される（Ｂｒｏｗｎ ａｎｄ Ｇｏｌｄｓｔｅｉｎ（１９９７）Ｃｅｌｌ ８９，３３１－３４０；Ｓａｋａｉ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｃｅｌｌ ８５，１０３７－１０４６）。細胞培養またはマウス肝臓における研究によって、ＳＲＥＢＰ１ｃおよびＳＲＥＢＰ２は、脂肪酸およびコレステロール合成にそれぞれ関与する遺伝子の発現を優先的に制御することが明らかにされている（Ｈｏｒｔｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１０１，２３３１－２３３９；Ｋｉｍ ａｎｄ Ｓｐｉｅｇｅｌｍａｎ（１９９６）Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．１０，１０９６－１１０７）。対照的に、ＳＲＥＢＰ１ａは、両方の経路を活性化するらしい（Ｈｏｒｔｏｎ ｅｔ ａｌ．（２００３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １００，１２０２７－１２０３２；Ｐａｉ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７３，２６１３８－２６１４８）。特に、３つすべてのＳＲＥＢＰは、トリグリセリドおよびコレステロールが大量に蓄積しているトランスジェニックマウスにおける重度の脂肪肝表現型を誘導し、トランスジェニック肝細胞における脂質合成と分泌との不均衡を示唆する（Ｈｏｒｔｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１０１，２３３１－２３３９；Ｓｈｉｍａｎｏ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９８，１５７５－１５８４；Ｓｈｉｍａｎｏ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９９，８４６－８５４）。さらに、健常な動物およびヒトにおける肝臓の脂質生合成は、肝臓の脂肪変性を発症させないリポタンパク質分泌と相関する。

【０００４】

転写因子は、コアクチベータータンパク質のドッキングを介して機能する。肝臓の脂質生合成においてＳＲＥＢＰとともに機能するコアクチベーターは、大部分は調査されていない。最近の研究によって、コアクチベーターのＰＧＣ－１ファミリーが肝臓代謝において重要な役割を果たすことが示されている（Ｐｕｉｇｓｅｒｖｅｒ ａｎｄ Ｓｐｉｅｇｅｌｍａｎ（２００３）Ｅｎｄｏｃｒ．Ｒｅｖ．２４，７８－９０）。

【０００５】

ＰＧＣ－１βは、その生物学的活性がこれまで未知であるＰＧＣ－１αに強く関連している最近同定された転写コアクチベーターである（非特許文献１；非特許文献２）。ＰＧＣ－１βは、ＰＧＣ－１βと類似の組織分布を共有しているが、これら２つのコアクチベーターは、発生の間および栄養状態の変化に応答して、異なって制御されるらしい（非特許文献２；非特許文献３；非特許文献４）。ＰＧＣ－１αのように、ＰＧＣ－１βは、分化した筋管および肝細胞においてミトコンドリアバイオジェネシスおよび細胞性呼吸を強く活性化する（非特許文献５；非特許文献６）。しかしながら、ＰＧＣ－１βは、糖新生遺伝子の発現に対して明らかな効果を有さず、これはおそらく肝臓の糖新生の重要な制御因子であるＨＮＦ４βおよびＦＯＸＯ１を同時活性化する能力を欠いていることを反映し

ている。
【非特許文献１】Ｋｒｅｓｓｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．（２００２）２７７，１３９１８－１３９２５
【非特許文献２】Ｌｉｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．（２００２）２７７，１６４５－１６４８
【非特許文献３】Ｋａｍｅｉ　ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（２００３）１００，１２３７８－１２３８３
【非特許文献４】Ｌｉｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．（２００３）２７８，３０８４３－３０８４８
【非特許文献５】Ｌｉｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．（２００３）２７８，３０８４３－３０８４８
【非特許文献６】Ｓｔ－Ｐｉｅｒｒｅ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．（２００３）２７８，２６５９７－２６６０３
【発明の開示】
【課題を解決するための手段】
【０００６】
（発明の概要）
本発明は、ＰＧＣ－１βが、脂質生合成および脂質輸送の制御に関わり、従ってトリグリセリドおよびコレステロール（例えば、ＶＬＤＬコレステロールおよびＬＤＬコレステロール）の生合成および輸送を例えば肝臓において制御するという発見に少なくとも一部は基づく。本発明はまた、ＰＧＣ－１βが、コレステロールおよび不飽和脂肪酸ではなく飽和脂肪およびトランス脂肪酸によって、肝臓および単離された肝細胞において誘導されるという発見に基づく。
【０００７】
従って、１つの局面において、本発明は、被験体（例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ウシまたはヒツジ）において、ＰＧＣ－１β調節因子（ｍｏｄｕｌａｔｏｒ）を投与することによって脂質関連疾患または障害を処置および／または予防するための方法を提供する。１つの実施形態において、脂質関連疾患または障害は、高レベルのＶＬＤＬコレステロール、ＬＤＬコレステロールまたはトリグリセリドによって示される。脂質関連疾患または障害の例としては、例えば、高脂血症、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、心臓血管疾患、肥満症およびＩＩ型糖尿病が挙げられる。
【０００８】
１つの実施形態において、本発明の方法において使用されるＰＧＣ－１β調節因子は、ＰＧＣ－１βを調節することができ、例えば、ＰＧＣ－１βの発現または活性を減少させることができる。別の実施形態において、ＰＧＣ－１β調節因子は、ＰＧＣ－１βポリペプチド活性を調節することができる。なおも別の実施形態において、調節因子は、配列番号２のアミノ酸配列またはそのフラグメントを含むＰＧＣ－１βポリペプチドである。さらに別の実施形態において、調節因子は、配列番号２のアミノ酸配列と少なくとも６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０または９５％同一なアミノ酸配列を含むＰＧＣ－１βポリペプチドを含む。
【０００９】
別の実施形態において、ＰＧＣ－１β調節因子は、配列番号２のアミノ酸配列からなるポリペプチドの天然に存在する単離された対立遺伝子改変体である。ここで、そのポリペプチドは、配列番号１からなる核酸分子の相補体に、０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ、６５℃での１回以上洗浄の前に６×ＳＳＣ、４５℃でハイブリダイズする核酸分子にコードされる。
【００１０】
なおも別の実施形態において、ＰＧＣ－１β調節因子は、ＰＧＣ－１β核酸発現を調節することができる。例えば、ＰＧＣ－１β調節因子は、ＰＧＣ－１β核酸分子（例えば、配列番号１またはそのフラグメントのヌクレオチド配列を含むＰＧＣ－１β核酸分子）を

含む。別の実施形態において、ＰＧＣ－１β調節因子は、アンチセンスＰＧＣ－１β核酸分子、リボザイムまたはＰＧＣ－１βを標的化するＲＮＡ干渉物質（例えば、ｓｉＲＮＡ分子）である。

【００１１】

さらに別の実施形態において、ＰＧＣ－１β調節因子は、ＳＲＥＢＰ転写因子の発現または活性を調節することができる。なおもさらなる実施形態において、ＰＧＣ－１β調節因子は、脂質生成遺伝子（例えば、ＦＡＳ、ＳＣＤ－１、ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼ、ＤＧＡＴおよびＧＰＡＴ）の発現または活性を調節することができる。なおもさらなる実施形態において、ＰＧＣ－１β調節因子は、肝臓Ｘレセプター（ＬＸＲ）標的遺伝子、例えば、ＬＸＲα標的遺伝子（例えば、ＰＬＴＰ、ＡＢＣＡ１およびＡＢＣＧ１）の発現または活性を調節することができる。ＰＧＣ－１β調節因子としては、低分子、核酸分子、ＲＮＡ干渉物質（例えば、ｓｉＲＮＡ）、抗体、ポリペプチドおよびペプチドまたはペプチド模倣物が挙げられるが、これらに限定されない。

【００１２】

別の局面において、本発明は、細胞（例えば、肝細胞）とＰＧＣ－１β調節因子とを接触させることによって細胞内の脂質生合成を調節する方法を提供し、脂質生合成が調節される。好ましい実施形態において、脂質生合成は、ＳＲＥＢＰ転写因子（例えば、ＳＲＥＢＰ１ａ、ＳＲＥＢＰ１ｃまたはＳＲＥＢＰ２）によって調節される。別の実施形態において、脂質は、トリグリセリドまたはコレステロール（例えば、ＶＬＤＬまたはＬＤＬコレステロール）である。

【００１３】

なおも別の局面において、本発明は、細胞とＰＧＣ－１β調節因子とを接触させることによって、細胞からの脂質輸送を調節するための方法を提供し、脂質輸送が調節される。１つの実施形態において、脂質輸送は、ＬＸＲ（例えば、ＬＸＲα）によって調節される。

【００１４】

さらに別の局面において、本発明は、細胞とＰＧＣ－１β調節因子とを接触させることによって、脂質生合成および細胞（例えば、肝細胞）からの脂質輸送を調節するための方法を提供し、脂質生合成および脂質輸送が調節される。

【００１５】

なおもさらなる局面において、本発明は、ＰＧＣ－１β調節因子を被験体（例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ウシまたはヒツジ）に投与することによって、被験体における脂質生合成および脂質輸送の少なくとも１つを調節する方法を提供する。１つの実施形態において、ＰＧＣ－１β調節因子は、ＰＧＣ－１βがＳＲＥＢＰ転写因子（例えば、ＳＥＲＢＰｌα、ＳＲＥＢＰ１ｃおよびＳＲＥＢＰ２）に結合する能力を調節することができる。別の実施形態において、ＰＧＣ－１β調節因子は、ＰＧＣ－１βがＬＸＲαに結合する能力を調節することができる。なおも別の実施形態において、脂質は、トリグリセリドまたはコレステロール（例えば、ＶＬＤＬまたはＬＤＬコレステロール）である。なおもさらなる実施形態において、脂質生合成および／または脂質輸送は、肝臓内である。

【００１６】

別の局面において、本発明は、その被験体にＰＧＣ－１β調節因子を投与することによって被験体における血漿トリグリセリドレベルおよび血漿コレステロールレベル（例えば、ＶＬＤＬまたはＬＤＬレベル）の少なくとも１つを調節する方法を提供する。

【００１７】

なおも別の局面において、本発明は、脂質関連疾患または障害を処置または予防することができる化合物のＰＧＣ－１β核酸発現またはＰＧＣ－１βポリペプチド活性を調節する能力をアッセイする工程を含む、その化合物を同定する方法を提供する。

【００１８】

なおもさらなる局面において、本発明は、脂質関連疾患または障害を処置または予防す

ることができる化合物のＰＧＣ－１β核酸発現またはＰＧＣ－１βポリペプチド活性を調節する能力をアッセイすることによって、その化合物を同定する方法を提供する。１つの実施形態において、ＰＧＣ－１β調節化合物は、脂質生成遺伝子（例えば、ＦＡＳ、ＳＣＤ－１、ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼ、ＤＧＡＴおよびＧＰＡＴ）の発現または活性の調節を検出することによって決定される。別の実施形態において、ＰＧＣ－１β調節化合物は、ＳＲＥＢＰ転写因子（例えば、ＳＲＥＢＰ１ａ、ＳＲＥＢＰ１ｃおよびＳＲＥＢＰ２）の発現または活性の調節を検出することによって決定される。なおも別の実施形態において、ＰＧＣ－１β調節化合物は、ＬＸＲ標的遺伝子（例えば、ＰＬＴＰ、ＡＢＣＡ１およびＡＢＣＧ１）の発現または活性の調節を検出することによって決定される。なおもさらなる実施形態において、ＰＧＣ－１β調節化合物は、コレステロールの血漿レベルおよびトリグリセリドの血漿レベルの少なくとも１つの調節を検出することによって決定される。なおもさらなる実施形態において、ＰＧＣ－１β調節化合物は、コレステロールホメオスタシスの調節を検出することによって決定される。

【００１９】

別の局面において、本発明は、被験体において、トリグリセリドレベルおよび血漿コレステロールレベルを調節することができる化合物のＰＧＣ－１β核酸発現またはＰＧＣ－１βポリペプチド活性を調節する能力をアッセイすることによって、その化合物を同定する方法を提供する。

【００２０】

なおも別の局面において、本発明は、脂質生合成および脂質輸送の少なくとも１つを調節することができる化合物のＰＧＣ－１βの発現または活性を調節する能力をアッセイすることによって、その化合物を同定する方法を提供する。１つの実施形態において、脂質は、トリグリセリドおよびコレステロール（例えば、ＶＬＤＬまたはＬＤＬコレステロール）の少なくとも１つである。なおもさらなる実施形態において、脂質生合成および／または脂質輸送は、肝臓内である。

【００２１】

なおもさらなる局面において、本発明は、被験体（例えば、ヒト）において脂質関連疾患または障害を阻害するための試験化合物の効能を評価する方法を提供し、この方法は、被験体から得られ、試験化合物の存在下で維持される第１サンプルにおけるＰＧＣ－１βの発現または活性のレベルと、被験体から得られ、試験化合物の非存在下で維持される第２サンプルにおけるＰＧＣ－１βの発現または活性のレベルとを比較することによって実施される。

【００２２】

別の局面において、本発明は、被験体において脂質関連疾患または障害を阻害するための治療の効能を評価する方法を提供し、この方法は、被験体への治療の少なくとも一部を提供する前の被験体から得られた第１サンプルにおけるＰＧＣ－１βの発現または活性のレベルと、治療の一部の提供後の被験体から得られた第２サンプルにおけるＰＧＣ－１βの発現または活性のレベルを比較することによって実施される。

【００２３】

なおも別の局面において、本発明は、被験体の細胞または組織（例えば、肝臓細胞）におけるＰＧＣ－１βの発現または活性を検出することによって、被験体が脂質関連疾患もしくは障害に罹患しているか否か、または脂質関連疾患もしくは障害を発症する危険性があるか否かを評価するための方法を提供する。

【００２４】

さらに別の局面において、本発明は、細胞（例えば、肝細胞）と少なくとも１つの食事成分を含有するサンプルとを接触させ、そしてＰＧＣ－１βの発現または活性を計測することによって食事成分を分類する方法を提供する。１つの実施形態において、ＰＧＣ－１βの発現または活性の増加は、アテローム発生の可能性が高い脂肪酸（例えば、トランス脂肪または飽和脂肪）の存在を示す。

【００２５】

なおもさらなる局面において、本発明は、細胞（例えば、肝細胞）とサンプルとを接触させて、ＰＧＣ－１βの発現または活性を計測し、これによってサンプルにおけるアテローム生成的な脂肪酸の存在を検出する、サンプルにおけるアテローム生成的な脂肪酸の存在を検出する方法を提供する。１つの実施形態において、ＰＧＣ－１βの発現または活性の増加は、サンプルにおけるアテローム生成的な脂肪酸（例えば、トランス脂肪または飽和脂肪）を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【００２６】

（発明の詳細な説明）

本発明は、ＰＧＣ－１βが、脂質生合成および脂質輸送の制御に関わり、そして例えば肝臓におけるトリグリセリドおよびコレステロール（例えば、ＶＬＤＬコレステロールおよびＬＤＬコレステロール）の生合成および輸送を制御するという発見に少なくとも一部は基づく。ＰＧＣ－１βは、脂質生合成を実施するためにＳＲＥＢＰ転写因子（例えば、ＳＲＥＢＰ１ａ、ＳＲＥＢＰ１ｃおよびＳＲＥＢＰ２）を同時活性化し、そして脂質輸送および分泌を実施するためにＬＸＲαを同時活性化する。ＰＧＣ－１βの高い発現または活性により、循環するトリグリセリドおよびコレステロールが高レベルになり、そして被験体における肝臓の脂肪変性が減少する。従って、ＰＧＣ－１βの誘導は、飽和脂肪およびトランス脂肪の食事摂取と循環コレステロールの増加とを結びつける重要な工程である。その結果、ＰＧＣ－１βの調節（例えば、ＰＧＣ－１βの発現もしくは活性および／またはＰＧＣ－１βによって制御される経路の調節）は、遺伝的または薬理学的方法を介して、脂質生合成、脂質輸送、血漿トリグリセリドレベルおよび血漿コレステロールレベルを調節し、それによって被験体における脂質関連疾患または障害（例えば、高脂血症、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、心臓血管疾患、肥満症およびＩＩ型糖尿病）を処置および／または予防する。

【００２７】

従って、１つの局面において、本発明は、被験体にＰＧＣ－１β調節因子を投与する工程を含む、被験体における脂質関連疾患または障害を処置または予防する方法を提供する。別の局面において、本発明は、ＰＧＣ－１αの発現または活性を調節する化合物を同定する方法を提供する。この方法は、ＰＧＣ－１αまたはＰＧＣ－１αを発現する細胞と試験化合物とを接触させて、ＰＧＣ－１αの発現または活性に対する試験化合物の効果を測定し、それによってＰＧＣ－１α発現または活性を調節（例えば、増加または減少）する化合物を同定する工程を含む。

【００２８】

本発明はまた、ＰＧＣ－１βが、肝臓および単離された肝細胞において、飽和脂肪およびトランス脂肪酸によって誘導されるが、コレステロールおよび不飽和脂肪酸によっては誘導されないという発見に基づく。従って、ＰＧＣ－１βは、被験体における血液脂質プロファイルに対するこれらの成分の効果を予測するために食事成分を同定および分類するために使用され得る。従って、本発明は、細胞（例えば、肝細胞）と食事成分または脂肪酸を含有するサンプルとを接触させて、ＰＧＣ－１βの発現または活性の調節を計測することによって食事成分およびアテローム生成的な脂肪酸を分類する方法を提供する。別の局面において、本発明は、被験体（例えば、哺乳動物）に食事成分またはアテローム生成的な脂肪酸を投与して、ＰＧＣ－１βの発現または活性の調節を計測することによって食事成分およびアテローム生成的な脂肪酸を分類する方法を提供する。ＰＧＣ－１βの発現または活性の増加は、脂肪酸（例えば、トランス脂肪または飽和脂肪）の存在を示し、これは、アテローム発生の可能性が高い。アテローム発生の可能性が高い食事成分は、被験体における脂質生合成、脂質輸送、トリグリセリドレベルおよび／または血漿コレステロールレベルの増加を引き起こし得、また被験体における脂質関連疾患または障害を発症させ得る。ＰＧＣ－１βの発現または活性の調節を計測する方法は、本明細書中に示される。

【００２９】

（定義）
本明細書中で使用されるとき、用語「ＰＧＣ－１βの発現または活性の調節因子」は、本明細書中に記載するようにＰＧＣ－１β発現または少なくとも１つのＰＧＣ－１β活性を調節または制御することができる化合物または物質を含む。ＰＧＣ－１βの発現または活性の調節因子は、ＰＧＣ－１βの発現または活性の誘導因子またはＰＧＣ－１βの発現または活性の阻害剤であり得る。本明細書中で使用されるとき、「ＰＧＣ－１β活性の誘導因子またはアゴニスト」は、完全または部分的のいずれかでＰＧＣ－１β活性を作動（ａｇｏｎｉｚｅ）、刺激、促進および／または模倣する。「ＰＧＣ－１β発現の誘導因子またはアゴニスト」は、完全または部分的のいずれかで、直接的または間接的にＰＧＣ－１β発現を増加、促進または刺激する。本明細書中で使用されるとき、「ＰＧＣ－１β活性の阻害剤またはアンタゴニスト」は、完全または部分的のいずれかでＰＧＣ－１β活性を拮抗、減少または遮断する。「ＰＧＣ－１β発現の阻害剤またはアンタゴニスト」は、完全または部分的のいずれかで、直接的または間接的にＰＧＣ－１β発現を減少または遮断する。ＰＧＣ－１β阻害剤の例としては、低分子、アンチセンスＰＧＣ－１β核酸分子、リボザイム、ｓｉＲＮＡ分子および抗ＰＧＣ－１β抗体が挙げられる。ＰＧＣ－１β誘導因子の例としては、ＰＧＣ－１β模倣物（例えば、ペプチド模倣物）、低分子、ＰＧＣ－１βをコードする核酸分子およびＰＧＣ－１βタンパク質またはそれらのフラグメントが挙げられる。

【００３０】
本明細書中で交換可能に使用されるとき、「ＰＧＣ－１β活性」、「ＰＧＣ－１βの生物学的活性」または「ＰＧＣ－１βの機能的活性」とは、標準的な技術に従ってインビトロおよび／またはインビボで測定される、ＰＧＣ－１βポリペプチドまたは核酸分子によってＰＧＣ－１β応答性の分子、細胞または組織に対して発揮される活性のことをいう。例示的な実施形態において、ＰＧＣ－１β活性は、脂質生成遺伝子（例えば、ＦＡＳ、ＳＣＤ－１、ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼ、ＤＧＡＴおよびＧＰＡＴ）の発現または活性を調節する能力である。別の実施形態において、ＰＧＣ－１β活性は、ＬＸＲ／ＲＸＲ、ＬＸＲαまたはＬＸＲα標的遺伝子（例えば、ＰＬＴＰ、ＡＢＣＡ１およびＡＢＣＧ１）の発現または活性を調節する能力である。なおも別の実施形態において、ＰＧＣ－１β活性は、ＳＲＥＢＰ転写因子（例えば、ＳＲＥＢＰ１ａ、ＳＲＥＢＰ１ｃおよびＳＲＥＢＰ２）の発現または活性を調節する能力である。さらに別の実施形態において、ＰＧＣ－１β活性は、例えば肝臓における脂質生合成および／または脂質輸送を調節する能力である。別の実施形態において、ＰＧＣ－１β活性は、血漿トリグリセリドレベルおよび／または血漿コレステロールレベルを調節する能力である。なおも別の実施形態において、ＰＧＣ－１β活性は、被験体における脂質関連疾患または障害を調節する能力である。

【００３１】
本明細書中で使用されるとき、用語「脂質関連疾患または障害」は、脂質代謝の機能不全または欠損によって引き起こされるかまたはそれらに関連する任意の疾患、障害または状態を含み、脂質代謝としては、脂質生合成、脂質輸送、トリグリセリドレベル、血漿レベル、血漿コレステロールレベルまたは任意の脂質特異的な経路もしくは活性の制御誤りもしくは調節が挙げられるが、これらに限定されない。脂質関連疾患または障害としては、肥満症および肥満症関連疾患および障害（例えば、肥満症、耐糖能障害（ＩＧＴ）、インスリン抵抗性、アテローム性動脈硬化症、アテローム性疾患、心疾患、高血圧症、脳卒中、シンドロームＸ、インスリン非依存性糖尿病（ＮＩＤＤＭまたはＨ型糖尿病）およびインスリン依存性糖尿病（ＩＤＤＭまたはＩ型糖尿病））が挙げられる。本発明の方法によって処置される糖尿病関連合併症としては、微小血管障害性病変、眼球の病変、網膜症、ニューロパシーおよび腎性病変が挙げられる。心疾患としては、心不全、冠状動脈不全および高血圧が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の化合物によって処置される他の肥満症関連障害は、高脂血症および高尿酸血症が挙げられる。本発明のなおも他の肥満症関連疾患または障害としては、悪液質、るいそう、食欲不振および過食症が挙げられる。

【００３２】
本明細書中で使用されるとき、用語「コレステロールレベル」とは、被験体における血清コレステロールのレベルまたはコレステロール形態（例えば、ＨＤＬコレステロール、ＬＤＬ、コレステロールおよびＶＬＤＬコレステロールなど）のレベルのことをいう。
【００３３】
本明細書中で使用されるとき、用語「低密度リポタンパク質」または「ＬＤＬ」は、当業者の共通の慣習に従って定義される。一般に、ＬＤＬとは、超遠心分離によって単離されるとき、ｄ＝１．０１９からｄ＝１．０６３の密度範囲である脂質－タンパク質複合体のことをいう。
【００３４】
本明細書中で使用されるとき、用語「高密度リポタンパク質」または「ＨＤＬ」は、当業者の共通の慣習に従って定義される。一般に「ＨＤＬ」とは、超遠心分離によって単離されるとき、ｄ＝１．０６３からｄ＝１．２１の密度範囲である脂質－タンパク質複合体のことをいう。
【００３５】
本明細書中で使用されるとき、用語「食事成分」は、生物（例えば、哺乳動物）によって消費される食物および飲料の任意の構成成分を含む。食事成分としては、例えば、コレステロール、（例えば、ＬＤＬ、ＶＬＤＬおよびＨＤＬ）、食餌性脂肪、脂肪酸（例えば、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、トランス脂肪酸）を含む脂質、繊維、炭水化物、タンパク質、アミノ酸、ビタミンおよび／またはミネラルが挙げられるが、これらに限定されない。
【００３６】
本明細書中で使用されるとき、用語「処置」は、疾患もしくは障害、疾患もしくは障害の症状または疾患もしくは障害に対する素因を治療、治癒、緩和、軽減、変更、矯正、寛解、改善または作用する目的で、疾患もしくは障害、疾患もしくは障害の症状または疾患もしくは障害に対する素因を有する患者への治療薬の適用もしくは投与または患者から単離された組織または細胞株への治療薬の適用もしくは投与として定義される。治療薬としては、本明細書中に記載される、低分子、ペプチド、ペプチド模倣物、核酸分子、抗体、リボザイム、ＲＮＡ干渉物質（例えば、ｓｉＲＮＡ分子）ならびにセンスオリゴヌクレオチドおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない。
【００３７】
本明細書中で使用されるとき、用語「動物または細胞に処置薬を投与する」とは、動物または細胞に処置薬を分配、送達または適用することをいうと意図される。治療薬に関して、用語「投与する」とは、接触または分配、動物の所望の部位への治療薬の送達（非経口経路または経口経路のいずれかによる送達、筋肉内注射、皮下／皮内注射、静脈内注射、頬側投与、鼻腔内または気道経路による経皮的な送達および投与を含む）に適した任意の経路によって動物に治療薬を送達または適用することをいうと意図される。
【００３８】
本明細書中で使用されるとき、用語「トランスジェニック動物」とは、動物の１以上の細胞が導入遺伝子を含む、非ヒト動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはげっ歯類（例えば、ラットまたはマウス）のことをいう。トランスジェニック動物の他の例としては、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などが挙げられる。導入遺伝子は、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノムに組み込まれ、そして成熟した動物のゲノム中に残存し、それによってトランスジェニック動物の１以上の細胞タイプまたは組織において、コードされる遺伝子産物の発現を指示する外来性ＤＮＡである。この導入遺伝子は、直接的または間接的に、その細胞の前駆体への導入（例えば、マイクロインジェクション、トランスフェクションまたは感染（例えば、組換えウイルスを用いた感染によって）によって）細胞に導入される。遺伝的操作との用語は、組換えＤＮＡ分子の導入を含む。この分子は、染色体内に組み込まれ得るか、または染色体外で複製するＤＮＡであり得る。

【００３９】
本明細書中で使用されるとき、用語「異所性発現」は、遺伝子発現の非野生型パターンを含む。本明細書中で使用されるとき、発現とは、転写、転写後（例えば、ｍＲＮＡ安定性）、翻訳および翻訳後の段階を含む。異所性発現としては：非野生型レベルでの発現、すなわち、過剰発現または過小発現；遺伝子が発現される時間または段階の点で野生型とは異なる発現のパターン（例えば、所定の発生の期間または段階における高発現または低発現（野生型と比較するとき）；所定の細胞タイプまたは組織タイプにおける低発現（野生型と比較するとき）という点で野生型とは異なる発現のパターン；スプライシングの大きさ、アミノ酸配列、移行後の修飾または発現されたポリペプチドの生物学的活性の点で野生型とは異なる発現のパターン；遺伝子の発現に対する環境の刺激または細胞外の刺激の効果の点で野生型とは異なる発現のパターン（例えば、刺激の強さが強いかまたは弱い状態での高発現または低発現のパターン（野生型と比較するとき））が挙げられる。異所性発現は、トランスジェニック核酸からの任意の発現を含む。異所性発現は、例えば、遺伝子またはその制御配列の全部または一部の欠失によって誘導され得る、遺伝子または導入遺伝子の欠失または非発現を含む。

【００４０】
本明細書中で使用されるとき、用語「ＲＮＡ干渉物質」は、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）によって標的遺伝子（例えば、本発明のマーカー）の発現を干渉または阻害する任意の物質として定義される。このようなＲＮＡ干渉物質としては、標的遺伝子（例えば、本発明のマーカー）に相同であるＲＮＡ分子、またはそれらのフラグメント、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）によって標的遺伝子の発現を干渉または阻害する、短鎖干渉ＲＮＡ（ｓｈｏｒｔ　ｉｎｔｅｒｆｅｒｉｎｇ　ＲＮＡ）（ｓｉＲＮＡ）および低分子を含む核酸分子が挙げられるが、これらに限定されない。

【００４１】
本明細書中で使用されるとき、用語「ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）」は、進化的に保存されたプロセスであり、それによって標的遺伝子と同一またはそれと高度に類似する配列のＲＮＡの発現または誘導により、標的化された遺伝子から転写されたメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の配列特異的な分解または特異的な転写後遺伝子サイレンシング（ＰＴＧＳ）が起き（Ｃｏｂｕｒｎ，Ｇ．　ａｎｄ　Ｃｕｌｌｅｎ，Ｂ．（２００２）Ｊ．ｏｆ　Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　７６（１８）：９２２５を参照のこと）、それによって標的遺伝子の発現を阻害する。１つの実施形態において、ＲＮＡは、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）である。このプロセスは、植物細胞、無脊椎動物細胞および哺乳動物細胞において説明されている。本来は、ＲＮＡｉは、長鎖ｄｓＲＮＡがｓｉＲＮＡと呼ばれる二本鎖フラグメントへの連続移動的な切断を促進するｄｓＲＮＡ特異的エンドヌクレアーゼＤｉｃｅｒによって開始される。ｓｉＲＮＡは、標的ｍＲＮＡを認識して切断するタンパク質複合体に組み込まれる。ＲＮＡｉはまた、標的遺伝子の発現を阻害またはサイレンシングするために、核酸分子（例えば、合成ｓｉＲＮＡまたはＲＮＡ干渉物質）を導入することによって開始され得る。本明細書中で使用されるとき、「標的遺伝子発現の阻害」または「マーカー遺伝子発現の阻害」は、発現もしくはタンパク質活性または標的遺伝子（例えば、本発明のマーカー遺伝子）もしくは標的遺伝子によってコードされるタンパク質（例えば、本発明のマーカータンパク質）のレベルの任意の低下を含む。標的遺伝子の発現またはＲＮＡ干渉物質によって標的化されていない標的遺伝子によってコードされるタンパク質の活性もしくはレベルと比較するとき、この低下は、少なくとも３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％または９９％以上であり得る。

【００４２】
本明細書中で使用されるとき、本明細書中で「低分子干渉ＲＮＡ（ｓｍａｌｌ　ｉｎｔｅｒｆｅｒｉｎｇ　ＲＮＡ）」とも呼ばれる用語「短鎖干渉ＲＮＡ」（ｓｉＲＮＡ）は、標的遺伝子の発現を（例えば、ＲＮＡｉによって）阻害するように機能する物質として定義される。ｓｉＲＮＡは、化学的に合成されてもよく、インビトロ転写によって生成されてもよく、または宿主細胞内で生成されてもよい。１つの実施形態において、ｓｉＲＮＡ

は、約１５～約４０ヌクレオチド長、好ましくは約１５～約２８ヌクレオチド長、より好ましくは約１９～約２５ヌクレオチド長およびより好ましくは約１９、２０、２１または２２ヌクレオチド長の二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）分子であり、約０、１、２、３、４または５ヌクレオチド長を有する各鎖において３’および／または５’突出を有し得る。突出の長さは、２本の鎖の間で独立している。すなわち、一方の鎖における突出の長さは、第２の鎖の突出の長さに左右されない。好ましくは、ｓｉＲＮＡは、標的メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の分解または特異的な転写後遺伝子サイレンシング（ＰＴＧＳ）を介してＲＮＡ干渉を促進することができる。

【００４３】

別の実施形態において、ｓｉＲＮＡは、低分子ヘアピン（ステムループとも呼ばれる）ＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）である。１つの実施形態において、これらのｓｈＲＮＡは、５～９ヌクレオチドループに続く、短い（例えば、１９～２５ヌクレオチド）アンチセンス鎖および類似のセンス鎖から構成される。あるいは、センス鎖は、ヌクレオチドループ構造より先にあり得、アンチセンス鎖がそれに続き得る。これらのｓｈＲＮＡは、プラスミド、レトロウイルスおよびレンチウイルス内に含まれ得、そして例えば、ｐｏｌ　ＩＩＩ　Ｕ６プロモーターまたは別のプロモーター（例えば、Ｓｔｅｗａｒｔ、ｅｔ　ａｌ．（２００３）ＲＮＡ　Ａｐｒ；９（４）：４９３－５０１を参照のこと。これは本明細書中に参考として援用される）から発現され得る。

【００４４】

本明細書中で使用されるとき、用語「構成的」プロモーターは、遺伝子産物をコードするか、または特定するポリヌクレオチドに作動可能に連結されるとき、細胞のほとんどまたはすべての生理学的条件下で生体のヒト細胞内で遺伝子産物を産生させるヌクレオチド配列である。

【００４５】

本明細書中で使用されるとき、用語「誘導性」プロモーターは、遺伝子産物をコードするか、または特定するポリヌクレオチドに作動可能に連結されるとき、実質的にプロモーターに相当する誘導因子が細胞内に存在するときだけ生体のヒト細胞内で遺伝子産物を産生させるヌクレオチド配列である。

【００４６】

本明細書中で使用されるとき、用語「組織特異的」プロモーターは、遺伝子産物をコードするか、または特定するポリヌクレオチドに作動可能に連結されるとき、実質的に細胞がプロモーターに対応する組織タイプの細胞である場合のみ、生体のヒト細胞内で遺伝子産物を産生させるヌクレオチド配列である。

【００４７】

本発明の様々な局面は、以下の小区分にさらに詳細に記載される：

（Ｉ．スクリーニングアッセイ：）

本発明は、例えば、ＰＧＣ－１β発現またはＰＧＣ－１β活性に対する刺激または阻害の効果を有するか、または例えば、ＰＧＣ－１β基質の発現または活性に対する刺激または阻害の効果を有する調節因子、すなわち、ＰＧＣ－１βタンパク質に結合する、候補化合物もしくは試験化合物または試験物質（例えば、ペプチド、ペプチド模倣物、低分子（有機もしくは無機）または他の薬剤）を同定するための（本明細書中で「スクリーニングアッセイ」ともいわれる）方法を提供する。本明細書中に記載されるアッセイを使用して同定される化合物は、ＰＧＣ－１βの発現または活性を調節する（例えば、ＰＧＣ－１βの発現または活性を低下させる）のに有用であり得る。従って、これらの化合物は、脂質関連疾患または障害を処置または予防するのに有用であり得る。

【００４８】

これらのアッセイは、ＰＧＣ－１βタンパク質に結合するか、もしくは相互作用する化合物またはＰＧＣ－１βタンパク質と相互作用するか、もしくは調節する他の細胞内または細胞外タンパク質に結合するか、もしくは相互作用する化合物を同定するために設計される。このような化合物としては、ペプチド、抗体、核酸分子、ｓｉＲＮＡ分子または小

さい有機化合物もしくは無機化合物が挙げられ得るが、これらに限定されない。このような化合物は、他の細胞タンパク質も含み得る。

【００４９】

本明細書中に記載されるようなアッセイを介して同定される化合物は、例えば、（例えば、ＰＧＣ－１βの発現または活性の減少を引き起こすことによって）ＰＧＣ－１βを調節するのに有用であり得る。それらの活動としては、例えば、脂質輸送の調節、脂質生合成の調節、血漿トリグリセリドレベルの調節および血漿コレステロールレベルの調節が挙げられる。従って、これらの化合物は、脂質関連疾患または障害を処置または予防するのに有用であり得る。それによって低いＰＧＣ－１β活性または発現が所望される場合、ＰＧＣ－１βタンパク質と相互作用する化合物は、ＰＧＣ－１βタンパク質の発現または活性を阻害または抑制する化合物を含み得る。このような化合物は、ＰＧＣ－１βタンパク質活性のレベルの効果的な減少を引き起こし得るので、脂質関連疾患または障害を処置または予防する。例えば、ＰＧＣ－１βの発現または活性を減少させる投与量または時間の長さで投与される部分的なアンタゴニストまたはアンタゴニストは、脂質輸送および／または脂質生合成を低下させるように作用し得、これによって被験体における血漿トリグリセリドレベルおよび／または血漿コレステロールレベルが低下する。あるいは、それによって高いＰＧＣ－１β活性または発現が、例えば、肥満症関連疾患または障害（例えば、悪液質、るいそう、食欲不振または過食症）を処置または予防することが所望される。ＰＧＣ－１βタンパク質と相互作用する化合物は、ＰＧＣ－１βタンパク質の発現または活性を強調するかまたは増幅する化合物を含み得る。このような化合物は、ＰＧＣ－１βタンパク質活性のレベルの効果的な増加を引き起こし得るので、化合物の投与量および化合物が投与される時間の長さに依存して、肥満症関連疾患または障害の誘導因子として作用する。

【００５０】

１つの実施形態において、本発明は、ＰＧＣ－１βタンパク質もしくはポリペプチドまたはそれらの生物学的に活性な部分の基質またはそれらと相互作用する候補または試験化合物をスクリーニングするアッセイを提供する。別の実施形態において、本発明は、ＰＧＣ－１βタンパク質もしくはポリペプチドまたはそれらの生物学的に活性な部分に結合するかまたはそれらの活性を調節する候補または試験化合物をスクリーニングするアッセイを提供する。本発明の試験化合物は、当該分野で公知のコンビナトリアルライブラリー法における多数のアプローチのいずれかを使用して得られ得る。コンビナトリアルライブラリー法としては：生物学的ライブラリー；空間的にアドレス呼び出し可能な平行固相または溶液相ライブラリー；デコンボルーションを必要とする合成ライブラリー法；「１ビーズ１化合物」ライブラリー法；およびアフィニティークロマトグラフィ選択を使用する合成ライブラリー法が挙げられる。生物学的ライブラリーアプローチは、ペプチドライブラリーに限定されるが、他の４つのアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマーまたは化合物の低分子ライブラリーに適用可能である（Ｌａｍ，Ｋ．Ｓ．（１９９７）Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓ．１２：１４５）。

【００５１】

分子ライブラリーの合成方法の例は、当該分野、例えば、Ｄｅ Ｗｉｔｔ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ Ｕ．Ｓ．Ａ．９０：６９０９；Ｅｒｂ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：１１４２２；Ｚｕｃｋｅｒｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．（１９９４）．Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３７：２６７８；Ｃｈｏ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６１：１３０３；Ｃａｒｒｅｌｌ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．３３：２０５９；Ｃａｒｅｌｌ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．３３：２０６１；およびＧａｌｌｏｐ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３７：１２３３において見出し得る。

【００５２】

化合物のライブラリーは、溶液中（例えば、Ｈｏｕｇｈｔｅｎ（１９９２）Ｂｉｏｔｅ

ｃｈｎｉｑｕｅｓ １３：４１２－４２１）またはビーズ上（Ｌａｍ（１９９１）Ｎａｔｕｒｅ ３５４：８２－８４）、チップ（Ｆｏｄｏｒ（１９９３）Ｎａｔｕｒｅ ３６４：５５５－５５６）、細菌（Ｌａｄｎｅｒ、米国特許第５，２２３，４０９号）、胞子（Ｌａｄｎｅｒ、米国特許第’４０９号）、プラスミド（Ｃｕｌｌ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ８９：１８６５－１８６９）またはファージ上（Ｓｃｏｔｔ ａｎｄ Ｓｍｉｔｈ（１９９０）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：３８６－３９０）；（Ｄｅｖｌｉｎ（１９９０）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：４０４－４０６）；（Ｃｗｉｒｌａ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８７：６３７８－６３８２）；（Ｆｅｌｉｃｉ（１９９１）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：３０１－３１０）；（Ｌａｄｎｅｒ前出）に存在し得る。

【００５３】

１つの実施形態において、アッセイは、ＰＧＣ－１βタンパク質またはその生物学的に活性な部分を発現する細胞を、試験化合物と接触して、ＰＧＣ－１β活性を調節する試験化合物の能力が測定される細胞に基づくアッセイである。ＰＧＣ－１β活性を調節する試験化合物の能力の測定は、例えば、細胞内のカルシウム、IP_3、ｃＡＭＰもしくはジアシルグリセロール濃度または細胞内のタンパク質のリン酸化プロファイルまたは下流の遺伝子の転写のレベルをモニターすることによって達成され得る。細胞は、哺乳動物起源（例えば、肝臓細胞）であり得る。１つの実施形態において、ＰＧＣ－１β結合部位と相互作用する化合物は、リガンドとして機能する能力、すなわち、ＰＧＣ－１β結合部位に結合して転写を調節するかまたはシグナル伝達経路を調節する能力についてスクリーニングされ得る。ＰＧＣ－１βリガンドの同定およびリガンド－ＰＧＣ－１β複合体の活性の計測により、この相互作用の調節因子（例えば、アンタゴニストまたはアゴニスト）が同定される。このような調節因子は、脂質関連疾患または障害の処置および予防、ＰＧＣ－１βの調節（例えば、ＰＧＣ－１βの発現または活性を低下させることによって）に有用であり得る。

【００５４】

基質に結合するＰＧＣ－１βを調節するか、またはＰＧＣ－１βに結合する試験化合物の能力もまた測定され得る。基質に結合するＰＧＣ－１βを調節する試験化合物の能力の測定は、例えば、ＰＧＣ－１β基質と放射性同位体または酵素標識とを結合することによって達成され得るので、ＰＧＣ－１βへのＰＧＣ－１β基質の結合が複合体における標識されたＰＧＣ－１β基質を検出することによって測定され得る。ＰＧＣ－１βはまた、複合体におけるＰＧＣ－１β基質に結合するＰＧＣ－１βを調節する試験化合物の能力をモニターするために放射性同位体または酵素標識と結合され得る。ＰＧＣ－１βを結合する試験化合物の能力の測定は、例えば、その化合物を放射性同位体または酵素標識と結合することによって達成され得るので、その化合物のＰＧＣ－１βへの結合は、複合体における標識されたＰＧＣ－１β化合物を検出することによって測定され得る。例えば、化合物（例えば、ＰＧＣ－１βリガンドまたは基質）は、直接的または間接的のいずれかで^{125}Ｉ、^{35}Ｓ、^{14}Ｃまたは^{3}Ｈおよび放射性放出（ｒａｄｉｏｅｍｍｉｓｓｉｏｎ）の直接的な計数またはシンチレーション計数によって検出される放射性同位体で標識され得る。化合物はさらに、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼまたはルシフェラーゼで酵素的に標識され得、そして酵素標識は、適切な基質の産物への変換の測定によって検出される。

【００５５】

任意の相互作用物の標識なしにＰＧＣ－１βと相互作用する化合物（例えば、ＰＧＣ－１βリガンドまたは基質）の能力を測定することは、本発明の範囲内でもある。例えば、マイクロフィジオメーターは、化合物またはＰＧＣ－１βのいずれかの標識なしで化合物とＰＧＣ－１βとの相互作用を検出するために使用され得る（ＭｃＣｏｎｎｅｌｌ，Ｈ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５７：１９０６－１９１２）。本明細書中で使用されるとき、「マイクロフィジオメーター」（例えば、Ｃｙｔｏｓｅｎｓｏｒ）は、光アドレス可能電位差測定センサ（ｌｉｇｈｔ－ａｄｄｒｅｓｓａｂｌｅ ｐｏｔ

ｅｎｔｉｏｍｅｔｒｉｃ ｓｅｎｓｏｒ）（ＬＡＰＳ）を使用して細胞がその環境を酸性化する速度を計測する分析機器である。この酸性化速度の変化は、化合物とＰＧＣ－１βとの間の相互作用の指標として使用され得る。

【００５６】

別の実施形態において、アッセイは、ＰＧＣ－１β標的分子（例えば、ＰＧＣ－１β基質）を発現する細胞と試験化合物とを接触する工程および試験化合物のＰＧＣ－１β標的分子の活性を調節する（例えば、刺激または阻害する）能力を測定する工程を含む細胞に基づくアッセイである。ＰＧＣ－１β標的分子の活性を調節する試験化合物の能力の測定は、例えば、ＰＧＣ－１β標的分子に結合するかまたは相互作用するＰＧＣ－１βタンパク質の能力を測定することによって達成され得る。

【００５７】

ＰＧＣ－１β標的分子に結合するまたは相互作用するＰＧＣ－１βタンパク質またはその生物学的に活性なフラグメントの能力の測定は、直接的な結合を測定するための上記の方法の１つによって達成され得る。好ましい実施形態において、ＰＧＣ－１β標的分子に結合するかまたは相互作用するＰＧＣ－１βタンパク質の能力の測定は、標的分子の活性を測定することによって達成され得る。例えば、標的分子の活性は、標的（すなわち、細胞内のCa^{2+}、ジアシルグリセロール、IP_3、ｃＡＭＰ）の、細胞の第２メッセンジャーの誘導を検出すること、適切な基質上の標的の触媒的／酵素的活性を検出すること、（検出可能なマーカー（例えば、ルシフェラーゼ））をコードする核酸に作動可能に連結された標的応答性制御エレメントを含む）レポーター遺伝子の誘導を検出することまたは標的に制御される細胞応答（例えば、遺伝子発現）を検出することによって測定され得る。

【００５８】

なおも別の実施形態において、本発明のアッセイは、ＰＧＣ－１βタンパク質またはその生物学的に活性な部分を、試験化合物と接触させ、そして試験化合物のＰＧＣ－１βタンパク質またはその生物学的に活性な部分に結合する能力を測定する無細胞系アッセイである。本発明のアッセイに使用されるＰＧＣ－１βタンパク質の好ましい生物学的に活性な部分は、非ＰＧＣ－１β分子（例えば、表面確率スコアの高いフラグメント）との相互作用に関与するフラグメントを含む。ＰＧＣ－１βタンパク質への試験化合物の結合は、上記したように直接的または間接的のいずれかで測定され得る。好ましい実施形態において、アッセイは、ＰＧＣ－１βタンパク質またはその生物学的に活性な部分と、アッセイ混合物を形成するようにＰＧＣ－１βを結合する公知の化合物とを接触する工程、アッセイ混合物と試験化合物とを接触する工程および試験化合物がＰＧＣ－１βタンパク質と相互作用する能力を測定する工程を含み、ここで試験化合物がＰＧＣ－１βタンパク質と相互作用する能力を測定する工程は、公知の化合物と比較して、試験化合物が優先的にＰＧＣ－１βまたはその生物学的に活性な部分に結合する能力を測定する工程を含む。ＰＧＣ－１βと公知の標的タンパク質との相互作用を調節する化合物は、ＰＧＣ－１βタンパク質、特にＰＧＣ－１βタンパク質変異体の活性を制御するときに有用であり得る。

【００５９】

別の実施形態において、アッセイは、ＰＧＣ－１βタンパク質またはその生物学的に活性な部分が、試験化合物と接触し、そして試験化合物がＰＧＣ－１βタンパク質またはその生物学的に活性な部分の活性を調節（例えば、刺激または阻害）する能力を測定する無細胞系アッセイである。試験化合物がＰＧＣ－１βタンパク質の活性を調節する能力の測定は、直接的な結合を測定するための上記の方法の１つによって、例えば、ＰＧＣ－１β標的分子に結合するＰＧＣ－１βタンパク質の能力を測定することによって達成され得る。ＰＧＣ－１βタンパク質がＰＧＣ－１β標的分子に結合する能力の測定はまた、リアルタイム生物分子相互作用解析（ＢＩＡ）などの技術を使用して達成され得る（Ｓｊｏｌａｎｄｅｒ，Ｓ．ａｎｄ Ｕｒｂａｎｉｃｚｋｙ，Ｃ．（１９９１）Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．６３：２３３８－２３４５およびＳｚａｂｏ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．５：６９９－７０５）。本明細書中で使用されるとき

、「ＢＩＡ」は、任意の相互作用物（例えば、ＢＩＡコア）を標識せずにリアルタイムで生体特異的な相互作用を研究するための技術である。表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）の光学現象の変化は、生物学的分子間のリアルタイムな反応の指標として使用され得る。

【００６０】

別の実施形態において、試験化合物がＰＧＣ－１βタンパク質の活性を調節する能力の測定は、ＰＧＣ－１β標的分子の下流のエフェクターの活性をさらに調節するＰＧＣ－１βタンパク質の能力を測定することによって達成され得る。例えば、適切な標的上のエフェクター分子の活性が、測定され得るか、または適切な標的へのエフェクターの結合が、前記したように測定され得る。

【００６１】

なおも別の実施形態において、無細胞系アッセイは、ＰＧＣ－１βタンパク質またはその生物学的に活性な部分と、アッセイ混合物を形成するＰＧＣ－１βタンパク質を結合する公知の化合物とを接触させる工程、アッセイ混合物と試験化合物とを接触させる工程および試験化合物がＰＧＣ－１βタンパク質と相互作用する能力を測定する工程を含み、ここで試験化合物がＰＧＣ－１βタンパク質と相互作用する能力を測定する工程は、優先的にＰＧＣ－１β標的分子に結合するかまたはその活性を調節するＰＧＣ－１βタンパク質の能力を測定する工程を含む。

【００６２】

本発明の上記のアッセイ方法の他の実施形態において、ＰＧＣ－１βまたはその標的分子の１つまたは両方の非複合型から複合型の分離を促進するためならびにアッセイの自動化を提供するためにそれらのタンパク質のいずれかを固定化することが望ましい可能性がある。候補化合物の存在下おおよび非存在下における、試験化合物のＰＧＣ－１βタンパク質への結合またはＰＧＣ－１βタンパク質と標的分子との相互作用は、反応物を含有するのに適した任意の容器中で達成され得る。このような容器の例としては、マイクロタイタープレート、試験管および微小遠心チューブが挙げられる。１つの実施形態において、１つまたは両方のタンパク質がマトリックスに結合することを可能にするドメインを添加する融合タンパク質が提供され得る。例えば、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ／ＰＧＣ－１β融合タンパク質またはグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ／標的融合タンパク質は、グルタチオンセファロースビーズ（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレートに吸着され得、そして試験化合物と混合されるか、または試験化合物および吸着されていない標的タンパク質もしくはＰＧＣ－１βタンパク質のいずれかおよびその混合物が、複合体形成を助長する条件下（例えば、塩およびｐＨについての生理学的条件）でインキュベートされる。インキュベーション後、ビーズまたはマイクロタイタープレートのウェルを任意の非結合成分を除去するために洗浄し、ビーズの場合はマトリックスを固定化し、例えば上記したように、直接的または間接的のいずれかで複合体を測定する。あるいは、複合体は、マトリックスから解離され得、そしてＰＧＣ－１β結合または活性のレベルを標準的な技術を使用して測定する。

【００６３】

マトリックス上のタンパク質を固定化する他の技術はまた、本発明のスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。例えば、ＰＧＣ－１βタンパク質またはＰＧＣ－１β標的分子のいずれかは、ビオチンおよびストレプトアビジンの結合体化を利用して固定化され得る。ビオチン化されたＰＧＣ－１βタンパク質または標的分子は、当該分野で公知の技術（例えば、ビオチン化キット、Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）を使用してビオチン－ＮＨＳ（Ｎ－ヒドロキシ－スクシンイミド）から調製され得、そしてストレプトアビジンコートされた９６ウェルプレート（Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ）のウェル内で固定化され得る。あるいは、ＰＧＣ－１βタンパク質または標的分子に反応性であるが、標的分子へのＰＧＣ－１βタンパク質の結合を干渉しない抗体は、プレートのウェルに誘導体化され得て、非結合の標的またはＰＧＣ－１βタンパク質を抗体結合体化によってウェル内で捕捉され得る。ＧＳＴ－固定化複合体について上記し

たものに加えて、このような複合体を検出する方法としては、ＰＧＣ－１βタンパク質または標的分子と反応性である抗体を使用する複合体の免疫検出ならびにＰＧＣ－１βタンパク質または標的分子に関連する酵素的活性の検出に依存する酵素結合アッセイが挙げられる。

【００６４】

別の実施形態において、ＰＧＣ－１β発現の調節因子は、細胞が候補化合物と接触して、その細胞におけるＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡまたはタンパク質の発現が測定される方法において同定される。候補化合物の存在下でのＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡまたはタンパク質の発現のレベルは、候補化合物の非存在下でのＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡまたはタンパク質の発現のレベルと比較される。次いで候補化合物は、この比較に基づいてＰＧＣ－１β発現の調節因子として同定され得る。例えば、ＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡまたはタンパク質の発現が候補化合物の非存在下より存在下のほうが高い（実質的に有意に高い）とき、候補化合物は、ＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡまたはタンパク質発現の刺激物質として同定される。あるいは、ＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡまたはタンパク質の発現が候補化合物の非存在下より存在下のほうが低い（実質的に有意に低い）とき、候補化合物は、ＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡまたはタンパク質発現の阻害剤として同定される。細胞におけるＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡまたはタンパク質発現のレベルは、ＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡまたはタンパク質を検出するための本明細書中に記載される方法によって測定され得る。

【００６５】

本発明のなおも別の局面において、ＰＧＣ－１βタンパク質は、ＰＧＣ－１βに結合するかまたは相互作用して（「ＰＧＣ－１β結合タンパク質」または「ＰＧＣ－１β－ｂｐ」）、ＰＧＣ－１β活性に関わる他のタンパク質を同定するためのツーハイブリッドアッセイまたはスリーハイブリッドアッセイにおける「ベイトタンパク質」として使用され得る（例えば、米国特許第５，２８３，３１７号；Ｚｅｒｖｏｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９９３）Ｃｅｌｌ　７２：２２３－２３２；Ｍａｄｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．（１９９３）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：１２０４６－１２０５４；Ｂａｒｔｅｌ　ｅｔ　ａｌ．（１９９３）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　１４：９２０－９２４；Ｉｗａｂｕｃｈｉ　ｅｔ　ａｌ．（１９９３）Ｏｎｃｏｇｅｎｅ　８：１６９３－１６９６；およびＢｒｅｎｔ　ＷＯ９４／１０３００を参照のこと）。このようなＰＧＣ－１β結合タンパク質はまた、例えば、ＰＧＣ－１β媒介シグナル伝達経路の下流のエレメントとしてＰＧＣ－１βタンパク質またはＰＧＣ－１β標的によるシグナルの伝達に関わる可能性がある。あるいは、このようなＰＧＣ－１β結合タンパク質は、ＰＧＣ－１β阻害剤である可能性がある。

【００６６】

ツーハイブリッドシステムは、分離可能なＤＮＡ結合ドメインおよび活性化ドメインからなるほとんどの転写因子のモジュールの性質に基づく。簡潔には、アッセイは、２つの異なるＤＮＡ構築物を利用する。一方の構築物において、ＰＧＣ－１βタンパク質についてコードする遺伝子は、公知の転写因子（例えば、ＧＡＬ－４）のＤＮＡ結合ドメインをコードする遺伝子に融合される。他方の構築物において、同定されていないタンパク質（「プレイ」または「サンプル」）をコードするＤＮＡ配列のライブラリーからのＤＮＡ配列は、公知の転写因子の活性化ドメインについてコードする遺伝子に融合される。「ベイト」および「プレイ」タンパク質が、インビボでＰＧＣ－１β依存性複合体の形成に相互作用することができる場合、転写因子のＤＮＡ結合ドメインおよび活性化ドメインが近接近する。この接近により、転写制御部位に作動可能に連結されるレポーター遺伝子（例えば、ＬａｃＺ）の転写が転写因子に応答性になる。レポーター遺伝子の発現は検出され得、機能的転写因子を有する細胞コロニーは、ＰＧＣ－１βタンパク質と相互作用するタンパク質をコードするクローン化遺伝子を得るために単離および使用され得る。

【００６７】

さらなる実施形態において、アッセイは、ＰＧＣ－１βとその基質および／または結合パートナーとの間の相互作用を調節する（例えば、正または負の影響を及ぼす）化合物を同定する目的で本発明の使用を通じて工夫され得る。このような化合物としては、分子（

例えば、低分子）、抗体、ペプチド、ホルモン、オリゴヌクレオチド、核酸およびそれらのアナログが挙げられ得るが、これらに限定されない。このような化合物はまた、天然化合物および／または合成化合物の体系的なライブラリーを含む任意の利用可能な供給源から手に入れることができる。この実施形態における使用のための好ましいアッセイ成分は、転写コアクチベーター、本明細書中で同定されるＰＧＣ－１β、公知の結合パートナーおよび／または同じ基質ならびに試験化合物である。試験化合物は、任意の供給源から供給され得る。

【００６８】

ＰＧＣ－１βとその結合パートナーとの間の相互作用を干渉する化合物を同定するために使用されるアッセイシステムの基本原理は、２つの生成物が相互作用および結合することができるのに十分な条件および時間で、ＰＧＣ－１βおよびその結合パートナーを含有する反応混合物を調製し、このようにして複合体を形成する工程を含む。阻害活性について物質を試験するために、反応混合物は、試験化合物の存在下および非存在下で調製される。試験化合物は、まず反応混合物中に入れられ得るか、またはＰＧＣ－１βおよびその結合パートナーの添加の後に添加され得る。コントロール反応混合物は、試験化合物なしか、またはプラセボとともにインキュベートされる。次いでＰＧＣ－１βとその結合パートナーとの間の任意の複合体の形成が検出される。コントロール反応において複合体を形成するが、試験化合物を含有する反応混合物においてはこのような形成をほとんどしないかまたは全くしないということは、その化合物がＰＧＣ－１βとその結合パートナーとの相互作用を干渉することを示す。反対に、コントロール反応より化合物の存在下のほうがより多く複合体を形成するということは、その化合物は、ＰＧＣ－１βとその結合パートナーとの相互作用を促進し得ることを示す。

【００６９】

ＰＧＣ－１βとその結合パートナーとの相互作用を干渉する化合物についてのアッセイは、不均一または均一な形態に導かれ得る。不均一なアッセイは、固相にＰＧＣ－１βまたはその結合パートナーのいずれかを固定する工程および反応の最後に固相に固定された複合体を検出する工程を含む。均一なアッセイにおいて、反応全体が液相中で実施される。いずれかのアプローチにおいて、反応物の添加の順序は、試験される化合物についての様々な情報を得るために変更され得る。例えば、ＰＧＣ－１βとその結合パートナーとの相互作用を干渉する（例えば、競合によって）試験化合物は、試験物質の存在下で反応を実施することによって、すなわち、試験物質を反応混合物に、ＰＧＣ－１βおよび相互作用的な結合パートナーの添加前またはそれらと同時に添加することによって同定され得る。あるいは、予め形成された複合体を破壊する試験化合物（例えば、複合体から成分の１つを置換する、より高い結合定数を有する化合物）が、複合体が形成された後に試験化合物を反応混合物に添加することによって試験され得る。様々な形態が、簡潔に以下に記載される。

【００７０】

不均一なアッセイシステムにおいて、ＰＧＣ－１βまたはその結合パートナーのいずれかが、固体表面またはマトリックスに固定され、他の対応する固定されない構成成分が、直接的または間接的のいずれかで標識され得る。実際のところ、マイクロタイタープレートがこのアプローチに利用されることが多い。固定された種は、当業者に周知である、非共有結合性または共有結合性のいずれかの多くの方法によって固定化され得る。非共有結合性付着は、ＰＧＣ－１βまたはその結合パートナーの溶液で固体表面をコートして乾燥することによって簡単に達成され得ることが多い。あるいは、固定されるべきアッセイ構成成分に特異的な固定化された抗体が、この目的で使用され得る。このような表面は、多くの場合、予め調製されて、保存され得る。

【００７１】

関連実施形態において、アッセイ成分の１つまたは両方がマトリックスに固定されるのを可能にするドメインを添加する融合タンパク質が、提供され得る。例えば、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ／ＰＧＣ－１β融合タンパク質またはグルタチオン－Ｓ－ト

ランスフェラーゼ／結合パートナーは、グルタチオンセファロースビーズ（Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ^{TM}，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレートに吸着され得て、次いで試験化合物または試験化合物および吸着されていないＰＧＣ－１βまたはその結合パートナーのいずれかを混合し、そして混合物を、複合体形成（例えば、生理学的条件）を誘導する条件下でインキュベートする。インキュベーション後、ビーズまたはマイクロタイタープレートのウェルを任意の非結合アッセイ成分を除去するために洗浄し、例えば上記したように、直接的または間接的のいずれかで固定化された複合体を評価する。あるいは、複合体は、マトリックスから解離され得、そしてＰＧＣ－１β結合または活性のレベルを標準的な技術を使用して測定する。

【００７２】

マトリックスにタンパク質を固定化する他の技術はまた、本発明のスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。例えば、ＰＧＣ－１βまたはＰＧＣ－１β結合パートナーのいずれかが、ビオチンおよびストレプトアビジンの結合体化を利用して固定化され得る。ビオチン化されたＰＧＣ－１βタンパク質または標的分子は、当該分野で公知の技術（例えば、ビオチン化キット、Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ^{TM}，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）を使用してビオチン－ＮＨＳ（Ｎ－ヒドロキシ－スクシンイミド）から調製され得て、ストレプトアビジンコートされた９６ウェルプレート（Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ^{TM}）のウェル内に固定化され得る。特定の実施形態において、タンパク質を固定化した表面は、予め調製されて、保存され得る。

【００７３】

アッセイを実施するために、固定化されたアッセイ構成成分の対応するパートナーは、試験化合物と一緒にか、またはそれ無しにコートされた表面に曝露される。反応が完了した後、未反応のアッセイ成分が（例えば、洗浄することによって）除去され、そして形成された任意の複合体が固体表面に固定化されたまま残り得る。固体表面に固定された複合体の検出は、多くの方法において達成され得る。固定化されていない構成成分が予め標識されている場合、表面に固定化された標識の検出は、複合体が形成されたことを示す。固定化されていない構成成分が予め標識されていない場合、間接的な標識が、表面に固定された複合体を検出するために使用され得る；例えば、はじめに固定化されていない種に特異的な標識された抗体（同様に、例えば標識された抗Ｉｇ抗体で直接標識され得るか、または間接的に標識され得る抗体）を使用して。反応成分の添加の順序に依存して、複合体形成を調節（阻害または促進）するか、または予め形成された複合体を破壊する試験化合物が検出され得る。

【００７４】

本発明の別の実施形態において、均一なアッセイが使用され得る。これは、試験化合物の存在下または非存在下で液相において実施される、上述したものと類似した代表的な反応である。次いで形成された複合体は、未反応成分から分離されて、形成された複合体の量が測定される。不均一なアッセイシステムについて述べたように、液相への反応物の添加の順序によって、試験化合物が複合体形成を調節（阻害または促進）して、予め形成された複合体を破壊することについての情報を得ることができる。

【００７５】

このような均一なアッセイにおいて、反応産物は、多くの標準的な技術（分画遠心法、クロマトグラフィ、電気泳動および免疫沈降が挙げられるが、これらに限定されない）のいずれかによって未反応のアッセイ成分から分離され得る。分画遠心法において、分子の複合体は、様々な大きさおよび密度に基づく複合体の様々な沈降平衡に起因して、一連の遠心分離の工程を介して複合体化していない分子から分離され得る（例えば、Ｒｉｖａｓ，Ｇ．ａｎｄ Ｍｉｎｔｏｎ，Ａ．Ｐ．，Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｓｃｉ １９９３ Ａｕｇ；１８（８）：２８４－７を参照のこと）。標準的なクロマトグラフィの技術はまた、複合体化されていない分子から複合体化された分子を分離するために利用され得る。例えば、ゲル濾過クロマトグラフィは、大きさに基づいてそしてカラム形態での適切なゲル濾過樹脂の利用を通じて分子を分離する。例えば、相対的に大きな複合体は、

相対的に小さい複合体化されていない成分から分離され得る。同様に、複合体化されていない分子と比較されるとき、複合体の相対的に異なる電荷特性が、例えばイオン交換クロマトグラフィ樹脂の使用を介して、残存する個々の反応物から複合体を差次的に分離するために利用され得る。このような樹脂およびクロマトグラフィの技術は、当業者に周知である（例えば、Ｈｅｅｇａａｒｄ、１９９８、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｒｅｃｏｇｎｉｔ．１１：１４１－１４８；Ｈａｇｅ ａｎｄ Ｔｗｅｅｄ、１９９７、Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．Ｂ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｓｃｉ．Ａｐｐｌ．、６９９：４９９－５２５を参照のこと）。ゲル電気泳動はまた、複合体化された分子を結合していない種から分離するために使用され得る（例えば、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．）、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｊ．Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ．１９９９を参照のこと）。この技術において、タンパク質または核酸複合体は、例えば大きさまたは電荷に基づいて分離される。電気泳動のプロセスの間、結合の相互作用を維持するために、還元剤の非存在下では非変性ゲルが代表的には好ましいが、特定の相互作用物に対して適切な条件は、当業者に周知であり得る。免疫沈降は、溶液からタンパク質－タンパク質複合体を単離するために利用される別の通常の技術である（例えば、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．）、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｊ．Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ．１９９９を参照のこと）。この技術において、結合する分子の１つに特異的な抗体に結合するすべてのタンパク質は、遠心分離によって容易に回収され得るポリマービーズへ抗体を結合体化することによって溶液から沈降される。結合アッセイ成分は、（複合体中のタンパク質－タンパク質相互作用を妨害し得ない、当業者に周知の特異的なタンパク質分解現象または他の技術を介して）ビーズから放出され、第２免疫沈降工程が実施される。今回は、対応して異なる、相互作用するアッセイ構成成分に特異的な抗体を利用する。この様式において、形成された複合体だけが、ビーズに付着したままであるはずである。試験化合物の存在下および非存在下の両方において複合体形成の差異が比較され得て、それによって、ＰＧＣ－１βとその結合パートナーとの間の相互作用を調節する化合物の能力についての情報を提供する。

【００７６】

均一または不均一なアッセイシステムにおいてさらなるサンプルの操作なしにＰＧＣ－１βとその天然の結合パートナーおよび／または試験化合物との間の相互作用を直接検出する方法はまた、本発明の範囲内である。例えば、蛍光エネルギー移動の技術を利用することができる（例えば、Ｌａｋｏｗｉｃｚ ｅｔ ａｌ．、米国特許第５，６３１，１６９号；Ｓｔａｖｒｉａｎｏｐｏｕｌｏｓ ｅｔ ａｌ．、米国特許第４，８６８，１０３号を参照のこと）。一般に、この技術は、第１「ドナー」分子（例えば、ＰＧＣ－１βまたは試験化合物）にフルオロフォア標識を添加する工程を含み、その放射蛍光性エネルギーが第２「アクセプター」分子（例えば、ＰＧＣ－１βまたは試験化合物）に蛍光性標識によって吸着され得る。それは、同様に吸着されたエネルギーに起因して蛍光を発することができる。あるいは、「ドナー」タンパク質分子は、トリプトファン残基の天然の蛍光性エネルギーを単に利用し得る。様々な光の波長を発する標識が選択されるので、「アクセプター」分子標識は、「ドナー」の波長とは区別され得る。標識間のエネルギー移動の効率が、分子を分離する距離に関連するので、分子間の空間的関係が評価され得る。結合が分子間に生じる場合、アッセイ中の「アクセプター」分子標識の蛍光性の放出は、最大であるはずである。ＦＥＴ結合現象は、当該分野で周知の標準的な蛍光定量的な検出手段を介して（例えば、蛍光光度計を使用して）都合よく計測され得る。予め形成された複合体中の種の１つの関与を促進するか、または妨げる試験物質は、バックグラウンドに対するシグナル変動が生じ得る。このようにして、ＰＧＣ－１βとその結合パートナーとの間の相互作用を調節する試験物質は、制御されたアッセイにおいて同定され得る。

【００７７】

別の実施形態において、ＰＧＣ－１β発現の調節因子は、細胞を候補化合物と接触させて、ＰＧＣ－１βに対応する細胞内のｍＲＮＡまたはタンパク質の発現を測定する方法で

同定される。候補化合物の存在下でのｍＲＮＡまたはタンパク質の発現のレベルは、候補化合物の非存在下でのｍＲＮＡまたはタンパク質の発現のレベルと比較される。そして候補化合物は、この比較に基づいてＰＧＣ－１β発現の調節因子として同定され得る。例えば、ＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡまたはタンパク質の発現が、候補化合物の非存在下より存在下のほうが高い（実質的に有意に高い）とき、候補化合物は、ＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡまたはタンパク質発現の刺激物質として同定される。反対に、ＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡまたはタンパク質の発現が候補化合物の非存在下より存在下のほうが低い（実質的に有意に低い）とき、候補化合物は、ＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡまたはタンパク質発現の阻害剤として同定される。細胞におけるＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡまたはタンパク質発現のレベルは、本明細書中に記載される、ＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡまたはタンパク質を検出する方法によって測定され得る。

【００７８】

別の局面において、本発明は、本明細書中に記載される２以上のアッセイの組み合わせに関する。例えば、調節物質は、細胞に基づくアッセイまたは無細胞系アッセイを使用して同定され得て、そして本明細書中に記載されているか、または例えば、Ｓａｔｈａｓｉｖａｍ Ｋ ｅｔ ａｌ．Ｐｈｉｌｏｓ Ｔｒａｎｓ Ｒ Ｓｏｃ Ｌｏｎｄ Ｂ Ｂｉｏｌ Ｓｃｉ．１９９９ Ｊｕｎ ２９；３５４（１３８６）：９６３－９；Ｂａｔｅｓ ＧＰ，ｅｔ ａｌ．Ｈｕｍ Ｍｏｌ Ｇｅｎｅｔ．１９９７；６（１０）：１６３３－７；Ｓｈａｗ ＣＡ ｅｔ ａｌ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ Ｂｉｏｂｅｈａｖ Ｒｅｖ．２００３ Ｏｃｔ；２７（６）：４９３－５０５；Ｍｅｎａｌｌｅｄ ＬＢ Ｔｒｅｎｄｓ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｓｃｉ．２００２ Ｊａｎ；２３（ｌ）：３２－９；Ｌｅｇａｒｅ ＭＥ ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｅｔ Ｍｏｌ Ｒｅｓ．２００３ Ｓｅｐ ３０；２（３）：２８８－９４；Ｏｉｗａ Ｙ Ｊ Ｎｅｕｒｏｓｕｒｇ．２００３ Ｊａｎ；９８（ｌ）：１３６－４４；およびＢａｒｄ Ｆ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｍｅｄ．２０００ Ａｕｇ；６（８）：９１６－９（これらの内容は、本明細書中に参考として援用される）に記載されているように、物質がＰＧＣ－１βタンパク質の活性を調節する能力が、インビボにおいて（例えば、脂質関連疾患または障害についての動物モデルなどの動物において）確認され得る。

【００７９】

本発明はさらに、上記のスクリーニングアッセイによって同定される新規物質に関する。従って、適切な動物モデルにおいて本明細書中に記載されるように同定される物質をさらに使用することは、本発明の範囲内である。例えば、本明細書中に記載されるように同定される物質（例えば、低分子、アンチセンスＰＧＣ－１β核酸分子、ＰＧＣ－１β特異的抗体またはＰＧＣ－１β結合パートナー）は、このような物質を用いた処置の効能、毒性または副作用を測定するために動物モデルにおいて使用され得る。あるいは、本明細書中に記載されるように同定される物質は、このような物質の作用のメカニズムを決定するために動物モデルにおいて使用され得る。さらに、本発明は、本明細書中に記載されるような処置についての上記のスクリーニングアッセイによって同定される新規物質の使用に関する。

【００８０】

前述のアッセイシステムにおいて同定されるような化合物を含むが、これらに限定されない任意の化合物は、ＰＧＣ－１β核酸発現またはＰＧＣ－１βポリペプチド活性を調節する能力を備える、脂質関連疾患または障害を処置または予防することができる化合物について試験され得、それによって脂質関連疾患または障害を処置または予防することができる化合物を同定する。脂質関連疾患または障害を処置または予防するそのような能力を示す化合物の同定に対する細胞に基づくアッセイおよび動物モデルに基づくアッセイを本明細書中に記載した。

【００８１】

１つの局面において、本明細書中に記載されるような細胞に基づくシステムは、ＰＧＣ－１β核酸発現またはＰＧＣ－１βポリペプチド活性を調節するかまたは脂質関連疾患も

しくは障害を処置するように作用し得る化合物を同定するために使用され得る。例えば、このような細胞システムは、曝露される細胞において、疾患症状の緩和を誘発するのに十分な濃度および十分な時間で、ＰＧＣ－１βを調節するか、または脂質関連疾患もしくは障害を処置もしくは予防する能力を示すと推測される化合物に曝露され得る。曝露後、細胞を、１以上の疾患表現型（例えば、高トリグリセリド血症）が、例えば、より正常の表現型に似るかまたはより野生型の疾患表現型に似るように変化しているか否かを決定するために調べる。

【００８２】

さらに、本明細書中に記載されるシステムなどの動物に基づく疾患システムは、ＰＧＣ－１β核酸発現もしくはＰＧＣ－１βポリペプチド活性または脂質関連疾患もしくは障害を調節するように作用し得る化合物を同定するために使用され得る。このような動物モデルは、ＰＧＣ－１βを調節し、脂質関連疾患または障害（例えば、高トリグリセリド血症）を処置または予防するのに効果的であり得る薬物、医薬品、治療および介入の同定のために試験基質として使用され得る。

【００８３】

１つの実施形態において、脂質関連疾患または障害を処置または予防することができる化合物を、その化合物がＰＧＣ－１β核酸発現またはＰＧＣ－１βポリペプチド活性を調節する能力をアッセイすることによって同定する。ＰＧＣ－１β核酸発現またはＰＧＣ－１βポリペプチド活性を調節することができる化合物は、脂質生成遺伝子（例えば、ＦＡＳ、ＳＣＤ－１、ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼ、ＤＧＡＴまたはＧＰＡＴ）の発現または活性における調節を検出することによって同定され得る。

【００８４】

さらに別の実施形態において、脂質関連疾患または障害を処置または予防することができる化合物は、ＬＸＲα標的遺伝子（例えば、ＰＬＴＰ、ＡＢＣＡ１およびＡＢＣＧ１）の発現または活性を調節する化合物の能力をアッセイすることによって同定される。

【００８５】

なおも別の実施形態において、脂質関連疾患または障害を処置または予防することができる化合物は、ＳＲＥＢＰ転写因子（例えば、ＳＲＥＢＰ１ａ、ＳＲＥＢＰ１ｃおよびＳＲＥＢＰ２）の発現または活性を調節する化合物の能力をアッセイすることによって同定される。

【００８６】

さらに、遺伝子発現パターンは、（例えば、ＰＧＣ－１βの発現または活性を低下させることによって）ＰＧＣ－１βを調節する化合物の能力を評価するために利用され得る。従って、これらの化合物は、脂質関連疾患または障害を処置、予防または評価するのに有用であり得る。例えば、１以上の遺伝子の発現パターンは、このような評価において使用され得る「遺伝子発現プロファイル」または「転写プロファイル」の一部を形成し得る。本明細書中で使用されるとき、「遺伝子発現プロファイル」または「転写プロファイル」は、所与の条件セット下で所与の組織または細胞タイプについて得られるｍＲＮＡ発現のパターンを含む。遺伝子発現プロファイルは、例えば、ディファレンシャルディスプレイ法、ノーザン解析および／またはＲＴ－ＰＣＲを利用することによって生成され得る。１つの実施形態において、ＰＧＣ－１β遺伝子配列は、このような遺伝子発現プロファイルの生成および確証のためにプローブおよび／またはＰＣＲプライマーとして使用され得る。

【００８７】

遺伝子発現プロファイルは、細胞および／または動物に基づくモデルシステム内の公知の状態について特徴付けられる。続いて、これらの公知の遺伝子発現プロファイルは、試験化合物がこのような遺伝子発現プロファイルを改変して、より所望のプロファイルにより似たプロファイルにしなければならないという効果を確かめるために比較され得る。

【００８８】

（ＩＩ．処置の方法：）

本発明は、被験体（例えば、脂質関連疾患または障害の危険性がある（または感受性の高い）ヒト）において、前記被験体にＰＧＣ－１β調節因子を投与することによって脂質関連疾患または障害を処置または予防する、予防的な方法と治療的な方法との両方を提供し、脂質関連疾患または障害を処置または予防する。予防的方法と治療的方法との両方を含む好ましい実施形態において、ＰＧＣ－１β調節因子は、薬学的に許容可能な製剤形態で投与される。

【００８９】

処置の予防的方法と治療的方法との両方に関して、このような処置は、薬理ゲノミクスの分野から得られる知識に基づいて、特異的に目的に合わされ得るかまたは改変され得る。本明細書中で使用されるとき、「薬理ゲノミクス」とは、臨床開発および市場における薬物に対するゲノミクス技術（例えば、遺伝子配列決定、統計遺伝学および遺伝子発現解析）の適用のことをいう。より具体的には、この用語は、どのようにして患者の遺伝子が薬物に対する彼らの応答を決定するのか（例えば、患者の「薬物応答表現型」または「薬物応答遺伝子型」）についての研究のことをいう。

【００９０】

従って、本発明の別の局面は、その個体の薬物応答遺伝子型に従って、本発明のＰＧＣ－１β分子またはＰＧＣ－１β調節因子のいずれかを用いた被験体の予防的または治療的な処置を目的に合わせるための方法を提供する。薬理ゲノミクスにより、臨床医または医師が、その処置から最大の恩恵を受け得る患者に対する予防的または治療的処置を標的化することおよび有毒な薬物関連副作用を受け得る患者の処置を避けることが可能になる。

【００９１】

（Ａ．予防的方法）

１つの局面において、本発明は、被験体にＰＧＣ－１β発現またはＰＧＣ－１β活性を調節する物質を投与することによって脂質関連疾患または障害を処置または予防する方法を提供する。本発明はまた、被験体における、脂質輸送、脂質生合成、血漿トリグリセリドレベルおよび血漿コレステロールレベルを調節する方法を提供する。脂質関連疾患または障害の危険性のある被験体は、例えば、本明細書中に記載される診断アッセイまたは予後アッセイのいずれかまたはそれらの組み合わせによって同定され得る。予防的物質は、脂質関連疾患または障害の特徴である症状の徴候の前に投与することができ、それらの脂質関連疾患または障害または症状は、予防されるか、または進行を遅延させる。ＰＧＣ－１βの異常型に応じて、例えば、ＰＧＣ－１βアゴニストまたはＰＧＣ－１βアンタゴニスト物質が、被験体を処置するために使用され得る。適切な物質は、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイに基づいて決定され得る。

【００９２】

（Ｂ．治療的方法）

本発明は、ＰＧＣ－１βの発現または活性を誘導するかまたは阻害するＰＧＣ－１β調節因子を投与することによって、被験体においてＰＧＣ－１βを調節する方法を提供する。１つの実施形態において、ＰＧＣ－１βの発現または活性は、ＰＧＣ－１βの発現または活性の阻害剤またはアンタゴニストを投与することによって低下する。これによって、被験体における脂質輸送、脂質生合成、血漿トリグリセリドレベルおよび血漿コレステロールレベルを調節し、脂質関連疾患または障害を処置または予防する。

【００９３】

従って、本発明の別の局面は、治療的な目的および脂質関連疾患または障害の処置における使用のためのＰＧＣ－１βの発現または活性を調節する方法に関する。１つの実施形態において、本発明の調節的な方法は、細胞をＰＧＣ－１βまたは脂質関連疾患もしくは障害に関与するＰＧＣ－１βタンパク質活性の１以上の活性（例えば、脂質生合成、脂質輸送、血漿トリグリセリドレベル、血漿コレステロールレベルの調節）を調節する物質と接触させる工程を含む。ＰＧＣ－１βタンパク質活性を調節する物質は、本明細書中に記載されるような物質（例えば、核酸またはタンパク質、ＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡを標的化するｓｉＲＮＡ、ＰＧＣ－１βタンパク質の天然に存在する標的分子（例えば、ＰＧＣ－

１βリガンドまたは基質）、ＰＧＣ－１β抗体、ＰＧＣ－１βアゴニストもしくはアンタゴニスト、ＰＧＣ－１βアゴニストもしくはアンタゴニストのペプチド模倣物または他の低分子）であり得る。１つの実施形態において、その物質は、１以上のＰＧＣ－１β活性を刺激する。このような刺激性物質の例としては、活性なＰＧＣ－１βタンパク質、ＰＧＣ－１βをコードする核酸分子または低分子アゴニストまたは模倣物（例えば、ペプチド模倣物）が挙げられる。別の実施形態において、その物質は、１以上のＰＧＣ－１β活性を阻害する。そのような阻害性物質の例としては、アンチセンスＰＧＣ－１β核酸分子、ｓｉＲＮＡ分子、抗ＰＧＣ－１β抗体、低分子およびＰＧＣ－１β阻害剤が挙げられる。これらの調節性の方法は、インビトロ（例えば、その物質とともに細胞を培養することによって）またはインビボ（例えば、その物質を被験体に投与することによって）において実施され得る。１つの実施形態において、本方法は、物質（例えば、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定される物質）またはＰＧＣ－１βの発現または活性を調節（例えば、アップレギュレートまたはダウンレギュレート）する物質の組み合わせを投与する工程を含む。別の実施形態において、本方法は、低いか、異常かまたは望ましくないＰＧＣ－１βの発現または活性を代償するための治療としてＰＧＣ－１βタンパク質または核酸分子を投与する工程を含む。

【００９４】

ＰＧＣ－１β活性の低下は、ＰＧＣ－１β活性の減少が、（例えば、脂質関連疾患または障害処置または予防に対して）有益な効果を有する可能性がある状況において望ましい。同様に、ＰＧＣ－１β活性の刺激は、ＰＧＣ－１β活性の増加が、（例えば、肥満症関連疾患または障害（例えば、悪液質、るいそう、食欲不振または過食症）の処置または予防に対して）有益な効果を有する可能性がある状況において望ましい。

【００９５】

（（ｉ）ＰＧＣ－１βの発現または活性を低下させる方法）

ＰＧＣ－１βの発現または活性を低下させると、脂質関連疾患または障害の処置または予防がもたらされる。従って、脂質関連疾患または障害（例えば、高脂血症、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、心臓血管疾患、肥満症およびＩＩ型糖尿病）を処置および／または予防する方法を提供する。種々の技術は、ＰＧＣ－１βの発現、合成または活性を低下させるために使用され得る。

【００９６】

例えば、阻害性の活性を示す、本明細書中に記載されるアッセイを介して同定される化合物などは、本発明に従って使用され得る。このような分子としては、有機低分子、ｓｉＲＮＡ分子、ペプチド、抗体などが挙げられ得るが、これらに限定されない。

【００９７】

例えば、ＰＧＣ－１βタンパク質に対して内在性リガンドと競合する化合物が、投与され得る。その結果生じた、リガンドに結合したＰＧＣ－１βタンパク質の量の減少は、内皮細胞の生理機能を調節し得る。この目的に特に有用であり得る化合物は、例えば、可溶性タンパク質またはペプチド（例えば、ＰＧＣ－１βタンパク質の１以上の細胞外ドメインもしくは部分および／またはそれらのアナログを含むペプチド）を含み、それらは、例えば、Ｉｇ末端の融合タンパク質などの可溶性融合タンパク質を含む。（Ｉｇ末端の融合タンパク質の生成の議論については、例えば、米国特許第５，１１６，９６４号を参照のこと。）あるいは、リガンドアナログまたは抗体などの、ＰＧＣ－１βレセプター部位に結合するが、そのタンパク質を活性化しない化合物（例えば、レセプターリガンドアンタゴニスト）は、ＰＧＣ－１βタンパク質活性を阻害するのに効果的であり得る。

【００９８】

さらに、ＰＧＣ－１β遺伝子の発現を阻害する、アンチセンスおよびリボザイム分子ならびにｓｉＲＮＡ分子はまた、本発明に従って、異常なＰＧＣ－１β遺伝子活性を阻害するために使用され得る。なおもさらに、三重らせん分子は、異常なＰＧＣ－１β遺伝子活性を阻害するときに利用され得る。

【００９９】

本発明の方法において使用されるアンチセンス核酸分子は、代表的には被験体に投与されるか、またはインサイチュで生成され、それらは、ＰＧＣ－１βタンパク質をコードする、細胞のｍＲＮＡおよび／またはゲノムＤＮＡとハイブリダイズするか、または結合し、それによってタンパク質の発現を阻害する（例えば、転写および／または翻訳を阻害することによって）。ハイブリダイゼーションは、安定な二重鎖を形成する通常のヌクレオチド相補性によってか、または、例えばＤＮＡ二重鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合、二重らせんの主溝における特異的な相互作用を介して起こり得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与の経路の例として、組織部位における直接注入が挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸分子は、選択された細胞を標的化するように改変されて、全身投与され得る。例えば、全身投与に向けて、アンチセンス分子は、選択された細胞表面上に発現するレセプターまたは抗原に特異的に結合するように（例えば、アンチセンス核酸分子を、細胞表面のレセプターまたは抗原に結合するペプチドまたは抗体に結合することによって）改変され得る。アンチセンス核酸分子はまた、本明細書中に記載されるベクターを使用して細胞に送達され得る。アンチセンス分子の十分な細胞内の濃度を達成するために、アンチセンス核酸分子が強力なｐｏｌ　ＩＩまたはｐｏｌ　ＩＩＩプロモーターの制御下に置かれているベクター構築物が好ましい。

【０１００】

なおも別の実施形態において、本発明の方法において使用されるアンチセンス核酸分子は、α－アノマー核酸分子である。α－アノマー核酸分子は、通常のβ－ユニットに反して、その鎖は互いに並行する相補ＲＮＡと特異的な二本鎖ハイブリッドを形成する（Ｇａｕｌｔｉｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１５：６６２５－６６４１）。アンチセンス核酸分子はまた、２’－ｏ－メチルリボヌクレオチド（Ｉｎｏｕｅ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．１５：６１３１－６１４８）またはキメラＲＮＡ－ＤＮＡアナログ（Ｉｎｏｕｅ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．２１５：３２７－３３０）を含み得る。

【０１０１】

さらに別の実施形態において、本発明の方法において使用されるアンチセンス核酸は、リボザイムである。リボザイムは、相補的な領域を有するｍＲＮＡなどの一本鎖の核酸を切断することができるリボヌクレアーゼ活性を有する触媒的ＲＮＡ分子である。従って、リボザイム（例えば、ハンマーヘッド型リボザイム（Ｈａｓｅｌｈｏｆｆ　ａｎｄ　Ｇｅｒｌａｃｈ（１９８８）Ｎａｔｕｒｅ　３３４：５８５－５９１に記載されている））が、ＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡ転写物を触媒的に切断するのに使用され得る。これによってＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡの翻訳を阻害する。ＰＧＣ－１βをコードする核酸に対して特異性を有するリボザイムは、本明細書中で開示されるＰＧＣ－１β　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（すなわち、配列番号１）に基づいて設計され得る。例えば、活性な部位のヌクレオチド配列が、ＰＧＣ－１βをコードするｍＲＮＡにおいて切断されるヌクレオチド配列に相補的であるＴｅｔｒａｈｙｍｅｎａ　Ｌ－１９　ＩＶＳ　ＲＮＡの誘導体が構築され得る（例えば、Ｃｅｃｈ　ｅｔ　ａｌ．米国特許第４，９８７，０７１号；およびＣｅｃｈ　ｅｔ　ａｌ．米国特許第５，１１６，７４２号を参照のこと）。あるいは、ＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡは、特異的なリボヌクレアーゼ活性を有する触媒的ＲＮＡをＲＮＡ分子のプールから選択するために使用され得る（例えば、Ｂａｒｔｅｌ，Ｄ．　ａｎｄ　Ｓｚｏｓｔａｋ，Ｊ．Ｗ．（１９９３）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２６１：１４１１－１４１８を参照のこと）。

【０１０２】

ＰＧＣ－１β遺伝子発現はまた、標的細胞においてＰＧＣ－１β遺伝子の転写を予防する三重らせん構造を形成するＰＧＣ－１βの制御領域（例えば、ＰＧＣ－１βプロモーターおよび／またはエンハンサー）に相補的なヌクレオチド配列を標的化することによって阻害され得る（例えば、Ｈｅｌｅｎｅ，Ｃ．（１９９１）Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｓ．６（６）：５６９－８４；Ｈｅｌｅｎｅ，Ｃ．ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ａｎｎ．ＮＹ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．６６０：２７－３６；およびＭａｈｅｒ，Ｌ．Ｊ．（１

９９２）Ｂｉｏａｓｓａｙｓ １４（１２）：８０７－１５を参照のこと）。
【０１０３】
ＰＧＣ－１βを標的化するＲＮＡ干渉物質（例えば、ｓｉＲＮＡ分子）はまた、ＰＧＣ－１βの発現を阻害する（例えば、ＰＧＣ－１βのメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の分解または特異的な転写後遺伝子サイレンシング（ＰＴＧＳ）を介して）ために使用され得る。
【０１０４】
ＰＧＣ－１βタンパク質に特異的であり、かつその活性を干渉する抗体はまた、ＰＧＣ－１βタンパク質の機能を調節または阻害するために使用され得る。このような抗体は、本明細書中に記載される標準的な技術を使用して生成され得て、これらの抗体は、ＰＧＣ－１βタンパク質自体に対するかまたはこのタンパク質の部分に対応するペプチドに対するものである。このような抗体としては、ポリクローナル、モノクローナル、Ｆａｂフラグメント、一本鎖抗体またはキメラ抗体が挙げられるがこれらに限定されない。
【０１０５】
標的遺伝子タンパク質が細胞内にあり、抗体全体が使用される場合、抗体を内部移行することは、好ましいであろう。リポフェクチンリポソームは、抗体または標的エピトープに結合するＦａｂ領域のフラグメントを細胞に送達するために使用され得る。抗体のフラグメントが使用されるとき、標的タンパク質の結合ドメインに結合する最小の阻害性フラグメントが好ましい。例えば、標的遺伝子タンパク質に結合する抗体の可変領域のドメインに対応するアミノ酸配列を有するペプチドが使用され得る。このようなペプチドは、化学的に合成され得るか、または当該分野で周知の方法を使用した組換えＤＮＡ技術を介して生成され得る（例えば、Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ（１９８３）、前出；およびＳａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．（１９８９）前出に記載されている）。細胞内の標的遺伝子エピトープに結合する一本鎖中和抗体がまた、投与され得る。このような一本鎖抗体は、例えば、Ｍａｒａｓｃｏ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：７８８９－７８９３に記載されているような技術を利用することによって、例えば、標的細胞集団内で一本鎖抗体をコードするヌクレオチド配列を発現することによって投与され得る。
【０１０６】
（（ｉｉ）ＰＧＣ－１βの発現、合成または活性を増加させる方法）
上で議論したように、ＰＧＣ－１βの発現または活性を増加させることは、特定の状態（例えば、肥満症関連疾患または障害（例えば、悪液質、るいそう、ＡＨＳ関連体重減少、食欲不振および過食症）の処置または予防）において望ましいであろう。種々の技術が、ＰＧＣ－１β遺伝子および／またはタンパク質の発現、合成または活性を増加させるために使用され得る。例えば、ＰＧＣ－１βタンパク質は、被験体に投与され得る。以下で議論される任意の技術は、このような投与に使用され得る。当業者は、以下に記載する技術などを利用して、ＰＧＣ－１βタンパク質の有効で、毒性のない用量の濃度を決定する方法を容易に知り得る。
【０１０７】
さらに、ＰＧＣ－１βタンパク質をコードするＲＮＡ配列は、ＰＧＣ－１βを調節するためのＰＧＣ－１βタンパク質のレベルを生成するのに十分な濃度で被験体に直接投与され得る。化合物の細胞内投与（例えばリポソーム投与など）を達成する、以下で議論する任意の技術は、このようなＲＮＡ分子の投与に使用され得る。ＲＮＡ分子は、例えば、本明細書中に記載されるような組換え技術によって生成され得る。他の薬学的組成物、薬剤または治療薬は、本明細書中に記載されるＰＧＣ－１βアゴニストと組み合わせて使用され得る。さらに、被験体は、遺伝子置換治療によって処置され得、その結果、ＰＧＣ－１βを永久的に調節する。ＰＧＣ－１βの機能を有する正常なＰＧＣ－１βタンパク質の生成を指示するＰＧＣ－１β遺伝子またはそれらの部分の１以上のコピーは、リポソームなどの細胞にＤＮＡを導入する他の粒子に加えてベクター（アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターおよびレトロウイルスベクターが挙げられるがこれらに限定され

ない）を使用して細胞に挿入され得る。さらに、上記したような技術は、ヒト細胞へのＰＧＣ－１β遺伝子配列の導入のために使用され得る。さらに、ＰＧＣ－１βに対して作用する転写アクチベーターの発現または活性は、ＰＧＣ－１βの発現および活性を増加させることによって増加され得る。直接的または間接的のいずれかでＰＧＣ－１βの発現または活性を誘導する低分子がまた、使用され得る。１つの実施形態において、低分子は、ＰＧＣ－１βと標的分子またはリガンドとの間のタンパク質－タンパク質相互作用を妨害するように機能し、これによってＰＧＣ－１βの活性を調節（例えば、増加または減少）する。

【０１０８】

次いでＰＧＣ－１βを発現する遺伝子配列を有する細胞、好ましくは自家細胞が、被験体に導入または再導入され得る。このような細胞置換技術は、例えば、遺伝子産物が分泌される細胞外遺伝子産物であるとき、好ましい可能性がある。

【０１０９】

（Ｃ．薬学的組成物）

本発明の方法は、被験体にＰＧＣ－１βの発現または活性を調節する物質（例えば、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定される物質）またはそのような物質の組み合わせを投与する工程を含む。ＰＧＣ－１β活性を調節する物質は、そのような投与に適した薬学的組成物を使用して被験体に投与され得る。そのような組成物は、代表的には物質（例えば、低分子、核酸分子、タンパク質、ｓｉＲＮＡまたは抗体）および薬学的に許容可能な担体を含む。本明細書中で使用されるとき、専門語「薬学的に許容可能な担体」は、医薬品の投与に適合する、任意およびすべての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌性物質および抗真菌性物質、等張性物質および吸収遅延物質などを含むと意図される。薬剤的に活性な物質に対するそのような媒質および物質の使用は、当該分野で周知である。通常の任意の媒質または物質が、活性な化合物と不適合である範囲以外の、組成物におけるそれらの使用が企図される。補充性の活性な化合物がまた、組成物に組み込まれ得る。

【０１１０】

本発明の治療的方法において使用される薬学的組成物は、意図される投与の経路に適合するように処方される。投与の経路の例としては、非経口（例えば、静脈内、皮内、皮下）、経口（例えば、吸入）、経皮的（局所的）、経粘膜的および直腸投与が挙げられる。非経口、皮内または皮下適用に使用される溶液または懸濁液としては、以下の成分：滅菌希釈剤（例えば、注射用蒸留水、食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒）；抗菌物質（例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン）；酸化防止剤（例えば、アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウム；キレート剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸）；緩衝液（例えば、アセテート、シトレートまたはホスフェートおよび張度の調節のための物質（例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロース）が挙げられ得る。ｐＨは、酸または塩基（例えば、塩酸または水酸化ナトリウム）を用いて調節され得る。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチック製の、アンプル、使い捨て注射器または反復投与バイアルに封入され得る。

【０１１１】

注射可能な使用に適した薬学的組成物としては、滅菌の注射可能な溶液または分散液の即席調製物用の滅菌水溶液（水溶性である）または分散液および滅菌粉末が挙げられる。静脈内投与について、適切な担体としては、生理食塩水、静菌水、Ｃｒｅｍｏｐｈｏｒ ＥＬ™（ＢＡＳＦ，Ｐａｒｓｉｐｐａｎｙ，ＮＪ）またはリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）が挙げられる。すべての場合において、組成物は、滅菌でなければならず、かつ容易に注射できる程度の流動性であるべきである。製造および貯蔵の条件下で安定でなければならず、かつ微生物（例えば、細菌および菌類）の汚染作用に対して保存されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど）およびそれらに適した混合物を含有する溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティン

グの使用、分散液の場合は求められる粒径の維持および界面活性剤の使用によって維持され得る。微生物の作用の予防は、様々な抗菌性物質および抗真菌性物質、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサールなどによって達成され得る。多くの場合、組成物中に等張性物質、例えば、糖、多価アルコール（例えば、マンニトール（ｍａｎｉｔｏｌ）、ソルビトール）および塩化ナトリウムを含むのが好ましいであろう。組成物中に吸収を遅延させる物質、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含むことによって注射可能な組成物の長期の吸収がもたらされ得る。

【０１１２】

注射可能な滅菌溶液は、上で列挙された成分の１つまたは組み合わせで、適切な溶媒中に必要量でＰＧＣ－１β活性を調節する物質（例えば、ＰＧＣ－１βタンパク質または抗ＰＧＣ－１β抗体のフラグメント）を組み込むことによって調製され得て、必要に応じて、濾過滅菌される。一般に、分散液は、活性化合物を基本的な分散媒および上で列挙されたものから必要とされる他の成分を含有する滅菌ビヒクルに組み込むことによって調製され得る。滅菌注射可能な溶液の調製のための滅菌粉末の場合、調製の好ましい方法は、それらの予めフィルター滅菌された溶液から任意の追加の所望成分に加えて活性な成分の粉末を得る真空乾燥および凍結乾燥である。

【０１１３】

経口組成物は、一般に不活性な希釈剤または可食の担体を含む。それらは、ゼラチンカプセルに封入され得るか、または錠剤に圧縮され得る。経口の治療的投与の目的で、活性化合物は、賦形剤とともに組み込まれ得て、錠剤、トローチ剤またはカプセルの形態で使用され得る。経口組成物はまた、うがい薬としての使用にむけて流体の担体を使用して調製され得る。ここで、流体の担体中の化合物は、経口的に投与され、くちゅくちゅされ、吐き出されるかまたは嚥下される。薬剤的に適合する結合物質および／または補助剤は、組成物の一部として含まれ得る。錠剤、丸剤、カプセル、トローチ剤などは、任意の類似の性質の以下の成分または化合物：結合剤（例えば、微結晶性セルロース、トラガカントゴムもしくはゼラチン）；賦形剤（例えば、デンプンもしくはラクトース、崩壊剤（例えば、アルギン酸、Ｐｒｉｍｏｇｅｌもしくはトウモロコシデンプン）；潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウムもしくはＳｔｅｒｏｔｅｓ）；滑剤（ｇｌｉｄａｎｔ）（例えば、コロイド状二酸化ケイ素；甘味剤（例えば、スクロースもしくはサッカリン）；または着香料（例えば、ペパーミント、サリチル酸メチルもしくはオレンジ香味料）を含有し得る。

【０１１４】

吸入による投与にむけて、化合物は、適切な噴霧剤（例えば、二酸化炭素などのガス）を含有する圧縮された容器もしくはディスペンサーまたは噴霧器からのエアロゾル噴霧の形態で送達される。

【０１１５】

全身性投与もまた、経粘膜的または経皮的な手段によって実施され得る。経粘膜的または経皮的投与のために、透過される障壁に適切な浸透剤が、製剤形態で使用される。このような浸透剤は、一般に当該分野で公知であり、例えば、経粘膜的投与のために、界面活性剤、胆汁酸塩およびフシジン酸誘導体を含む。経粘膜的投与は、点鼻薬または坐剤の使用を通じて達成され得る。経皮的投与のために、活性化合物は、一般に当該分野で公知なように軟膏剤（ｏｉｎｔｍｅｎｔ）、軟膏剤（ｓａｌｖｅ）、ゲルまたはクリームに処方される。

【０１１６】

ＰＧＣ－１β活性を調節する物質はまた、坐剤（例えば、通常の坐剤基剤（例えば、ココアバターおよび他のグリセリド）とともに）または直腸送達のための保持浣腸の形態で調製され得る。

【０１１７】

１つの実施形態において、ＰＧＣ－１β活性を調節する物質は、移植片およびマイクロカプセル化した送達システムを含む制御された放出製剤形態で、身体からの迅速な排出に

対して化合物を保護し得る担体とともに調製される。生分解性で生体適合性のポリマーとしては、例えば、エチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸が使用され得る。このような製剤形態の調製のための方法は、当業者に明らかであろう。材料はまた、Ａｌｚａ　ＣｏｒｐｏｒａｔｉｏｎおよびＮｏｖａ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ．から商業的に入手することができる。リポソームの懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を有する感染細胞に標的化されたリポソームを含む）はまた、薬学的に許容可能な担体として使用され得る。これらは、例えば、米国特許第４，５２２，８１１号に記載されているような当業者に公知の方法に従って調製され得る。

【０１１８】

経口または非経口の組成物を処方することは、投与しやすい剤形単位および均一な投与量という点で特に有利である。本明細書中で使用されるとき、剤形単位とは、処置される被験体に対する単一の投与量として適した物理的に分離した単位のことをいい；各単位は、必要な薬学的担体に関連して所望の治療的効果を発揮するように計算された所定の量の活性化合物を含有する。本発明の剤形単位に対する規格は、ＰＧＣ－１β活性および達成されるべき特定の治療的効果を調節する物質の特有の特徴および被験体の処置に向けてこのような物質を配合する当該分野に固有の制限によって規定され、これらに直接依存する。

【０１１９】

このような物質の毒性および治療的効能は、例えば、ＬＤ５０（集団の５０％に対する致死量）およびＥＤ５０（集団の５０％における治療有効量）を測定するために細胞培養物または実験動物において標準的な薬学的手順によって測定され得る。毒性と治療的効果との間の用量比は、治療的指標であり、ＬＤ５０／ＥＤ５０比として表され得る。大きい治療的指標を示す物質が好ましい。有毒な副作用を示す物質が使用され得るが、感染していない細胞に対する損傷の可能性を最小にするために、患部組織の部位にこのような物質を標的化する送達システムを設計するように注意が払われるべきであり、それによって副作用が減少する。

【０１２０】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得られるデータは、ヒトにおける使用についての投与量の範囲を計画する際に使用され得る。このようなＰＧＣ－１β調節物質の投与量は、好ましくは毒性がほとんどないか、または全くないＥＤ５０を含む循環濃度の範囲内にある。投与量は、使用される投与形態および利用される投与の経路に依存してこの範囲内で変動し得る。本発明の治療的方法において使用される任意の物質について、治療に有効な用量は、初めに細胞培養アッセイから評価され得る。細胞培養において決定されるように、用量は、ＩＣ５０（すなわち、症状の最大半量の阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するように動物モデルにおいて計画され得る。このような情報は、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定するために使用され得る。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィによって計測され得る。

【０１２１】

本明細書中で定義されるとき、治療有効量のタンパク質またはポリペプチド（すなわち、有効量）は、約０．００１～３０ｍｇ／ｋｇ体重、好ましくは約０．０１～２５ｍｇ／ｋｇ体重、より好ましくは約０．１～２０ｍｇ／ｋｇ体重およびなおもより好ましくは約１～１０ｍｇ／ｋｇ、２～９ｍｇ／ｋｇ、３～８ｍｇ／ｋｇ、４～７ｍｇ／ｋｇまたは５～６ｍｇ／ｋｇ体重にわたる。当業者は、特定の要因が被験体を効果的に処置するのに必要な投与量に影響を及ぼし得ることを認識し得る。その要因としては、疾患または障害の重症度、事前の処置、被験体の身体全体の健康および／または年齢ならびに他の疾患の存在が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、治療有効量の低分子、核酸分子、タンパク質、ｓｉＲＮＡまたは抗体による被験体の処置は、単一の処置を含み得るか、または好ましくは、一連の処置を含み得る。

【０１２２】

好ましい実施例において、被験体は、約１～１０週間、好ましくは２～８週間、より好ましくは約３～７週間およびなおもより好ましくは約４、５または６週間の１週間あたり１回、約０．１～２０ｍｇ／ｋｇ体重の範囲の抗体、タンパク質またはポリペプチドで処置される。処置に使用される抗体、タンパク質またはポリペプチドの有効量が、特定の処置にわたって増加または減少し得ることも認識され得る。投与量の変更は、本明細書中に記載される診断アッセイの結果に起因し得て、そして明らかになり得る。

【０１２３】

本発明は、発現または活性を調節する物質を包含する。物質は、例えば、低分子であり得る。例えば、このような低分子としては、ペプチド、ペプチド模倣物、アミノ酸、アミノ酸アナログ、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドアナログ、ヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、約１０，０００グラム／モル未満の分子量を有する有機化合物または無機化合物（すなわち、ヘテロ有機化合物および有機金属化合物を含む）、約５，０００グラム／モル未満の分子量を有する有機化合物または無機化合物、約１，０００グラム／モル未満の分子量を有する有機化合物または無機化合物、約５００グラム／モル未満の分子量を有する有機化合物または無機化合物ならびにこのような化合物の塩、エステルおよび他の薬学的に許容可能な形態が挙げられるが、これらに限定されない。低分子物質の適切な用量は、通常熟練した医師、獣医師または研究者の知識の範囲内の多くの因子に依存することが理解される。低分子の用量は、例えば、処置される被験体またはサンプルの個性、大きさおよび条件に依存し、さらに組成物が適用可能である場合、投与される経路；ならびに当業者が本発明の核酸またはポリペプチドに対して有する低分子に望む効果に依存して変動し得る。

【０１２４】

例示的な用量としては、被験体またはサンプルの重量の１キログラムあたりの低分子の量のミリグラムまたはマイクログラム（例えば、約１マイクログラム／キログラム～約５００ミリグラム／キログラム、約１００マイクログラム／キログラム～約５ミリグラム／キログラムまたは約１マイクログラム／キログラム～約５０マイクログラム／キログラム）を含む。低分子の適切な用量は、調節される発現または活性に関する低分子の効力に依存することがさらに理解される。このような適切な用量は、本明細書中に記載されるアッセイを使用して決定され得る。ＰＧＣ－１β分子の発現または活性を調節するために、１以上のこれらの低分子が、動物（例えば、ヒト）に投与されるとき、医師、獣医師または研究者は、適切な応答が得られるまで、例えば、最初は比較的低用量で、その後用量を増加して処方し得る。さらに、任意の特定の動物被験体に対する特異的な用量レベルが、使用される特異的な化合物の活性、年齢、体重、身体全体の健康、性別および被験体の食餌、投与回数、投与経路、排出速度、任意の薬物併用および調節される発現または活性の程度（例えば、アゴニストまたはアンタゴニストの意図された使用）を含む種々の因子に依存し得ることが理解される。

【０１２５】

本発明はまた、ＲＮＡ干渉物質（例えば、ＰＧＣ－１βを標的化するｓｉＲＮＡ分子）を包含する。本明細書中で定義されるとき、ＲＮＡ干渉物質（例えば、ｓｉＲＮＡ）の治療有効量（すなわち、有効量）は、約０．００１～３，０００ｍｇ／ｋｇ体重、好ましくは約０．０１～２５００ｍｇ／ｋｇ体重、より好ましくは約０．１～２０００、約０．１～１０００ｍｇ／ｋｇ体重、０．１～５００ｍｇ／ｋｇ体重、０．１～１００ｍｇ／ｋｇ体重、０．１～５０ｍｇ／ｋｇ体重、０．１～２５ｍｇ／ｋｇ体重およびなおもより好ましくは約１～１０ｍｇ／ｋｇ、２～９ｍｇ／ｋｇ、３～８ｍｇ／ｋｇ、４～７ｍｇ／ｋｇまたは５～６ｍｇ／ｋｇ体重にわたる。治療有効量のＲＮＡ干渉物質での被験体の処置は、単回処置を含み得るか、または好ましくは、一連の処置を含み得る。好ましい実施例において、被験体は、約１～１０週間、好ましくは２～８週間、より好ましくは約３～７週間およびなおもより好ましくは約４、５または６週間、１週間に１回、約０．１～２０ｍｇ／ｋｇ体重の範囲のＲＮＡ干渉物質で処置される。

【０１２６】

さらに、抗体（またはそのフラグメント）は、治療的部分、例えば、細胞毒、治療薬または放射性金属イオンに結合体化され得る。細胞毒または細胞傷害性物質は、細胞に有害な任意の物質を含む。例としては、タキソール、サイトカラシンＢ、グラミシジンＤ、エチジウムブロミド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド（ｔｅｎｏｐｏｓｉｄｅ）、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンＤ、１－デヒドロテストステロン、糖質コルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびピューロマイシンならびにこれらのアナログまたはホモログが挙げられる。治療薬としては、代謝拮抗物質（例えば、メトトレキサート、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、シタラビン、５－フルオロウラシルダカルバジン（ｄｅｃａｒｂａｚｉｎｅ））、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオテパ（ｔｈｉｏｅｐａ）クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（ＢＳＮＵ）およびロムスチン（ＣＣＮＵ）、シクロホスファミド（ｃｙｃｌｏｔｈｏｓｐｈａｍｉｄｅ）、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンＣおよびシス－ジクロロジアミン白金（ＩＩ）（ＤＤＰ）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（以前のダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前のアクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン（ＡＭＣ））ならびに抗有糸分裂物質（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１２７】

本発明の結合体は、所与の生物学的応答を改変するために使用され得、その薬物部分は、伝統的な化学治療薬に限定されるように解釈されない。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであり得る。このようなタンパク質としては、例えば、トキシン（例えば、アブリン、リシンＡ、シュードモナス外毒素もしくはジフテリアトキシン）；タンパク質（例えば、腫瘍壊死因子、α－インターフェロン、β－インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノゲンアクチベーター；または生物学的応答修飾因子（ｍｏｄｉｆｉｅｒ）（例えば、リンフォカイン、インターロイキン－１（「ＩＬ－１」）、インターロイキン－２（「ＩＬ－２」）、インターロイキン－６（「ＩＬ－６」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「ＧＭ－ＣＳＦ」）、顆粒球コロニー刺激因子（「Ｇ－ＣＳＦ」）もしくは他の成長因子など）が挙げられ得る。

【０１２８】

このような治療的部分を抗体へ結合体化するための技術は、周知であり、例えば、Ａｒｎｏｎ ｅｔ ａｌ．，“Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｏｒ Ｉｍｍｕｎｏｔａｒｇｅｔｉｎｇ Ｏｆ Ｄｒｕｇｓ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，”ｉｎ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ｒｅｉｓｆｅｌｄ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．），ｐｐ．２４３－５６（Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．１９８５）；Ｈｅｌｌｓｔｒｏｍ ｅｔ ａｌ．，“Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｏｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，”ｉｎ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ（２ｎｄ Ｅｄ．），Ｒｏｂｉｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．），ｐｐ．６２３－５３（Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．１９８７）；Ｔｈｏｒｐｅ，“Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｃａｒｒｉｅｒｓ Ｏｆ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ Ａｇｅｎｔｓ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ：Ａ Ｒｅｖｉｅｗ，”ｉｎ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ’８４：Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｐｉｎｃｈｅｒａ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．），ｐｐ．４７５－５０６（１９８５）；“Ａｎａｌｙｓｉｓ，Ｒｅｓｕｌｔｓ，Ａｎｄ Ｆｕｔｕｒｅ Ｐｒｏｓｐｅｃｔｉｖｅ Ｏｆ Ｔｈｅ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｕｓｅ Ｏｆ Ｒａｄｉｏｌａｂｅｌｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，”ｉｎ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ｂａｌｄｗｉｎ ｅｔ ａｌ．

（ｅｄｓ．），ｐｐ．３０３－１６（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ １９８５）、およびＴｈｏｒｐｅ ｅｔ ａｌ．，“Ｔｈｅ Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ Ａｎｄ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ Ｏｆ Ａｎｔｉｂｏｄｙ－Ｔｏｘｉｎ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ，”Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖ．，６２：１１９－５８（１９８２）を参照のこと。あるいは、抗体は、Ｓｅｇａｌによる米国特許第４，６７６，９８０号に記載されているような抗体ヘテロ結合体（ｈｅｔｅｒｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ）を形成する二次抗体に結合体化され得る。

【０１２９】

本発明の方法において使用される核酸分子は、ベクターに挿入され得、そして遺伝子治療ベクターとして使用され得る。遺伝子治療ベクターは、例えば、静脈内注射、局所的な投与（米国特許第５，３２８，４７０号を参照のこと）または定位的注入（例えば、Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ ９１：３０５４－３０５７を参照のこと）によって被験体に送達され得る。遺伝子治療ベクターの薬学的調製物は、許容可能な希釈剤中に遺伝子治療ベクターを含み得るか、または遺伝子送達ビヒクルが包埋される緩効性マトリックスを含み得る。あるいは、完全な遺伝子送達ベクターが、組換え細胞（例えば、レトロウイルスベクター）から無傷で生成され得るとき、薬学的調製物は、遺伝子送達システムを生成する１以上の細胞を含み得る。

【０１３０】

（ＩＩＩ．予測医学：）

本発明はまた、診断アッセイ、予後アッセイおよび臨床試験のモニタリングが、予後（予測）目的に使用され、それによって個体を予防的に処置する予測医学の分野に関する。従って、本発明の１つの局面は、生物学的サンプル（例えば、血液、血清、体液、細胞（例えば、肝細胞）または組織（例えば、肝臓組織））に関してＰＧＣ－１βタンパク質および／または核酸発現ならびにＰＧＣ－１β活性を測定するための診断アッセイに関し、それによって、個体が脂質関連疾患または障害に罹患しているか否か、脂質関連疾患または障害が脂質関連疾患または障害を発症する危険性を有するか否かを判定する。本発明はまた、個体が脂質関連疾患または障害を発症する危険性があるか否かを決定するための予後（または予測）アッセイを提供する。例えば、ＰＧＣ－１β遺伝子における変異が、生物学的サンプルにおいてアッセイされ得る。このようなアッセイは、予後または予測目的に使用され得て、それによって、脂質関連疾患または障害の発病の前に個体を予防的に（ｐｈｏｐｈｙｌａｃｔｉｃａｌｌｙ）処置する。

【０１３１】

１つの特定の実施形態は、被験体が脂質関連疾患または障害を発症する危険性を有する脂質関連疾患または障害に罹患しているか否かを評価する方法を含み、この方法は、被験体の細胞または組織サンプルにおけるＰＧＣ－１β遺伝子またはＰＧＣ－１βの活性の発現を検出する工程を含む。ここでＰＧＣ－１β遺伝子の発現の増加またはＰＧＣ－１βの活性の増加は、被験体における脂質関連疾患もしくは障害の存在または脂質関連疾患もしくは障害を発症する危険性を示す。この実施形態において、試験される被験体サンプルは、例えば、血液、血清、体液、細胞（例えば、肝細胞）または組織（例えば、肝臓組織）である。

【０１３２】

本発明の別の局面は、臨床試験におけるＰＧＣ－１βの発現または活性に対するＰＧＣ－１β調節因子の影響をモニターすることに関する。

【０１３３】

このような物質および他の物質は、以下の節にさらに詳細に記載される。

【０１３４】

（Ａ．予後および診断アッセイ）

被験体が、脂質関連疾患もしくは障害に罹患しているか否か、または脂質関連疾患もしくは障害を発症する危険性を有するか否かを判定するために、生物学的サンプルを、被験体から入手し得て、そしてその生物学的サンプルを、生物学的サンプルにおいて、ＰＧＣ

－１βタンパク質またはＰＧＣ－１βタンパク質をコードする核酸（例えば、ｍＲＮＡもしくはゲノムＤＮＡ）を検出することができる化合物または物質と接触させ得る。

【０１３５】

ＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡを検出するための好ましい物質は、ＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡにハイブリダイズすることができる標識された核酸プローブである。核酸プローブは、例えば、配列番号１に記述されているＰＧＣ－１β核酸またはその一部であり得る。例えば、少なくとも１５、２０、２５、３０、２５、４０、４５、５０、１００、２５０または５００ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドおよびストリンジェントな条件下でＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡに特異的にハイブリダイズするのに十分なオリゴヌクレオチドであり得る。本発明の診断アッセイにおける使用に対して他の適切なプローブは、本明細書中に記載される。

【０１３６】

用語「生物学的サンプル」は、被験体から単離した組織、細胞および生体液ならびに被験体内に存在する組織、細胞および体液（例えば、血液、血清、体液、細胞（例えば、肝細胞）または組織（例えば、肝臓組織））を含むと意図される。つまり、本発明の検出方法は、生物学的サンプル内のＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡ、タンパク質またはゲノムＤＮＡをインビトロならびにインビボで検出するために使用され得る。例えば、ＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡを検出するためのインビトロ技術としては、ノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイチュハイブリダイゼーションが挙げられる。ＰＧＣ－１βタンパク質を検出するためのインビトロ技術としては、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）、ウエスタンブロット、免疫沈降および免疫蛍光法が挙げられる。ＰＧＣ－１βゲノムＤＮＡを検出するためのインビトロ技術としては、サザンハイブリダイゼーションが挙げられる。さらに、ＰＧＣ－１βタンパク質を検出するためのインビボ技術としては、標識された抗ＰＧＣ－１β抗体を被験体に導入することが挙げられる。例えば、抗体は、被験体中の存在および位置が、標準的なイメージング技術によって検出され得る放射性マーカーで標識され得る。

【０１３７】

別の実施形態において、本方法はさらに、コントロール被験体からコントロール生物学的サンプルを得る工程、コントロールサンプルをＰＧＣ－１βタンパク質、ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡを検出することができる化合物または物質と接触させて、ＰＧＣ－１βタンパク質、ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡの存在が生物学的サンプルにおいて検出される工程およびコントロールサンプルにおけるＰＧＣ－１βタンパク質、ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡの存在を試験サンプルにおけるＰＧＣ－１βタンパク質、ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡの存在と比較する工程を含む。

【０１３８】

被験体における１以上のＰＧＣ－１β多型領域の解析は、被験体が、脂質関連疾患または障害を有するかまたは発症する可能性があるか否かを予測するために有用であり得る。好ましい実施形態において、本発明の方法は、被験体由来の細胞のサンプルにおける、ＰＧＣ－１β遺伝子の１以上の多型領域の特異的な対立遺伝子改変体の存在または非存在を検出する工程を含むことで特徴付けられ得る。対立遺伝子の差異は：（ｉ）少なくとも１つヌクレオチドの同一性における違いまたは（ｉｉ）ヌクレオチドの数の違いであり得る。この差異は、単一のヌクレオチドまたはいくつかのヌクレオチドであり得る。本発明はまた、ＰＧＣ－１β遺伝子の差異、例えば、染色体再編成（例えば、染色体転位）を検出する方法を提供する。本発明はまた、出生前診断に使用され得る。

【０１３９】

好ましい検出方法は、多型部位と重複するプローブおよび多型領域周辺の約５、１０、２０、２５または３０ヌクレオチドを有するプローブを使用した対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーションである。本発明の好ましい実施形態において、対立遺伝子改変体に特異的にハイブリダイズすることができるいくつかのプローブは、固相支持物（例えば、「チップ」）に付着される。オリゴヌクレオチドは、リソグラフィーを含む種々のプロセスに

よって固体支持物に結合され得る。例えば、チップは、最大２５０，０００個のオリゴヌクレオチドを保持し得る（ＧｅｎｅＣｈｉｐ、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ）。オリゴヌクレオチドを備えるこれらのチップを使用した変異検出解析は、「ＤＮＡプローブアレイ」とも呼ばれ、例えば、Ｃｒｏｎｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｈｕｍａｎ Ｍｕｔａｔｉｏｎ７：２４４に記載されている。１つの実施形態において、チップは、遺伝子の少なくとも１つの多型領域のすべての対立遺伝子改変体を含む。次いで固相支持物は、試験核酸と接触され、そして特異的プローブへのハイブリダイゼーションが検出される。従って、１以上の遺伝子の多数の対立遺伝子改変体の同一性は、単純なハイブリダイゼーション実験において同定され得る。例えば、５’上流制御エレメントにおけるヌクレオチド多型の対立遺伝子改変体の同一性は、単一のハイブリダイゼーション実験において決定され得る。

【０１４０】

他の検出方法において、対立遺伝子改変体を同定する前に、最初にＰＧＣ－１β遺伝子の少なくとも一部を増幅する必要がある。増幅は、当該分野で公知の方法に従って、例えば、ＰＣＲおよび／またはＬＣＲ（Ｗｕ ａｎｄ Ｗａｌｌａｃｅ、（１９８９）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ４：５６０を参照のこと）によって実施され得る。１つの実施形態において、細胞のゲノムＤＮＡは、２つのＰＣＲプライマーに曝露されて、必要量の増幅されたＤＮＡを生成するのに十分なサイクル数で増幅される。好ましい実施形態において、プライマーは、１５０～３５０塩基対離れて位置する。

【０１４１】

別の増幅方法としては：自己保持配列複製（ｓｅｌｆ ｓｕｓｔａｉｎｅｄ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｒｅｐｌｉｃａｔｉｏｎ）（Ｇｕａｔｅｌｌｉ，Ｊ．Ｃ．ｅｔ ａｌ．，１９９０，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７：１８７４－１８７８）、転写増幅システム（Ｋｗｏｈ，Ｄ．Ｙ．ｅｔ ａｌ．，１９８９，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：１１７３－１１７７）、Ｑ－ベータレプリカーゼ（Ｌｉｚａｒｄｉ，Ｐ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．，１９８８，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ６：１１９７）および自己保持配列複製（Ｇｕａｔｅｌｌｉ ｅｔ ａｌ．，（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８７：１８７４）および核酸に基づく配列増幅（ＮＡＢＳＡ）または他の任意の核酸増幅方法が挙げられ、それに続いて、当該分野で周知の技術を使用して増幅された分子が検出される。これらの検出機構は、このような分子が非常に少ない数で存在する場合、核酸分子の検出に特に有用である。

【０１４２】

１つの実施形態において、当該分野で公知の任意の種々の配列決定反応が、サンプル配列の配列を対応する参照（コントロール）配列と比較することによってＰＧＣ－１β遺伝子の少なくとも一部を直接配列決定するためおよび対立遺伝子改変体（例えば、変異）を検出するために使用され得る。例示的な配列決定反応は、ＭａｘａｍおよびＧｉｌｂｅｒｔ（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ（１９７７）７４：５６０）またはＳａｎｇｅｒ（Ｓａｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９７７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ７４：５４６３）によって開発された技術に基づいたものを含む。任意の種々の自動配列決定方法は、質量分析による配列決定（例えば、米国特許第５，５４７，８３５号およびＨ．ＫｏｓｔｅｒによるＤＮＡ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ｂｙ Ｍａｓｓ Ｓｐｅｃｔｒｏｍｅｔｒｙと題される国際特許出願公開番号ＷＯ９４／１６１０１；米国特許第５，５４７，８３５号およびＨ．Ｋｏｓｔｅｒによる「ＤＮＡ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ｂｙ Ｍａｓｓ Ｓｐｅｃｔｒｏｍｅｔｒｙ Ｖｉａ Ｅｘｏｎｕｃｌｅａｓｅ Ｄｅｇｒａｄａｔｉｏｎ」と題される国際特許出願公開番号ＷＯ９４／２１８２２および米国特許第５，６０５，７９８号およびＨ．ＫｏｓｔｅｒによるＤＮＡ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ Ｂａｓｅｄ ｏｎ Ｍａｓｓ Ｓｐｅｃｔｒｏｍｅｔｒｙと題される国際特許出願番号ＰＣＴ／ＵＳ９６／０３６５１；Ｃｏｈｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ａｄｖ Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ ３６：１２７－１６２；およびＧｒｉｆｆｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ａｐｐｌ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ３８：１４７－１５９を参照のこと）を含む被験者アッセイ（Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ（１９９５）１９：４４

８）を実施するときに利用され得ることもまた企図される。特定の実施形態について、たった１つ、２つまたは３つの核酸塩基の存在が配列決定反応において決定される必要があることは、当業者には明らかであり得る。例えば、Ａ－ｔｒａｃｋなど（例えば、１ヌクレオチドだけが検出される）が実施され得る。

【０１４３】

なおも他の配列決定方法は、例えば、「Ｍｅｔｈｏｄ ｏｆ ＤＮＡ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ｅｍｐｌｏｙｉｎｇ ａ ｍｉｘｅｄ ＤＮＡ－ｐｏｌｙｍｅｒ ｃｈａｉｎ ｐｒｏｂｅ」と題される米国特許第５，５８０，７３２号および「Ｍｅｔｈｏｄ ｆｏｒ ｍｉｓｍａｔｃｈ－ｄｉｒｅｃｔｅｄ ｉｎ ｖｉｔｒｏ ＤＮＡ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ」と題される米国特許第５，５７１，６７６号に開示されている。

【０１４４】

いくつかの場合において、被験体由来のＤＮＡにおけるＰＧＣ－１β遺伝子の特異的な対立遺伝子の存在は、制限酵素解析によって示され得る。例えば、特異的なヌクレオチド多型は、別の対立遺伝子改変体のヌクレオチド配列にない制限部位を含むヌクレオチド配列を生じ得る。

【０１４５】

さらなる実施形態において、切断物質（例えば、ヌクレアーゼ、ヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウムおよびピペリジンを含む物質）からの保護は、ＲＮＡ／ＲＮＡ ＤＮＡ／ＤＮＡまたはＲＮＡ／ＤＮＡヘテロ二重鎖（Ｍｙｅｒｓ，ｅｔ ａｌ．（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３０：１２４２）におけるミスマッチの塩基を検出するために使用され得る。一般に、「ミスマッチ切断」の技術は、ＰＧＣ－１β対立遺伝子改変体のヌクレオチド配列を含むコントロール核酸（必要に応じて標識される）（例えば、ＲＮＡまたはＤＮＡ）と、組織サンプルから得られたサンプル核酸（例えば、ＲＮＡまたはＤＮＡ）とをハイブリダイズすることによって形成されるヘテロ二重鎖を得ることによって開始される。二本鎖二重鎖は、コントロール鎖とサンプル鎖との間の塩基対ミスマッチに基づいて形成される二重鎖のような二重鎖の一本鎖領域を切断する物質で処置される。例えば、ＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖は、ＲＮアーゼで処置され得、そしてＤＮＡ／ＤＮＡハイブリッドは、ミスマッチ領域を酵素的に消化するＳ１ヌクレアーゼで処置され得る。他の実施形態において、ＤＮＡ／ＤＮＡ二重鎖またはＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖のいずれかは、ヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウムで処置され得、そしてミスマッチ領域を消化するためにピペリジンで処置され得る。ミスマッチ領域の消化後、生じた材料は、コントロールおよびサンプル核酸が同一ヌクレオチド配列を有するか否かまたはどのヌクレオチドが異なるかを決定するために変性ポリアクリルアミドゲル上で大きさによって分離される。例えば、Ｃｏｔｔｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ８５：４３９７；Ｓａｌｅｅｂａ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．２１７：２８６－２９５を参照のこと。好ましい実施形態において、コントロールまたはサンプル核酸は、検出のために標識される。

【０１４６】

別の実施形態において、対立遺伝子改変体は、変性高速液体クロマトグラフィ（ＤＨＰＬＣ）（Ｏｅｆｈｅｒ ａｎｄ Ｕｎｄｅｒｈｉｌｌ，（１９９５）Ａｍ．Ｊ．Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎ．５７：Ｓｕｐｐｌ．Ａ２６６）によって同定され得る。ＤＨＰＬＣは、そのフラグメント内の特定のヌクレオチド座でヘテロ接合である個体由来のＰＣＲフラグメントの増幅の間に生成されるヘテロ二重鎖を検出するために逆相イオンペアークロマトグラフィを使用する（Ｏｅｆｈｅｒ ａｎｄ Ｕｎｄｅｒｈｉｌｌ（１９９５）Ａｍ．Ｊ．Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎ．５７：Ｓｕｐｐｌ．Ａ２６６）。一般に、ＰＣＲ産物は、目的のＤＮＡに隣接するＰＣＲプライマーを使用して生成される。ＤＨＰＬＣ解析が実施され、そして生じたクロマトグラムが、特異的クロマトグラフィのプロファイルに基づいて塩基対の変化または欠失を同定するために解析される（Ｏ’Ｄｏｎｏｖａｎ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ５２：４４－４９を参照のこと）。

【０１４７】

他の実施形態において、電気泳動の移動度の変化は、ＰＧＣ－１β対立遺伝子改変体のタイプを同定するために使用される。例えば、一本鎖高次構造多型（ＳＳＣＰ）は、変異体核酸と野生型核酸との間の電気泳動の移動度の差を検出するために使用され得る（Ｏｒｉｔａ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ ８６：２７６６；またＣｏｔｔｏｎ（１９９３）Ｍｕｔａｔ Ｒｅｓ ２８５：１２５－１４４；およびＨａｙａｓｈｉ（１９９２）Ｇｅｎｅｔ Ａｎａｌ Ｔｅｃｈ Ａｐｐｌ ９：７３－７９を参照のこと）。サンプルおよびコントロール核酸の一本鎖ＤＮＡフラグメントは、変性されて、そして再生されることが可能である。一本鎖核酸の二次構造は、配列に従って変化し、電気泳動の移動度において生じた変化は、一塩基の変化さえも検出することができる。ＤＮＡフラグメントは、標識され得るか、または標識されたプローブで検出され得る。アッセイの感度は、その二次構造が配列における変化に対してより感受性であるＲＮＡ（むしろＤＮＡ）を使用することによって増強され得る。別の好ましい実施形態において、被験体方法は、電気泳動の移動度における変化に基づいて二本鎖ヘテロ二重鎖分子を分離するヘテロ二重鎖解析を利用する（Ｋｅｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｔｒｅｎｄｓ Ｇｅｎｅｔ ７：５）。

【０１４８】

なおも別の実施形態において、多型領域の対立遺伝子改変体の同一性は、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（ＤＧＧＥ）を使用してアッセイされる、変性剤の勾配を有するポリアクリルアミドゲルにおける多型領域を含む核酸の移動を解析することによって得られる（Ｍｙｅｒｓ ｅｔ ａｌ．（１９８５）Ｎａｔｕｒｅ ３１３：４９５）。ＤＧＧＥが解析の方法として使用されるとき、ＤＮＡは、例えば、約４０ｂｐの高融解ＧＣリッチＤＮＡのＧＣクランプを追加することによって、ＰＣＲによって完全に変性しないことを保証するように改変され得る。さらなる実施形態において、温度勾配が、コントロールおよびサンプルＤＮＡの移動度における差を同定するために変性剤勾配の代わりに使用される（Ｒｏｓｅｎｂａｕｍ ａｎｄ Ｒｅｉｓｓｎｅｒ（１９８７）Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｃｈｅｍ ２６５：１２７５）。

【０１４９】

２つの核酸の間の少なくとも１つのヌクレオチドの差を検出するための技術の例としては、選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅または選択的プライマー伸長が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、既知の多型性ヌクレオチドが中心に置かれるオリゴヌクレオチドプローブ（対立遺伝子特異的プローブ）が、調製され得、そして、完全な一致が見られる場合のみハイブリダイゼーションが可能である条件下で標的ＤＮＡにハイブリダイズされ得る（Ｓａｉｋｉ ｅｔ ａｌ．（１９８６）Ｎａｔｕｒｅ ３２４：１６３）；Ｓａｉｋｉ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ ８６：６２３０；およびＷａｌｌａｃｅ ｅｔ ａｌ．（１９７９）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．６：３５４３）。このような対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション技術は、ＰＧＣ－１βの様々な多型領域におけるいくつかのヌクレオチド変化の同時検出に使用され得る。例えば、特異的な対立遺伝子改変体のヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドは、ハイブリダイズ膜に付着し、そしてこの膜は、標識されたサンプル核酸とハイブリダイズされる。そしてハイブリダイゼーションシグナルの解析は、サンプル核酸のヌクレオチドの同一性を明らかにし得る。

【０１５０】

あるいは、選択的ＰＣＲ増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅技術は、当該発明と同時に使用され得る。特異的増幅についてプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、目的の対立遺伝子改変体を分子の中心に保持し得る（そのため、増幅は、ディファレンシャルハイブリダイゼーションに依存する）（Ｇｉｂｂｓ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１７：２４３７－２４４８）か、または適切な条件下でミスマッチがポリメラーゼ伸長を妨害または低減させ得る１つのプライマーの３’末端の先端に保持し得る（Ｐｒｏｓｓｎｅｒ（１９９３）Ｔｉｂｔｅｃｈ １１：２３８；

Ｎｅｗｔｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１７：２５０３）。この技術はまた、プローブオリゴ塩基伸長（Ｐｒｏｂｅ Ｏｌｉｇｏ Ｂａｓｅ Ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ）「ＰＲＯＢＥ」と呼ばれる。さらに、切断に基づく検出を可能にするために変異の領域に新規制限部位を導入することが望ましい可能性がある（Ｇａｓｐａｒｉｎｉ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｐｒｏｂｅｓ ６：１）。

【０１５１】

別の実施形態において、対立遺伝子改変体の同定は、例えば、米国特許第４，９９８，６１７号およびＬａｎｄｅｇｒｅｎ，Ｕ．ｅｔ ａｌ．、（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４１：１０７７－１０８０に記載されているようなオリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ（ＯＬＡ）を使用して実施される。ＯＬＡプロトコールは、標的の一本鎖の隣接する配列にハイブリダイズすることができるように設計される２つのオリゴヌクレオチドを使用する。一方のオリゴヌクレオチドは、分離マーカー（例えば、ビオチン化されたマーカー）に連結され、そして他方は、検出可能に標識される。正確な相補配列が標的分子中に見られる場合、オリゴヌクレオチドは、それらの末端が隣接し、そしてライゲーション基質を生成するようにハイブリダイズし得る。そしてライゲーションにより、標識されたオリゴヌクレオチドをアビジンまたは別のビオチンリガンドを使用して回収することが可能になる。Ｎｉｃｋｅｒｓｏｎ，Ｄ．Ａ．ｅｔ ａｌ．は、ＰＣＲおよびＯＬＡの特質を併用する核酸検出アッセイを記載している（Ｎｉｃｋｅｒｓｏｎ、Ｄ．Ａ．ｅｔ ａｌ．、（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（Ｕ．Ｓ．Ａ．）８７：８９２３－８９２７）。この方法において、ＰＣＲは、標的ＤＮＡの指数関数的な増幅を達成するために使用され、そしてＯＬＡを使用して検出される。

【０１５２】

このＯＬＡ法に基づくいくつかの技術が開発されており、そしてＰＧＣ－１β遺伝子の多型領域の特異的な対立遺伝子改変体を検出するために使用され得る。例えば、米国特許第５，５９３，８２６号は、ホスホルアミデート結合を有する結合体を形成する、３’－アミノ基および５’－リン酸化オリゴヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドを使用するＯＬＡを開示する。Ｔｏｂｅ ｅｔ ａｌ．（（１９９６）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ２４：３７２８）に記載されるＯＬＡの別の変形において、ＰＣＲと併用されるＯＬＡにより、単一のマイクロタイターウェルにおいて２つの対立遺伝子のタイピングが可能になる。対立遺伝子特異的プライマーの各々を独特のハプテン、すなわちジゴキシゲニンおよびフルオレセインで標識することによって、各ＯＬＡ反応は、様々な酵素レポーター、アルカリホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼで標識されたハプテン特異的抗体を使用して検出され得る。このシステムにより、２つの異なる色を産生させるハイスループットな形式を使用して２つの対立遺伝子の検出が可能になる。

【０１５３】

本発明はさらに、ＰＧＣ－１β遺伝子における単一ヌクレオチド多型を検出する方法を提供する。単一ヌクレオチド多型が、不変な配列の領域に隣接される変異の部位を構成するので、それらの解析は、変異の部位に存在する単一ヌクレオチドの同一性の決定を必要とするだけで、各被験体について完全な遺伝子配列を決定する必要がない。いくつかの方法が、このような単一ヌクレオチド多型の解析を促進するために開発されている。

【０１５４】

１つの実施形態において、一塩基多型は、例えば、Ｍｕｎｄｙ，Ｃ．Ｒ．（米国特許第４，６５６，１２７号に開示されているような特殊化したエキソヌクレアーゼ抵抗性ヌクレオチドを使用して検出され得る。この方法によると、多型部位の３’に隣接して対立遺伝子の配列に相補的なプライマーは、特定の動物またはヒトから得られた標的分子にハイブリダイズすることが可能になる。標的分子上の多型部位が、存在する特定のエキソヌクレアーゼ抵抗性ヌクレオチド誘導体に相補的なヌクレオチドを有する場合、その誘導体は、ハイブリダイズされるプライマーの末端に組み込まれ得る。このような組み込みは、エキソヌクレアーゼに抵抗性のプライマーを生成し、それによってその検出が可能になる。サンプルのエキソヌクレアーゼ抵抗性誘導体の同一性が既知である場合、プライマーがエ

キソヌクレアーゼに抵抗性になっているという知見により、標的分子の多型部位に存在するヌクレオチドが、反応に使用されるヌクレオチド誘導体に相補的であることが明らかになる。この方法は、大量の無関係な配列データの決定を必要としないという利点を有する。

【０１５５】

本発明の別の実施形態において、溶液に基づく方法は、多型部位のヌクレオチドの同一性を決定するために使用される（Ｃｏｈｅｎ，Ｄ．ｅｔ　ａｌ．（仏国特許第２，６５０，８４０号；ＰＣＴ出願番号ＷＯ９１／０２０８７）。米国特許第４，６５６，１２７号のＭｕｎｄｙ法におけるように、多型部位の３’に隣接して対立遺伝子の配列に相補的であるプライマーが使用される。その方法は、多型部位のヌクレオチドに相補的である場合、プライマーの末端に組み込まれ得る標識されたジデオキシヌクレオチド誘導体を使用してその部位のヌクレオチドの同一性を決定する。

【０１５６】

遺伝的ビット解析（Ｇｅｎｅｔｉｃ　Ｂｉｔ　Ａｎａｌｙｓｉｓ）またはＧＢＡとして知られる別の方法は、Ｇｏｅｌｅｔ，Ｐ．ｅｔ　ａｌ．によって記載されている（ＰＣＴ出願番号９２／１５７１２）。Ｇｏｅｌｅｔ，Ｐ．ｅｔ　ａｌ．の方法は、標識されたターミネーターと多型部位に対して３’の配列に相補的であるプライマーとの混合物を使用する。従って、組み込まれる標識されたターミネーターは、評価される標的分子の多型部位に存在するヌクレオチドによって決定され、それに相補的である。Ｃｏｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．の方法（仏国特許第２，６５０，８４０号；ＰＣＴ出願番号ＷＯ９１／０２０８７）とは対照的に、Ｇｏｅｌｅｔ，Ｐ．ｅｔ　ａｌ．の方法は、好ましくは、プライマーまたは標的分子が固相に固定化される、不均一な相アッセイである。

【０１５７】

ＤＮＡにおける多型部位をアッセイするための、いくつかのプライマーが誘導するヌクレオチドの組み込み手順は、記載されている（Ｋｏｍｈｅｒ，Ｊ．Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．１７：７７７９－７７８４（１９８９）；Ｓｏｋｏｌｏｖ，Ｂ．Ｐ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１８：３６７１（１９９０）；Ｓｙｖａｎｅｎ，Ａ．　－Ｃ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　８：６８４－６９２（１９９０）；Ｋｕｐｐｕｓｗａｍｙ，Ｍ．Ｎ．ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（Ｕ．Ｓ．Ａ．）８８：１１４３－１１４７（１９９１）；Ｐｒｅｚａｎｔ，Ｔ．Ｒ．ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｍｕｔａｔ．１：１５９－１６４（１９９２）；Ｕｇｏｚｚｏｌｉ，Ｌ．ｅｔ　ａｌ．，ＧＡＴＡ　９：１０７－１１２（１９９２）；Ｎｙｒｅｎ，Ｐ．ｅｔ　ａｌ．，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２０８：１７１－１７５（１９９３））。これらの方法は、それらすべてが、多型部位における塩基間を識別する標識されたデオキシヌクレオチドの組み込みに依存するという点でＧＢＡとは異なる。このような形態において、シグナルが組み込まれるデオキシヌクレオチドの数に比例するので、同一のヌクレオチドの一続きで起きる多型は、一続きの長さに比例するシグナルを生じ得る（Ｓｙｖａｎｅｎ，Ａ．　－Ｃ．，ｅｔ　ａｌ．，Ａｍｅｒ．Ｊ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔ．５２：４６－５９（１９９３））。

【０１５８】

ＰＧＣ－１β遺伝子のコード領域に位置する多型領域の対立遺伝子改変体の同一性を決定するために、上記した方法よりなおも他の方法が使用され得る。例えば、変異したＰＧＣ－１βタンパク質をコードする対立遺伝子改変体の同定は、例えば、免疫組織化学または免疫沈降において、変異タンパク質を特異的に認識する抗体を使用することによって実施され得る。野生型ＰＧＣ－１βまたはＰＧＣ－１βタンパク質の変異した形態に対する抗体は、当該分野で公知の方法に従って調製され得る。

【０１５９】

あるいは、ＰＧＣ－１βリガンドに結合するようなＰＧＣ－１βタンパク質の活性を計測することもできる。結合アッセイは、当該分野で公知であり、タンパク質の変異した形態への結合が、タンパク質の野生型への結合と異なるか否かを決定するために、例えば、

被験体から細胞を得る工程および標識された脂質との結合実験を実施する工程を含む。

【０１６０】

上で議論された、参照ポリペプチドあるいは変異ＰＧＣ－１βポリペプチドまたはそれらの対立遺伝子改変体に対して作られた抗体は、疾患診断および予後に使用され得る。このような診断方法は、ＰＧＣ－１βポリペプチド発現のレベルでの異常または構造の異常および／またはＰＧＣ－１βポリペプチドの組織、細胞もしくは細胞内の位置を検出するために使用され得る。構造の差としては、例えば、正常なＰＧＣ－１βポリペプチドと比較したときの変異ＰＧＣ－１βポリペプチドの大きさ、電気陰性度または抗原性における差が挙げられ得る。解析される組織または細胞タイプ由来のタンパク質は、当業者に周知である技術（ウエスタンブロット解析が挙げられるが、これに限定されない）を使用して、容易に検出または単離され得る。ウエスタンブロット解析を実施するための方法の詳細な説明については、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．、１９８９、前出の第１８章を参照のこと。本明細書中で使用されるタンパク質の検出および単離方法はまた、ＨａｒｌｏｗおよびＬａｎｅ、例えば、（Ｈａｒｌｏｗ，Ｅ．　ａｎｄ　Ｌａｎｅ，Ｄ．，１９８８，“Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，”Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ）（これらの全体が本明細書中に参考として援用される）に記載される方法であり得る。

【０１６１】

これは、光学顕微鏡による検出、フローサイトメトリーによる検出または蛍光定量的な検出を組み合わせた、蛍光で標識された抗体（以下を参照のこと）を使用して、例えば、免疫蛍光技術によって達成され得る。本発明において有用な抗体（またはそれらのフラグメント）は、追加として、ＰＧＣ－１βポリペプチドのインサイチュ検出のために免疫蛍光法または免疫電子顕微鏡において、組織学的に使用され得る。インサイチュ検出は、被験体から組織学的検体を取り出して、それに本発明の標識された抗体を適用することによって達成され得る。抗体（またはフラグメント）は、好ましくは生物学的サンプルに標識された抗体（またはフラグメント）をおおうことによって適用される。このような手順の使用を通して、ＰＧＣ－１βポリペプチドの存在だけでなく、調べられる組織における分布も決定することができる。本発明を使用して、当業者は、このようなインサイチュ検出を達成するために、任意の種々の広範な組織学的方法（例えば、染色手順）が改変され得ることを容易に認識し得る。

【０１６２】

固相支持物または担体は、抗原または抗体を結合することができる支持物として使用されることが多い。周知の支持物または担体としては、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然セルロースおよび加工セルロース、ポリアクリルアミド、斑れい岩ならびに磁鉄鉱が挙げられる。担体の性質は、本発明の目的で、ある程度可溶性か、または不溶性のいずれかであり得る。支持物の材料は、結合される分子が抗原または抗体に結合することができる限り、実質的にいかなる可能な構造形態をとっていてもよい。従って、支持物の形態は、ビーズまたは円柱状のような球状、試験管の内側の表面または棒の外側の表面であってもよい。あるいは、表面は平坦（例えば、シート、試験片など）であってもよい。好ましい支持物としては、ポリスチレンビーズが挙げられる。当業者は、抗体または抗原を結合するのに適した他の多くの担体を知り得るか、またはルーチン的な実験の使用によって同じものを確かめることができるであろう。

【０１６３】

抗ＰＧＣ－１βポリペプチド特異的抗体を標識するための１つの手段は、酵素に対する結合および酵素免疫測定法（ＥＩＡ）における使用を介する（Ｖｏｌｌｅｒ、“Ｔｈｅ　Ｅｎｚｙｍｅ　Ｌｉｎｋｅｄ　Ｉｍｍｕｎｏｓｏｒｂｅｎｔ　Ａｓｓａｙ（ＥＬＩＳＡ），”Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ　Ｈｏｒｉｚｏｎｓ　２：１－７，１９７８，Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ　Ｑｕａｒｔｅｒｌｙ　Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏ

ｎ，Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ，ＭＤ；Ｖｏｌｌｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｐａｔｈｏｌ．３１：５０７－５２０（１９７８）；Ｂｕｔｌｅｒ，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．７３：４８２－５２３（１９８１）；Ｍａｇｇｉｏ，（ｅｄ．）Ｅｎｚｙｍｅ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，ＦＬ，１９８０；Ｉｓｈｉｋａｗａ，ｅｔ ａｌ．，（ｅｄｓ．）Ｅｎｚｙｍｅ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ，Ｋｇａｋｕ Ｓｈｏｉｎ，Ｔｏｋｙｏ，１９８１）。抗体に結合する酵素は、例えば、分光光度的、蛍光定量的または視覚的な手段によって検出され得る化学的部分を生成するような様式で適切な基質、好ましくは色素産生性基質と反応し得る。抗体を検出可能に標識するために使用され得る酵素としては、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌性ヌクレアーゼ、δ－５－ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、α－グリセロホスフェート、デヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、β－ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼが挙げられるがこれらに限定されない。検出は、酵素に対する色素産生性基質を使用する比色定量の方法によって達成され得る。検出はまた、類似の調製された標準物質と比較して、基質の酵素的反応の程度の視覚的な比較によって達成され得る。

【０１６４】

検出はまた、任意の種々の他のイムノアッセイを使用して達成され得る。例えば、抗体または抗体フラグメントを放射性で標識することによって、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）の使用を介して野生型のフィンガープリント遺伝子または変異ペプチドを検出することができる（例えば、Ｗｅｉｎｔｒａｕｂ，Ｂ．，Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｒａｄｉｏｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙｓ，Ｓｅｖｅｎｔｈ Ｔｒａｉｎｉｎｇ Ｃｏｕｒｓｅ ｏｎ Ｒａｄｉｏｌｉｇａｎｄ Ａｓｓａｙ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，Ｔｈｅ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｅ Ｓｏｃｉｅｔｙ，Ｍａｒｃｈ，１９８６を参照のこと。これは、本明細書中に参考として援用される）。放射性同位体は、ガンマカウンターもしくはシンチレーションカウンターの使用のような手段またはオートラジオグラフィによって検出され得る。

【０１６５】

抗体を蛍光性化合物で標識することが可能である。蛍光的に標識された抗体が適切な波長の光線に曝露されるとき、その存在は、蛍光によって検出され得る。最も一般に使用される蛍光性標識化合物は、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、ｏ－フトアルデヒド（ｐｈｔｈａｌｄｅｈｙｄｅ）およびフルオレサミンである。抗体はまた、^{152}Ｅｕなどの蛍光放射金属または他のランタン系列を使用して検出可能に標識され得る。これらの金属は、ジエチレントリアミン五酢酸（ＤＴＰＡ）またはエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）のような金属キレート基を使用して抗体に付着され得る。

【０１６６】

抗体はまた、化学発光の化合物に結合することによって検出可能に標識され得る。そして化学発光のタグをつけた抗体の存在は、化学反応の間、生じるルミネセンスの存在を検出することによって決定される。特定の有用な化学発光の標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、セロマティック（ｔｈｅｒｏｍａｔｉｃ）アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびシュウ酸エステルである。

【０１６７】

同様に、生物発光の化合物は、本発明の抗体を標識するために使用され得る。生物発光は、触媒的タンパク質が化学発光の反応の効率を増大させる生物学的システムにおいて見られる化学発光のタイプである。生物発光のタンパク質の存在は、ルミネセンスの存在を検出することによって決定される。標識する目的の重要な生物発光の化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼおよびエクオリンである。

【０１６８】

多型領域がエキソンに位置する場合、遺伝子のコード部分または非コード部分のいずれ

かにおいて、対立遺伝子改変体の同一性は、ｍＲＮＡ、プレｍＲＮＡまたはｃＤＮＡの分子構造を決定するために決定され得る。分子構造は、ゲノムＤＮＡの分子構造を決定するために任意の上記の方法を使用して決定され得る。

【０１６９】

本明細書中に記載される方法は、上記したものなどの、本明細書中に記載される、少なくとも１つのプローブまたはプライマー核酸を備える、例えば、包装済みの診断キットを利用することによって実施され得る。それらのキットは、例えば、被験体が特異的なＰＧＣ－１β対立遺伝子改変体に関連する疾患を発症する危険性を有するか否か、または危険性があるか否かを判定するために都合よく使用され得る。

【０１７０】

任意の上記した診断方法および予後方法によって解析されるサンプル核酸は、被験体の任意の細胞タイプまたは組織から得ることができる。例えば、被験体の体液（例えば、血液）は、公知の技術（例えば、静脈穿刺）によって得られ得る。あるいは、核酸試験は、乾燥サンプル（例えば、毛または皮膚）で実施され得る。胎児の核酸サンプルは、Ｂｉａｎｃｈｉに対する国際特許出願番号ＷＯ９１／０７６６０に記載されるように母親の血液から得ることができる。あるいは、羊膜細胞または絨毛膜絨毛が、出生前試験を実施するために入手され得る。

【０１７１】

診断手順はまた、バイオプシーまたは切除から得られる被験体組織の組織切片（固定および／または凍結）上で、直接インサイチュで実施され得、核酸精製の必要はない。核酸試薬は、このようなインサイチュ法のためのプローブおよび／またはプライマーとして使用され得る（例えば、Ｎｕｏｖｏ、Ｇ．Ｊ．、１９９２、ＰＣＲ ｉｎ ｓｉｔｕ ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ：ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ａｎｄ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｒａｖｅｎ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹを参照のこと）。

【０１７２】

１つの核酸配列の検出に主に注目した方法に加えて、プロファイルは、このような検出機構において評価され得る。フィンガープリントプロファイルは、例えば、ディファレンシャルディスプレイ法、ノーザン解析および／またはＲＴ－ＰＣＲを利用することによって生成され得る。

【０１７３】

（Ｂ．脂肪酸を分類するための診断アッセイ）

ＰＧＣ－１βは、被験体における血液脂質プロファイルのこれらの構成要素の効果を予測するために食事成分を同定および分類するために使用され得る。従って、本発明は、細胞（例えば、肝細胞）を食事成分または脂肪酸を含有するサンプルと接触させて、ＰＧＣ－１βの発現または活性の調節を計測することによって、食事成分およびアテローム生成的な脂肪酸を分類する方法を提供する。別の局面において、食事成分または脂肪酸は、被験体（例えば、哺乳動物）に投与され得、そしてＰＧＣ－１βの発現または活性の調節が計測される。

【０１７４】

ＰＧＣ－１βの発現または活性の増加は、アテロームを発生する可能性が高い脂肪酸（例えば、トランス脂肪または飽和脂肪）の存在を示す。アテロームを発生する可能性が高い食事成分は、被験体における、脂質生合成、脂質輸送、トリグリセリドレベルおよび／または血漿コレステロールレベルの増加を引き起こし得、そしてまた被験体において脂質関連疾患または障害を発症させ得る。ＰＧＣ－１βの発現または活性の調節を計測する方法は上に記載している。１つの実施形態において、ＰＧＣ－１βの発現または活性を増加させるアテローム生成的な脂肪酸または他の化合物を含有しないコントロールサンプルが利用される。

【０１７５】

（Ｃ．臨床試験中の効果のモニタリング）

本発明はさらに、被験体において、脂質関連疾患または障害を処置もしくは予防するか

、または脂質関連疾患または障害を発症する危険性を評価するときのＰＧＣ－１β調節因子（例えば、本明細書中で同定されるＰＧＣ－１β調節因子）の有効性を測定する方法を提供する。例えば、ＰＧＣ－１β遺伝子発現、タンパク質レベルを上昇もしくは低下させるときまたはＰＧＣ－１β活性をアップレギュレートもしくはダウンレギュレートするときのＰＧＣ－１β調節因子の有効性は、上昇したかもしくは低下したＰＧＣ－１β遺伝子発現、タンパク質レベルまたはアップレギュレートもしくはダウンレギュレートしたＰＧＣ－１β活性を示す被験体の臨床試験においてモニターされ得る。このような臨床試験において、ＰＧＣ－１β遺伝子および好ましくは、例えば、ＰＧＣ－１β経路において関係付けられている他の遺伝子の発現または活性が、特定の細胞の表現型の「読み出し」またはマーカーとして使用され得る。

【０１７６】

例えば、限定する目的ではないが、ＰＧＣ－１β活性を調節する物質を用いた処置によって細胞において、調節されるＰＧＣ－１βを含む（例えば、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイにおいて同定される）遺伝子が同定され得る。従って、脂質関連疾患または障害に罹患している被験体におけるＰＧＣ－１β活性を調節する物質または予防薬として使用される物質の効果を研究するため、例えば、臨床試験のために、細胞が、単離され得、そしてＲＮＡが調製され、ＰＧＣ－１βおよびＰＧＣ－１β活性または発現に関係付けられる他の遺伝子の発現のレベルについて解析され得る。遺伝子発現のレベル（例えば、遺伝子発現パターン）は、明細書中に記載されるような、ノーザンブロット解析またはＲＴ－ＰＣＲによってか、あるいは本明細書中に記載される方法の１つによって産生されるタンパク質の量を計測することまたはＰＧＣ－１βもしくは他の遺伝子の活性のレベルを計測することによって定量され得る。このような方法で、遺伝子発現パターンは、ＰＧＣ－１β活性を調節する物質に対する細胞の生理学的応答を示すマーカーとして機能し得る。この応答状態は、ＰＧＣ－１β活性を調節する物質を用いた個体の処置の前およびその間の様々な時点で測定され得る。

【０１７７】

好ましい実施形態において、本発明は、ＰＧＣ－１β活性を調節する物質（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、タンパク質、ペプチド、核酸、ｓｉＲＮＡ、抗体または本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定される低分子）を用いた被験体の処置の有効性をモニタリングする方法を提供する。この方法は、（ｉ）物質の投与前に被験体から投与前サンプルを得る工程；（ｉｉ）投与前サンプルにおけるＰＧＣ－１βタンパク質、ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡの発現のレベルを検出する工程；（ｉｉｉ）被験体から１以上の投与後サンプルを得る工程；（ｉｖ）投与後サンプルにおけるＰＧＣ－１βタンパク質、ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡの発現または活性のレベルを検出する工程；（ｖ）投与前サンプルにおけるＰＧＣ－１βタンパク質、ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡの発現または活性のレベルを投与後サンプル（単数または複数）におけるＰＧＣ－１βタンパク質、ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡと比較する工程；および（ｖｉ）それに応じて被験体に物質の投与を変更する工程を含む。例えば、物質の増加した投与は、検出されたレベルよりも高くするため、すなわち、物質の有効性を増加させるためにＰＧＣ－１βの発現または活性を増加または減少させることが望ましい可能性がある。このような実施形態によれば、ＰＧＣ－１βの発現または活性は、観察可能な表現型の応答がない状態でも物質の有効性の指標として使用され得る。

【０１７８】

（ＩＶ．本発明の方法において使用される組換え発現ベクターおよび宿主細胞）

本発明の方法（例えば、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイならびに治療的および／または予防的な方法）は、ＰＧＣ－１βタンパク質（またはその一部）をコードする核酸を有するベクター、好ましくは発現ベクターの使用を含む。例えば、１つの実施形態において、ＰＧＣ－１βタンパク質またはその一部をコードする核酸を有するベクターは、被験体における脂質関連疾患または障害を処置または予防するためにＰＧＣ－１βタンパク質またはその一部を被験体に送達するために使用され得る。１つの実施形態に

おいて、ＰＧＣ－１βタンパク質またはその一部をコードする核酸を有するベクターは、本明細書中に記載されるような特定の細胞タイプ、器官または組織（例えば、肝細胞）に標的化される。

【０１７９】

本明細書中で使用されるとき、用語「ベクター」とは、連結している別の核酸を輸送することができる核酸分子のことをいう。ベクターの１つのタイプは、「プラスミド」であり、これは、追加のＤＮＡセグメントを連結することができる環状の二本鎖ＤＮＡループのことをいう。ベクターの別のタイプは、ウイルスベクターであり、これは追加のＤＮＡセグメントをウイルスゲノムに連結することができる。一定のベクターは、導入される宿主細胞において自立的に複製することができる（例えば、複製の細菌起源を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入に依存して宿主細胞のゲノムに組み込まれる。そしてそれによって宿主ゲノムとともに複製される。さらに、一定のベクターは、作動可能に連結される遺伝子の発現を指示することができる。このようなベクターは、本明細書中で「発現ベクター」といわれる。一般に、組換えＤＮＡ技術において有用な発現ベクターは、プラスミドの形態であることが多い。本明細書において、プラスミドが、ベクターの最も一般に使用される形態であるので、「プラスミド」と「ベクター」は、交換可能に使用され得る。しかしながら、本発明は、等しく機能するウイルスベクターなどの発現ベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、複製欠損アデノウイルスおよび複製欠損アデノ随伴ウイルス）のこのような他の形態を含むことが意図される。

【０１８０】

本発明の方法において使用される組換え発現ベクターは、宿主細胞における核酸の発現に適した形態の本発明の核酸を含み、このことは、組換え発現ベクターが、発現されるように核酸配列に作動可能に連結される、発現に使用される宿主細胞に基づいて選択される１以上の制御配列を含むことを意味する。組換え発現ベクターの内部で、「作動可能に連結される」とは、目的のヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列の発現を可能にする様式で（例えば、インビトロの転写／翻訳系またはベクターが宿主細胞に導入されるときの宿主細胞内で）制御配列（単数または複数）に連結されることを意味すると意図される。用語「制御配列」とは、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現コントロールエレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むと意図される。このような制御配列は、例えば、Ｇｏｅｄｄｅｌ（１９９０）Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８５：３－７に記載されている。制御配列は、宿主細胞の多くのタイプにおいてヌクレオチド配列の構成的発現を指示する配列および一定の宿主細胞においてのみヌクレオチド配列の発現を指示する配列（例えば、組織特異的制御配列）を含む。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現のレベルなどの因子に依存し得ることが当業者によって理解され得る。本発明の発現ベクターは、宿主細胞に導入され得、それによって、本明細書中に記載されるような核酸によってコードされる、融合タンパク質またはペプチド（例えば、ＰＧＣ－１βタンパク質、ＰＧＣ－１βタンパク質の変異体の形態、融合タンパク質など）を含むタンパク質またはペプチドを産生する。

【０１８１】

本発明の方法において使用される組換え発現ベクターは、原核細胞または真核細胞におけるＰＧＣ－１βタンパク質の発現のために設計され得る。例えば、ＰＧＣ－１βタンパク質は、Ｅ．ｃｏｌｉなどの細菌細胞、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを使用して）、酵母細胞または哺乳動物細胞において発現され得る。適切な宿主細胞は、Ｇｏｅｄｄｅｌ（１９９０）前出にさらに議論されている。あるいは、組換え発現ベクターは、例えば、Ｔ７プロモーター制御配列およびＴ７ポリメラーゼを使用してインビトロで転写および翻訳され得る。

【０１８２】

原核生物におけるタンパク質の発現は、融合タンパク質または非融合タンパク質のいずれかの発現を指示する構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターを含むベクターを有

するＥ．ｃｏｌｉ中で実施されることが最も多い。融合ベクターは、そこでコードされるタンパク質に、通常は組換えタンパク質のアミノ末端に多くのアミノ酸を追加する。このような融合ベクターは、代表的に３つの目的：１）組換えタンパク質の発現を増加させること；２）組換えタンパク質の溶解度を増大させること；および３）親和性精製におけるリガンドとして作用することによって組換えタンパク質の精製を助けることという役割を果たす。しばしば、融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解性切断部位は、融合部分と組換えタンパク質との連結部に導入され、融合部分から組換えタンパク質の分離が可能になり、それに続いて融合タンパク質の精製が実施される。このような酵素およびそれらの同族の認識配列は、Ｆａｃｔｏｒ　Ｘａ、トロンビンおよびエンテロキナーゼを含む。代表的な融合発現ベクターとしては、それぞれ、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、マルトースＥ結合タンパク質またはプロテインＡを標的組換えタンパク質に融合する、ｐＧＥＸ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ｉｎｃ；Ｓｍｉｔｈ，Ｄ．Ｂ．およびＪｏｈｎｓｏｎ，Ｋ．Ｓ．（１９８８）Ｇｅｎｅ　６７：３１－４０）、ｐＭＡＬ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｂｅｖｅｒｌｙ，ＭＡ）ならびにｐＲＩＴ５（Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）が挙げられる。

【０１８３】

精製された融合タンパク質は、ＰＧＣ－１β活性アッセイ（例えば、以下に詳細に記載される直接アッセイまたは競合アッセイ）において利用され得るか、またはＰＧＣ－１βタンパク質に対して特異的な抗体を生成するために利用され得る。好ましい実施形態において、本発明のレトロウイルス発現ベクターにおいて発現されるＰＧＣ－１β融合タンパク質は、照射されたレシピエントにその後移植される骨髄細胞を感染させるために利用され得る。そして被験体レシピエントの病状は、十分な時間（例えば、６週間）が経過した後に調べられる。

【０１８４】

別の実施形態において、本発明の核酸は、哺乳動物発現ベクターを使用して哺乳動物細胞において発現される。哺乳動物発現ベクターの例としては、ｐＣＤＭ８（Ｓｅｅｄ，Ｂ．（１９８７）Ｎａｔｕｒｅ　３２９：８４０）およびｐＭＴ２ＰＣ（Ｋａｕｆｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）ＥＭＢＯ　Ｊ．６：１８７－１９５）が挙げられる。哺乳動物細胞において使用されるとき、発現ベクターの制御機能は、ウイルス制御エレメントによって提供されることが多い。例えば、一般に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス２、サイトメガロウイルスおよびサルウイルス４０由来である。原核細胞と真核細胞との両方に適した他の発現システムは、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ．２ｎｄ　ｅｄ．，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ，１９８９の第１６章および第１７章を参照のこと。

【０１８５】

別の実施形態において、組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞タイプにおいて優先的に核酸の発現を指示することができる（例えば、組織特異的制御エレメントが核酸を発現するために使用される）。組織特異的制御エレメントは、当該分野で公知である。適切な組織特異的プロモーターの非限定的な例としては、肝臓特異的プロモーター（例えば、ヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ（ｈＰＡＨ）遺伝子プロモーター；Ｍａｎｃｉｃｎｉ　ａｎｄ　Ｒｏｙ，（１９９６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．９３，７２８－７３３）；ニューロン特異的プロモーター（例えば、ニューロフィラメントプロモーター；Ｂｙｒｎｅ　ａｎｄ　Ｒｕｄｄｌｅ，１９８９，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：５４７３－５４７７）、アルブミンプロモーター（肝臓特異的；Ｐｉｎｋｅｒｔ　ｅｔ　ａｌ．，１９８７，Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ．１：２６８－２７７）、リンパ系特異的プロモーター（Ｃａｌａｍｅ　ａｎｄ　Ｅａｔｏｎ，１９８８，Ａｄｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４３：２３５－２７５）、特にＴ細胞レセプターのプロモーター（Ｗｉｎｏｔｏ　ａｎｄ　Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，１９８９，ＥＭＢＯ　Ｊ．８：

７２９－７３３）および免疫グロブリン（Ｂａｎｅｒｊｉ ｅｔ ａｌ．，１９８３，Ｃｅｌｌ ３３：７２９－７４０；Ｑｕｅｅｎ ａｎｄ Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，１９８３，Ｃｅｌｌ ３３：７４１－７４８）、膵臓特異的プロモーター（Ｅｄｌｕｎｄ ｅｔ ａｌ．，１９８５，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３０：９１２－９１６）および乳腺特異的プロモーター（例えば、乳清プロモーター；米国特許第４，８７３，３１６号および欧州出願公開番号２６４，１６６）が挙げられる。発生的に制御されるプロモーター、例えば、マウスｈｏｘプロモーター（Ｋｅｓｓｅｌ ａｎｄ Ｇｒｕｓｓ，１９９０，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：３７４－３７９）およびα－フェトプロテインプロモーター（Ｃａｍｐｅｒ ａｎｄ Ｔｉｌｇｈｍａｎ，１９８９，Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．３：５３７－５４６）もまた包含される。

【０１８６】

本発明の方法はさらに、アンチセンス方向で発現ベクターにクローニングされた本発明のＤＮＡ分子を含む組換え発現ベクターを使用し得る。つまり、ＤＮＡ分子は、ＰＧＣ－１β ｍＲＮＡに対してアンチセンスであるＲＮＡ分子の発現を可能にする様式で（ＤＮＡ分子の転写によって）制御配列に作動可能に連結される。種々の細胞タイプにおけるアンチセンスＲＮＡ分子の連続的な発現を指示する、アンチセンス方向でクローニングされた核酸に作動可能に連結された制御配列（例えばウイルスプロモーターおよび／またはエンハンサー）が選択され得るか、またはアンチセンスＲＮＡの構成的な、組織特異的なもしくは細胞タイプ特異的な発現を指示する制御配列が選択され得る。アンチセンス発現ベクターは、アンチセンス核酸が高効率制御領域の制御下で産生される、組換えプラスミド、ファージミドまたは弱毒ウイルスの形態であり得、それらの活性は、ベクターが導入される細胞タイプによって決定され得る。アンチセンス遺伝子を使用した遺伝子発現の制御の議論については、Ｗｅｉｎｔｒａｕｂ，Ｈ．ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ ＲＮＡ ａｓ ａ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｔｏｏｌ ｆｏｒ ｇｅｎｅｔｉｃ ａｎａｌｙｓｉｓ，Ｒｅｖｉｅｗｓ－Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，Ｖｏｌ．１（１）１９８６を参照のこと。

【０１８７】

本発明の別の局面は、本発明のＰＧＣ－１β核酸分子（例えば、組換え発現ベクター内のＰＧＣ－１β核酸分子または宿主細胞のゲノムの特異的部位に相同的に組み換えることが可能な配列を有するＰＧＣ－１β核酸分子）が導入される宿主細胞の使用に関する。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書中で交換可能に使用される。このような用語は、特定の被験体細胞だけでなく、このような細胞の子孫または可能性のある子孫にも適用されることが理解される。一定の改変が、変異または環境の影響のいずれかに起因して次の世代に起こりうるので、そのような子孫は、実際は親細胞と同一ではないが、やはり本明細書中で使用される用語の範囲内に含まれる。

【０１８８】

宿主細胞は、任意の原核細胞または真核細胞であり得る。例えば、ＰＧＣ－１βタンパク質は、Ｅ．ｃｏｌｉなどの細菌細胞、昆虫細胞、酵母または哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）もしくはＣＯＳ細胞）において発現され得る。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

【０１８９】

ベクターＤＮＡは、通常の形質転換またはトランスフェクション技術を介して原核細胞または真核細胞に導入され得る。本明細書中で使用されるとき、用語「形質転換」および「トランスフェクション」は、外来核酸（例えば、ＤＮＡ）を宿主細胞に導入するための種々の当該分野で認識されている技術のことをいうと意図される。それらの技術としては、リン酸カルシウム共沈もしくは塩化カルシウム共沈、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクションまたはエレクトロポレーションが挙げられる。宿主細胞を形質転換するかまたはトランスフェクトするための適切な方法は、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ．２ｎｄ、ｅｄ．、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａ

ｔｏｒｙ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、ＮＹ、１９８９）および他の実験室の手引書に見られ得る。

【０１９０】

本発明の方法において使用される宿主細胞（例えば、培養された原核宿主細胞または真核宿主細胞）は、ＰＧＣ－１βタンパク質を産生（すなわち、発現）するために使用され得る。従って、本発明はさらに、本発明の宿主細胞を使用してＰＧＣ－１βタンパク質を産生するための方法を提供する。１つの実施形態において、その方法は、（ＰＧＣ－１βタンパク質をコードする組換え発現ベクターが導入されている）本発明の宿主細胞を適切な培地で培養する工程を含み、その結果、ＰＧＣ－１βタンパク質が産生される。別の実施形態において、この方法はさらに、その培地または宿主細胞からＰＧＣ－１βタンパク質を単離する工程を含む。

【０１９１】

本発明の宿主細胞はまた、非ヒトトランスジェニック動物の作製に使用され得る。例えば、１つの実施形態において、本発明の宿主細胞は、本発明のマーカーに対応するポリペプチドをコードする配列が導入されている、受精した卵母細胞または胚性幹細胞である。そしてこのような宿主細胞は、本発明のマーカータンパク質をコードする外来性配列がそれらのゲノムに導入されている非ヒトトランスジェニック動物または本発明配列のマーカーに対応するポリペプチドをコードする内在性遺伝子（単数または複数）が変更されている相同組換え動物を作製するために使用され得る。このような動物は、ＰＧＣ－１βの機能および／または活性を研究するために、ＰＧＣ－１βポリペプチド活性の調節因子を同定および／または評価するために、ならびに治療薬または診断分子の前臨床試験において、マーカーの発見あるいは評価（例えば、治療的マーカーおよび診断マーカーの発見または評価）のためにまたは薬効および特異性の代用物として有用である。

【０１９２】

本発明のトランスジェニック動物は、ＰＧＣ－１βに対応するポリペプチドをコードする核酸を受精した卵母細胞の雄性前核に（例えば、マイクロインジェクション、レトロウイルス感染によって）導入することおよび卵母細胞が偽妊娠の雌里親動物内で発生することを可能にすることによって作製され得る。イントロン配列およびポリアデニル化シグナルはまた、導入遺伝子の発現の効率を増加させるために導入遺伝子に含まれ得る。組織特異的制御配列（単数および複数）は、特定の細胞に本発明のポリペプチドの発現を指示する導入遺伝子に作動可能に連結され得る。胚操作およびマイクロインジェクションを介してトランスジェニック動物、特に、マウスなどの動物を発生させるための方法は、当該分野で慣習的になっており、例えば、米国特許第４，７３６，８６６号および同４，８７０，００９号、米国特許第４，８７３，１９１号およびＨｏｇａｎ、Ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｎｇ ｔｈｅ Ｍｏｕｓｅ Ｅｍｂｒｙｏ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、Ｎ．Ｙ．、１９８６に記載されている。同様の方法が、他のトランスジェニック動物の作製のために使用される。トランスジェニック動物創始者は、ゲノムにおける導入遺伝子の存在および／または動物の組織もしくは細胞において導入遺伝子をコードするｍＲＮＡの発現に基づいて同定され得る。そしてトランスジェニック動物創始者は、導入遺伝子を保持するさらなる動物を繁殖するために使用され得る。さらに、導入遺伝子を保持するトランスジェニック動物はさらに、他の導入遺伝子を保持する他のトランスジェニック動物と交配され得る。

【０１９３】

相同組換え動物を作製するために、欠失、付加または置換が導入されている本発明のマーカーに対応するポリペプチドをコードする遺伝子の少なくとも一部を有するベクターが調製され、それによって遺伝子を変更させる（例えば、機能的に破壊する）。好ましい実施形態において、ベクターは、相同組換えに基づいて、内在性遺伝子が機能的に破壊されるように設計される（すなわち、もはや機能タンパク質をコードできなくなる；「ノック

アウト」ベクターとも呼ばれる）。あるいは、ベクターは、相同組換えに基づいて、内在性遺伝子を変異させるか、そうではなく変更されるが、なおも機能タンパク質をコードするように設計され得る（例えば、上流制御領域が変更され得、それによって内在性タンパク質の発現を変化させる）。相同組換えベクターにおいて、遺伝子の変更された部分は、相同組換えがベクターによって運搬される外因性遺伝子と胚性幹細胞内の内在性遺伝子との間に起こるようにするために遺伝子の付加的核酸によってその５’および３’末端に隣接される。付加的フランキング核酸配列は、内在性遺伝子との相同組換えが成功するのに十分な長さである。代表的には、数キロベースのフランキングＤＮＡ（５’および３’末端両方での）がベクター内に含まれる（相同組換えベクターの説明については、例えば、Ｔｈｏｍａｓ ａｎｄ Ｃａｐｅｃｃｈｉ，１９８７，Ｃｅｌｌ ５１：５０３を参照のこと）。ベクターは、胚性幹細胞株に導入され（例えば、エレクトロポレーションによって）、そして導入された遺伝子が内在性遺伝子と相同的に組み換わっている細胞が選択される（例えば、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，１９９２，Ｃｅｌｌ ６９：９１５を参照のこと）。そして選択された細胞は、動物（例えば、マウス）の胚盤胞に注入され、凝集キメラを形成する（例えば，Ｂｒａｄｌｅｙ，Ｔｅｒａｔｏｃａｒｃｉｎｏｍａｓ ａｎｄ Ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｒｏｂｅｒｔｓｏｎ，Ｅｄ．，ＩＲＬ，Ｏｘｆｏｒｄ，１９８７，ｐｐ．１１３－１５２を参照のこと）。そしてキメラ胚は、適切な偽妊娠の雌里親動物に移植され得、胚が長期間保たれる。それらの生殖細胞に相同組換えされたＤＮＡを含む子孫は、その動物のすべての細胞が、導入遺伝子の生殖細胞系列伝達による相同組換えされたＤＮＡを有する動物を繁殖するために使用され得る。相同組換えベクターおよび相同組換え動物を構築するための方法はさらに、Ｂｒａｄｌｅｙ（１９９１）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２：８２３－８２９ならびにＰＣＴ公開番号ＷＯ９０／１１３５４、ＷＯ９１／０１１４０、ＷＯ９２／０９６８およびＷＯ９３／０４１６９に記載されている。

【０１９４】

別の実施形態において、導入遺伝子の発現が制御可能な選択されたシステムを有するトランスジェニック非ヒト動物が作製され得る。このような系の１つの例は、バクテリオファージＰ１のｃｒｅ／ｌｏｘＰリコンビナーゼシステムである。ｃｒｅ／ｌｏｘＰリコンビナーゼシステムの説明については、例えば、Ｌａｋｓｏ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：６２３２－６２３６を参照のこと。リコンビナーゼシステムの別の例は、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅのＦＬＰリコンビナーゼシステムである（Ｏ’Ｇｏｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５１：１３５１－１３５５）。ｃｒｅ／ｌｏｘＰリコンビナーゼシステムが、導入遺伝子の発現を制御するために使用される場合、Ｃｒｅリコンビナーゼと選択されたタンパク質との両方をコードする導入遺伝子を有する動物が必要になる。このような動物は、「ダブル」トランスジェニック動物の構築を介して（例えば、一方が選択されたタンパク質をコードする導入遺伝子を有し、他方がリコンビナーゼをコードする導入遺伝子を有する２匹のトランスジェニック動物を交配することによって）提供され得る。

【０１９５】

本明細書中に記載される非ヒトトランスジェニック動物のクローンはまた、Ｗｉｌｍｕｔ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｎａｔｕｒｅ ３８５：８１０－８１３ならびにＰＣＴ公開番号ＷＯ９７／０７６６８およびＷＯ９７／０７６６９に記載されている方法に従って作製され得る。

【０１９６】

（Ｖ．本発明の方法において使用される単離された核酸分子）

単離されたヒトＰＧＣ－１β ｃＤＮＡのヌクレオチド配列およびヒトＰＧＣ－１βポリペプチドの予想されるアミノ酸配列をそれぞれ配列番号１および２に示す。ヒトＰＧＣ－１βのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列はまた、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番

号ＧＩ：３１５４３３９１に記載されている。

【０１９７】

本発明の方法は、ＰＧＣ－１βタンパク質またはそれらの生物学的に活性な部分をコードする単離された核酸分子、ならびにＰＧＣ－１βをコードする核酸分子（例えば、ＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡ）およびフラグメントを同定するためのハイブリダイゼーションプローブとしての使用に十分な核酸フラグメントおよびＰＧＣ－１β核酸分子の増幅または変異についてのＰＣＲプライマーとしての使用のためのフラグメントの使用を含む。本明細書中で使用されるとき、用語「核酸分子」は、ＤＮＡ分子（例えば、ｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡ）およびＲＮＡ分子（例えば、ｍＲＮＡ）およびヌクレオチドアナログを使用して生成されるＤＮＡまたはＲＮＡのアナログを含むと意図される。核酸分子は、一本鎖または二本鎖であり得るが、好ましくは二本鎖ＤＮＡである。

【０１９８】

本発明の方法において使用される核酸分子（例えば、配列番号１またはその一部のヌクレオチド配列を有する核酸分子）は、標準的な分子生物学技術および本明細書中で提供される配列情報を使用して単離され得る。配列番号１の核酸配列の全部または一部をハイブリダイゼーションプローブとして使用して、ＰＧＣ－１β核酸分子が、標準的なハイブリダイゼーション技術およびクローニング技術（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．，Ｆｒｉｔｓｈ，Ｅ．Ｆ．　ａｎｄ　Ｍａｎｉａｔｉｓ，Ｔ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ．２ｎｄ，ｅｄ．，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ，１９８９に記載されているような）を使用して単離され得る。

【０１９９】

さらに、配列番号１の全部または一部を含む核酸分子は、配列番号１の配列に基づいて設計された合成オリゴヌクレオチドプライマーを使用してポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって単離され得る。

【０２００】

本発明の方法において使用される核酸は、テンプレートとしてｃＤＮＡ、ｍＲＮＡ、あるいは、ゲノムＤＮＡおよび適切なオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、標準的なＰＣＲ増幅技術に従って、増幅され得る。さらに、ＰＧＣ－１βヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドは、標準的な合成技術（例えば、自動ＤＮＡ合成装置を使用して）によって調製され得る。

【０２０１】

好ましい実施形態において、本発明の方法において使用される単離された核酸分子は、配列番号１に示されるヌクレオチド配列、配列番号１に示されるヌクレオチド配列の相補体またはこれらのヌクレオチド配列の任意の一部を含む。配列番号１に示されるヌクレオチド配列に相補的な核酸分子は、配列番号１に示されるヌクレオチド配列に十分に相補的な核酸配列であり、配列番号１に示されるヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができ、それによって安定な二重鎖を形成する。

【０２０２】

なおも別の好ましい実施形態において、本発明の方法において使用される単離された核酸分子は、配列番号１に示されるヌクレオチド配列の全体の長さまたはこのヌクレオチド配列の任意の一部に対して少なくとも約５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％以上同一であるヌクレオチド配列を含む。

【０２０３】

さらに、本発明の方法において使用される核酸分子は、配列番号１の核酸配列の一部、例えば、プローブもしくはプライマーとして使用され得るフラグメントまたはＰＧＣ－１βタンパク質の一部（例えば、ＰＧＣ－１βタンパク質の生物学的に活性な部分）をコードするフラグメントのみを含み得る。プローブ／プライマーは、代表的には実質的に精製

されたオリゴヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは、代表的には、配列番号１のアンチセンス配列の配列番号１のセンス配列または配列番号１の天然に存在する対立遺伝子改変体もしくは変異体の、少なくとも約１２または１５、好ましくは約２０または２５、より好ましくは約３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５または７５の連続したヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。１つの実施形態において、本発明の方法において使用される核酸分子は、１００、１００～２００、２００～３００、３００～４００、４００～５００、５００～６００、６００～７００、７００～８００、８００～９００、９００～１０００、１０００～１１００、１１００～１２００、１２００～１３００またはそれ以上のヌクレオチド長より長く、そしてストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号１の核酸分子にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む。

【０２０４】

本明細書中で使用されるとき、用語「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」は、互いに有意に同一または相同であるヌクレオチド配列が互いにハイブリダイズされたままである、ハイブリダイゼーションおよび洗浄のための条件を説明すると意図される。好ましくは、その条件は、少なくとも約７０％、より好ましくは少なくとも約８０％、なおもより好ましくは少なくとも約８５％または９０％互いに同一の配列が、互いにハイブリダイズされたままであるような条件である。このようなストリンジェントな条件は、当業者に公知であり、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．（１９９５）の第２、４および６節に見られ得る。付加的なストリンジェントな条件は、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ（１９８９）、第７、９および１１章に見られ得る。好ましい、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の非限定的な例としては、４×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（ＳＳＣ）中、約６５～７０℃でのハイブリダイゼーション（または５０％ホルムアミドを加えた４×ＳＳＣ中、約４２～５０℃でのハイブリダイゼーション）に続く１×ＳＳＣ中、約６５～７０℃での１回以上の洗浄が挙げられる。好ましい、高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の非限定的な例としては、１×ＳＳＣ中、約６５～７０℃でのハイブリダイゼーション（または５０％ホルムアミドを加えた１×ＳＳＣ中、約４２～５０℃でのハイブリダイゼーション）に続く０．３×ＳＳＣ中、約６５～７０℃での１回以上の洗浄が挙げられる。好ましい、低ストリンジェンシーなハイブリダイゼーション条件の非限定的な例としては、４×ＳＳＣ中、約５０～６０℃でのハイブリダイゼーション（または５０％ホルムアミドを加えた６×ＳＳＣ中、約４０～４５℃でのハイブリダイゼーション）に続く２×ＳＳＣ中、約５０～６０℃での１回以上の洗浄が挙げられる。上で列挙した値の中間の範囲（例えば、６５～７０℃または４２～５０℃で）はまた、本発明によって包含されると意図される。ＳＳＰＥ（１×ＳＳＰＥは、０．１５Ｍ ＮａＣｌ、１０ｍＭ NaH_2PO_4および１．２５ｍＭ ＥＤＴＡ，ｐＨ７．４である）は、ハイブリダイゼーション緩衝液および洗浄緩衝液におけるＳＳＣ（１×ＳＳＣは、０．１５Ｍ ＮａＣｌおよび１５ｍＭクエン酸ナトリウムである）と置換され得る；洗浄は、ハイブリダイゼーションが完了した後に各１５分間実施される。５０塩基対長未満であると予測されるハイブリッドに対するハイブリダイゼーション温度は、融解温度（T_m）が以下の等式に従って決定されるとき、ハイブリッドのT_mより５～１０℃低くするべきである。１８塩基対長未満のハイブリッドに対しては、T_m（℃）＝２（Ａ＋Ｔ塩基の数）＋４（Ｇ＋Ｃ塩基の数）。１８～４９塩基対長のハイブリッドに対しては、T_m（℃）＝８１．５＋１６．６（$\log_{10}$［Na^+］）＋０．４１（％Ｇ＋Ｃ）－（６００／Ｎ）、ここでＮは、ハイブリッドにおける塩基の数であり、［Na^+］は、ハイブリダイゼーション緩衝液中のナトリウムイオンの濃度である（［Na^+］は、１×ＳＳＣ＝０．１６５Ｍ）。付加的な試薬が、膜（例えば、ニトロセルロース膜またはナイロン膜）への核酸分子の非特異的ハイブ

リダイゼーションを減少させるためにハイブリダイゼーション緩衝液および／または洗浄緩衝液に添加され得ることは当業者によって認識され得る。これらの試薬としては、ブロッキング物質（例えば、ＢＳＡまたはサケもしくはニシンの精子キャリアＤＮＡ）、界面活性剤（例えば、ＳＤＳ）、キレート剤（例えば、ＥＤＴＡ）、Ｆｉｃｏｌｌ、ＰＶＰなどが挙げられるが、これらに限定されない。ナイロン膜を使用するとき、特に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の追加の好ましい非限定的な例は、０．２５～０．５Ｍ NaH_2PO_4、７％ＳＤＳ、約６５℃でのハイブリダイゼーション、それに続く０．０２Ｍ NaH_2PO_4、１％ＳＤＳ、６５℃での１回以上の洗浄であり、例えば、Ｃｈｕｒｃｈ ａｎｄ Ｇｉｌｂｅｒｔ（１９８４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１：１９９１－１９９５を参照のこと（あるいは、０．２×ＳＳＣ、１％ＳＤＳ）。

【０２０５】

好ましい実施形態において、プローブはさらに、それらに結合される標識群を含み、例えば、標識群は、放射性同位体、蛍光性化合物、酵素または酵素補助因子であり得る。このようなプローブは、例えば、被験体由来の細胞のサンプルにおけるＰＧＣ－１βをコードする核酸のレベルを計測すること（例えば、ＰＧＣ－１β ｍＲＮＡレベルを検出することまたはゲノムのＰＧＣ－１β遺伝子が変異しているかまたは欠失しているかを判定すること）によってＰＧＣ－１βタンパク質を異所性発現する細胞または組織を同定するための診断試験キットの一部として使用され得る。

【０２０６】

本発明の方法はさらに、遺伝暗号の縮重のために配列番号１に示されるヌクレオチド配列と異なり、従って配列番号１に示されるヌクレオチド配列によってコードされるものと同じＰＧＣ－１βタンパク質をコードする核酸分子の使用を包含する。別の実施形態において、本発明の方法に含まれる単離された核酸分子は、配列番号２に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する。

【０２０７】

本発明の方法はさらに、ヒトＰＧＣ－１βの対立遺伝子改変体（例えば、機能的対立遺伝子改変体および非機能的対立遺伝子改変体）の使用を含む。機能的対立遺伝子改変体は、ＰＧＣ－１β活性を維持するヒトＰＧＣ－１βタンパク質の天然に存在するアミノ酸配列改変体である。機能的対立遺伝子改変体は、代表的には配列番号２の１以上のアミノ酸の保存的置換もしくは置換、欠失またはタンパク質の重要でない領域における重要でない残基の挿入のみを含み得る。

【０２０８】

非機能的対立遺伝子改変体は、ＰＧＣ－１β活性を有さないヒトＰＧＣ－１βタンパク質の天然に存在するアミノ酸配列改変体である。非機能的対立遺伝子改変体は、代表的には非保存的置換、欠失もしくは挿入または配列番号２のアミノ酸配列の未熟な切断またはタンパク質の重要な残基もしくは重要な領域における置換、挿入もしくは欠失を含み得る。

【０２０９】

本発明の方法はさらに、ヒトＰＧＣ－１βタンパク質の非ヒトオルソログを使用し得る。ヒトＰＧＣ－１βタンパク質のオルソログは、非ヒト生物から単離され、そして同じＰＧＣ－１β活性を有するタンパク質である。

【０２１０】

本発明の方法はさらに、変異が導入されている配列番号１またはその一部のヌクレオチド配列を含む核酸分子の使用を含む。変異は、「非必須」アミノ酸残基または「必須」アミノ酸残基でのアミノ酸置換を導き得る。「非必須」アミノ酸残基は、生物学的活性を変更することなくＰＧＣ－１βの野生型配列（例えば、配列番号２の配列）から変更され得る残基であり、一方、「必須」アミノ酸残基は、生物学的活性が必要である。例えば、本発明のＰＧＣ－１βタンパク質とＰＧＣ－１ファミリーとの他のメンバーの間で保存されているアミノ酸残基は、変更を受け入れられない可能性がある。

【０２１１】
変異は、標準的な技術（例えば、部位特異的突然変異生成およびＰＣＲ媒介突然変異生成）によって配列番号１に導入され得る。好ましくは、保存的アミノ酸置換は、１以上の予想される非必須アミノ酸残基でなされる。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されるものの１つである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で定義されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、無電荷極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β分枝側鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が挙げられる。従って、ＰＧＣ－１βタンパク質における予測される非必須アミノ酸残基は、好ましくは同じ側鎖ファミリー由来の別のアミノ酸残基で置換される。あるいは、別の実施形態において、変異は、ＰＧＣ－１βコード配列の全部または一部について無作為に（例えば、飽和突然変異生成によって）導入され得る。そして生じた変異体は、活性を保持する変異体を同定するためにＰＧＣ－１β生物学的活性についてスクリーニングされ得る。配列番号１の突然変異生成後、コードされるタンパク質は、組換え的に発現され得、そしてタンパク質の活性は、本明細書中に記載されるアッセイを使用して測定され得る。

【０２１２】
本発明の別の局面は、配列番号１のヌクレオチド配列に対してアンチセンスである単離された核酸分子の使用に関する。「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードする「センス」核酸に相補的である（例えば、二本鎖ｃＤＮＡ分子のコーディング鎖に相補的か、またはｍＲＮＡ配列に相補的である）ヌクレオチド配列を包含する。従って、アンチセンス核酸は、センス核酸に水素結合し得る。アンチセンス核酸は、ＰＧＣ－１βコーディング鎖全体またはその一部のみに相補的であり得る。１つの実施形態において、アンチセンス核酸分子は、ＰＧＣ－１βをコードするヌクレオチド配列のコーディング鎖の「コード領域」に対してアンチセンスである。用語「コード領域」とは、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含むヌクレオチド配列の領域のことをいう。別の実施形態において、アンチセンス核酸分子は、ＰＧＣ－１βをコードするヌクレオチド配列のコーディング鎖の「非コード領域」に対してアンチセンスである。用語「非コード領域」とは、アミノ酸に翻訳されない、コード領域に隣接する５’および３’配列のことをいう（５’非翻訳領域および３’非翻訳領域とも呼ばれる）。

【０２１３】
本明細書中に開示されるＰＧＣ－１βをコードするコーディング鎖配列を所与として、本発明のアンチセンス核酸は、ＷａｔｓｏｎおよびＣｒｉｃｋの塩基対の法則に従って設計され得る。アンチセンス核酸分子は、ＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡのコード領域全体に相補的であり得るが、より好ましくはＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡのコード領域または非コード領域の一部のみに対してアンチセンスであるオリゴヌクレオチドである。
例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡの翻訳開始部位を取り囲む領域に相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５または５０ヌクレオチド長であり得る。本発明のアンチセンス核酸は、当該分野で公知の手順を使用した化学的合成および酵素的ライゲーション反応を使用して構築され得る。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然に存在するヌクレオチドを使用して化学的に合成され得るか、または分子の生物学的安定性を増大させるか、もしくはアンチセンス核酸とセンス核酸との間で形成される二重鎖の物理的安定性を増大させるように設計された様々に改変されたヌクレオチド（例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換

ヌクレオチド）が使用され得る。アンチセンス核酸を生成するために使用され得る改変ヌクレオチドの例としては、５－フルオロウラシル、５－ブロモウラシル、５－クロロウラシル、５－ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、４－アセチルシトシン、５－（カルボキシヒドロキシルメチル）ウラシル、５－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオウリジン、５－カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、β－Ｄ－ガラクトシルキュェオシン（ｇａｌａｃｔｏｓｙｌｑｕｅｏｓｉｎｅ）、イノシン、Ｎ６－イソペンテニルアデニン、１－メチルグアニン、１－メチルイノシン、２，２－ジメチルグアニン、２－メチルアデニン、２－メチルグアニン、３－メチルシトシン、５－メチルシトシン、Ｎ６－アデニン、７－メチルグアニン、５－メチルアミノメチルウラシル、５－メトキシアミノメチル－２－チオウラシル、β－Ｄ－マンノシルキュェオシン（ｍａｎｎｏｓｙｌｑｕｅｏｓｉｎｅ）、５’－メトキシカルボキシメチルウラシル、５－メトキシウラシル、２－メチルチオ－Ｎ６－イソペンテニルアデニン、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、ワイブトキソシン、プソイドウラシル、キュェオシン（ｑｕｅｏｓｉｎｅ）、２－チオシトシン、５－メチル－２－チオウラシル、２－チオウラシル、４－チオウラシル、５－メチルウラシル、ウラシル－５－オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、５－メチル－２－チオウラシル、３－（３－アミノ－３－Ｎ－２－カルボキシプロピル）ウラシル、（ａｃｐ３）ｗおよび２，６－ジアミノプリンが挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス方向にサブクローニングされた発現ベクターを使用して生物学的に生成され得る（すなわち、挿入された核酸から転写されるＲＮＡが、目的の標的核酸に対してアンチセンス方向であり得る）。本発明の方法において使用されるアンチセンス核酸分子はさらに、以下のＩＶ節に記載される。

【０２１４】

なおも別の実施形態において、本発明の方法において使用されるＰＧＣ－１β核酸分子は、例えば、安定性、ハイブリダイゼーションまたは分子の溶解性を改善するために、塩基部分、糖部分またはリン酸骨格において改変され得る。例えば、核酸分子のデオキシリボースリン酸骨格は、ペプチド核酸を生成するために改変され得る（Ｈｙｒｕｐ Ｂ．ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ ＆ Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ４（１）：５－２３を参照のこと）。本明細書中で使用されるとき、用語「ペプチド核酸」または「ＰＮＡ」とは、デオキシリボースリン酸骨格が擬ペプチド骨格に置換されていて、４種類の天然の核酸塩基のみを保持している核酸模倣物（例えば、ＤＮＡ模倣物）のことをいう。ＰＮＡの中性の骨格は、低イオン強度の条件下でＤＮＡおよびＲＮＡに特異的なハイブリダイゼーションが可能になることが示されている。ＰＮＡオリゴマーの合成は、Ｈｙｒｕｐ Ｂ．ｅｔ ａｌ．（１９９６）前出；Ｐｅｒｒｙ－Ｏ’Ｋｅｅｆｅ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９３：１４６７０－６７５に記載されているような標準的な固相ペプチド合成プロトコールを使用して実施され得る。

【０２１５】

ＰＧＣ－１β核酸分子のＰＮＡは、本明細書中に記載される治療的適用および診断適用に使用され得る。例えば、ＰＮＡは、例えば、転写もしくは翻訳アレストの誘導または複製の阻害によって遺伝子発現の配列特異的調節についてのアンチセンスまたはアンチジーン物質として使用され得る。ＰＧＣ－１β核酸分子のＰＮＡはまた、遺伝子における単一塩基対変異の解析（例えば、ＰＮＡ指向性ＰＣＲクランピングによって）；他の酵素（例えば、Ｓ１ヌクレアーゼ（Ｈｙｒｕｐ Ｂ．ｅｔ ａｌ．（１９９６）前出））と組み合わせて使用されるときの「人工制限酵素」として；またはＤＮＡ配列決定またはハイブリダイゼーションのためのプローブもしくはプライマーとして（Ｈｙｒｕｐ Ｂ．ｅｔ ａｌ．（１９９６）前出；Ｐｅｒｒｙ－Ｏ’Ｋｅｅｆｅ ｅｔ ａｌ．（１９９６）前出）に使用され得る。

【０２１６】

別の実施形態において、ＰＧＣ－１βのＰＮＡは、（例えば、それらの安定性または細胞の取り込みを促進するために）、ＰＮＡに脂肪親和性基または他の補助基を結合するこ

とによってか、ＰＮＡ－ＤＮＡキメラの形成によってか、またはリポソームもしくは当該分野で公知の薬物送達の他の技術の使用によって改変され得る。例えば、ＰＮＡおよびＤＮＡの有利な特性を組み合わし得るＰＧＣ－１β核酸分子のＰＮＡ－ＤＮＡキメラが生成され得る。このようなキメラによって、ＤＮＡ認識酵素（例えば、ＲＮアーゼＨおよびＤＮＡポリメラーゼ）がＤＮＡ部分と相互作用することを可能にし、ＰＮＡ部分が高い結合親和性および特異性を提供し得る。ＰＮＡ－ＤＮＡキメラは、塩基の積み重ね、核酸塩基間の結合数および方向の点から選択された適切な長さのリンカーを使用して結合され得る（Ｈｙｒｕｐ Ｂ．ｅｔ ａｌ．（１９９６）前出）。ＰＮＡ－ＤＮＡキメラの合成は、Ｈｙｒｕｐ Ｂ．ｅｔ ａｌ．（１９９６）前出およびＦｉｎｎ Ｐ．Ｊ．ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２４（１７）：３３５７－６３に記載されるように実施され得る。例えば、ＤＮＡ鎖は、標準的なホスホルアミダイト結合化学を使用して固体支持物上で合成され得、そして改変ヌクレオシドアナログ（例えば、５’－（４－メトキシトリチル）アミノ－５’－デオキシ－チミジンホスホルアミダイト）は、ＰＮＡとＤＮＡの５’末端の間で使用され得る（Ｍａｇ，Ｍ．ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．１７：５９７３－８８）。そしてＰＮＡモノマーは、５’ＰＮＡセグメントおよび３’ＤＮＡセグメントを用いてキメラ分子を生成するために段階的な様式で結合される（Ｆｉｎｎ Ｐ．Ｊ．ｅｔ ａｌ．（１９９６）前出）。あるいは、キメラ分子は、５’ＤＮＡセグメントおよび３’ＰＮＡセグメントを用いて合成され得る（Ｐｅｔｅｒｓｅｒ，Ｋ．Ｈ．ｅｔ ａｌ．（１９７５）Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．５：１１１９－１１１２４）。

【０２１７】

他の実施形態において、本発明の方法において使用されるオリゴヌクレオチドは、ペプチド（例えば、インビボで宿主細胞レセプターを標的化するために）などの他の付加基または細胞膜（例えば、Ｌｅｔｓｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：６５５３－６５５６；Ｌｅｍａｉｔｒｅ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８４：６４８－６５２；ＰＣＴ公開番号ＷＯ８８／０９８１０を参照のこと）または血液脳関門（例えば、ＰＣＴ公開番号ＷＯ８９／１０１３４を参照のこと）を通過する輸送を促進する物質を含み得る。さらに、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションによって誘発される切断物質（例えば、Ｋｒｏｌ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｂｉｏ－Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ６：９５８－９７６を参照のこと）または挿入物質を用いて改変され得る。（例えば、Ｚｏｎ（１９８８）Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．５：５３９－５４９を参照のこと。）この目的を達成するために、オリゴヌクレオチドは、別の分子（例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーションによって誘発される架橋物質、輸送物質またはハイブリダイゼーションによって誘発される切断物質）と結合体化され得る。

【０２１８】

（ＶＩ．本発明の方法において使用される単離されたＰＧＣ－１βタンパク質および抗ＰＧＣ－１β抗体）

本発明の方法は、抗ＰＧＣ－１β抗体を惹起させる免疫原としての使用に適した単離されたＰＧＣ－１βタンパク質およびそれらの生物学的に活性な部分、ならびにポリペプチドフラグメントの使用を含む。１つの実施形態において、未変性ＰＧＣ－１βタンパク質は、標準的なタンパク質精製技術を使用して適切な精製機構によって細胞または組織供給源から単離され得る。別の実施形態において、ＰＧＣ－１βタンパク質は、組換えＤＮＡ技術によって生成される。組換え発現の代わりに、ＰＧＣ－１βタンパク質またはポリペプチドは、標準的なペプチド合成技術を使用して化学的に合成され得る。

【０２１９】

本明細書中で使用されるとき、ＰＧＣ－１βタンパク質の「生物学的に活性な部分」は、ＰＧＣ－１β活性を有するＰＧＣ－１βタンパク質のフラグメントを含む。ＰＧＣ－１βタンパク質の生物学的に活性な部分は、完全長ＰＧＣ－１βタンパク質より少ないアミノ酸を含み、そしてＰＧＣ－１βタンパク質の少なくとも１つの活性を示す、ＰＧＣ－１

βタンパク質のアミノ酸配列と十分に同一か、またはそれ由来のアミノ酸配列（例えば、配列番号２に示されるアミノ酸配列）を含むペプチドを含む。代表的には、生物学的に活性な部分は、ＰＧＣ－１βタンパク質の少なくとも１つの活性を有するドメインまたはモチーフ（例えば、アポトーシスの活性の制御に関わると考えられているＰＧＣ－１βタンパク質のＮ末端の領域）を含む。ＰＧＣ－１βタンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、２５、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２５０、３００以上のアミノ酸長であるポリペプチドであり得る。ＰＧＣ－１βタンパク質の生物学的に活性な部分は、ＰＧＣ－１β活性を調節する物質を開発するための標的として使用され得る。

【０２２０】

好ましい実施形態において、本発明の方法において使用されるＰＧＣ－１βタンパク質は、配列番号２に示されるアミノ酸配列を有する。他の実施形態において、ＰＧＣ－１βタンパク質は、配列番号２に実質的に同一であり、そして配列番号２のタンパク質機能的活性を保持するが、上のＶ節に詳細に記載されているように天然の対立遺伝子の変異体または突然変異生成に起因してアミノ酸配列が異なる。従って、別の実施形態において、本発明の方法において使用されるＰＧＣ－１βタンパク質は、配列番号２と少なくとも約５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％以上同一のアミノ酸配列を含むタンパク質である。

【０２２１】

２つのアミノ酸配列または２つの核酸配列の同一性パーセントを決定するために、その配列を最適な比較目的のためにアラインメントする（例えば、最適なアラインメントのために第１アミノ酸配列および第２アミノ酸配列または第１核酸配列および第２核酸配列の一方またはその両方においてギャップが導入され得、そして非同一配列は、比較目的のために無視され得る）。好ましい実施形態において、比較目的のためにアラインメントされる参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも３０％、好ましくは少なくとも４０％、より好ましくは少なくとも５０％、なおもより好ましくは少なくとも６０％およびなおもより好ましくは少なくとも７０％、８０％または９０％である（例えば、５００アミノ酸残基を有する配列番号２のＰＧＣ－１βアミノ酸配列に対して第２配列をアラインメントするとき、少なくとも７５、好ましくは少なくとも１５０、より好ましくは少なくとも２２５、なおもより好ましくは少なくとも３００およびなおもより好ましくは少なくとも４００以上のアミノ酸残基がアラインメントされる）。そして対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置におけるアミノ酸残基またはヌクレオチドが比較される。第１配列における位置が第２配列における対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占められるとき、その分子は、その位置において同一である（本明細書中で使用されるとき、アミノ酸または核酸「同一性」は、アミノ酸または核酸「相同性」と等価である）。２つの配列間の同一性パーセントは、配列によって共有される同一の位置の数の関数であり、ギャップの数および各ギャップの長さを考慮して、２つの配列の最適なアラインメントのために導入される必要がある。

【０２２２】

配列の比較および２つの配列間の同一性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成され得る。好ましい実施形態において、２つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、Ｂｌｏｓｕｍ　６２行列またはＰＡＭ２５０行列のいずれかおよび１６、１４、１２、１０、８、６または４のギャップウェイト（ｇａｐ　ｗｅｉｇｈｔ）および１、２、３、４、５または６のレングスウェイト（ｌｅｎｇｔｈ　ｗｅｉｇｈｔ）を使用したＧＣＧソフトウェアパッケージ内のＧＡＰプログラムに組み込まれているＮｅｅｄｌｅｍａｎおよびＷｕｎｓｃｈ（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４４－４５３（１９７０））アルゴリズム（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｇｃｇ．ｃｏｍにて入手可能）を使用して決定される。なおも別の好ましい実施形態において、２つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、ＮＷＳｇａｐｄｎａ．ＣＭＰ行列および４０、５０、６０、７０または８０のギャップウェイトおよび１、２、３、４、５または６のレングスウェイトを使用したＧＣＧソ

フトウェアパッケージ内のＧＡＰプログラム（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｇｃｇ．ｃｏｍにて入手可能）を使用して決定される。別の実施形態において、２つのアミノ酸配列間または２つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、ＰＡＭ１２０重みづけ残基表、１２のギャップレングスペナルティ（ｇａｐ　ｌｅｎｇｔｈ　ｐｅｎａｌｔｙ）および４のギャップペナルティを使用したＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０または２．０Ｕ）に組み込まれているＥ．ＭｅｙｅｒｓおよびＷ．Ｍｉｌｌｅｒのアルゴリズム（Ｃｏｍｐｕｔ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｓｃｉ．４：１１－１７（１９８８））を使用して決定される。

【０２２３】

本発明の方法はまた、ＰＧＣ－１βキメラタンパク質または融合タンパク質を使用し得る。本明細書中で使用されるとき、ＰＧＣ－１β「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、非ＰＧＣ－１βポリペプチドに作動可能に連結されたＰＧＣ－１βポリペプチドを含む。「ＰＧＣ－１βポリペプチド」とは、ＰＧＣ－１β分子に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドのことをいい、他方では「非ＰＧＧ－１βポリペプチド」とは、ＰＧＣ－１βタンパク質に実質的に相同でないタンパク質（例えば、ＰＧＣ－１βタンパク質と異なり、そして同一または異なる生物由来のタンパク質）に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドのことをいう。ＰＧＣ－１β融合タンパク質内のＰＧＣ－１βポリペプチドは、ＰＧＣ－１βタンパク質の全部または一部に一致し得る。好ましい実施形態において、ＰＧＣ－１β融合タンパク質は、ＰＧＣ－１βタンパク質の少なくとも１つの生物学的に活性な部分を含む。別の好ましい実施形態において、ＰＧＣ－１β融合タンパク質は、ＰＧＣ－１βタンパク質の少なくとも２つの生物学的に活性な部分を含む。融合タンパク質内の、用語「作動可能に連結された」とは、ＰＧＣ－１βポリペプチドおよび非ＰＧＣ－１βポリペプチドが互いにインフレームで融合されていることを示すと意図される。非ＰＧＣ－１βポリペプチドは、ＰＧＣ－１βポリペプチドのＮ末端またはＣ末端に融合され得る。

【０２２４】

例えば、１つの実施形態において、融合タンパク質は、ＰＧＣ－１β配列がＧＳＴ配列のＣ末端に融合されているＧＳＴ－ＰＧＣ－１β融合タンパク質である。このような融合タンパク質は、組換えＰＧＣ－１βの精製を促進し得る。

【０２２５】

別の実施形態において、この融合タンパク質は、そのＮ末端に異種性のシグナル配列を有するＰＧＣ－１βタンパク質である。一定の宿主細胞（例えば、哺乳動物宿主細胞）において、ＰＧＣ－１βの発現および／または分泌は、異種性のシグナル配列の使用を介して減少され得る。

【０２２６】

本発明の方法において使用されるＰＧＣ－１β融合タンパク質は、薬学的組成物に組み込まれ得、そして被験体にインビボで投与され得る。ＰＧＣ－１β融合タンパク質は、ＰＧＣ－１β基質のバイオアベイラビリティに影響するために使用され得る。ＰＧＣ－１β融合タンパク質の使用は、例えば、（ｉ）ＰＧＣ－１βタンパク質をコードする遺伝子の異常な改変または変異；（ｉｉ）ＰＧＣ－１β遺伝子の誤った制御；および（ｉｉｉ）ＰＧＣ－１βタンパク質の異常な翻訳後修飾によって引き起こされる障害の処置に対して治療的に有用であり得る。

【０２２７】

さらに、本発明の方法において使用されるＰＧＣ－１β融合タンパク質は、被験体において抗ＰＧＣ－１β抗体を産生するための免疫原として、ＰＧＣ－１βリガンドを精製するために、そしてＰＧＣ－１βとＰＧＣ－１β基質との相互作用を阻害する分子を同定するためのスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。

【０２２８】

好ましくは、本発明の方法において使用されるＰＧＣ－１βキメラタンパク質または融合タンパク質は、標準的な組換えＤＮＡ技術によって生成される。例えば、異なるポリペプチド配列にコードするＤＮＡフラグメントが、通常の技術に従って、例えば、ライゲー

ションのために平滑末端またはジグザグ末端（ｓｔａｇｇｅｒ－ｅｎｄｅｄ）を使用すること、適切な末端を提供するための制限酵素消化、粘着末端を埋めること、必要であれば、望ましくない結合を避けるためのアルカリホスファターゼ処理、
および酵素的ライゲーションによって、ともにインフレームで連結される。別の実施形態において、融合遺伝子は、自動ＤＮＡ合成装置を含む通常の技術によって合成され得る。あるいは、遺伝子フラグメントのＰＣＲ増幅は、２つの連続した遺伝子フラグメント間に相補的な突出を生じるアンカープライマーを使用して実施され得て、キメラ遺伝子配列を生成するために、引き続いてアニールおよび再増幅され得る（例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、ｅｄｓ．Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ：１９９２を参照のこと）。さらに、融合部分（例えば、ＧＳＴポリペプチド）をすでにコードする多くの発現ベクターが、市販されている。ＰＧＣ－１βをコードする核酸は、このような発現ベクターにクローニングされ得て、その融合部分がインフレームでＰＧＣ－１βタンパク質に連結される。

【０２２９】

本発明はまた、ＰＧＣ－１βアゴニスト（模倣物）またはＰＧＣ－１βアンタゴニストのいずれかとして機能するＰＧＣ－１βタンパク質の改変体の使用に関する。ＰＧＣ－１βタンパク質の改変体は、突然変異生成（例えば、不連続な点変異）またはＰＧＣ－１βタンパク質の切断によって生成され得る。ＰＧＣ－１βタンパク質のアゴニストは、ＰＧＣ－１βタンパク質の天然に存在する形態の生物学的活性と実質的に同じかまたはそれのサブセットを保持し得る。ＰＧＣ－１βタンパク質のアンタゴニストは、例えば、ＰＧＣ－１βタンパク質のＰＧＣ－１β媒介性活性を競合的に調節することによってＰＧＣ－１βタンパク質の天然に存在する形態の１以上の活性を阻害し得る。従って、特異的な生物学的効果は、制限された機能の改変体を用いた処置によって誘発され得る。１つの実施形態において、タンパク質の天然に存在する形態の生物学的活性のサブセットを有する改変体を用いた被験体の処置は、ＰＧＣ－１βタンパク質の天然に存在する形態での処置と比較して、被験体においてより少ない副作用を有する。

【０２３０】

１つの実施形態において、ＰＧＣ－１βアゴニスト（模倣物）またはＰＧＣ－１βアンタゴニストのいずれかとして機能するＰＧＣ－１βタンパク質の改変体は、ＰＧＣ－１βタンパク質アゴニストまたはアンタゴニスト活性についてのＰＧＣ－１βタンパク質の変異体（例えば、切断変異体）のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって同定され得る。１つの実施形態において、ＰＧＣ－１β改変体の変化に富んだライブラリーは、核酸レベルでの組み合わせの突然変異生成によって生成され、そして変化に富んだ遺伝子ライブラリーによってコードされる。ＰＧＣ－１β改変体の変化に富んだライブラリーは、例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物を遺伝子配列に酵素的に連結することによって生成され得、有望なＰＧＣ－１β配列の変性セットが、個別のポリペプチドとして、あるいは、それらの中のＰＧＣ－１β配列のセットを有するより大きい融合タンパク質のセットとして（例えば、ファージディスプレイのために）発現可能である。変性オリゴヌクレオチド配列から有望なＰＧＣ－１β改変体ライブラリーを生成し得る種々の方法が存在する。変性遺伝子配列の化学的合成は、自動ＤＮＡ合成装置において実施され得、そしてその合成遺伝子は、適切な発現ベクターに連結される。遺伝子の変性セットの使用により、１つの混合物において、有望なＰＧＣ－１β配列の所望のセットをコードする配列すべての供給を可能にする。変性オリゴヌクレオチドを合成するための方法は、当該分野で公知である（例えば、Ｎａｒａｎｇ，Ｓ．Ａ．（１９８３）Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ ３９：３；Ｉｔａｋｕｒａ ｅｔ ａｌ．（１９８４）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．５３：３２３；Ｉｔａｋｕｒａ ｅｔ ａｌ．（１９８４）Ｓｃｉｅｎｃｅ １９８：１０５６；Ｉｋｅ ｅｔ ａｌ．（１９８３）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．１１：４７７を参照のこと）。

【０２３１】

さらに、ＰＧＣ－１βタンパク質コード配列のフラグメントのライブラリーは、スクリーニングおよびそれに続くＰＧＣ－１βタンパク質の改変体の選択のための、ＰＧＣ－１βフラグメントの変化に富んだ集団を生成するために使用され得る。１つの実施形態において、コード配列フラグメントのライブラリーは、１分子あたり１回のみニッキングが起きる条件下でＰＧＣ－１βコード配列の二本鎖ＰＣＲフラグメントをヌクレアーゼで処置すること、二本鎖ＤＮＡを変性すること、様々なニックが入った生成物からＤＮＡをセンス／アンチセンス対を含み得る二本鎖ＤＮＡを形成するように復元すること、Ｓ１ヌクレアーゼで処置することによって再形成された二重鎖から一本鎖部分を除去することおよび発現ベクターに生じたフラグメントライブラリーを連結することによって生成され得る。この方法によって、ＰＧＣ－１βタンパク質の様々な大きさの、Ｎ末端の、Ｃ末端のおよび内部のフラグメントをコードする発現ライブラリーを得ることができる。

【０２３２】

点変異または切断によって作製されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするためおよび選択される特性を有する遺伝子産物についてｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングするためのいくつかの技術は、当該分野で公知である。このような技術は、ＰＧＣ－１βタンパク質の組み合わされた突然変異生成によって生成される遺伝子ライブラリーの迅速なスクリーニングに対して改変可能である。大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングするために、ハイスループット解析が可能である最も広範に使用される技術は、代表的には複製可能な発現ベクターに遺伝子ライブラリーをクローニングすること、適切な細胞を生じたライブラリーのベクターを用いて形質転換することおよび所望の活性の検出が、その産物が検出される遺伝子をコードするベクターの単離を促進する条件下で組み合わされた遺伝子を発現することが挙げられる。帰納的集合突然変異生成（Ｒｅｃｕｒｓｉｖｅ ｅｎｓｅｍｂｌｅ ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ）（ＲＥＭ）は、ライブラリー中の機能的変異体の頻度を上げる新技術であり、ＰＧＣ－１β改変体を同定するためにスクリーニングアッセイと組み合わせて使用され得る（Ａｒｋｉｎ ａｎｄ Ｙｏｕｒｖａｎ（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：７８１１－７８１５；Ｄｅｌｇｒａｖｅ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ６（３）：３２７－３３１）。

【０２３３】

本発明の方法はまた、抗ＰＧＣ－１β抗体の使用を含む。単離されたＰＧＣ－１βタンパク質またはその部分もしくはフラグメントは、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の調製のために標準的な技術を使用してＰＧＣ－１βを結合する抗体を生成するための免疫原として使用され得る。完全長ＰＧＣ－１βタンパク質が、免疫原として使用され得るか、あるいは、ＰＧＣ－１βの抗原性ペプチドフラグメントが免疫原として使用され得る。ＰＧＣ－１βの抗原性ペプチドは、配列番号２に示されるアミノ酸配列の少なくとも８アミノ酸残基を含み、そしてＰＧＣ－１βのエピトープを含み、このペプチドに対して惹起される抗体は、ＰＧＣ－１βタンパク質と特異的な免疫複合体を形成する。好ましくは、抗原性ペプチドは、少なくとも１０アミノ酸残基、より好ましくは少なくとも１５アミノ酸残基、なおもより好ましくは少なくとも２０アミノ酸残基および最も好ましくは少なくとも３０アミノ酸残基を含む。

【０２３４】

抗原性ペプチドによって含まれる好ましいエピトープは、タンパク質の表面（例えば、親水性領域）に位置するＰＧＣ－１βの領域ならびに高い抗原性を有する領域である。

【０２３５】

ＰＧＣ－１β免疫原は、代表的には、この免疫原で適切な被験体（例えば、ウサギ、ヤギ、マウスまたは他の哺乳動物）を免疫することによって抗体を調製するために使用される。適切な免疫原性調製物は、例えば、組換えで発現されるＰＧＣ－１βタンパク質または化学的に合成されたＰＧＣ－１βポリペプチドを含有し得る。この調製物はさらに、アジュバント（例えば、フロイントの完全アジュバントもしくは不完全アジュバント）または同様の免疫刺激物質を含み得る。免疫原性ＰＧＣ－１β調製物を用いた適切な被験体の

免疫は、ポリクローナル抗ＰＧＣ－１β抗体応答を誘発する。

【０２３６】

本明細書中で使用されるとき用語「抗体」とは、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、ＰＧＣ－１βなどの抗原に特異的に結合する（免疫応答する）抗原結合部位を有する分子のことをいう。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分の例としては、抗体をペプシンなどの酵素で処置することによって生成され得る、Ｆ（ａｂ）およびＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントが挙げられる。本発明は、ＰＧＣ－１β分子を結合するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を提供する。用語「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」とは、本明細書中で使用されるとき、ＰＧＣ－１βの特定のエピトープで免疫応答することができる抗原結合部位の１種類のみを有する抗体分子の集団のことをいう。従って、モノクローナル抗体組成物は、代表的にはそれが免疫応答する特定のＰＧＣ－１βタンパク質に対して単一の結合親和性を示す。

【０２３７】

ポリクローナル抗ＰＧＣ－１β抗体は、適切な被験体をＰＧＣ－１β免疫原で免疫することによって上記したように調製され得る。免疫された被験体における抗ＰＧＣ－１β抗体力価は、標準的な技術、例えば、固定化したＰＧＣ－１βを使用した酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）によって長期にわたってモニターされ得る。所望であれば、ＰＧＣ－１βに対する抗体分子は、哺乳動物（例えば、その血液）から単離され得、ＩｇＧ画分を得るためにプロテインＡクロマトグラフィなどの周知技術によってさらに精製され得る。免疫後の適切な時間で（例えば、抗ＰＧＣ－１β抗体力価が最も高いとき）、抗体産生細胞を被験体から得ることができ、モノクローナル抗体を調製するために標準的な技術、例えば、ＫｏｈｌｅｒおよびＭｉｌｓｔｅｉｎ（１９７５）Ｎａｔｕｒｅ ２５６：４９５－４９７によって最初に記載されたハイブリドーマ技術（Ｂｒｏｗｎ ｅｔ ａｌ．（１９８１）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２７：５３９－４６；Ｂｒｏｗｎ ｅｔ ａｌ．（１９８０）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５５：４９８０－８３；Ｙｅｈ ｅｔ ａｌ．（１９７６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７６：２９２７－３１；およびＹｅｈ ｅｔ ａｌ．（１９８２）Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ２９：２６９－７５もまた参照のこと）、より最近ではヒトＢ細胞ハイブリドーマ技術（Ｋｏｚｂｏｒ ｅｔ ａｌ．（１９８３）Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｔｏｄａｙ ４：７２）、ＥＢＶ－ハイブリドーマ技術（Ｃｏｌｅ ｅｔ ａｌ．（１９８５）Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．，ｐｐ．７７－９６）またはトリオーマ技術によって使用され得る。モノクローナル抗体ハイブリドーマを生成するための技術は、周知である（一般にＫｅｎｎｅｔｈ，Ｒ．Ｈ．ｉｎ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｎｅｗ Ｄｉｍｅｎｓｉｏｎ Ｉｎ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ａｎａｌｙｓｅｓ，Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｒｐ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８０）；Ｌｅｒｎｅｒ，Ｅ．Ａ．（１９８１）Ｙａｌｅ Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｍｅｄ．５４：３８７－４０２；Ｇｅｆｔｅｒ，Ｍ．Ｌ．ｅｔ ａｌ．（１９７７）Ｓｏｍａｔｉｃ Ｃｅｌｌ Ｇｅｎｅｔ．３：２３１－３６を参照のこと）。簡潔には、不死の細胞株（代表的には、ミエローマ）を、上記したようにＰＧＣ－１β免疫原で免疫された哺乳動物由来のリンパ球（代表的には脾細胞）と融合し、そして生じたハイブリドーマ細胞の培養上清を、ＰＧＣ－１βを結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを同定するためにスクリーニングする。

【０２３８】

リンパ球と不死化した細胞株とを融合するために使用される、任意の多くの周知のプロトコールが、抗ＰＧＣ－１βモノクローナル抗体を生成する目的で適用され得る（例えば、Ｇ．Ｇａｌｆｒｅ ｅｔ ａｌ．（１９７７）Ｎａｔｕｒｅ ２６６：５５０５２；Ｇｅｆｔｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９７７）前出；Ｌｅｒｎｅｒ（１９８１）前出；およびＫｅｎｎｅｔｈ（１９８０）前出を参照のこと）。さらに、当業者は、有用でもあり得るこのような方法の多くの改変物が存在することを理解し得る。代表的には、不死の細胞株（

例えば、ミエローマ細胞株）は、リンパ球と同じ哺乳動物種由来である。例えば、マウスハイブリドーマは、本発明の免疫原性調製物で免疫されたマウス由来のリンパ球と不死化マウス細胞株とを融合することによって作製され得る。好ましい不死の細胞株は、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含有する培養培地（「ＨＡＴ培地」）に感受性であるマウスミエローマ細胞株である。任意の多くのミエローマ細胞株は、標準的な技術に従って融合パートナーとして使用され得る（例えば、Ｐ３－ＮＳ１／１－Ａｇ４－１、Ｐ３－ｘ６３－Ａｇ８．６５３またはＳｐ２／Ｏ－Ａｇ１４ミエローマ株）。これらのミエローマ株は、ＡＴＣＣから入手可能である。代表的には、ＨＡＴ感受性マウスミエローマ細胞は、ポリエチレングリコール（「ＰＥＧ」）を使用してマウス脾細胞に融合される。融合により生じたハイブリドーマ細胞は、融合していないミエローマ細胞および非生産的に融合したミエローマ細胞を殺滅するＨＡＴ培地を使用して選択される（形質転換されていないので、数日後に融合していない脾細胞は死滅する）。本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞は、ＰＧＣ－１βを結合する抗体についてハイブリドーマ培養上清をスクリーニングすることによって（例えば、標準的なＥＬＩＳＡアッセイを使用して）検出される。

【０２３９】

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを調製する代わりに、モノクローナル抗ＰＧＣ－１β抗体が、ＰＧＣ－１βを結合する免疫グロブリンライブラリーメンバーを単離するために、組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリー（例えば、抗体ファージディスプレイライブラリー）をＰＧＣ－１βでスクリーニングすることによって同定および単離され得る。ファージディスプレイライブラリーを生成およびスクリーニングするためのキットは、市販されている（例えば、Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｐｈａｇｅ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｓｙｓｔｅｍ、カタログ番号２７－９４００－０１；およびＳｔｒａｔａｇｅｎｅ ＳｕｒｆＺＡＰ™ファージディスプレイキット、カタログ番号２４０６１２）。さらに、抗体ディスプレイライブラリーを生成およびスクリーニングするときに使用することが特に可能な方法および試薬の例は、例えば、Ｌａｄｎｅｒ ｅｔ ａｌ．米国特許第５，２２３，４０９号；Ｋａｎｇ ｅｔ ａｌ．ＰＣＴ国際公開番号ＷＯ９２／１８６１９；Ｄｏｗｅｒ ｅｔ ａｌ．ＰＣＴ国際公開番号ＷＯ９１／１７２７１；Ｗｉｎｔｅｒ ｅｔ ａｌ．ＰＣＴ国際公開ＷＯ９２／２０７９１；Ｍａｒｋｌａｎｄ ｅｔ ａｌ．ＰＣＴ国際公開番号ＷＯ９２／１５６７９；Ｂｒｅｉｔｌｉｎｇ ｅｔ ａｌ．ＰＣＴ国際公開ＷＯ９３／０１２８８；ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ ｅｔ ａｌ．ＰＣＴ国際公開番号ＷＯ９２／０１０４７；Ｇａｒｒａｒｄ ｅｔ ａｌ．ＰＣＴ国際公開番号ＷＯ９２／０９６９０；Ｌａｄｎｅｒ ｅｔ ａｌ．ＰＣＴ国際公開番号ＷＯ９０／０２８０９；Ｆｕｃｈｓ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ９：１３７０－１３７２；Ｈａｙ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｈｕｍ．Ａｎｔｉｂｏｄ．Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ ３：８１－８５；Ｈｕｓｅ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４６：１２７５－１２８１；Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ ｅｔ ａｌ．（１９９３）ＥＭＢＯ Ｊ １２：７２５－７３４；Ｈａｗｋｉｎｓ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２６：８８９－８９６；Ｃｌａｒｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｎａｔｕｒｅ ３５２：６２４－６２８；Ｇｒａｍ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：３５７６－３５８０；Ｇａｒｒａｄ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ９：１３７３－１３７７；Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｎｕｃ．Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．１９：４１３３－４１３７；Ｂａｒｂａｓ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：７９７８－７９８２；およびＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｎａｔｕｒｅ ３４８：５５２－５５４に見出され得る。

【０２４０】

さらに、組換え抗ＰＧＣ－１β抗体、例えば、標準的な組換えＤＮＡ技術を使用して作製され得る、ヒト部分と非ヒト部分との両方を含む、キメラモノクローナル抗体およびヒ

ト化モノクローナル抗体は、本発明の方法の範囲内である。このようなキメラモノクローナル抗体およびヒト化モノクローナル抗体は、当該分野で公知の組換えＤＮＡ技術、例えば、Ｒｏｂｉｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．国際出願番号ＰＣＴ／ＵＳ８６／０２２６９；Ａｋｉｒａ，ｅｔ　ａｌ．欧州特許出願１８４，１８７；Ｔａｎｉｇｕｃｈｉ，Ｍ．、欧州特許出願１７１，４９６；Ｍｏｒｒｉｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．欧州特許出願１７３，４９４；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．ＰＣＴ国際公開番号ＷＯ８６／０１５３３；Ｃａｂｉｌｌｙ　ｅｔ　ａｌ．米国特許第４，８１６，５６７号；Ｃａｂｉｌｌｙ　ｅｔ　ａｌ．欧州特許出願１２５，０２３；Ｂｅｔｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４０：１０４１－１０４３；Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８４：３４３９－３４４３；Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３９：３５２１－３５２６；Ｓｕｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８４：２１４－２１８；Ｎｉｓｈｉｍｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）Ｃａｎｃ．Ｒｅｓ．４７：９９９－１００５；Ｗｏｏｄ　ｅｔ　ａｌ．（１９８５）Ｎａｔｕｒｅ　３１４：４４６－４４９；Ｓｈａｗ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔ．８０：１５５３－１５５９；Ｍｏｒｒｉｓｏｎ、Ｓ．Ｌ．（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２９：１２０２－１２０７；Ｏｉ　ｅｔ　ａｌ．（１９８６）ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　４：２１４；Ｗｉｎｔｅｒ　米国特許第５，２２５，５３９号；Ｊｏｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９８６）Ｎａｔｕｒｅ　３２１：５５２－５２５；Ｖｅｒｈｏｅｙａｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２３９：１５３４；およびＢｅｉｄｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４１：４０５３－４０６０に記載の方法を使用して生成され得る。

【０２４１】

抗ＰＧＣ－１β抗体は、ＰＧＣ－１βタンパク質の発現の量およびパターンを評価するために、（例えば、細胞可溶化物または細胞上清中の）ＰＧＣ－１βタンパク質を検出するために使用され得る。抗ＰＧＣ－１β抗体は、臨床試験手順の一部として組織中のタンパク質レベルをモニターするために（例えば、所与の処置レジメンの効能を決定するために）診断的に使用され得る。検出は、抗体を検出可能な物質に結合すること（すなわち、物理的に連結すること）によって促進され得る。検出可能な物質の例としては、様々な酵素、補欠分子族、蛍光性材料、発光材料、生物発光材料および放射性材料が挙げられる。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが挙げられる；適切な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンが挙げられる；適切な蛍光性材料の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンが挙げられる；発光材料の例としては、ルミノールが挙げられる；生物発光の材料の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられ、そして適切な放射性材料の例としては、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{35}Ｓまたは^{3}Ｈが挙げられる。

【０２４２】

本発明はさらに、以下の実施例によって説明されるが、これらは限定として解釈されるべきでない。この出願を通して列挙されたすべての参考文献、配列、図、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号および公開された特許出願の内容が、本明細書中に参考として援用される。

【実施例】

【０２４３】

（材料および方法）

以下の材料および方法を下に記載される実験に使用した。

【０２４４】

（高脂肪摂餌およびアレイ解析）

動物に標準的なげっ歯類用固形飼料を与え、そして１２時間明期および暗期サイクルの制御された環境に収容した。高脂肪摂餌のために、３か月齢の老雄Ｃ５７／Ｂ１６Ｊマウスを５８％脂肪由来カロリーを有する食餌（Ｄ１２３３１、Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｄｉｅｔｓ™）に２４または４８時間切り替えた。高コレステロール摂餌のために、２群のマウスに０．０７％または２％コレステロールのいずれかを補充した基本食餌を２４または４８時間与えた。肝臓を解剖し、そして直ちにＲＮＡ単離のために凍結した。摂餌実験を、各食餌処置に対して１群あたり４匹のマウスを用いて３回反復した。

【０２４５】

３匹の固形飼料を与えられたマウスおよび４匹の高脂肪を与えられたマウス（２４および４８時間について２匹ずつ）から単離した肝臓ＲＮＡを包括的な発現解析のために使用した。Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘアレイハイブリダイゼーションおよびスキャニングを、マウス４３０ ２．０チップ（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ™）を使用して、Ｄａｎａ－Ｆａｒｂｅｒ Ｃａｎｃｅｒ ＩｎｓｔｉｔｕｔｅのＣｏｒｅ Ｆａｃｉｌｉｔｙにより実施した。アレイデータを、ｄ－ＣＨＩＰアレイ解析プログラム（Ｌｉ ａｎｄ Ｗｏｎｇ（２００１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９８、３１－３６）を用いて解析した。

【０２４６】

（遊離脂肪酸処置）

まず灌流緩衝液（ハンクス平衡塩類溶液、ＨＢＳＳ）で、次いでコラゲナーゼ溶液（１％ＢＳＡおよび０．０５％コラゲナーゼを含むＨＢＳＳ）で肝臓全体を灌流した後、初代肝細胞を単離した。分散した細胞を再懸濁し、そして１ｍＭのピルビン酸ナトリウム、１μＭのデキサメタゾンおよび５０ｎＭのインスリンの存在下で１０％ＦＢＳを補充したＤＭＥＭ中のコラーゲンコートしたプレートに蒔いた。この細胞を、その後０．１％ＢＳＡおよび１ｍＭのピルビン酸ナトリウムを補充したＤＭＥＭに処置前の２４時間維持した。０．５％ＢＳＡを補充したＤＭＥＭにおいて最終濃度４００μＭとなるようにさらに希釈するために、遊離脂肪酸を、１００ｍＭの保存溶液としてエタノール中に溶解した。肝細胞をＲＮＡ単離および解析の前に４時間処置した。

【０２４７】

（アデノウイルスの形質導入）

雄ウィスターラット（Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ™）に高脂肪食餌（ＴＤ９６００１，Ｈａｒｌａｎ Ｔａｋｌａｄ）を１０週間与えた。動物をネンブタールで麻酔し、精製アデノウイルスを用いて尾部静脈注射を介して形質導入した（ラット１匹あたり１×１０１２ウイルス粒子）。肝臓毒性を、ＡＬＴ／ＡＳＴアッセイキット（５０５－ＯＰ，Ｓｉｇｍａ™）によって測定したときの血漿アラニンアミノトランスフェラーゼレベルおよびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼレベルによってモニターした。血漿および肝臓を、遺伝子発現および脂質解析のためにアデノウイルスの形質導入の６日後に回収した。

【０２４８】

（肝臓脂質および血漿脂質の解析）

肝臓トリグリセリドをクロロホルム／メタノール（２：１）混合物を使用して抽出し、換気フード内で一晩乾燥させ、そして６０％ブタノールおよび４０％のＴｒｉｔｏｎ－Ｘ１１４／メタノール混合物（２：１）を含有する溶液に溶解した。肝臓トリグリセリド濃度および血漿トリグリセリド濃度を比色定量のアッセイキット（３３７，Ｓｉｇｍａ™）を使用して計測した。総血漿コレステロールを、Ｉｎｆｉｎｉｔｙコレステロール試薬（４０１，Ｓｉｇｍａ™）を使用して測定した。リポタンパク質解析のために、３００μｌの血漿をＦＰＬＣにより分取した。各画分中のトリグリセリドおよびコレステロールの濃度を上で記載したように測定した。

【０２４９】

（ＲＮＡ単離および解析）

全ＲＮＡを、Ｔｒｉｚｏｌ試薬（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ™）を使用して肝臓または培

養肝細胞から単離した。リアルタイムＰＣＲ解析のために、ランダムプライマーを使用して逆転写によってｃＤＮＡを合成し、サイバーグリーン（Ｂｉｏｒａｄ^{TM}）の存在下で遺伝子特異的プライマーを用いたＰＣＲ増幅に供した。ｍＲＮＡの相対的な存在量を、１８ＳリボソームｒＲＮＡに対する正規化の後に算出した。本研究において使用されたプライマーの配列を表１に示す。ハイブリダイゼーションのために、２０μｇの全ＲＮＡをホルムアルデヒドゲル上で分離し、ナイロン膜に転写し、そして３２Ｐ標識遺伝子特異的プローブでハイブリダイズした。リボソームタンパク質３６Ｂ４へのハイブリダイゼーションをローディングコントロールとして含んだ。

【０２５０】

【表１－１】

表1:RNA単離および解析に使用したプライマー

遺伝子	プライマー
PGC-1 α（マウス）	agccgtgaccactgacaacgag（配列番号 3) gctgcatggttctgagtgctaag（配列番号 4)
PGC-1β（マウス）	ctccaggagactgaatccagag（配列番号 5) cttgactactgtctgtgaggc（配列番号 6)
SREBP1a（マウス）	cgccatggacgagctggccttc（配列番号 7) gggaagtcactgtcttggttg（配列番号 8)
SREBP1c（マウス）	atcggcgcggaagctgtcggg（配列番号 9) gggaagtcactgtcttggttg（配列番号 8)
SREBP2（マウス）	tcagcaccgctccgcagacgag（配列番号 10) taccgtctgcacctgctgctgg（配列番号 11)
FAS（マウス）	ggttacactgtgctaggtgttg（配列番号 12) tccaggcgcatgaggctcagc（配列番号 13)
SREBP1a（ラット）	cgccatggacgagctggccttc（配列番号 7) gggaagtcactgtcttggttg（配列番号 8)
SREBP1c（ラット）	atcggcgcggaagctgtcggg（配列番号 9) gggaagtcactgtcttggttg（配列番号 8)
SREBP2（ラット）	gcaaagcctcgtgacatcct（配列番号 14) tgtggtgtagcgactgtctg（配列番号 15)

【０２５１】

【表１－２】

HMG-CoA シンターゼ1（ラット）	tctctgcctgactgtggttc（配列番号 16） ttcccagactcctcaaacag（配列番号 17）
HMG-CoA レダクターゼ（ラット）	cacgctcacagtcgctggatag（配列番号 18） cacttgctcgatgtccatgctg（配列番号 19）
メバロン酸キナーゼ（ラット）	gttgtcagaagtcctgctggtg（配列番号 20） ggccacatcccagacctgctta（配列番号 21）
ホスホメバロン酸キナーゼ（ラット）	gctgcagagcagacttggaggt（配列番号 22） ttccggcagaagaagcctgggt（配列番号 23）
メバロン酸 PP（ラット）	tgaacggtcgtgaggaggacgt（配列番号 24） caaggtataggctaggcaggcg（配列番号 25）
デカルボキシラーゼ（ラット）	cagattatcattgaagtgactg（配列番号 26） gcttcactgcatctgggtgatc（配列番号 27）
GPP シンターゼ（ラット）	cagattatcattgaagtgactg（配列番号 28） gcttcactgcatctgggtgatc（配列番号 29）
IPP イソメラーゼ（ラット）	gctcctgttacagcagagatcg（配列番号 30） gctccgcctttaagcgcttctg（配列番号 31）
スクアレンシンターゼ（ラット）	gtgatcgctgacatctgtcac（配列番号 32） gaataggcgagaaaggccgattc（配列番号 33）
スクアレンエポキシダーゼ（ラット）	cctaccgctgtcgccatcgaaa（配列番号 34） ccgttaacgtcgtctctgacag（配列番号 35）
ラノステロールシンターゼ（ラット）	aagttctggctggctgtcctga（配列番号 36） cacttagccgagtggcgtagca（配列番号 37）
Cyp51（ラット）	atcgcctgcgccttcacgctta（配列番号 38） gttgtcagccgaccgtagacct（配列番号 39）
7-DHCR（ラット）	cctggcttcctgacttctgcca（配列番号 40） caggatgttggcacaccatagc（配列番号 41）
24-DHCR（ラット）	cctgcatgaggcagctggaga（配列番号 42） tcagtgcctcgcagccttgcagat（配列番号 43）
LDL レセプター（ラット）	cgagtgcccggatggctccgat（配列番号 44） catccgagccattttcacagtc（配列番号 45）
ATP5j（ラット）	gttctgcagaggatcttcaggc（配列番号 46） gtcctccagatgcctgtcgctt（配列番号 47）
SCD-1（ラット）	cctcatcattgccaacaccatg（配列番号 48） tgtttgcgcacaagcagccaac（配列番号 49）
FAS（ラット）	caggaactgaacggcattactc（配列番号 50） cattttctagggataacagcac（配列番号 51）
PLTP（ラット）	agtctgcgctggagtctctggc（配列番号 52） caacagtgacgaagcctgcatg（配列番号 53）
ABCA1（ラット）	gccatcagttcattcctgaatg（配列番号 54） acctccgagagctgctgcttg（配列番号 55）
ABCG1（ラット）	actgcagcatcgtgtactgg（配列番号 56） gggatggtgtcaaagctgac（配列番号 57）
ABCG8（ラット）	atgcgcctgcccaagaccttc（配列番号 58） ccgatgctcactcttcggcgc（配列番号 59）

（一過性トランスフェクション）

マウスＨ２．３５ヘパトーマ細胞（ＣＲＬ－１９９５、ＡＴＣＣ）を０．２μＭのデキサメタゾンの存在下で４％ウシ胎児血清を補充したＤＭＥＭ中に維持した。一過性トランスフェクションを、Ｓｕｐｅｒｆｅｃｔ（Ｑｉａｇｅｎ^{TM}）を使用して実施した。代表的な実験において、１００ｎｇのレポータープラスミドを、０．５～１．０μｇのＰＧＣ－１発現構築物またはＲＮＡｉ構築物の存在下または非存在下で２０～５０ｎｇの転写因子についての発現構築物と混合した。等量のＤＮＡを、適切なベクターＤＮＡを添加することによってすべてのトランスフェクションの組み合わせに使用した。ＬＸＲアゴニスト処置のために、Ｔ０９０１３１７（Ｃａｙｍａｎ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ^{TM}）を最終濃度１０μＭとなるようにルシフェラーゼアッセイの２０時間前に添加した。すべてのトランスフェクション実験を３つ組で少なくとも３回反復した。

【０２５２】

（クロマチン免疫沈降）

Ｈ２．３５ヘパトーマ細胞をＡｄ－ＳＲＥＢＰ１ｃの非存在下または存在下で２日間、

Ａｄ－ＧＦＰ、Ａｄ－ｆｌａｇ－ＰＧＣ－１αまたはＡｄ－ＰＧＣ－１βを用いて感染させた。剪断されたクロマチンの調製のために１０％ホルマリンで短時間の固定後、細胞を回収した。免疫沈降を抗ｆｌａｇ抗体または抗ＩｇＧコントロール抗体を使用して実施した。沈降物をＤＮＡ単離およびＰＣＲ解析のために脱クロスリンクした。

【０２５３】

（タンパク質相互作用アッセイ）

細胞におけるＰＧＣ－１βとＳＲＥＢＰ１ｃとの物理的結合を共免疫沈降により調べた。簡潔には、Ｈ２．３５ヘパトーマ細胞をＡｄ－ＳＲＥＢＰ１ｃ、Ａｄ－Ｆｌａｇ－ＰＧＣ－１β、Ａｄ－Ｆｌａｇ－ＰＧＣ－１β単独または示したような組み合わせで感染させた。感染の４８時間後に核を感染細胞から単離し、そして２０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．９）、４００ｍＭ　ＮａＣｌ、１．５ｍＭ　ＭｇＣｌ２、０．５ｍＭ　ＤＴＴ、０．２ｍＭ　ＥＤＴＡ、１５％グリセリンおよび１ｍＭ　ＰＭＳＦを含有する溶解緩衝液中で抽出した。免疫沈降を、ＳＲＥＢＰ１に対するポリクローナル抗体（ｓｃ－８９８４、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ^{TM}）を使用して、１．５％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００および０．２ｍｇ／ｍｌのＢＳＡを補充した溶解緩衝液中で実施した。複合体中のＰＧＣ－１をＦｌａｇエピトープに対するモノクローナル抗体（Ｍ２，Ｓｉｇｍａ^{TM}）を使用して免疫ブロット法により明らかにした。

【０２５４】

インビトロ相互作用アッセイのために、固定化されたＧＳＴまたはＧＳＴ－ＳＲＥＢＰ１ｃ（１－４７１）を含有するグルタチオンビーズを２０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ＝７．２）、８０ｍＭ　ＫＣｌ、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．０５％ＮＰ－４０、５％グリセリンおよび０．５ｍＭ　ＤＴＴを含有する結合緩衝液中で、インビトロで翻訳されたＰＧＣ－１βの３５Ｓ標識した完全長または切断型の変異体とともにインキュベートした。ビーズを同じ緩衝液で４回洗浄した。ビーズに結合したタンパク質をＳＤＳ－ＰＡＧＥの後、オートラジオグラフィにより解析した。ＬＸＲ／ＰＧＣ－１相互作用を検出するために、固定化されたＧＳＴまたはＧＳＴ－ＰＧＣ－１（Ｎ末端）をインビトロで翻訳された３５Ｓ標識ＬＸＲαとインキュベートし、そして上で記載したように処理した。

【０２５５】

（ＰＧＣ－１β　ＲＮＡｉベクター）

ＰＧＣ－１βに対するＲＮＡｉ構築物を、ＰＧＣ－１βのコード領域中の２つの配列：５’－ＧＡＴＡＴＣＣＴＣＴＧＴＧＡＴＧＴＴＡ－３’（配列番号６０）および５’－ＧＴＡＣＧＧＡＡＣＴＧＣＡＴＡＡＧＣＡ－３’（配列番号６１）を使用して作製した。これらの配列を有するオリゴヌクレオチドをポリメラーゼＩＩＩ　Ｈ１－ＲＮＡプロモーターの制御下のｐＳＵＰＥＲ－レトロベクターにサブクローニングした。一過性トランスフェクションのために、１．０μｇのｐＳＵＰＥＲベクターまたはＰＧＣ－１β　ＲＮＡｉ構築物を、適切な転写因子のために１００ｎｇのレポータープラスミドと５０ｎｇの発現構築物とを組み合わせて使用した。

【０２５６】

ＰＧＣ－１β　ＲＮＡｉアデノウイルスをｐＳＵＰＥＲベクター由来の発現カセットを使用して作製した。ノックダウン実験のために、Ｈ２．３５ヘパトーマ細胞を、Ａｄ－ＳＲＥＢＰ１ｃとのインキュベーション前の４８時間Ａｄ－ＧＦＰアデノウイルスまたはＡｄ－ＰＧＣ－１β　ＲＮＡｉアデノウイルスのいずれかを用いて感染させた。全ＲＮＡを、Ａｄ－ＳＲＥＢＰ１ｃ感染の２０時間後に感染細胞から回収し、そしてリアルタイムＰＣＲによって解析した。

【０２５７】

マウスにおけるアデノウイルスの形質導入を、マウス（３ヶ月齢の老Ｃ５７Ｂ１／６雄）１匹あたり１．５×10^{11}ウイルス粒子で尾部静脈注射によって実施した。４日後、動物をさらに２日間高脂肪食餌に切り替えた。血漿サンプルを、高脂肪摂餌の前および後で収集し、トリグリセリド濃度およびコレステロール濃度についてアッセイした。ＨＤＬコレステロールを自動ＡＣＥ　Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙシステム（ＡＬＦ

Ａ　Ｗａｓｓｅｒｍａｎｎ^{TM}，ＮＪ）を使用して計測した。肝臓を遺伝子発現および脂質解析のために高脂肪摂餌の終わりに解剖した。

【０２５８】

（実施例１：高脂肪摂餌による肝臓の脂質生合成のプログラムの刺激）

マウスに、飽和脂肪に富むが、コレステロール（５８％脂肪、主に水素化されたやし油由来；Ｄ１２３３１、Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｄｉｅｔｓ^{TM}）をほとんど含まないか、または全く含まない食餌を与えた。これらの食餌が多くの慢性的な効果（例えば、インスリン抵抗性および肥満症）を引き起こすことが知られているので、本実験は、初期の変化のみに着目した。マウスを標準的なげっ歯類用の固形飼料から高脂肪食餌に１および２日間切り替えて、肝臓の遺伝子発現を、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ^{TM}アレイを用いて調べた。クラスタリング解析から得られた結果により、デノボ脂質合成に関わる多数の遺伝子の発現が、この短期間の高脂肪摂餌の後に強く誘導されることが明らかとなり、それらは、脂肪酸、コレステロールおよびトリグリセリド合成に関与する遺伝子を含んでいた（図１Ａ）。グルコーストランスポーター２、解糖経路およびペントースリン酸経路におけるいくつかの酵素ならびに脂質輸送に関連する酵素をコードするｍＲＮＡの発現がまた、協調的に増加した。コレステロール合成経路における多くの酵素（例えば、ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼ、ホスホメバロン酸キナーゼおよびラノステロールシンターゼ）についてのｍＲＮＡレベルはまた、食餌性飽和脂肪に応答して有意に上昇する。この肝臓の脂質生成プログラムの活性化は、２つの潜在的に重要な肝臓の転写制御因子である、ＳＲＥＢＰ１ｃ（脂質生成遺伝子発現の中心的な制御因子）およびＰＧＣ－１β（ＰＧＣ－１ファミリーにおける転写コアクチベーター）の高い発現をさらに伴う（図１Ａ）。ＳＲＥＢＰ１ｃのｍＲＮＡレベルは、定量的リアルタイムＰＣＲ解析によって測定したとき、高脂肪摂餌の第１日目で７倍以上増加する（図１Ｂ）。ＳＲＥＢＰ１ａの発現はまた、約２倍誘導される。対照的に、ＳＲＥＢＰ２発現は、変化しないままである。食餌の切り替えによってわずかしか誘導されないＰＧＣ－１αとは異なって、ＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡの発現は、高脂肪摂餌に応答して４倍以上刺激され、ＳＲＥＢＰ１ｃの発現に匹敵する（図２Ｂ）。脂質生成遺伝子（例えば、脂肪酸シンターゼ（ＦＡＳ）およびＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼ）についてのｍＲＮＡの数倍の誘導がまた、リアルタイムＰＣＲ解析によって示される（図１Ｂ）。ＰＧＣ－１βの発現は、これらの条件下で骨格筋および白色脂肪組織において変化しない。

【０２５９】

食餌性コレステロールがＳＲＥＢＰおよびＰＧＣ－１βの発現にいかなる影響を及ぼすか調べるために、マウスに０．０７％コレステロールを含有するコントロール食餌または２％コレステロールを含有する同様の食餌を与えた。高コレステロール摂餌がコレステロール生合成の転写制御因子であるＳＲＥＢＰ２をコードするｍＲＮＡの肝臓における発現をＨＭＧＣｏＡレダクターゼの発現とともに抑制するという結果が証明される（図１Ｃ）。ＰＧＣ－１βの発現は、食餌性コレステロール含有量によって変化しないが、ＳＲＥＢＰ１ｃ　ｍＲＮＡが高コレステロール食餌に応答してわずかに増加する（図１Ｃ）。ＦＡＳ、ステアロイル－ＣｏＡデサチュラーゼ１（ＳＣＤ－１）およびグルコースキナーゼ（ＧＫ）を含むいくつかの脂質生成酵素のｍＲＮＡレベルは、ほとんど変化しないままである。これらの結果は、食餌性飽和脂肪およびコレステロールが、ＳＲＥＢＰおよびＰＧＣ－１β、ならびに肝臓の脂肪酸およびコレステロール合成に関わる遺伝子についてのｍＲＮＡの発現に対して別々の効果を有することを証明している。高飽和脂肪食餌の短期間の摂取後の肝臓の脂質生合成の遺伝的プログラムのこの誘導は、以前には観察されていなかった。

【０２６０】

以前の研究では、脂肪酸、特に多価不飽和種が、ＳＲＥＢＰ１ｃの発現と切断された核アイソフォームの生成との両方を抑制することが証明されている（Ｈａｎｎａｈ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７６，４３６５－４３２７）。食餌性脂肪が、ＰＧＣ－１β発現に直接影響を及ぼすか否かを調べるために、初代肝細胞を様々な

飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸およびトランス脂肪酸で処置し、そしてリアルタイムＰＣＲ解析によってＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡのレベルを調べた。一不飽和（オレイン酸、$C_{18:1}$ｎ－９）および多価不飽和（リノール酸、$C_{18:2}$ｎ－６、ＥＰＡ、$C_{20:5}$ｎ－３およびアラキドン酸、$C_{20:4}$ｎ－６）は、ＰＧＣ－１β発現をわずかにしか誘導しないが、種々の鎖長（C_{10}：０～C_{18}：０）の飽和脂肪酸が、ＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡレベルをより強く増加させる（図１Ｄ）。トランス脂肪酸（例えば、エライジン酸（トランス$C_{18:1}$ｎ－９）およびトランスバクセン酸（トランス$C_{18:1}$ｎ－７））は、それぞれ水素化された植物油および乳製品中に大量に存在し、またＰＧＣ－１αの発現を強く誘導した（３．２倍）。対照的に、ＰＧＣ－１β　ｍＲＮＡを２．２倍に誘導するステアリン酸（C_{18}：０）以外の脂肪酸の処置は、これらの条件下でＰＧＣ－１α　ｍＲＮＡの発現に対する効果を有さない（図１Ｄ）。これらの結果から、一定の脂肪酸、特に飽和脂肪酸およびトランス脂肪酸が、細胞自立的様式でＰＧＣ－１β発現を直接刺激することが示される。

【０２６１】

（実施例２：ＰＧＣ－１βによる転写因子のＳＲＥＢＰファミリーの同時活性化）

ＰＧＣ－１βは、核内レセプター（例えば、ＰＰＡＲβおよびＥＲＲならびにそれほどではないがＨＮＦ４α）を含むいくつかの転写因子を強く同時活性化することが示されている（Ｋａｍｅｉ　ｅｔ　ａｌ．（２００３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　１００，１２３７８－１２３８３；Ｌｉｎ　ｅｔ　ａｌ．（２００２ａ）Ｎａｔｕｒｅ　４１８，７９７－８０１；Ｌｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，（２００３）Ｊ．Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ．２７８，３０８４３－３０８４８）。ＰＧＣ－１βはまた、核内レセプターではないＮＲＦ－１を同時活性化する。高脂肪を与えられたマウスの肝臓におけるＰＧＣ－１βおよびＳＲＥＢＰ１ｃの同時誘導により、ＰＧＣ－１βがＳＲＥＢＰ１ｃの転写活性を調節し得、そしてその標的遺伝子の発現に影響を与え得ることが示唆されている。この理論を検証するために、ヘパトーマ細胞にＦＡＳプロモーターの制御下のルシフェラーゼレポーターを一過的にトランスフェクトした；この構築物は、機能的ＳＲＥＢＰ結合部位を有し、そしてＳＲＥＢＰに対して応答性が高い（Ｊｏｓｅｐｈ　ｅｔ　ａｌ．（２００２）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７７，１１０１９－１１０２５；Ｍａｇａｎａ　ａｎｄ　Ｏｓｂｏｒｎｅ（１９９６）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７１，３２６８９－３２６９４；Ｔｏｎｔｏｎｏｚ　ｅｔ　ａｌ．（１９９３）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．１３，４７５３－４７５９）。ＳＲＥＢＰ１ｃ発現が、一過的にトランスフェクトされたＨ２．３５マウスヘパトーマ細胞においてルシフェラーゼレポーター遺伝子から約５倍促進されるという結果が示される（図２Ａ）。ＰＧＣ－１βは、基礎レベルと比較して、ルシフェラーゼ活性において１７倍増加することにより示されるように、ＦＡＳプロモーターにおけるＳＲＥＢＰ１ｃの転写活性を顕著に増強する。対照的に、ＰＧＣ－１αは、ＳＲＥＢＰ１ｃによるレポーター遺伝子活性の誘導に対して最小の効果を示す。プロモーターにおけるＳＲＥＢＰ結合部位の変異は、ＳＲＥＢＰ１ｃ単独およびＳＲＥＢＰ１ｃとＰＧＣ－１βとの組み合わせの両方によってその活性化を完全に無効とし、このことからＰＧＣ－１βは、このプロモーターにおけるＳＲＥを介してＳＲＥＢＰ１ｃを同時活性化することが示唆される。ＰＧＣ－１βはまた、これらの同時活性化アッセイにおいてＳＲＥＢＰ２およびＳＲＥＢＰ１ａの活性を強く増加させる（図２Ｂ）。

【０２６２】

ＰＧＣ－１βが内在性ＳＲＥＢＰ標的遺伝子のプロモーター／エンハンサー領域に存在するＳＲＥにリクルートされた否かを判定するために、クロマチン免疫沈降（ＣＨＩＰ）アッセイを実施した。図２Ｃに示すように、ＰＧＣ－１αではなくＰＧＣ－１βが、ＦＡＳプロモーターにおけるＳＲＥの近傍に存在する。ＰＧＣ－１βのＳＲＥＢＰ結合部位へのリクルートは、それらのプロモーターの状況に依存する；ＰＧＣ－１βは、ＬＤＬＲプロモーターにおけるＳＲＥにはリクルートしない。コントロールのＩｇＧが免疫沈降に使用されるとき、ＰＣＲ産物は検出されなかった（図２Ｃ）。これらの結果から、ＳＲＥＢＰ１ｃが標的プロモーターにおける結合部位の近傍にＰＧＣ－１βを直接リクルートする

ことができることが証明される。実際は、これらの２つのタンパク質は、共免疫沈降アッセイによって示されるように細胞中で物理的に互いに相互作用する。これらのタンパク質がヘパトーマ細胞において同時発現されるとき、ＳＲＥＢＰ１ｃは、ＰＧＣ－１βと相互作用し、ＰＧＣ－１βを沈殿させるが、ＰＧＣ－１βはそうではない（図２Ｄ）。ＰＧＣ－１βの発現レベルがＰＧＣ－１βより高いという事実にもかかわらず、このことは観察される。ＳＲＥＢＰ１ｃと相互作用し得るＰＧＣ－１βのドメインを同定するために、融合タンパク質をＧＳＴとＳＲＥＢＰ１ｃの処理された形態との間で利用した。完全長ＰＧＣ－１βは、ＳＲＥＢＰ１ｃと効果的に相互作用し（図２Ｅ）、そしてＰＧＣ－１β変異体の解析によりＰＧＣ－１βに対して特有の（ＰＧＣ－１αには存在しない）ドメイン（アミノ酸３５０－５３０）が、ＳＲＥＢＰ１ｃとＰＧＣ－１βとの間の相互作用に必要とされることが明らかとなる（図２Ｅ～Ｆ）。この結果により、ＰＧＣ－１αではなくＰＧＣ－１βが、直接的な物理的結合により転写因子のＳＲＥＢＰファミリーを同時活性化することが証明される。

【０２６３】

（実施例３：ＰＧＣ－１βによる肝臓の脂質生合成および高脂血症の活性化）

内因性脂質生成遺伝子の発現に対するＰＧＣ－１βの効果を調べるために、β－ガラクトシダーゼ（β－Ｇａｌ）、ＰＧＣ－１αまたはＰＧＣ－１βを発現する組換えアデノウイルスを、尾部静脈注射を介してラットに注入した。尾部静脈を通って導入される場合、ほとんどのアデノウイルスは、もっぱら肝細胞に感染した。その結果、異所的に肝臓において発現する場合、ＰＧＣ－１βとＰＧＣ－１αとの両方が、脂質生成遺伝子（例えば、シトクロムｃ、βＡＴＰアーゼおよび中位鎖アシル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼ（ＭＣＡＤ）の発現を刺激することが証明される（図３Ａ）。脂質生成遺伝子の誘導に加えて、ＰＧＣ－１βはまた、脂質合成に関連する遺伝子（例えば、ＦＡＳ、ＳＣＤ－１、ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼ、ＤＧＡＴおよびＧＰＡＴ（これらすべてがＳＲＥＢＰ標的であることが周知である））の発現を強力に刺激する。対照的に、ＰＧＣ－１αは、これらの遺伝子の発現に対してほとんどかまたは全く効果を有さない。ミクロソームのトリグリセリド移送タンパク質（ＭＴＴＰ）、ＶＬＤＬ分泌を制御し、そして家族性無βリポタンパク質血症における変異を有する遺伝子の発現は、ＰＧＣ－１αとＰＧＣ－１βとの両方によって誘導される。リアルタイムＰＣＲによる遺伝子発現解析により、ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼを調節することに加えて、ＰＧＣ－１βはまた、コレステロール合成経路において、多数の酵素のｍＲＮＡレベルを増加させるが、ＰＧＣ－１αは、より弱い効果を有することが明らかとなる（図３Ｂ）。実際は、多くのこれらのＰＧＣ－１β標的遺伝子はまた、高脂肪摂餌に応答して強く誘導される。このことから、ＰＧＣ－１βがコレステロール生合成を含む肝臓の脂質生合成に対して食餌性飽和脂肪の効果を媒介する重要な因子であることが証明される。さらに、古典的なＳＲＥＢＰ標的であるＬＤＬＲの発現は、ＰＧＣ－１βによって増加されない。ＰＧＣ－１βによるＳＲＥＢＰ標的遺伝子のこの誘導は、ｍＲＮＡ解析およびタンパク質解析によって示されるように、高レベルのＳＲＥＢＰ転写因子に起因しないようである（図３Ｂ～Ｃ）。むしろ、これらの結果は、ＰＧＣ－１βが、直接的な物理的結合およびそれらの転写活性の増強を通じてＳＲＥＢＰを同時活性化するという観察と一致する。

【０２６４】

マウス肝臓におけるＳＲＥＢＰのトランスジェニック発現は、脂質生成遺伝子発現を活性化し、そして脂肪酸およびコレステロール合成の速度を上昇させることにより示される。しかしながら、脂質の大部分は、肝臓に蓄積され、貯蔵および利用のために末梢組織へ搬出されない（Ｈｏｒｔｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１０１，２３３１－２３３９；Ｓｈｉｍａｎｏ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９８，１５７５－１５８４；Ｓｈｉｍａｎｏ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９９，８４６－８５４）。血漿トリグリセリドレベルは、野生型コントロールと比較するとき、おそらく肝臓における高レベルのＬＤＬＲに起因して、実際にトランスジェニックマウスにおいて減少している（Ｓｈｉｍａｎｏ ｅｔ

ａｌ．（１９９７）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９９，８４６－８５４）。全身性脂質ホメオスタシスに対するＰＧＣ－１βの影響を評価するために、肝臓および血漿における脂質レベルを、適宜、高脂肪を与えられたラットにおいてアデノウイルスの形質導入の後に調べた。ＳＲＥＢＰ発現を含む以前の結果を考慮して、肝臓におけるアデノウイルスが媒介するＰＧＣ－１β発現は、これらのラットにおいて５０％以上肝臓のトリグリセリド含有量を減少させた（図４Ａ）。肝臓の脂質貯蔵のこの減少は、この器官からの脂質搬出の増加によって説明され、肝臓におけるＰＧＣ－１β発現が、Ａｄ－β－Ｇａｌを与えられたコントロールラットと比較するとき血漿トリグリセリド濃度が６倍以上増加しているラットにおいて深刻な血漿高トリグリセリド血症を引き起こした（図４Ｂ）。血漿トリグリセリドの同様の増加がまた、固形飼料を与えられたラットにおいて観察されるが、それらの動物由来の肝臓におけるより少ない脂質蓄積に起因して、ＰＧＣ－１βの抗脂肪効果は、明白ではない。ＰＧＣ－１αはまた、わずかに血漿トリグリセリドレベルを増加させる一方で肝臓トリグリセリド含有量を減少させた（図４Ａ～Ｂ）。血漿コレステロールの解析により、総コレステロールが、ＰＧＣ－１αおよびＰＧＣ－１βによってそれぞれ約５５％および２００％増加することが示された（図４Ｃ）。血漿コレステロールにおける増加は、主に、リポタンパク質プロファイルのＦＰＬＣ解析によって示されるようにＶＬＤＬ画分中のコレステロールの蓄積の結果である（図４Ｄ）。実際は、ＶＬＤＬにおけるトリグリセリドおよびコレステロールのレベルが、ＰＧＣ－１βに応答してβ－Ｇａｌコントロールと比較してそれぞれ６．２倍および５．３倍増加する（図４Ｅ）。対照的に、ＨＤＬコレステロールのレベルは、大きく影響されない。このことは、ＶＬＤＬコレステロールがＬＤＬコレステロールの前駆体であるという事実を考慮に入れると意味のあることである。結果は、ＰＧＣ－１βがＳＲＥＢＰを同時活性化し、そしてＳＲＥＢＰの標的である脂質生成遺伝子の発現を増加させるが；このコアクチベーターはまた、肝臓の脂質と血漿脂質との間のバランスを変化させる脂質輸送経路を調節することを強く証明する。

【０２６５】

ＳＲＥＢＰが脂質生成遺伝子発現に対するＰＧＣ－１βの効果を媒介するために必要であるか否かを判定するために、ラットに、ＳＲＥＢＰのうまく特徴付けられたドミナントネガティブ変異体と組み合わせてＡｄ－ＰＧＣ－１βとともに注入した（Ｆｏｒｅｔｚ　ｅｔ　ａｌ．（１９９９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ　ＵＳＡ　９６，１２７３７－１２７４２；Ｋｉｍ　ａｎｄ　Ｓｐｉｅｇｅｌｍａｎ（１９９６）Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ．１０，１０９６－１１０７）。等しい力価（１．２×１０^{12}ウイルス粒子）のアデノウイルスをラットに尾部静脈注射を介して送達した。図５Ａに示されるように、ＤＮ－ＳＲＥＢＰ単独は、β－Ｇａｌコントロールと比較して血漿トリグリセリドのレベルに対する効果を有さなかったが、ＤＮ変異体は、ＰＧＣ－１βによって引き起こされる高トリグリセリド血症を有意に減弱させる。これらの結果と一致して、いくつかの脂質生成遺伝子（例えば、ＦＡＳ、ＳＣＤ－１およびＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼ）の誘導はまた、ラットがＡｄ－ＰＧＣ－１βとＡｄ－ＤＮ－ＳＲＥＢＰとの両方で形質導入されるとき減少する（図５Ｂ）。対照的に、βＡＴＰアーゼ、ＳＲＥＢＰによって制御されることが知られていないミトコンドリア遺伝子の誘導は、ＰＧＣ－１β単独またはその存在下のいずれでもＤＮ－ＳＲＥＢＰによって影響されない。これらの結果は、脂質生成遺伝子発現に対するＰＧＣ－１βの効果の少なくとも重要な部分が、ＳＲＥＢＰファミリーである転写因子を通じて媒介されることを示す。

【０２６６】

（実施例４：ＰＧＣ－１αとＰＧＣ－１βとの両方によるＬＸＲβ経路の調節）

実施例３に示したように、ＰＧＣ－１βは、ＶＬＤＬトリグリセリドおよびコレステロールのレベルにおいて大幅な増加を誘導し、このことから肝臓の脂質輸送およびＶＬＤＬ分泌を促進するときのＰＧＣ－１βの役割が示唆される。実際に、ＰＧＣ－１βによって誘導される高トリグリセリド血症は、アゴニストリガンドを用いた肝臓Ｘレセプター（ＬＸＲ）の活性化によって動物において引き起こされると暗示されている（Ｇｒｅｆｈｏｒｓｔ　ｅｔ　ａｌ．（２００２）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７７，３４１８２－３４１

９０；Ｓｃｈｕｌｔｚ　ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ．１４，２８３１－２８３８）。ＬＸＲαは、肝臓、脂肪組織、腸およびマクロファージにおいて強く発現される。ＬＸＲαの活性化は、マクロファージにおける脂質搬出およびコレステロール逆輸送の制御に重要な役割を果たすと示されている（Ｃｈａｗｌａ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ　７，１６１－１７１）。ＰＧＣ－１βがＬＸＲαの転写活性に影響するか否かを判定するために、多量体を形成するＬＸＲ結合部位を有するレポータープラスミド（４×ＬＸＲＥ－ｌｕｃ）をＰＧＣ－１αおよびＰＧＣ－１βを用いて同時トランスフェクトした。図６Ａに示されるように、ＰＧＣ－１βは、リガンド依存性様式でＬＸＲαおよびＲＸＲβによるレポーター遺伝子発現の活性化を強く増大する。ＬＸＲα／ＲＸＲβとＰＧＣ－１βとの組み合わせは、ＬＸＲαリガンドの存在下で基礎レベルと比較されるとき、ルシフェラーゼ活性を２４０倍以上増加させた。同様に、このレポーター構築物においてアッセイされるとき、両方のＰＧＣ－１コアクチベーターが、ＬＸＲβの転写活性を増加させることができる（図９Ａ）。外来性ＬＸＲまたはＲＸＲβが添加されないとき、レポーター遺伝子発現に対するＰＧＣ－１βの効果がまた見られた。これは、おそらくＨ２．３５ヘパトーマ細胞における内在性ＬＸＲおよびＲＸＲの存在を反映する。ＰＧＣ－１αおよびＰＧＣ－１βが内在性プロモーターにおいてＬＸＲαを同時活性化するか否かという実験を実施した。ＰＧＣ－１の同時トランスフェクションは、ＡＴＰ結合カセットトランスポーターＡ１（ＡＢＣＡ１）のプロモーター活性を、ＬＸＲα／ＲＸＲβ単独と比較して約２～３倍増加させる（図６Ｂ）。プロモーターにおけるＬＸＲ結合部位の変異は、ＬＸＲおよびＰＧＣ－１によるその制御を完全に消失させ、このことから、ＡＢＣＡ１プロモーターにおけるその応答エレメントへのＬＸＲの結合がＰＧＣ－１の効果を媒介する必要があることが示される。実際は、ＰＧＣ－１βとＰＧＣ－１βとの両方が、ＬＸＲ標的遺伝子として知られるＣＹＰ７ａ１およびＡＢＣＡ１のプロモーターに存在するＬＸＲＥの近傍にリクルートされる（図６Ｃ）。さらに、これらの２つのコアクチベーターは、インビトロ相互作用アッセイにおいてＬＸＲαを直接結合することができる（図６Ｄ）。核内レセプター結合に関わる保存されたＬＸＸＬＬモチーフを有するＰＧＣ－１の両方のＮ末端（ＰＧＣ－１α　Ｎ４００およびＰＧＣ－１β　Ｎ３５０）は、ＬＸＲαと相互作用するのに十分である。ＰＧＣ－１βとＬＸＲαとの間の相互作用は、ＰＧＣ－１αよりもリガンド依存性であるようだ。保存されたＬＸＸＬＬモチーフ（ＰＧＣ－１β　Ｎ３５０）を有する小さい領域の欠失は、ＰＧＣ－１βとＬＸＲとの間の結合を減少させ、そしてリガンドの効果を完全に消失させる（図６Ｄ）。

【０２６７】

ＰＧＣ－１コアクチベーターが内在性ＬＸＲ標的遺伝子の発現を制御するか否かを判定するために、ＬＸＲα標的であると知られるいくつかの遺伝子のｍＲＮＡレベルを、アデノウイルスで形質導入されたラット肝臓から単離されたＲＮＡのリアルタイムＰＣＲ解析によって計測した。レポーター遺伝子アッセイと一致して、両方のＰＧＣ－１コアクチベーターが、ＣＹＰ７ａ１リン脂質輸送タンパク質（ＰＬＴＰ）、ＡＢＣＡ１およびＡＢＣＧ１に対するｍＲＮＡ発現を誘導し、ＣＹＰ７ａ１は、ＰＧＣ－１αとＰＧＣ－１βとの両方の異所性の発現に最も応答する（図６Ｅ）。さらに、ＡＢＣＧ８の発現は、ＰＧＣ－１に応答して変化しないが、ＡＢＣＧ５は、ＰＧＣ－１によってわずかに減少する（図６Ｅ）。従って、単なるＰＧＣ－１β標的である、脂肪酸およびコレステロール合成に関わる遺伝子の制御と対照的に、ＰＧＣ－１αとＰＧＣ－１βとの両方が、ＬＸＲ標的遺伝子の発現を活性化するようである。

【０２６８】

ＬＸＲを欠損したマウスは、ＳＲＥＢＰ１ｃの発現が非常に低いということが知られているので（Ｒｅｐａ　ｅｔ　ａｌ．、（２０００）Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ　１４，２８１９－２８３０）、ＳＲＥＢＰ１ｃに独立したＰＧＣ－１β応答におけるＬＸＲの役割を遺伝的に決定することができない。しかしながら、アデノウイルスＰＧＣ－１βをＬＸＲαとＬＸＲβとの両方を欠くマウスへ導入することにより、この経路におけるＬＸＲの役割に一致して、野生型動物において示される高脂血症の応答を完全に欠くことが示される（図

９Ｂ）。

【０２６９】

（実施例５：ＳＲＥＢＰの転写活性におけるＰＧＣ－１βの必要性）

ＰＧＣ－１βが、高脂肪摂餌に応答してＳＲＥＢＰ１ａ／１ｃとともに強く誘導されるという事実は、肝細胞におけるＰＧＣ－１βの濃度がＳＲＥＢＰ活性に必要かつその制限因子であることを示唆する。この理論を検証するために、細胞におけるＰＧＣ－１βレベルを特異的にノックダウンするＲＮＡｉベクター（配列番号６０および配列番号６１）を構築した。図７Ａに示されるように、一過性のトランスフェクションアッセイにおいて試験されるとき、コントロールベクターと比較して、ＰＧＣ－１βに対する両方のＲＮＡｉベクターがＰＧＣ－１βのタンパク質レベルを６０～９０％減少させる。ＰＧＣ－１βがＳＲＥＢＰ機能に必要か否かを判定するために、一過性トランスフェクションにおいてＳＲＥＢＰ転写活性に対するＰＧＣ－１β　ＲＮＡｉの効果を解析した。トランスフェクトされたヘパトーマ細胞において評価されるとき、ＳＲＥＢＰ１ｃは、ＦＡＳプロモーター活性を強く増加させる（図７Ｂ）。ＳＲＥＢＰ１ｃによるＦＡＳプロモーターの活性化は、コントロールベクターまたはベクター発現ランダムＲＮＡｉ配列と比較してＰＧＣ－１β　ＲＮＡｉ構築物によって６０％以上減少する。ＳＲＥＢＰ転写活性の非常に類似した減少はまた、ＳＲＥＢＰ２とＳＲＥＢＰ１ａとを組み合わせるとき、これらのＲＮＡとともに観察される（図７Ｃ）。これらのＰＧＣ－１β　ＲＮＡｉベクターは、ＰＧＣ－１αおよびＨＮＦ４αによるＧ６Ｐａｓｅプロモーター活性の制御に対する効果をほとんど有さないか、または全く有さない（図７Ｄ）。これらのＲＮＡｉベクターはまた、肝細胞におけるＬＸＲに対するＰＧＣ－１αおよび／または他のコアクチベータータンパク質の存在に起因して、多量体を形成したＬＸＲ応答性エレメントを有するレポーターにおいてアッセイされるとき、ＬＸＲα／ＲＸＲα転写活性を変化させない（図７Ｅ）。このデータは、ＰＧＣ－１β活性が、ＦＡＳプロモーターに対するＳＲＥＢＰの完全な転写効果に必要であることを強く示す。

【０２７０】

ＰＧＣ－１βが、内在性ＳＲＥＢＰ１ｃ標的の発現に必要であるか否かを判定するために、ＰＧＣ－１βに対するＲＮＡｉ（配列番号６０）を使用したアデノウイルスＲＮＡｉベクター（Ａｄ－ＲＮＡｉ）を構築し、脂質生成遺伝子の発現に対するその効果を調べた。図７Ｆに示されるように、このＡｄ－ＲＮＡｉを用いたヘパトーマ細胞の感染は、内在性ＰＧＣ－１βタンパク質をこれらのＨ２．３５細胞において約８０％減少させる。ＰＧＣ１－αに対する効果は、検出されなかった。図７Ｇに示されるように、ヘパトーマ細胞におけるＳＲＥＢＰ１ｃ発現は、いくつかの脂質生成遺伝子、例えば、ＳＣＤ－１（３．５倍）、ＦＡＳ（３．６倍）、ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼ（１．８倍）およびＬＤＬＲ（２．４倍）のｍＲＮＡ量を強く刺激する。ＰＧＣ－１βに対するＡｄ－ＲＮＡｉで感染されたヘパトーマ細胞は、ＳＣＤ－１の基礎ｍＲＮＡレベルを減少させるが（５０％）、ＦＡＳおよびＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼを減少させない。しかしながら、ＳＲＥＢＰ１ｃに応答するこれらすべての遺伝子の誘導は、コントロールＧＦＰと比較してＡｄ－ＲＮＡｉで感染された細胞において著しく損なわれる。特に、ＦＡＳおよびＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼの誘導は、５０％以上減少するが、ＳＣＤ－１ｍＲＮＡの発現は、ＳＲＥＢＰ１ｃの存在下でさえも基礎レベル近くまで減少する。対照的に、ＳＲＥＢＰ１ｃなどのＬＸＲ標的遺伝子の誘導は、ＰＧＣ－１βノックダウンによって影響されず（図７Ｈ）、このことは、ＰＧＣ－１βがまた、ＬＸＲを同時活性化することができ、そしてその標的の発現を刺激することができるという観察を反映する（図６）。

【０２７１】

ＰＧＣ－１βが、インビボでの脂質生成遺伝子発現の活性化に必要であるか否かを検証するために、特に高脂肪摂餌に照らして、Ａｄ－ＲＮＡｉを有するマウスをＰＧＣ－１βに対してかまたはコントロールのランダムＲＮＡｉを４日間形質導入し、次いで２日間動物を高脂肪食餌に切り替えた。ＰＧＣ－１βに対するＡｄ－ＲＮＡｉは、肝臓における内在性ＰＧＣ－１βタンパク質を著しく減少させたという結果が証明される（図８Ａ）。肝

臓の遺伝子発現の解析により、ＦＡＳ、ＳＣＤ－１およびＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼを含むいくつかの重要な脂質生成酵素のｍＲＮＡレベルが、コントロールＲＮＡｉベクターと比較してＡｄ－ＲＮＡｉを受けたマウス由来の肝臓において有意に減少することが示される（図８Ｂ）。ＣＹＰ７ａ１およびＰＬＴＰの発現は、２群間で類似している。さらに、ＬＤＬＲのｍＲＮＡレベルはまた、ＰＧＣ－１βノックダウンに応答して約４０％減少し、このことから、このコアクチベーターが、肝臓におけるＬＤＬＲの最適な発現について、直接的または間接的に制限因子であり得ることが示される。これらの結果は、ＰＧＣ－１βが、ＳＲＥＢＰおよびおそらくマウス肝臓において今のところ定義されていない他の転写因子によって活性化される脂質生成プログラムの完全な活性化に本当に必要であることを例証する。

【０２７２】

ＰＧＣ－１βに対するＲＮＡｉで形質導入されたマウスにおける循環脂質レベルもまた調べた。リポタンパク質合成および分泌の制御におけるＰＧＣ－１βの重要な役割に一致して、血漿トリグリセリド濃度は、固形飼料または高脂肪食餌のいずれかを与えたとき、Ａｄ－ＲＮＡｉ形質導入マウスにおいて有意に減少する（１５％）（図８Ｃ）。肝臓のトリグリセリドレベルは、その差が統計的有意性に達しないが、ＲＮＡｉ群よりも高い傾向にある。血漿コレステロールレベルが、高脂肪摂餌後のマウスにおいて増加することが結果により証明される（図８Ｄ）。総血漿コレステロール濃度が、高脂肪摂餌後のＡｄ－ＲＮＡｉ形質導入マウスよりもわずかであるが有意に高い。これは、ＨＤＬコレステロールと非ＨＤＬコレステロールとの両方における増加に起因する（図８Ｄ）。これはまた、少なくとも一部は、ＰＧＣ－１βを生体動物においてノックダウンするときに観察されるＬＤＬＲの低発現の結果であり得る（図８Ｂ）。

【０２７３】

（等価物）

当業者は、単なるルーチン的な実験を使用して、本明細書中に記載される本発明の特定の実施形態との多くの等価物を認識し得るか、または確認することができる。このような等価物は、以下の特許請求の範囲によって包含されることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【０２７４】

【図１】図１Ａ～Ｄは、飽和脂肪の食事摂取によるＰＧＣ－１β発現の誘導を表す。特に、図１Ａは、高脂肪摂餌に応答した肝臓の遺伝子発現のクラスター解析を表す。図１Ａは、高脂肪摂餌に応答して１．８倍以上誘導される肝臓の脂質生合成に関わる遺伝子を例証する。多数のプローブセットが単一遺伝子について利用可能である場合、代表的なプローブセットを、系図を生成するために使用した。ＳＲＥＢＰ１ｃおよびＰＧＣ－１βは、この脂質生成クラスター内に含まれた。図１Ｂは、高脂肪食餌を１日間（斜線四角）または２日間（黒四角）与えられたマウス由来の全肝臓ＲＮＡのリアルタイムＰＣＲ解析を表す。相対的なｍＲＮＡ存在量をコントロール固形飼料値に対する正規化により算出した（白四角）；Ｎ＝４；＊：ｐ＜０．０１。図１Ｃは、０．０７％コレステロールを含有するコントロール食餌を与えられたマウス（白四角）または２％コレステロールを含有する食餌を１日間（斜線四角）もしくは２日間（黒四角）与えられたマウス由来の全肝臓ＲＮＡのリアルタイムＰＣＲ解析を表す。値を、コントロール食餌を与えられたマウスの値に対して正規化した；Ｎ＝４；＊：ｐ＜０．０２。図１Ｄは、単離された肝細胞における遊離脂肪酸によるＰＧＣ－１β発現の制御を表す。初代肝細胞を４００μＭの様々な脂肪酸で４時間処置した。全ＲＮＡを単離し、ＰＧＣ－１β（黒四角）およびＰＧＣ－１β（白四角）に対して特異的なプライマーを使用してリアルタイムＰＣＲにより解析した；＊：ｐ＜０．０１。

【図２】図２Ａ～Ｆは、ＰＧＣ－１βによる転写因子のＳＲＥＢＰファミリーの同時活性化を表す。特に、図２Ａは、ＰＧＣ－１の存在下または非存在下でＳＲＥＢＰ１ｃと組み合わせて、野生型ＦＡＳプロモーター（ＦＡＳ－７００　ｌｕｃ）またはＳＲＥ変異体（ＦＡＳ－７００　ΔＳＲＥ　ｌｕｃ）レポーター構築物のいずれかで一過的にトランスフ

ェクトしたＨ２．３５マウスヘパトーマ細胞を表す。図２Ｂは、ＰＧＣ－１の存在下または非存在下におけるＳＲＥＢＰ２を有するＦＡＳ－７００　ｌｕｃレポータープラスミドの一過性トランスフェクションを表す。図２Ｃは、ＳＲＥＢＰ標的遺伝子に対するチップ解析を表す。ヘパトーマ細胞をアデノウイルスに２日間感染させ、抗Ｆｌａｇ抗体またはコントロールＩｇＧ（下）を用いてチップ解析のために回収した。沈降したゲノムフラグメントを、ＦＡＳおよびＬＤＬＲプロモーターまたはコントロールＧＡＰＤＨプロモーター上のＳＲＥに隣接するプライマーを使用して増幅した。全クロマチン溶解産物由来のゲノムＤＮＡを投入コントロールとして含めた。図２Ｄは、ＰＧＣ－１βおよびＳＲＥＢＰ１ｃの共免疫沈降を表す。培養された２９３細胞を、示すようなプラスミドでトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞由来の全溶解産物を、ＳＲＥＢＰ１ｃに対して特異的な抗体を使用して免疫沈降に供した。溶解産物と沈降物との両方を、ＳＲＥＢＰ１ｃまたはＦｌａｇエピトープタグに対して特異的な抗体を用いて免疫ブロット法により解析した。矢印は、Ｆｌａｇ－ＰＧＣ－１α（ｆ－ＰＧＣ－１α）、Ｆｌａｇ－ＰＧＣ－１β（ｆ－ＰＧＣ－１β）およびＳＲＥＢＰ１ｃに対応するバンドを示す。図２Ｅは、ＳＲＥＢＰ１ｃと相互作用するＰＧＣ－１βドメインのマッピングを表す。固定化されたＧＳＴ（－）またはＧＳＴ－ＳＲＥＢＰ１ｃ（＋）を含有するグルタチオンビーズを、インビトロで翻訳された３５－Ｓ標識完全長ＰＧＣ－１βまたは切断型ＰＧＣ－１β変異体とともにインキュベートした。インビトロで翻訳されたＰＧＣ－１β変異体を左に示すが、これは相互作用アッセイについての投入の１０％に匹敵する。ゲルの上の数字は、変異体のアミノ酸の位置を表示する。ＰＧＣ－１βのアミノ酸３５０と５３０との間のドメインは、ＳＲＥＢＰ１ｃのドッキングに必要であることに注意しなければならない。図２Ｆは、ＳＲＥＢＰ１ｃに対するドッキング部位を提供するＰＧＣ－１βについて特有なドメインを示す、ＰＧＣ－１αおよびＰＧＣ－１βの構造の線図である。

【図３】図３Ａ～Ｃは、ＰＧＣ－１βによる脂肪酸生合成およびコレステロール生合成の経路における酵素をコードするｍＲＮＡの誘導を表す。特に、図３Ａは、コントロールアデノウイルス（Ａｄ－β－Ｇａｌ）、Ａｄ－ＰＧＣ－１αまたはＡｄ－ＰＧＣ－１βを用いて形質導入されたラット由来の全肝臓ＲＮＡのハイブリダイゼーション解析を表す。リボソームタンパク質３６Ｂ４に対して特異的なプローブをローディングコントロールとして含めた。図３Ｂはさらに、高脂肪を与えられたマウス肝臓と比較するとき、ＰＧＣ－１βによってコレステロール生合成経路内の酵素をコードする肝臓のｍＲＮＡの誘導を表す。高脂肪を与えられたマウス肝臓の発現レベルをＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘ[TM]アレイから得られた正規化された値として表す。ＰＧＣ－１に応答したこれらの遺伝子の発現は、示したようなアデノウイルスベクターで形質導入されたラット肝臓由来の全ＲＮＡのリアルタイムＰＣＲ解析によって測定された。ＰＧＣ－１βは、コレステロール生合成に関わる多数の酵素の発現を誘導することができ、これはまた、高脂肪摂餌に応答して誘導される。図３Ｃは、ラットＳＲＥＢＰ１ｃタンパク質の膜および核の形態を表す。この結果から、ＰＧＣ－１β活性がラット肝臓においてＳＲＥＢＰ１ｃの発現およびプロセシングに対して効果を有さないことが証明される。

【図４】図４Ａ～Ｅは、ＰＧＣ－１βによる高脂血症の誘導を表す。ラットを、アデノウイルスを用いて尾部静脈注射を介して形質導入した。特に、図Ａ～Ｃは、Ａｄ－β－Ｇａｌ、Ａｄ－ＰＧＣ－１αまたはＡｄ－ＰＧＣ－１βで形質導入されたラットにおける、肝臓トリグリセリド（Ａ）、血漿トリグリセリド（Ｂ）および総血漿コレステロール（Ｃ）を表す。（Ａ）＊：ｐ＜０．０００３；（Ｂ）＊：ｐ＜０．０００１、＊＊：ｐ＜０．００７；（Ｃ）＊：ｐ＜０．０００４、＊＊：ｐ＜１０～６。図４Ｄは、リポタンパク質プロファイルの解析を表す。コントロールＡｄ－β－ＧａｌまたはＡｄ－ＰＧＣ－１βで形質導入されたラット由来の血漿を、ＦＰＬＣによって分取した。各画分中のトリグリセリド濃度およびコレステロール濃度を計測した。図４Ｅは、パネル（Ｄ）内の曲線下の範囲を使用して算出したＶＬＤＬ画分中の相対的脂質含有量を表す。図４Ｅは、コントロールβ－Ｇａｌと比較するとき、Ａｄ－ＰＧＣ－１βで形質導入されたラット由来の血漿中のＶＬＤＬトリグリセリドおよびコレステロールの大幅な増加を図示する。

【図５】図５Ａ～Ｂは、ＰＧＣ－１βの肝臓の効果におけるＳＲＥＢＰ活性の所要量を図示する。特に、図５Ａは、コントロールβ－Ｇａｌ、ＰＧＣ－１β、ドミナントネガティブＳＲＥＢＰ１ｃ（ＤＮ）またはＰＧＣ－１βとＤＮとの組み合わせを発現するアデノウイルスベクターを用いて形質導入されたラットにおける血漿トリグリセリド濃度を表す。＊：ｐ＜０．０００１（ＰＧＣ－１β　対　β－Ｇａｌ）、＊＊：ｐ＜０．０２（ＰＧＣ－１β　対　ＰＧＣ－１β＋ＤＮ）。図５Ｂは、アデノウイルスで形質導入したラットにおける肝臓の遺伝子発現のリアルタイムＰＣＲ解析を表す。＊：ｐ＜０．００１（ＰＧＣ－１β　対　ＰＧＣ－１β＋ＤＮ）。

【図６】図６Ａ～Ｅは、ＰＧＣ－１αおよびＰＧＣ－１βによるＬＸＲαの同時活性化を図示する。特に、図６Ａは、プラスミドと組み合わせた４×ＬＸＲＥ－ｌｕｃで一過的にトランスフェクトされたＨ２．３５ヘパトーマ細胞を表す。トランスフェクトされた細胞をビヒクルＤＭＳＯ（白四角）または１０μＭのＬＸＲアゴニストＴ０９０１３１７（黒四角）のいずれかでルシフェラーゼアッセイの前の２４時間処置した。図６Ｂは、野生型ＡＢＣＡ１プロモーターレポータープラスミド（ＡＢＣＡ１－ｌｕｃ）またはプラスミドと組み合わせたＬＸＲＥを有さない変異体（ＡＢＣＡ１　ΔＬＸＲＥ－ｌｕｃ）で一過的にトランスフェクトされたＨ２．３５ヘパトーマ細胞を表す。トランスフェクトされた細胞を、図６Ａに記載したようなビヒクルまたはＴ０９０１３１７で処置した。図６Ｃは、ＬＸＲ標的遺伝子についてのチップ解析を表す。Ｈ２．３５細胞を、ＧＦＰ、ｆｌａｇ－ＰＧＣ－１αまたはｆｌａｇ－ＰＧＣ－１βを発現するアデノウイルスに感染させた。細胞を、回収する前の３時間１０μＭのＴ０９０１３１７で処置した。ＰＣＲを、示したようなプライマーを使用して投入ＤＮＡまたは沈降ＤＮＡについて実施した。図６Ｄは、ＬＸＲαとＰＧＣ－１タンパク質のＮ末端との間の相互作用を表す。インビトロで翻訳されたＬＸＲαをＧＳＴまたはＧＳＴとＰＧＣ－１のＮ末端との融合タンパク質とインキュベートした。結合反応を、１０μＭ　Ｔ０９０１３１７の存在下（＋）または非存在下（－）でインキュベートした。反応についてのＬＸＲα投入の１０％を左に示す。図６Ｅは、ＰＧＣ－１αおよびＰＧＣ－１βによる内在性ＬＸＲ標的遺伝子の誘導を表す。Ａｄ－β－Ｇａｌ（白四角）、Ａｄ－ＰＧＣ－１α（斜線四角）またはＡｄ－ＰＧＣ－１β（黒四角）で形質導入したラットから単離した全肝臓ＲＮＡのリアルタイムＰＣＲ解析。１８ＳｒＲＮＡに対して特異的なプライマーを正規化のために内部標準として使用した。

【図７】図７Ａ～Ｈは、ＳＲＥＢＰ媒介性転写におけるＰＧＣ－１βについての所要量を図示する。特に、図７Ａは、ＲＮＡｉ構築物によるＰＧＣ－１βタンパク質レベルのノックダウンを表す。培養された２９３細胞を、ＲＮＡｉ構築物またはベクターコントロールの存在下でＰＧＣ－１β発現プラスミド（ｆ－ＰＧＣ－１β）を用いて一過的にトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を、Ｆｌａｇエピトープに対するモノクローナル抗体を使用する免疫ブロット法のために回収した。両方のＲＮＡｉ構築物が、ベクターコントロールと比較してＰＧＣ－１βタンパク質レベルを減少させる。図７Ｂ～Ｅは、プラスミドと組み合わせた、ＦＡＳ－７００　ｌｕｃ（Ｂ～Ｃ）、Ｇ６Ｐアーゼ－１２００　ｌｕｃ（Ｄ）または４×ＬＸＲＥ－ｌｕｃ（Ｅ）で一過的にトランスフェクトしたヘパトーマ細胞を表す。ＲＮＡｉに向けて、ＰＧＣ－１βに関するベクターコントロールまたはＲＮＡｉ構築物のいずれかをトランスフェクション実験に含めた。ルシフェラーゼ活性をトランスフェクションの４８時間後に計測した。図７Ｆは、ＲＮＡｉのアデノウイルス発現によるＰＧＣ－１βタンパク質のノックダウンを表す。Ｈ２．３５ヘパトーマ細胞を２日間Ａｄ－ＧＦＰまたはＡｄ－ＲＮＡｉに感染させ、次いでＡｄ－ＰＧＣ－１βに感染させた。全溶解産物をＰＧＣ－１βに対して惹起された抗体を使用して免疫ブロット解析のために調製した。図７Ｇは、内在性ＳＲＥＢＰ標的遺伝子の誘導におけるＰＧＣ－１βに対する所要量を図示する。Ｈ２．３５ヘパトーマ細胞を、２日間Ａｄ－ＧＦＰ（黒四角）またはＡｄ－ＲＮＡｉ（白四角）に感染させ、次いで２０時間Ａｄ－ＳＲＥＢＰ１ｃに感染させた。全ＲＮＡを感染細胞から単離し、そしてその遺伝子に対して特異的なプライマーを使用してリアルタイムＰＣＲによって解析した。図７Ｈは、２日間Ａｄ－ＧＦＰ（黒四角）またはＡｄ－ＲＮＡｉ（白四角）に感染させ、その後示したような１０μＭの

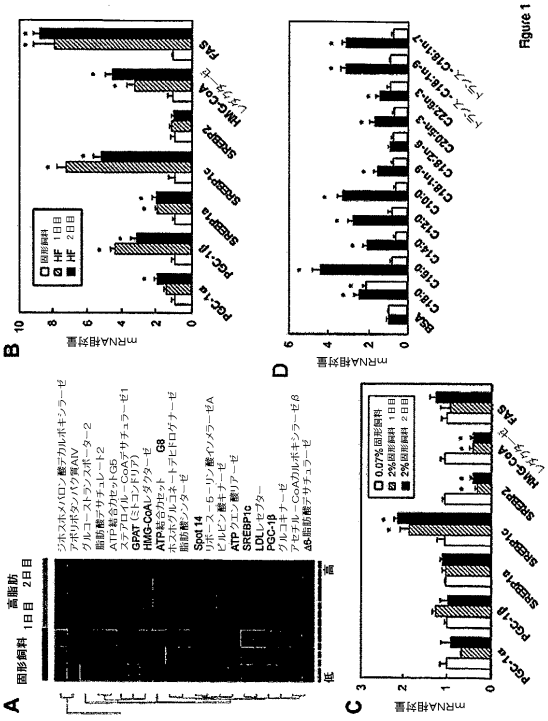
Ｔ０９０１３１７を処置したＨ２．３５ヘパトーマ細胞を表す。相対的なＳＲＥＢＰ１ｃ発現は、リアルタイムＰＣＲ解析によって測定され、１８Ｓ　ｒＲＮＡについて正規化された。

【図８】図８Ａ～Ｄは、インビボでの脂質生成遺伝子発現および脂質ホメオスタシスに対するＰＧＣ－１βの所要量を図示する。特に、図８Ａは、Ａｄ－ＲＮＡｉで形質導入されたマウス由来の肝臓における内在性ＰＧＣ－１βのノックダウンを表す。コントロールアデノウイルスまたはＲＮＡｉアデノウイルスを与えられたマウス由来の８０μｇの肝臓溶解産物は、ＰＧＣ－１β抗体を使用した免疫ブロット解析に供された。図８Ｂは、コントロールアデノウイルス（黒四角、ｎ＝５）またはＲＮＡｉアデノウイルス（白四角、ｎ＝６）で形質導入されたマウスにおける肝臓の遺伝子発現を表す。＊ｐ＜０．０３。図８Ｃは、コントロールアデノウイルス（黒四角）またはＲＮＡｉアデノウイルス（白四角）で形質導入されたマウスにおける肝臓トリグリセリドおよび血漿トリグリセリドの濃度を表す。血漿トリグリセリド濃度を、示したような高脂肪摂餌の２日前（固形飼料）または２日後（ＨＦ）に計測した。＊ｐ＜０．０３；＊＊ｐ＝０．０００２。図８Ｄは、コントロールアデノウイルス（黒四角）またはＲＮＡｉアデノウイルス（白四角）で形質導入されたマウスにおける総コレステロール濃度およびＨＤＬ／非ＨＤＬ血漿コレステロール濃度を表す。ＨＤＬコレステロールを、高脂肪摂餌の２日後の動物において計測した。非ＨＤＬコレステロールを、総コレステロールからＨＤＬを引くことによって算出した。＊ｐ＜０．０３；＊＊ｐ＝０．０２。

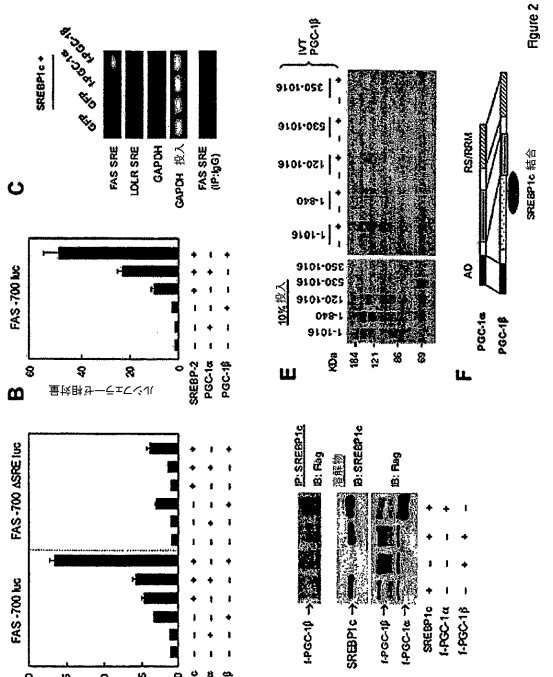
【図９】図９Ａは、ＰＧＣ－１αおよびＰＧＣ－１βによるＬＸＲβの同時活性化を表す。特に、Ｈ２．３５ヘパトーマ細胞を、示したようなプラスミドで一過的にトランスフェクトした。２４時間後、細胞を、ルシフェラーゼアッセイ前の１６時間１０μＭのＴ０９０１３１７で処置した。図９Ｂは、インビボでのＰＧＣ－１βの高脂血症の効果を媒介するときのＬＸＲαおよびＬＸＲβの所要量を表す。特に、野生型またはＬＸＲα／β欠損（ＬＸＲ　ＤＫＯ）マウスを、コントロールβ－ＧａｌまたはＰＧＣ－１βを発現するアデノウイルスで形質導入した。血漿トリグリセリド濃度をウイルス形質導入の５日後に計測した。ＰＧＣ－１βがＬＸＲの非存在下で血漿トリグリセリドレベルを増加させないことに注意すべきである。

【図１０】図１０は、ＰＧＣ－１βによる転写の同時活性化を介する脂質合成およびリポタンパク質分泌の協調を図示する。ＰＧＣ－１βは、転写因子のＳＲＥＢＰファミリーを同時活性化することによって肝臓の脂質合成を刺激する。ＰＧＣ－１βはまた、ＬＸＲを含む転写因子の同時活性化を通じてリポタンパク質分泌を活性化する。

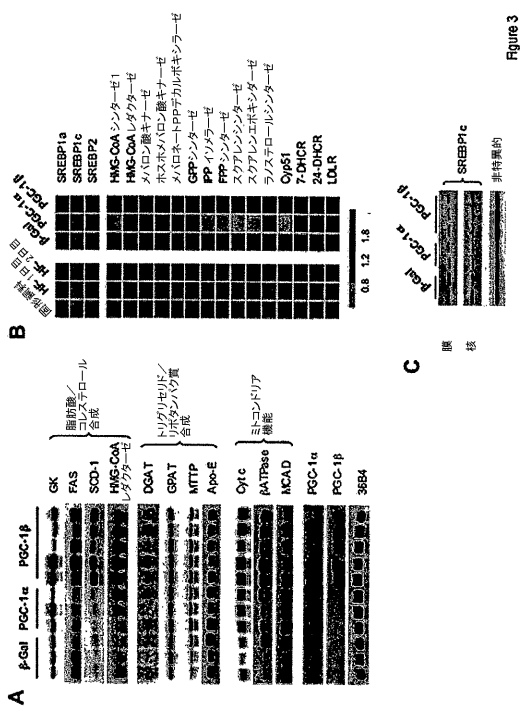
【図１】



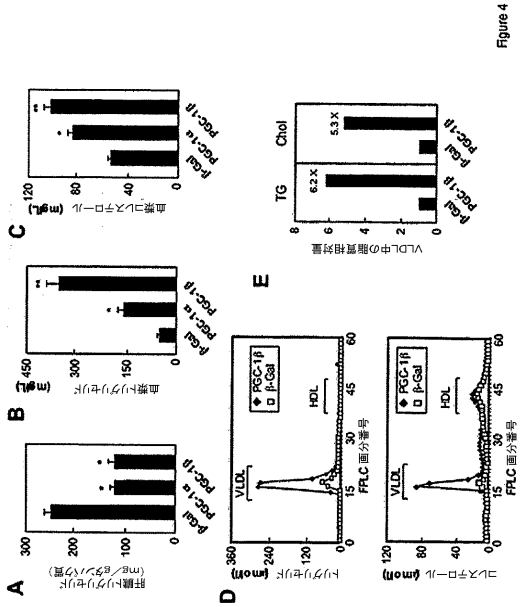
【図２】



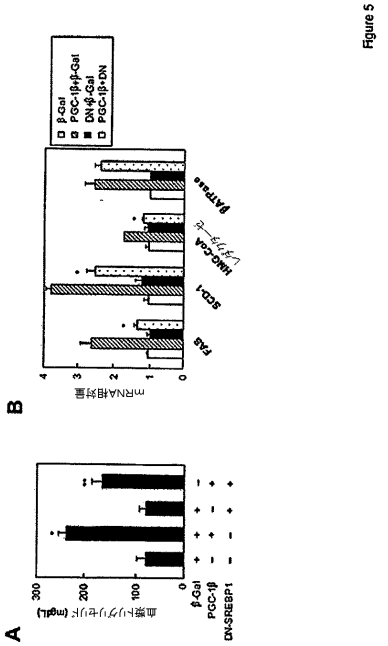
【図３】



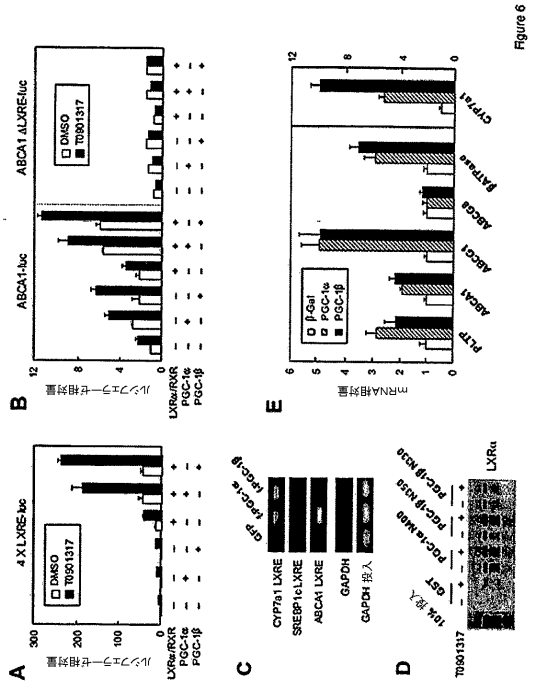
【図４】



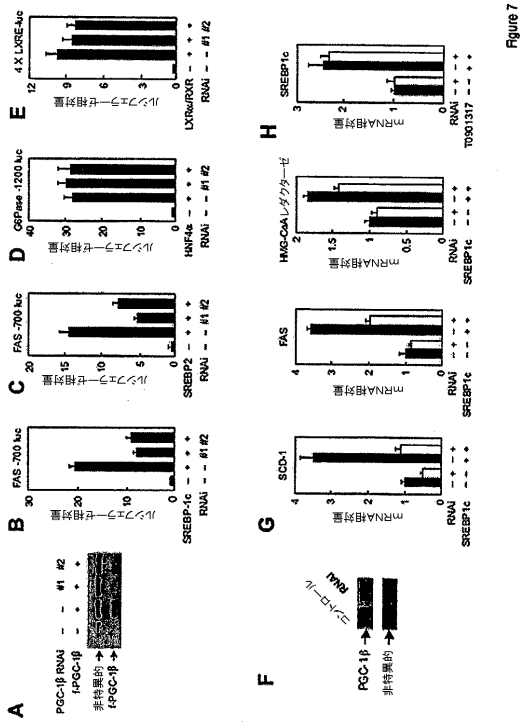
【図５】



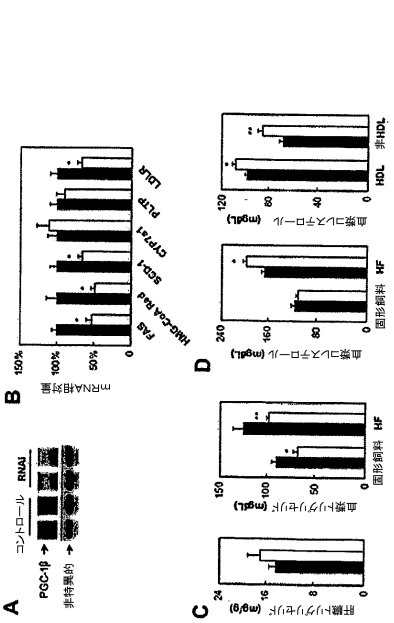
【図６】



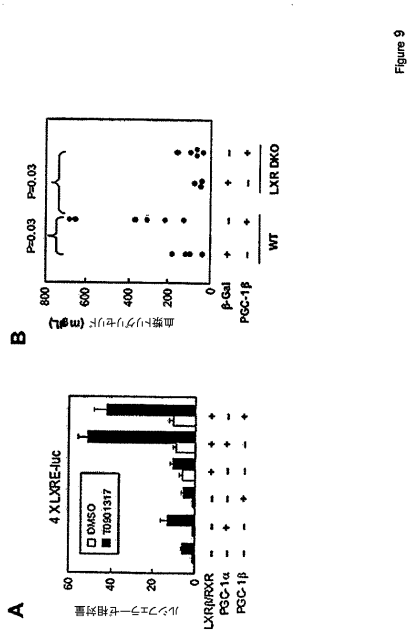
【図７】



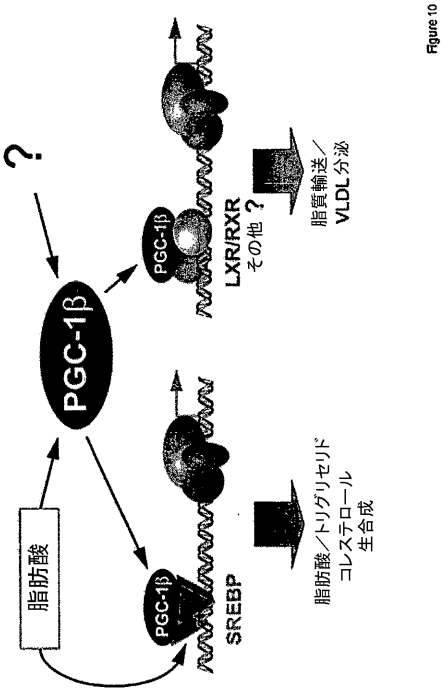
【図８】



【図９】



【図１０】



【配列表】
2008517931000001.xml
【手続補正書】
【提出日】平成19年8月16日(2007.8.16)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】
【配列表】
2008517931000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
A61P	*3/04*	*(2006.01)*	A61P	3/04		4C085
A61P	*3/10*	*(2006.01)*	A61P	3/10		4C086
A61K	*39/395*	*(2006.01)*	A61K	39/395	D	
A61K	*31/7088*	*(2006.01)*	A61K	39/395	N	
A61K	*48/00*	*(2006.01)*	A61K	31/7088		
C12Q	*1/68*	*(2006.01)*	A61K	48/00		
C12Q	*1/02*	*(2006.01)*	C12Q	1/68	A	
G01N	*33/15*	*(2006.01)*	C12Q	1/02		
G01N	*33/50*	*(2006.01)*	G01N	33/15	Z	
G01N	*33/92*	*(2006.01)*	G01N	33/50	Z	
A23L	*1/305*	*(2006.01)*	G01N	33/92	A	
C12N	*15/09*	*(2006.01)*	G01N	33/92	C	
			A23L	1/305		
			C12N	15/00	A	

(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,LV,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,LY,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 スピーゲルマン, ブルース エム.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１６８, ウェーバン, ウェーバン アベニュー ２７１
(72)発明者 リン, チャンディー
アメリカ合衆国 ミシガン ４８１０３, アナーバー, ビラ フランス アベニュー ５６３３
(72)発明者 ニューガード, クリストファー ビー.
アメリカ合衆国 ノース カロライナ ２７５１４, チャペル ヒル, ブルックビュー ドライブ ６６４

Fターム(参考) 2G045 AA40 BB20 CB01 DA36 DA69 DA70 FB03
4B018 MD20 ME01 ME04
4B024 AA01 AA11 BA53 CA01 CA12 HA08 HA11
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ53 QR08 QR42 QR55 QR62 QR77 QS25 QS36 QX02
4C084 AA02 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 DC50 NA14 ZA362 ZA702 ZC332 ZC352
4C085 AA13 AA14
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA36 ZA70 ZC02 ZC33 ZC35