

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006 年 6 月 29 日 (29.06.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/068249 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/023674
- (22) 国際出願日: 2005 年 12 月 22 日 (22.12.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2004-374168
2004 年 12 月 24 日 (24.12.2004) JP
特願 2005-195022 2005 年 7 月 4 日 (04.07.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 堀田 紀久子 (HOTA, Kikuko) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町一丁目 7 番 2 2 号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 田辺 篤 (TANABE, Atsushi) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町一丁目 7 番 2 2 号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 川口 嘉之, 外 (KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋 3 丁目 4 番 10 号 アクロポリス 21 ビル 6 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, 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, KN, 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.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF OBESITY TEST AND METHOD OF SCREENING OF PREVENTIVE OR THERAPEUTIC DRUG FOR OBESITY

(54) 発明の名称: 肥満の検査方法及び肥満の予防又は治療薬のスクリーニング方法

(57) Abstract: Any single nucleotide polymorphism present on secretogranin-3 gene is analyzed, and obesity test is carried out on the basis of obtained analytical results. Further, screening of a preventive or therapeutic drug for obesity is carried out by selecting a substance capable of changing the expression amount of secretogranin-3.

(57) 要約: セクレトグラニン 3 遺伝子上に存在する一塩基多型を分析し、該分析結果に基づいて肥満を検査する。また、セクレトグラニン 3 の発現量を変化させる物質を選択することにより肥満の予防又は治療薬のスクリーニングを行う。

明 細 書

肥満の検査方法及び肥満の予防又は治療薬のスクリーニング方法

技術分野

- [0001] 本発明は肥満の検査方法、及び肥満を予防又は治療するための医薬のスクリーニング方法に関する。

背景技術

- [0002] 近年、食生活などのライフスタイルの変化に伴って、肥満の患者が増加している(非特許文献1)。肥満は糖尿病などの疾患にもつながる危険性があるため、早めに肥満発症を予測し、食生活の改善等に努めることが重要である。

肥満に寄与する要因として、遺伝的要因と環境的要因があるが、遺伝的要因として、多くの肥満関連遺伝子が報告されている(非特許文献2)。しかしながら、これらの遺伝子と肥満との関連は必ずしも明確ではなく、より正確に肥満発症を予測できる遺伝子解析法の開発が求められていた。

- [0003] グラニン β 細胞(インスリン分泌細胞)などの内分泌細胞(非特許文献4)や神経細胞に局在し、ペプチドホルモンや生理活性アミンなどを含む分泌顆粒を形成するタンパク質である。その一つであるセクレトグラニンIII(SCG3)は、脳及び下垂体に特異的なmRNAとしてクローニングされ、視床下部の弓状核に発現することが報告されている(非特許文献3)。また、SCG3の膵臓 β 細胞での発現も報告されている(非特許文献4)。しかしながら、SCG3の肥満への関連については全く知られていなかった。

非特許文献1:Kopelman, P.G. Nature 404, 635-643 (2000)

非特許文献2:Snyder, E.E. et al.Obes. Res. 12, 369-439 (2004)

非特許文献3:Ottiger, H.P., Battenberg, E.F., Tsou, A.P., Bloom, F.E. & Sutcliffe, J.G. J. Neurosci. 10, 3135-3147 (1990)

非特許文献4:Hosaka M et al. Mol Biol Cell. 13, 3388-3399 (2002)

発明の開示

- [0004] 本発明は、肥満の発症や進行、さらには肥満に伴う耐糖能異常、インスリン分泌低

下、糖尿病などの合併症の発症を正確に予測するための検査方法を提供することを課題とする。本発明はまた、肥満及びその合併症の予防薬又は治療薬のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

[0005] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた。その結果、SCG3遺伝子の一塩基多型が肥満に関連することを見出した。さらに、SCG3遺伝子の発現を調節する化合物をスクリーニングすれば、肥満の予防・治療薬が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0006] すなわち、本発明は以下の通りである。

(1)セクレトグラニン3遺伝子上に存在する一塩基多型を分析し、該分析結果に基づいて肥満を検査する方法。

(2)さらに、前記分析結果に基づいて、肥満患者におけるインスリン分泌低下、耐糖能異常、または糖尿病の発症を予測する、(1)の方法。

(3)前記一塩基多型が、配列番号1～12それぞれの塩基配列の塩基番号61番目の塩基に相当する塩基における多型から選ばれる1又は2以上の多型である、(1)または(2)の方法。

(4)配列番号1～12のいずれかの塩基配列において、塩基番号61番目の塩基を含む10塩基以上の配列、又はその相補配列を有する肥満検査用プローブ。

(5)配列番号1～12のいずれかの塩基配列において、塩基番号61番目の塩基を含むDNA断片を増幅することのできる肥満検査用プライマー。

(6)セクレトグラニン3遺伝子またはセクレトグラニン3遺伝子のプロモーターに連結されたレポーター遺伝子を発現する細胞に医薬候補物質を添加する工程、セクレトグラニン3遺伝子またはレポーター遺伝子の発現量を測定する工程、及び前記発現量を変化させる物質を選択する工程を含む、肥満の予防薬又は治療薬をスクリーニングする方法。

図面の簡単な説明

[0007] [図1]SCG3遺伝子上のSNPの位置を示す図。＃がランドマークSNP、＊が挿入／欠失多型、†は1次スクリーニングで解析したSNPsを示す。

[図2A]各SNPを含むフラグメント(1つ)の転写活性化能をSH-SY5Y細胞において解

析した結果を示す図。□はメジャーアレル、■はマイナーアレルに相当するフラグメントを用いた場合の結果をそれぞれ示している。ルシフェラーゼ活性は平均値±SEで示し、有意差は非対t-検定に従った。

[図2B]各SNPを含むフラグメント(4つ連結したもの)の転写活性化能をSH-SY5Y細胞において解析した結果を示す図。□はメジャーアレル、■はマイナーアレルに相当するフラグメントを用いた場合の結果をそれぞれ示している。ルシフェラーゼ活性は平均値±SEで示し、有意差は非対t-検定に従った。

[図3A]各SNPを含むフラグメント(1つ)の転写活性化能をBE(2)-C細胞において解析した結果を示す図。□はメジャーアレル、■はマイナーアレルに相当するフラグメントを用いた場合の結果をそれぞれ示している。ルシフェラーゼ活性は平均値±SEで示し、有意差は非対t-検定に従った。

[図3B]各SNPを含むフラグメント(4つ連結したもの)の転写活性化能をBE(2)-C細胞において解析した結果を示す図。□はメジャーアレル、■はマイナーアレルに相当するフラグメントを用いた場合の結果をそれぞれ示している。ルシフェラーゼ活性は平均値±SEで示し、有意差は非対t-検定に従った。

[図4A]各SNPを含むフラグメント(1つ)の転写活性化能をHIT-T15細胞において解析した結果を示す図。□はメジャーアレル、■はマイナーアレルに相当するフラグメントを用いた場合の結果をそれぞれ示している。ルシフェラーゼ活性は平均値±SEで示し、有意差は非対t-検定に従った。

[図4B]各SNPを含むフラグメント(4つ連結したもの)の転写活性化能をHIT-T15細胞において解析した結果を示す図。□はメジャーアレル、■はマイナーアレルに相当するフラグメントを用いた場合の結果をそれぞれ示している。ルシフェラーゼ活性は平均値±SEで示し、有意差は非対t-検定に従った。

[図5A]SNP-2(5' Flanking -1203)を含むオリゴヌクレオチドを用いたゲルシフト実験の結果を示す図(写真)。C,G,Aはそれぞれの多型に対応するオリゴヌクレオチドを示す。矢印は特異的結合を示している。

[図5B]SNP-9(Intron 1 +190)を含むオリゴヌクレオチドを用いたゲルシフト実験の結果を示す図(写真)。C,G,Aはそれぞれの多型に対応するオリゴヌクレオチドを示す。

す。矢印は特異的結合を示している。

[図6]SCG3遺伝子を含むプラスミドまたはコントロールプラスミドをトランスフェクトしたBE(2)-C細胞の電子顕微鏡による観察結果を示す図(写真)。(A)はコントロールプラスミドをトランスフェクトしたBE(2)-C細胞、(B)はSCG3遺伝子を含むプラスミドをトランスフェクトしたBE(2)-C細胞の電子顕微鏡像である。矢印(→)は分泌顆粒を示す。(C)はSCG3遺伝子を含むプラスミドをトランスフェクトしたBE(2)-C細胞を抗SCG3抗体で染色した染色結果を示す像である。矢印(黒三角)はSCG抗体で染色された分泌顆粒を示している。スケールバーは 500 nmを示している。

発明を実施するための最良の形態

[0008] <1>本発明の検査方法

本発明の検査方法は、セクレタグランニンIII(SCG3)遺伝子上に存在する肥満に関連する一塩基多型(SNP; single nucleotide polymorphism)を分析し、該分析に基づいて肥満を検査する方法である。肥満としては、例えば、BMI (Body Mass Index; (体重kg)/(身長m)²) が25以上の状態をいう。なお、本発明において、「検査」とは将来、肥満になるかどうかを予測ための検査、及び肥満の程度が悪化するかどうかを予測するための検査を含む。また、肥満になった場合における、インスリン分泌能の低下や耐糖能異常、糖尿病などの合併症の発症の検査も含む。さらに、肥満が皮下脂肪蓄積によるものであるかどうかの検査も含む。

[0009] SCG3遺伝子としては、ヒトSCG3遺伝子が好ましく、例えば、GenBank Accession No. AC020892に登録された配列を有する遺伝子を挙げることができる。ただし、該遺伝子は人種の違いなどによって1又は複数の塩基に置換や欠失等が存在する可能性があるため、上記配列の遺伝子に限定されない。

[0010] 肥満に関連するSCG3遺伝子の一塩基多型部位は特に制限されないが、例えば、以下に示すSNP-1、SNP-2、SNP-5、SNP-9、SNP-11、SNP-12、SNP-16、SNP-17、SNP-20、SNP-26、SNP-27、SNP-29が挙げられる。

[0011] [表1]

表 1

SNP no.	多型	Accession_location	SNP location	dbSNP
SNP-1	A/G	AC020892.7_144248	5' Flanking -1492	rs3764220
SNP-2	A/C	AC020892.7_144537	5' Flanking -1203	rs16964465
SNP-5	G/C	AC020892.7_145675	5' Flanking -65	rs3809498
SNP-9	A/G	AC020892.7_146414	Intron 1 +190	rs16964476
SNP-11	C/T	AC020892.7_146702	Intron 1 +478	登録なし
SNP-12	A/C	AC020892.7_146829	Intron 1 +605	rs3214014
SNP-16	C/A	AC020892.7_147775	Exon 4 +351 (I117I)	rs2305709
SNP-17	A/G	AC020892.7_147948	Intron 4 +127	rs3816544
SNP-20	G/A	AC020892.7_153466	Intron 5 +677	rs2305715
SNP-26	C/T	AC020892.7_153481	Intron 6 +2677	rs2305716
SNP-27	T/C	AC020892.7_160403	Intron 8 +25	登録なし
SNP-29	T/C	AC020892.7_163841	Intron 9 +52	rs3765067

[0012] 表1において、例えば、SNP-1はGenBank Accession No. AC020892の144248番目の塩基におけるアデニン(A)／グアニン(G)の多型を意味し、この塩基がAである場合は肥満になる確率が高い。また、アレルを考慮して解析した場合は、SNP-1がAA＞AG＞GGの順で肥満になる確率が高い。なお、SNP locationの5' Flankingは、転写開始点を基準とした位置を示している。例えば、SNP-1は5' 隣接領域内の、転写開始点より1492塩基上流の塩基におけるSNPである。dbSNPはNational Center for Biotechnology InformationのdbSNPデータベース(www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/)の登録番号を示す。この欄が空欄のSNPはdbSNPデータベースに登録されていない新規SNPである。

その他のSNPについても同様であるが、いずれについても左側の塩基が肥満になりやすい塩基である(例えば、SNP-2の場合、A/CのうちAの場合が肥満になりやすく、SNP-5の場合、G/CのうちGの場合が肥満になりやすい)。

なお、SNP-1、SNP-2、SNP-5、SNP-9、SNP-11、SNP-12、SNP-16、SNP-17、SNP-20、SNP-26、SNP-27又はSNP-29について、SNP塩基及びその前後60bpの領域を含む合計121bpの長さの配列を、それぞれ配列番号1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12に示した。それぞれ61番目の塩基が多型を有する。

これらの塩基に相当する塩基を本発明においては解析する。ここで、「相当する」と

は、ヒトSCG3遺伝子上の上記配列を有する領域中の該当塩基を意味し、仮に、人種の違いなどによって上記配列がSNP以外の位置で若干変化したとしても、その中の該当塩基を解析することも含む。

- [0013] 上記SNPの塩基の種類を調べることによって、肥満を検査することができる。検査するSNPの数は、一種類でもよいし、複数でもよい。なお、SNP-1がAであれば他のSNPも左側の塩基(SNP-2=A、SNP-5=G、SNP-9=A、SNP-11=C、SNP-12=A、SNP-16=C、SNP-17=A、SNP-20=G、SNP-26=C、SNP-27=T、SNP-29=T)であるというように、上記SNPのタイプは互いに相関するため、一箇所のみを解析することによっても十分正確な肥満の予測を行うことができる。なお、SCG3遺伝子の配列はセンス鎖を解析してもよいし、アンチセンス鎖を解析してもよい。
- [0014] 肥満患者においては、SNP-2がCC(SNP-1はGG)の場合、インスリンの分泌量が少なく、血糖値が上昇する傾向がある。したがって、肥満患者においてSCG3遺伝子の一塩基多型を調べることで、肥満患者が、インスリン分泌低下、耐糖能異常、または糖尿病を引き起こす可能性について予測することもできる。
- [0015] SCG3遺伝子の一塩基多型の解析に用いる試料としては、染色体DNAを含む試料であれば特に制限されないが、例えば、血液、尿等の体液サンプル、細胞、毛髪等の体毛などが挙げられる。一塩基多型の解析にはこれらの試料を直接使用することもできるが、これらの試料から染色体DNAを常法により単離し、これを用いて解析することが好ましい。
- [0016] SCG3遺伝子の一塩基多型の解析は、通常の一塩基多型解析方法によって行うことができる。例えば、シーケンス解析、PCR、ハイブリダイゼーションなどが挙げられるが、これらに限定されない。
- [0017] シーケンスは通常の方法により行うことができる。具体的には、多型を示す塩基の5'側 数十塩基の位置に設定したプライマーを使用してシーケンス反応を行い、その解析結果から、該当する位置がどの種類の塩基であるかを決定することができる。なお、シーケンスを行う場合、あらかじめ多型を含む断片をPCRなどによって増幅しておくことが好ましい。
- [0018] また、PCRによる増幅の有無を調べるによっても解析することができる。例えば、

多型を示す塩基を含む領域に対応する配列を有し、かつ、各多型に対応するプライマーをそれぞれ用意する。それぞれのプライマーを使用してPCRを行い、増幅産物の有無によってどのタイプの多型であるかを決定することができる。

[0019] また、多型を含むDNA断片を増幅し、増幅産物の電気泳動における移動度の違いによってどのタイプの多型であるかを決定することもできる。このような方法としては、例えば、PCR-SSCP(single-strand conformation polymorphism)法(Genomics. 1992 Jan 1; 12(1): 139-146.)が挙げられる。具体的には、まず、SCG3遺伝子の多型部位を含むDNAを増幅し、増幅したDNAを一本鎖DNAに解離させる。次いで、解離させた一本鎖DNAを非変性ゲル上で分離し、分離した一本鎖DNAのゲル上での移動度の違いによってどのタイプの多型であるかを決定することができる。

[0020] さらに、多型を示す塩基が制限酵素認識配列に含まれる場合は、制限酵素による切断の有無によって解析することもできる(RFLP法)。この場合、まず、DNA試料を制限酵素により切断する。次いで、DNA断片を分離し、検出されたDNA断片の大きさによってどのタイプの多型であるかを決定することができる。

[0021] ハイブリダイゼーションの有無を調べることによって多型の種類を解析することも可能である。すなわち、各塩基に対応するプローブを用意し、いずれのプローブにハイブリダイズするかを調べることによってSNPがいずれの塩基であるかを調べることもできる。

[0022] なお、本発明の検査法においては、SCG3遺伝子の多型に加え、他の遺伝子の多型を解析し、それらの遺伝子の多型の組合わせに基いて肥満の検査を行ってもよい。他の遺伝子としては、 β アドレナリンレセプター遺伝子(日本臨床、2002 Jul;60 Suppl 7:565-70.)やレプチン遺伝子(Hum Genet., 2001, vol.108(3), p233-236)などが挙げられる。

[0023] <2> 本発明の検査用試薬

本発明はまた、肥満を検査するためのプライマーやプローブなどの検査試薬を提供する。このようなプローブとしては、SCG3遺伝子における上記多型部位を含み、ハイブリダイズの有無によって多型部位の塩基の種類を判定できるプローブが挙げら

れる。具体的には、配列番号1～12のいずれかの塩基配列の61番目の塩基を含む配列、又はその相補配列を有する10塩基以上の長さのプローブが挙げられる。プローブの長さはより好ましくは、15～35塩基である。

また、プライマーとしては、SCG3遺伝子における上記多型部位を増幅するためのPCRに用いることのできるプライマー、又は上記多型部位を配列解析（シーケンシング）するために用いることのできるプライマーが挙げられる。具体的には、配列番号1～12のいずれかの塩基配列の61番目の塩基含む領域を増幅したりシーケンシングしたりすることのできるプライマーが挙げられる。このようなプライマーの長さは10～50塩基が好ましく、15～35塩基がより好ましい。

上記多型部位をシーケンシングするためのプライマーとしては、上記塩基の5'側領域、好ましくは30～100塩基上流の配列を有するプライマーや、上記塩基の3'側領域、好ましくは30～100塩基下流の領域に相補的な配列を有するプライマーが例示される。PCRによる増幅の有無で多型を判定するために用いるプライマーとしては、上記塩基を含む配列を有し、上記塩基を3'側に含むプライマーや、上記塩基を含む配列の相補配列を有し、上記塩基の相補塩基を3'側に含むプライマーなどが例示される。

なお、本発明の検査用試薬はこれらのプライマーやプローブに加えて、PCR用のポリメラーゼやバッファー、ハイブリダイゼーション用試薬などを含むものであってもよい。

なお、上記のようなプローブやプライマーは肥満患者がインスリン分泌低下、耐糖能異常、または糖尿病を引き起こすかどうかを予測するためにも用いることができる。

[0024] <3>スクリーニング方法

本発明者の研究により、SCG3は食欲調節に深く関与することが知られている弓状核、室傍核、視床下部外側野に局在することが明らかとなり、SCG3はこれらの部位において食欲の調節に関与するペプチドホルモンの分泌に関与していることが強く示唆された。以上のことから、SCG3遺伝子の発現を調節する物質をスクリーニングすることにより、肥満の予防薬又は治療薬となりうる候補物質を得ることができる。また、肥満に伴う、耐糖能異常、インスリン分泌低下、糖尿病などの合併症の予防薬又は治

療薬となりうる候補物質を得ることもできる。

すなわち、本発明のスクリーニング方法は、SCG3遺伝子またはSCG3遺伝子のプロモーターに連結されたレポーター遺伝子を発現する細胞に医薬候補物質を添加する工程、セクレタグランin3遺伝子またはレポーター遺伝子の発現量を測定する工程、及び前記発現量を変化させる物質を選択する工程を含む、肥満またはその合併症の予防薬又は治療薬のスクリーニング方法である。

[0025] SCG3遺伝子を発現する細胞としては、神経系の細胞が好ましく、SH-SY5Y細胞(ATCC CRL-2266)やBE(2)-C細胞(ATCC CRL-2268)、HIT-T15細胞(ATCC CRL-1777)などを用いることができる。

SCG3遺伝子のプロモーターに連結されたレポーター遺伝子を用いる場合、SCG3遺伝子のプロモーターとしては、上述したSNPを含む領域が好ましく、該遺伝子の転写開始点の上流の少なくとも1.5kbpを含む領域が好ましい。また、プロモーターはその一部を用いてもよく、例えばSNPを含む10～50bpの短い領域を用いてもよい。SNPを含むプロモーターを使用する場合、SNPの塩基としては肥満の危険度が低い方の塩基(例えば、SNP-2の場合はC、SNP-9の場合はG)を含むプロモーターが好ましい。

レポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ遺伝子、GFP遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子などが例示できる。これらのレポーター遺伝子をSCG3遺伝子のプロモーターに連結し、これを哺乳類細胞に遺伝子を導入するために用いられるプラスミドに組み込み、リポフェクションなどの通常の方法にて細胞にトランスフェクションする。

[0026] 上記のような神経細胞又はレポーター遺伝子が導入された細胞に医薬候補物質を添加し、SCG3遺伝子またはレポーター遺伝子の発現量を測定する。

医薬候補物質としては特に制限はなく、例えば、低分子合成化合物であってもよいし、天然物に含まれる化合物であってもよい。また、ペプチドであってもよい。スクリーニングには個々の被検物質を用いてもよいが、これらの物質を含む化合物ライブラリーを用いてもよい。候補物質の中からSCG3遺伝子又はレポーター遺伝子の発現量を変化させるものを選択することにより、肥満薬の候補物質を得ることができる。なお

、「変化」とは、医薬候補物質が、非添加時に比べて、SCG3遺伝子の発現量を増加させること、および減少させることを含む。

SCG3遺伝子の発現量はRT-PCR、定量PCR、ノーザンブロット、ELISA、Western blotting、In situ hybridization、免疫組織染色などの方法により測定することができる。レポーター遺伝子の発現量はレポーター遺伝子の種類にもよるが、蛍光強度などによって測定することができる。

SCG3遺伝子またはレポーター遺伝子の発現量を変化させた物質を抗肥満薬の候補物質として選択することができる。

実施例

[0027] 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれらの実施例に限定されない。

[0028] (1)多型解析

まず、以下のようにして、肥満に関連するSNPの探索を行った。

東京医科大学、大阪大学などの大学病院や豊中市病院、大手前病院などの病院の外来患者から選ばれた肥満患者 ($BMI \geq 30$) を解析の対象とした。2次的肥満や遺伝的肥満の患者は解析対象から除いた。

対照の被験者は東京医科大学などで検診を受けた通常体重のボランティアから任意に選んだ。

各被験者より書面のインフォームドコンセントを得たうえで、各施設の倫理委員会及び理化学研究所の承認を得たプロトコルに基づいて解析を行った。

[0029] <DNAの調製とSNPジェノタイピング>

試料として、各被験者の血液サンプルから染色体DNAを、通常の手順にて調製した。

JSNPデータベース (A database of Japanese Single Nucleotide Polymorphisms; snp.i.ms.u-tokyo.ac.jp/index_ja.html) から任意に選んだ62663種類のSNPsを、94人の日本人の肥満患者 (症例1; 39名の男性及び55名の女性、平均年齢 47 ± 2 歳、 $BMI 36.3 \pm 0.5 \text{ kg/m}^2$) において、インベーターアッセイ (Ohnishi, Y. et al. J. Hum. Genet. 46, 471-477 (2001)) によりジェノタイピングを行った。これらのSNPsのジェノタイプ

とアレル頻度を一般的な日本人からなる658人(対照1)と比較した。その結果、SCG3遺伝子上のSNP(5' Flanking-1492 AC020892.7_144248又はrs3764220;IMS-JST1 18085)が肥満との相関を示し、メジャーアレル(A)とマイナーアレル(G)の比較で $p=0.02$ を示すことがわかった(表2、3の上段参照)。

[0030] したがって、このSCG3遺伝子に注目し、別の肥満患者(症例2;379名の男性及び417名の女性、平均年齢 49 ± 1 歳、BMI $34.3 \pm 0.2 \text{ kg/m}^2$)及び通常体重の対照被験者(コントロール2;285名の男性及び489名の女性、平均年齢 52 ± 1 歳、BMI $21.6 \pm 0.1 \text{ kg/m}^2$)について、SCG3遺伝子上に存在する上記ランドマークSNP(5' Flanking 領域-1492)の多型をさらに調べた。

[0031] 結果を表2、3(下段)に示す。このSNPは、メジャーアレル(A)とマイナーアレル(G)の比較で $p=0.000032$ 、マイナーアレルホモ体(GG)とその他(AG、AA)の比較で $p=0.0000035$ と、肥満に対して非常に高い相関を示すことがわかった。

ジェノタイプ分布、アレル頻度は χ^2 乗検定又はFisher's exact testによって解析した。

表2のHWEテストはHardy-Weinberg equilibrium test (Nealsen, D.M., Ehm, M.G. & Weir, B.S. Am. J. Hum. Gent. 63, 153-1540 (1998))を示す。

[0032] [表2]

表2. SCG3 遺伝子のランドマーク SNP(5' Flanking-1492) と肥満との関連

Population	No. (%) of Subjects			No. (%) of Chromosomes		HWE Test ^a	
	AA	AG	GG	A	G	χ^2	P
症例1 (n=94)	81 (86.2)	13 (13.8)	0 (0.0)	175 (93.1)	13 (6.9)	0.5	0.47
対照1 (n=634)	486 (76.7)	134 (21.1)	14 (2.2)	1106 (87.2)	162 (12.8)	1.7	0.19
症例2 (n=796)	639 (80.3)	154 (19.3)	3 (0.4)	1432 (89.9)	160 (10.1)	3.9	0.05
対照2 (n=711)	522 (73.4)	164 (23.1)	25 (3.5)	1208 (85.0)	374 (15.0)	6.8	0.01

[0033] [表3]

表3. SCG3 遺伝子のランドマーク SNP(5' Flanking-1492) と肥満との関連～まとめ

Population	Genotype		Major allele vs. minor allele (A vs. G)			Minor allele homozygote vs. others (GG vs. AG, AA)		
	χ^2	P ^b	χ^2	P	Odds ratio (95% c.i.)	χ^2	P ^b	Odds ratio (95% c.i.)
症例1 vs. 対照1	5.2	0.088	5.3	0.021	1.97 (1.10-3.54)	2.1	0.24	ND ^c
症例2 vs. 対照2	24.7	0.0000019	17.3	0.000032	1.59 (1.27-1.97)	20.3	0.0000035	9.63 (2.90-32.05)

^a Hardy-Weinberg equilibrium test, ^b Fisher's exact test, ^c not determined

[0034] 次に、上記症例2及び対照2について、SCG3遺伝子内の他のSNPについても調べた。なお、各SNPsのSCG3遺伝子上の位置関係を図1に示した。

その結果(表4)、11種類のSNPの型はSNP-1とほとんど完全に相関しており(Δ の欄参照)、肥満とも有意に相関する(χ^2 P value参照)ことがわかった。危険率(Odds ratio)及び95%信頼区間(c.i.)はWoolfの方法に従った。また、相関の非平衡係数(Δ)はDelvin, B. & Rish, N. Genomics 29, 311-322 (1995)に従った。

以上より、これらの多型を解析することにより、肥満を予測できることが示唆された。

[0035] [表4]

表 4. SGC3 遺伝子上の SNPs と肥満との関連

Genotype																		
Allele1/	症例2					対照2					Genotype		Allele 1 versus allele 2		Genotype 11+12 vsrus 22		Δ ^b	
	Allele2	11	12	22	Sum	11	12	22	Sum	χ ²	P value ^a	χ ²	P value	OR (95%ci.)	χ ²	P value		OR (95%ci.)
SNP No. Position	Allele2	11	12	22	Sum	11	12	22	Sum	χ ²	P value ^a	χ ²	P value	OR (95%ci.)	χ ²	P value	OR (95%ci.)	Δ ^b
SNP-1 5' Flanking -1492	A/G	639	154	3	796	522	164	25	711	24.7	0.0000019	17.3	0.000032	1.59 (1.27-1.97)	20.3	0.0000035	9.63 (2.90-32.05)	-
SNP-2 5' Flanking -1203	A/C	637	156	3	796	522	165	24	711	23.3	0.0000043	15.9	0.000067	1.56 (1.25-1.93)	19.2	0.0000067	9.23 (2.77-30.80)	1.00
SNP-5 5' Flanking -65	G/C	638	155	3	796	522	165	24	711	23.5	0.0000039	16.4	0.000052	1.57 (1.26-1.95)	19.2	0.0000067	9.23 (2.77-30.80)	1.00
SNP-9 Intron 1 +190	A/G	639	154	3	796	522	165	24	711	23.7	0.0000033	16.8	0.000041	1.57 (1.27-1.96)	19.2	0.0000067	9.23 (2.77-30.80)	1.00
SNP-11 Intron 1 +478	C/T	638	155	3	796	522	165	24	711	23.5	0.0000039	16.4	0.000052	1.57 (1.26-1.95)	19.2	0.0000067	9.23 (2.77-30.80)	1.00
SNP-12 Intron 1 +605	A/C	638	155	3	796	522	165	24	711	23.5	0.0000039	16.4	0.000052	1.57 (1.26-1.95)	19.2	0.0000067	9.23 (2.77-30.80)	1.00
SNP-16 Exon 4 +351 (11177)	C/A	636	157	3	796	521	165	25	711	24.2	0.0000025	16.3	0.000054	1.56 (1.26-1.94)	20.3	0.0000035	9.63 (2.90-32.05)	0.99
SNP-17 Intron 4 +127	A/G	638	154	3	795	522	165	24	711	23.7	0.0000034	16.7	0.000043	1.57 (1.27-1.96)	19.2	0.0000068	9.22 (2.77-30.76)	0.99
SNP-20 Intron 5 +677	G/A	637	154	5	796	521	166	24	711	19.8	0.0000034	15.4	0.000085	1.54 (1.24-1.92)	15.0	0.000099	5.53 (2.10-14.56)	0.99
SNP-26 Intron 6 +2677	C/T	637	156	3	796	521	166	24	711	23.5	0.0000038	16.3	0.000053	1.56 (1.26-1.94)	19.2	0.0000067	9.23 (2.77-30.80)	0.99
SNP-27 Intron 8 +25	T/C	637	156	3	796	520	167	24	711	23.8	0.0000032	16.8	0.000042	1.57 (1.26-1.96)	19.2	0.0000067	9.23 (2.77-30.80)	0.99
SNP-29 Intron 9 +52	T/C	637	156	3	796	519	167	25	711	25.0	0.0000016	17.7	0.000026	1.59 (1.28-1.98)	20.3	0.0000035	9.63 (2.90-32.05)	0.99

a, Fisher's exact test; b, Δ shows pairwise LD with SNP-1

[0036] 次に、上記症例2及び対照2について、さらに、BMI、血中インスリン値、血糖値、血中コレステロール値、血中トリグリセリド値、血中HDL-コレステロール値及び血圧を

測定し、それらのパラメーターとSNP-2 (5' Flanking-1203) の多型との関連を調べた。結果を表5に示す。

その結果、肥満患者ではC/Cの場合にBMI、血中インスリン値、血中トリグリセリド値及び血圧が低く、血糖値が高い傾向を示した。一方で、対照群ではこれらのパラメーターは多型によって違いは見られなかった。

上記結果より、肥満患者の中でも、SNP-2のC/C型を有する患者はインスリン抵抗性に応答して血糖値を下げるためのインスリンを十分に分泌できないため、耐糖能異常や糖尿病に陥る可能性が高くなることが示唆された。

[0037] [表5]

表5									
	症例			対照			合計(症例 + 対照)		
	AA	AC	CC	AA	AC	CC	AA	AC	CC
N	637	156	3	522	165	24	1159	321	27
BMI (kg m ⁻²)	34.4 ± 0.2	34.4 ± 0.5	31.2 ± 0.5	21.6 ± 0.1	21.5 ± 0.2	21.8 ± 0.5	28.6 ± 0.2	27.8 ± 0.4	22.8 ± 0.7
グルコース (mmol l ⁻¹)	7.36 ± 0.12	7.33 ± 0.26	8.88 ± 1.64	5.33 ± 0.06	5.19 ± 0.05	5.38 ± 0.15	6.41 ± 0.08	6.21 ± 0.14	5.75 ± 0.29
インスリン (pmol l ⁻¹)	101 ± 4	93 ± 9	57 ± 11	36 ± 1	37 ± 3	40 ± 4	66 ± 2	68 ± 3	43 ± 4
総コレステロール (mmol l ⁻¹)	5.44 ± 0.04	5.42 ± 0.07	5.85 ± 0.19	5.23 ± 0.05	5.27 ± 0.10	5.38 ± 0.21	5.37 ± 0.03	5.36 ± 0.06	5.46 ± 0.18
トリグリセリド (mg dl ⁻¹)	157 ± 4	160 ± 9	115 ± 25	95 ± 3	96 ± 5	101 ± 14	128 ± 3	127 ± 5	102 ± 13
HDL-コレステロール (mmol l ⁻¹)	1.35 ± 0.02	1.41 ± 0.04	1.34 ± 0.17	1.69 ± 0.02	1.68 ± 0.03	1.61 ± 0.07	1.52 ± 0.01	1.56 ± 0.03	1.58 ± 0.06
最大血圧 (mmHg)	138 ± 1	137 ± 1	126 ± 9	116 ± 1	114 ± 1	112 ± 4	130 ± 1	127 ± 1	113 ± 4
最低血圧 (mmHg)	85 ± 1	83 ± 1	79 ± 4	73 ± 1	72 ± 1	69 ± 3	81 ± 1	78 ± 1	70 ± 2

[0038] 次に、肥満の有無に関係なくランダムに選ばれた403人の日本人被検者(男性144名、女性259名;年齢48 ± 1歳)について、BMI、内臓脂肪面積、皮下脂肪面積を測定し、SNP-2の多型との関係を調べた。結果を表6に示した。皮下脂肪面積、内臓脂肪面積と、BMIの相関は、それぞれ0.77 (p<0.001)、0.50 (p<0.001)であった。皮下脂肪面積は内臓脂肪面積に対し、有意に相関を示した (r=0.27, p<0.001)。

[0039] [表6]

表 6

	SNP-2 (5' Flanking-1203) の多型		
	AA	AC	CC
N(男性, 女性)	306 (117 / 189)	88 (26 / 62)	9 (1 / 8)
年齢 (歳)	48 ± 1	49 ± 1	49 ± 3
BMI (kg m ⁻²)	29.7 ± 0.4	30.0 ± 0.9	25.1 ± 0.8
内臓脂肪面積 (cm ²)	128 ± 5	124 ± 7	77 ± 12
皮下脂肪面積 (cm ²)	252 ± 7	238 ± 13	195 ± 16

[0040] SNP-2の多型と皮下脂肪面積および内臓脂肪面積との相関を明らかにするため、SNP-2の多型をAAとその他(AC、CC)に分け、重回帰分析を行った(表7)。その結果、AA型 (n = 306, P = 0.0015), 女性 (P < 0.0001) 及びBMIの増加(P < 0.0001) は、皮下脂肪面積の増加に有意に相関した ($R^2 = 0.67$)。SNP-2の多型は皮下脂肪面積に独立して影響を与えることがわかった。一方、内臓脂肪面積に対しては有意な相関を示さなかった。

[0041] [表7]

表 7

内臓脂肪		AA versus AC + CC		
Independent Variable		回帰係数	標準偏差	P
性別 (男性/女性, 1/0)		61.271	6.583	<0.0001
年齢(歳)		1.064	0.264	<0.0001
BMI, kg m ⁻²		5.723	0.454	<0.0001
Genotype, 1/0		3.193	7.332	0.66
R ²		41%		
皮下脂肪		AA versus AC + CC		
Independent Variable		回帰係数	標準偏差	P
性別 (男性/女性, 1/0)		-69.550	7.167	<0.0001
年齢(歳)		-0.329	0.289	0.26
BMI, kg m ⁻²		13.044	0.495	<0.0001
Genotype, 1/0		25.499	7.952	0.0015
R ²		67%		

[0042] (2)SCG遺伝子の転写解析

SNP-1、SNP-2、SNP-5は5'隣接領域に、SNP-9、SNP-11、SNP-12はイントロン1内に存在する。したがって、これらの多型がSCG3遺伝子の転写に与える影響を調べるために、以下の実験を行った。

各SNPにつき、メジャーアレル又はマイナーアレルを含む20bp領域に相当する2本鎖オリゴヌクレオチドまたはそれが4つ連結したものに、5'側にNheIサイト、3'側にXbaIサイトを導入したオリゴヌクレオチドをそれぞれ合成した。SV40プロモーターに連結されたルシフェラーゼ遺伝子を含むpGL3-Promoter Vector (Promega) に上記オリゴヌクレオチドを組み込んでレポータープラスミドを構築した。オリゴヌクレオチドが組み込まれたことはシーケンスによって確認した。このレポータープラスミドを、トランスフェクション効率の内部標準としてのphRL-TKベクター (Promega) とともに、リポフェクトアミン2000 (Invitrogen) を用いてSH-SY5Y細胞又はBE(2)-C神経芽細胞腫細胞にトランスフェクションした。24時間後に細胞を回収し、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

[0043] なお、SH-SY5Y細胞およびBE(2)-C細胞はATCC (American Tissue Culture Collection) より購入した。これらは2mMグルタミン、5%ウシ胎児血清、100U/mlペニシリン及び100 μ g/mlストレプトマイシンを添加したadvanced Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) を用いて培養した。

[0044] SH-SY5Y細胞、BE(2)-C細胞を用いた結果を図2、3にそれぞれ示す。SNP-2及びSNP-9を含むフラグメントが転写活性化能を有することがわかった。また、これらのフラグメントの転写活性化能はいずれもマイナーアレルのほうが高いことがわかった。さらに、SNP-2を含む33bpの2本鎖オリゴヌクレオチド(以下の段落で用いたフラグメントと同じ)でも、マイナーアレルで転写活性能が高いことを確認した。

また、SCG3は膵臓の β 細胞で発現していることが報告されていることから、ハムスターの膵臓 β 細胞株であるHIT-T15細胞においても、上記と同様の転写解析を行った。(図4)。その結果、HIT-T15細胞でも同様の結果が得られたが、SH-SY5Y細胞よりも転写活性は弱かった。これはヒトとハムスターという種の違いによるものと考えられた。

[0045] 次に、これらのSNP部位にタンパク質が結合するかを調べるため、以下の実験を行

った。

まず、各SNP(SNP-2又はSNP-9)を含む33bpの2本鎖オリゴヌクレオチドを、ジゴキシゲニンゲルシフトキットを用いてジゴキシゲニン-11-ddUTPで標識した。

NE-PER抽出試薬(Pierce)を用いてSH-SY5Y細胞又はBE(2)-C細胞から核抽出物を調製し、上記ジゴキシゲニン-11-ddUTPラベルした2本鎖オリゴヌクレオチドとインキュベートした。競合アッセイには、核抽出物を標識オリゴヌクレオチドの100倍過剰量の非標識オリゴヌクレオチドとプレインキュベートした後に標識オリゴヌクレオチドとインキュベートした。タンパク質-DNA複合体を、0.5Xトリス-ホウ酸-EDTAバッファ-中、5%の非変性ポリアクリルアミドゲルにて分離した。ゲルをナイロン膜に移し、シグナルを化学発光検出システム(Roche)を用い、製造元のプロトコルに従って検出した。

[0046] 結果を図5に示す。SNP-2又はSNP-9のいずれのフラグメントにおいても矢印の位置に核タンパク質の特異的な結合が見られた。この結合は、マイナーアレルに対応するフラグメントでのみ見られ、メジャーアレルに対応するフラグメントでは見られなかった。このことから、転写に関与する核タンパク質がこれらの領域に結合してSCG3遺伝子の転写を調節しており、メジャーアレルの場合にはこの調節が起こらない可能性が示唆された。

[0047] (3)SCG3の組織分布の解析

次に、SCG3の組織分布を調べるため、In situハイブリダイゼーション及び2重ラベル免疫組織化学を行った。

オスのマウス(B57BL/6、8週齢)を三共ラボサービスより購入した。マウスはTissue Fixative(Genostaff)を用いて還流することにより固定化し、パラフィンで包埋した。組織片(4 μ m)を脱パラフィン化し、RNAプローブをハイブリダイズさせた。

プローブは、マウスcDNA(GenBank Accession No. NM_009130)の943~1383番目に相当する441bpのDNA断片をpGEM-T-Easyベクター(Promega)に組み込み、センスとアンチセンスのRNAプローブを生成させ、これをDIG RNAラベリングミックス(Roche)を用いて標識することにより調製した。

ジゴキシゲニン標識RNAプローブを、上記組織片に42°Cで18時間ハイブリダイズさ

せた。結合した標識物質はアルカリフォスファターゼ標識DIG抗体及びアルカリフォスファターゼの基質であるNBT-BCIPを用いて検出した。

その結果、SCG3のmRNAは弓状核(ARC)、室傍核(PVN)、視床下部外側野(LHA)のいずれにも検出された。

[0048] 次に免疫組織染色を行った。組織切片(厚さ4 μ m)を、オレキシンB(1:500 Chemicon)、MCH(melanin-concentrating hormone)(1:500 Phenix Pharmaceuticals)、NPY(neuro peptide Y)(1:200 Chemicon)、BDNF(Brain-derived neurotrophic factor)(1:100 Santa Cruz)又はPOMC(proopiomelanocortin)(1:500 Phenix Pharmaceuticals)のいずれかに対するウサギポリクローナル抗体と、SCG3に対するヤギポリクローナル抗体(1:200 Santa Cruz)の組み合わせのそれぞれと4°Cで一晩インキュベートした。切片を洗浄し、蛍光標識された2次抗体(ヤギIgGに対するAlexa Fluor568ロバポリクローナル抗体、及びウサギIgGに対するAlexa Fluor488ロバポリクローナル抗体;いずれも1:2000 Molecular Probe)を加え、室温で2時間インキュベートした。2重免疫蛍光をオリンパスのBX51顕微鏡にて観察した。

[0049] その結果、SCG3タンパク質は主にARC、LHAおよびPVNに検出された。

ARCは食欲調節に関わる部位であり、NPYやPOMCニューロンが存在する。2重免疫染色の結果、ARC内では、SCG3タンパク質はNPYやPOMCと同じ部位に局在していることが確かめられた。

一方、LHAは、食欲抑制に関与するオレキシンやMCHが存在する部位である。2重免疫染色の結果、SCG3タンパク質は、LHA内ではその一部がオレキシンBやMCHと同じ部位に局在することが確かめられた。

	ARC	LHA	PVN
SCG3	○	○	○
BDNF	○	○	○
NPY	○	—	—
POMC	○	—	—
オレキシンB	—	○	—
MCH	—	○	—

[0050] (4) SCG3タンパク質の細胞内局在

SCG3タンパク質の細胞内局在を調べるため、神経細胞を用いて免疫染色を行った。

SCG3遺伝子のコード領域を、PstIサイトを有する5'プライマー及びSalIサイトを有する3'プライマー、及び鋳型として視床下部のcDNAを用いたRT-PCRにより増幅した。PCR産物を制限酵素で消化した後、同酵素で消化したpBIベクター (Clonotech) に組み込んだ (pBI-SCG3)。一方、preproオレキシン、POMC、proNPY、proMCHのそれぞれをコードする遺伝子をMluIサイトを有する5'プライマー及びEcoRVサイトを有する3'プライマーを用いたRT-PCRにより増幅した。増幅産物をMluI及びEcoRVで消化し、同酵素で消化したpBI-SCG3にそれぞれ組み込んだ (pBI-SCG3-preproorexin、pBI-SCG3-POMC、pBI-SCG3-proNPY、pBI-SCG3-proMCH)。

pBI-SCG3-preproorexin、pBI-SCG3-POMC、pBI-SCG3-proNPY、pBI-SCG3-proMCHを、それぞれ、pTet-Offベクター (Clonotech) を含むSH-SY5Y細胞またはBE(2)-C細胞にリポフェクトアミン2000試薬 (Invitrogen) を用いてトランスフェクトした。免疫細胞染色のために、PBSで洗浄後、細胞を4%パラフォルムアルデヒドで15分固定した。細胞をさらに0.5% Triton X-100で処理し、PBSで洗浄し、1% BSAで室温、2時間ブロッキングし、4℃で一晩インキュベートした。上記の組織染色と同様に、オレキシン、POMC、NPY又はMCHのいずれかに対する抗体及びSCG3抗体で反応させ、次いで、蛍光標識された2次抗体を反応させた。細胞は共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて観察した。

[0051] その結果、SCG3は顆粒状の構造を形成し、オレキシン、MCH、NPY及びPOMCと細胞内局在が同じであることがわかった。以上より、SCG3はこれらの食欲調節に関与するペプチドの分泌を担っており、SNPによってこの発現や機能に変化が生じることにより、肥満が起こることが示唆された。

[0052] (5) 電子顕微鏡による解析

SCG3遺伝子を含むプラスミドまたはコントロールプラスミドでトランスフェクトしたBE(2)-C細胞において、SCG3の局在を免疫電子顕微鏡解析によって調べた。

まず、開始コドンの前にKozak配列及びNotI認識配列を付加した5'プライマー、及

び終止コドンの後にEcoRI認識配列を付加した3'プライマーを用い、視床下部のcDNAからヒトSCG3遺伝子のコード領域を増幅した。増幅産物をNotIとEcoRIで消化した後、pcDNA3.1(-)ベクター (Invitrogen)のNotI部位とEcoRI部位の間に挿入した。得られたpcDNA-SCG3を、FuGENE6 Transfection Reagent (Roche)を用いて、BE(2)-C細胞にトランスフェクトした。48時間後、細胞をPBSで洗浄し、0.05%トリプシン-0.53 mM EDTA (Invitrogen)で処理してディッシュからはがし、遠心分離を行って細胞を回収した。

回収した細胞を2.5% グルタルアルデヒドを含むカコジル酸バッファー (pH7.2) で固定化し、次いで、2% 四酸化オスミウムで処理し、脱水した後、エポキシ樹脂に包埋した。超薄片を酢酸ウラニル及びクエン酸鉛で染色した。

一方、免疫組織染色のためには、回収した細胞を4% パラホルムアルデヒドを含むカコジル酸バッファー (pH7.2) で固定化し、脱水し、LR-WHITE (登録商標) 樹脂に包埋した。超薄片を抗SCG3ヤギポリクローナル抗体 (Santa Cruze; 200倍希釈) で処理し、次いで、5 nm の金で標識された抗ヤギIgGウサギ抗体 (Amersham Bioscience) で処理した。

それぞれの像を透過型電子顕微鏡 (JEOL) を用いて観察した (図6)。SCG3遺伝子をトランスフェクトしたBE(2)-C細胞では顆粒が観察されたが、コントロールベクターをトランスフェクトした細胞では観察されなかった。免疫電子顕微鏡解析の結果、顆粒は抗SCG3抗体で染色され、SCG3が神経細胞内で分泌顆粒を形成していることがわかった。

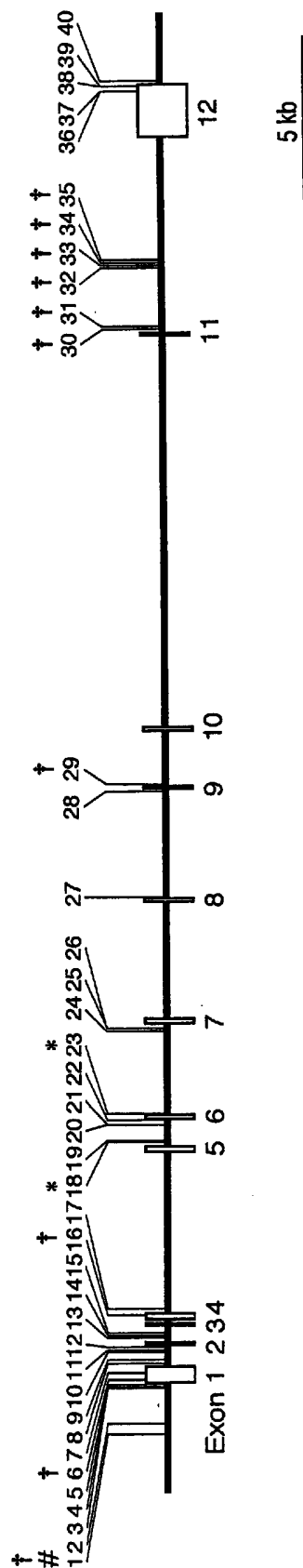
産業上の利用の可能性

[0053] 本発明の検査方法により、肥満の発症リスクや進行を正確に予測することができるため、肥満を予防したり、進行を抑えたりすることができる。また、本発明のスクリーニング方法によれば、肥満の新規な予防・治療薬を得ることができる。

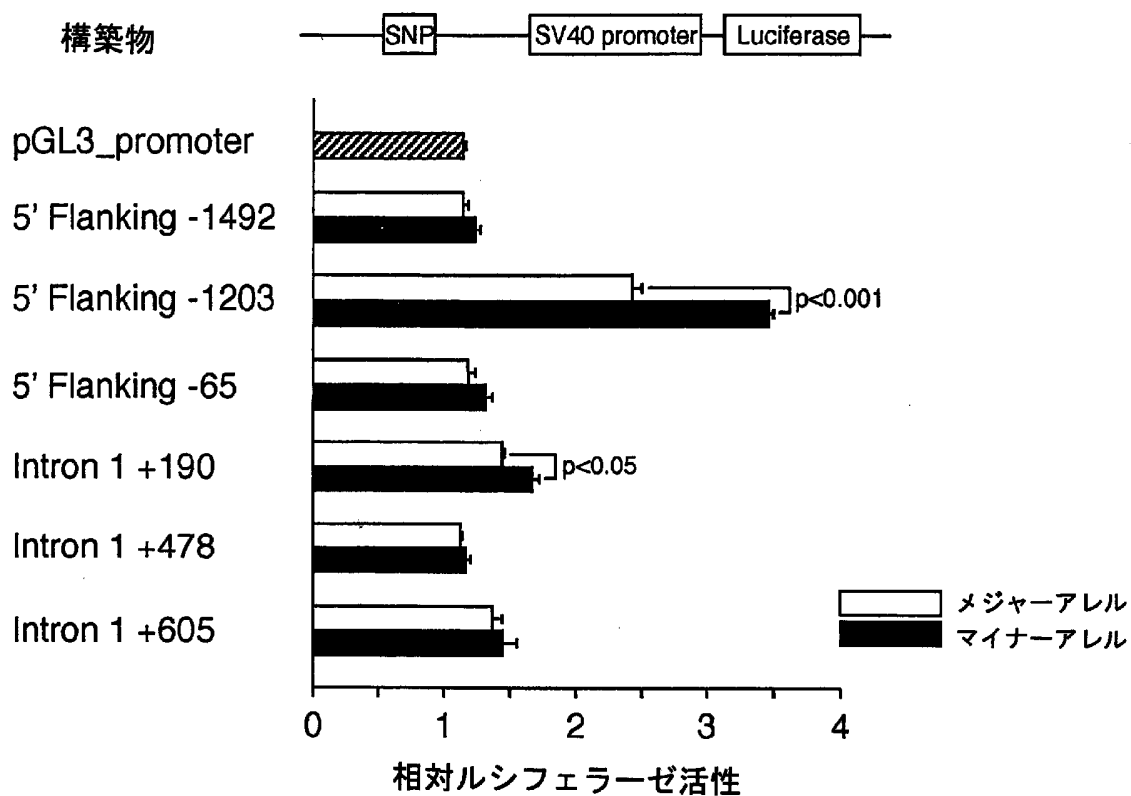
請求の範囲

- [1] セクレトグラニン3遺伝子上に存在する一塩基多型を分析し、該分析結果に基づいて肥満を検査する方法。
- [2] さらに、前記分析結果に基づいて、肥満患者におけるインスリン分泌低下、耐糖能異常、または糖尿病の発症を予測する、請求項1に記載の方法。
- [3] 前記一塩基多型が、配列番号1～12それぞれの塩基配列の塩基番号61番目の塩基に相当する塩基における多型から選ばれる1又は2以上の多型である、請求項1又は2に記載の方法。
- [4] 配列番号1～12のいずれかの塩基配列において、塩基番号61番目の塩基を含む10塩基以上の配列、又はその相補配列を有する肥満検査用プローブ。
- [5] 配列番号1～12のいずれかの塩基配列において、塩基番号61番目の塩基を含むDNA断片を増幅することのできる肥満検査用プライマー。
- [6] セクレトグラニン3遺伝子またはセクレトグラニン3遺伝子のプロモーターに連結されたレポーター遺伝子を発現する細胞に医薬候補物質を添加する工程、セクレトグラニン3遺伝子またはレポーター遺伝子の発現量を測定する工程、及び前記発現量を変化させる物質を選択する工程を含む、肥満の予防薬又は治療薬をスクリーニングする方法。

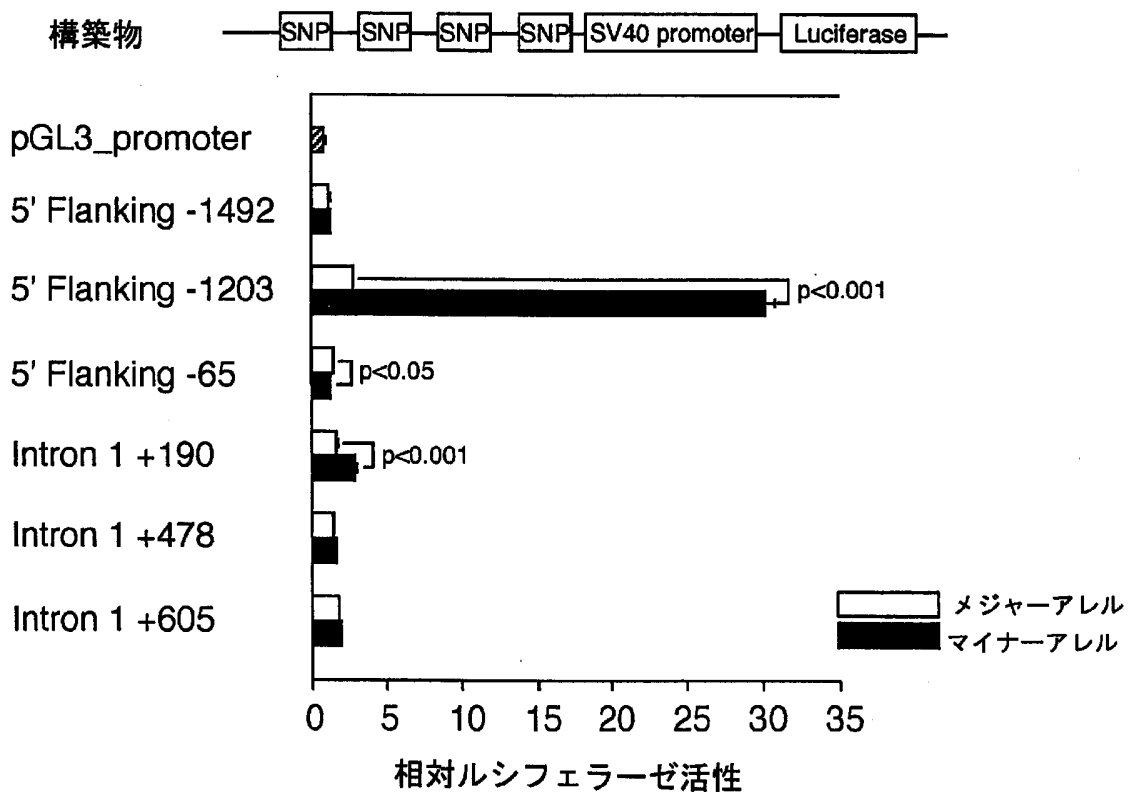
[図1]



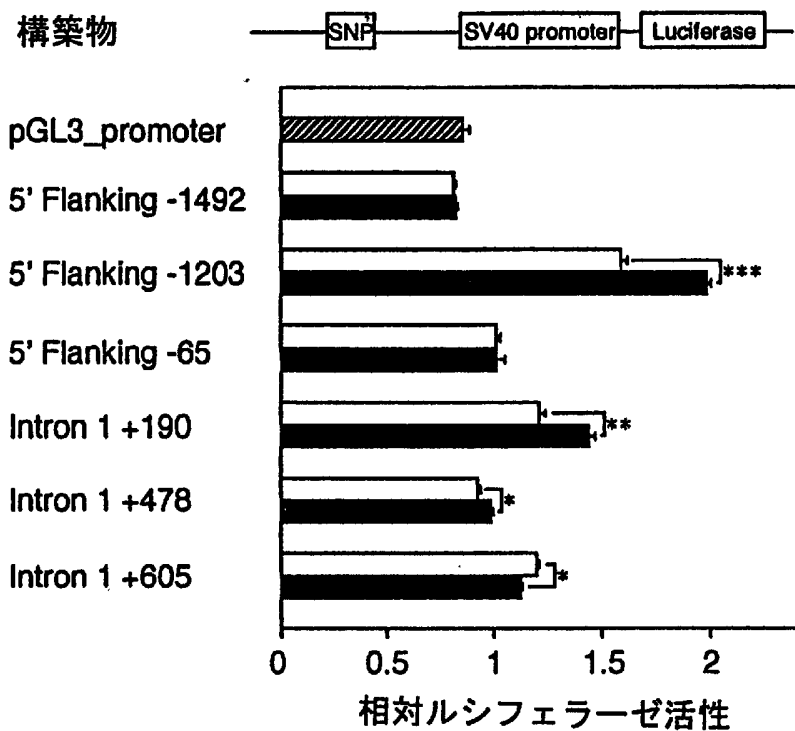
[図2A]



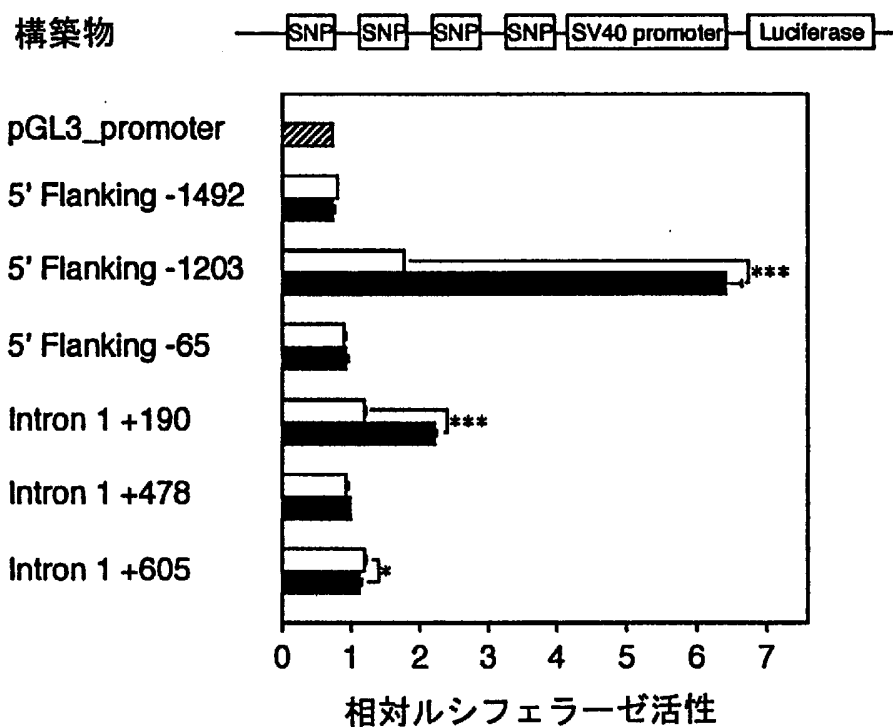
[図2B]



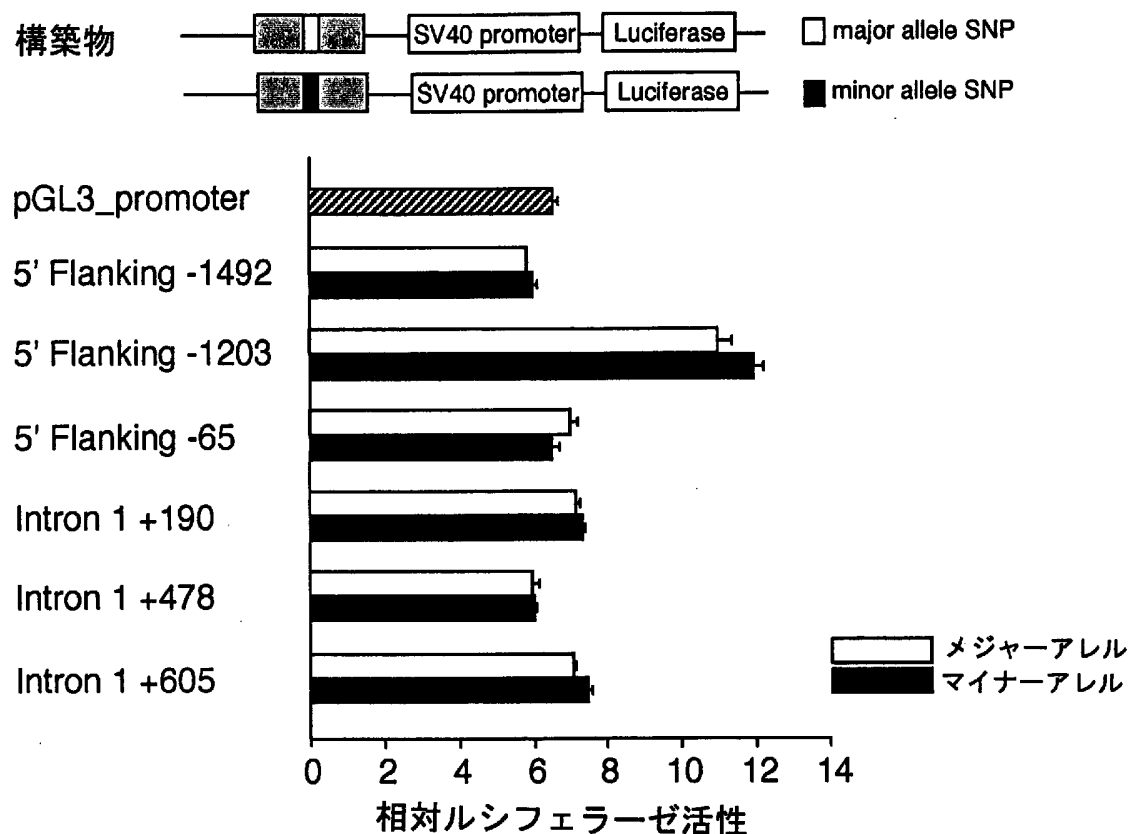
[図3A]



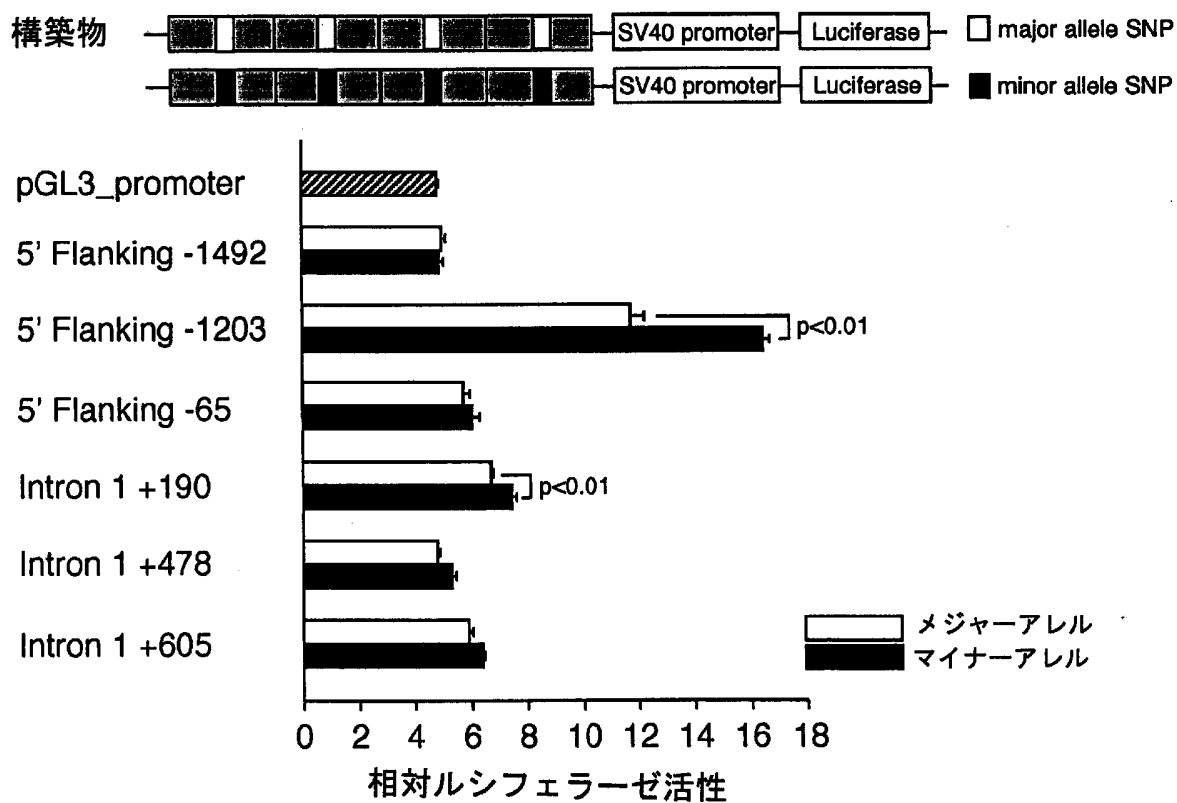
[図3B]



[図4A]



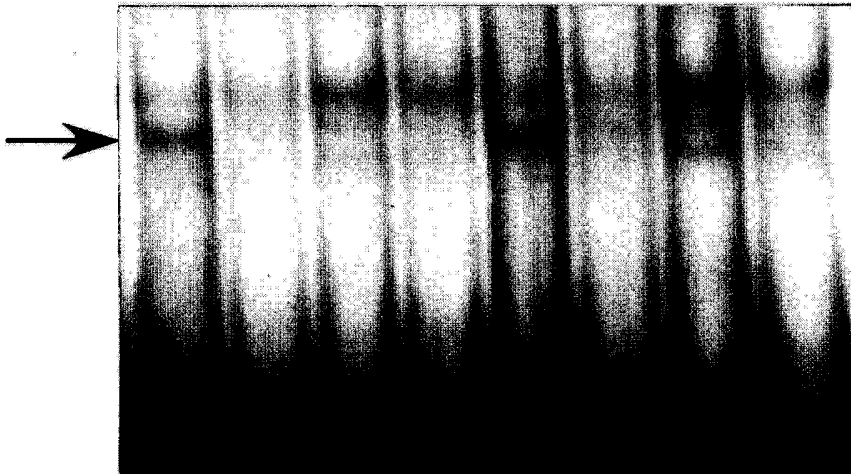
[図4B]



[図5A]

5' Flanking -1203

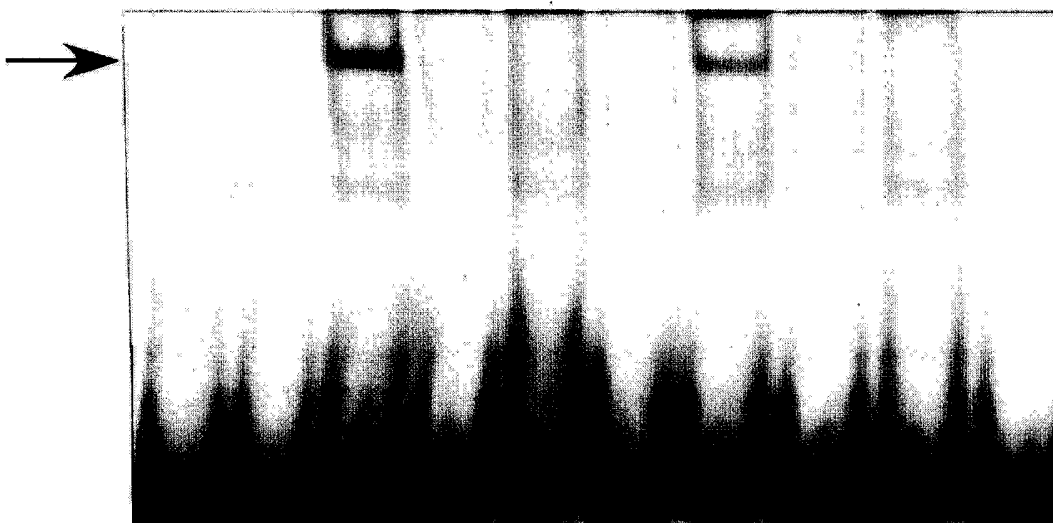
細胞	SY5Y				BE(2)-C			
標識プローブ	C	C	A	A	C	C	A	A
非標識プローブ	-	+	-	+	-	+	-	+



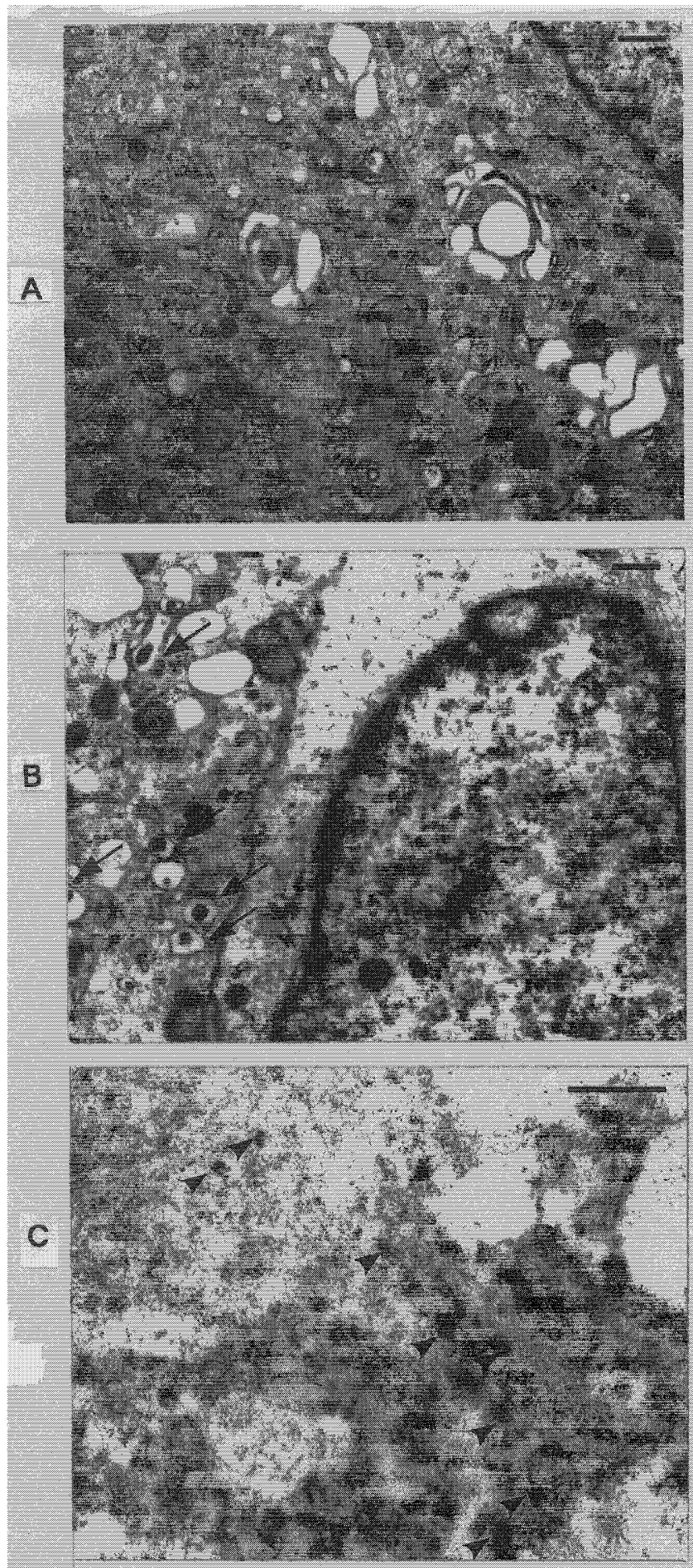
[図5B]

Intron 1 +190

細胞	SY5Y				BE(2)-C			
標識プローブ	G	G	A	A	G	G	A	A
非標識プローブ	-	+	-	+	-	+	-	+



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/023674

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09 (2006.01), **C12Q1/68** (2006.01), **G01N33/15** (2006.01), **G01N33/50** (2006.01)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09 (2006.01), **C12Q1/68** (2006.01), **G01N33/15** (2006.01), **G01N33/50** (2006.01)

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OTTIGER, H.P. et al., 1B1075: a brain- and pituitary-specific mRNA that encodes a novel chromogranin/secretogranin-like component of intracellular vesicles, J.Neurosci., 1990, Vol.10, No.9, pages 3135 to 3147	1-6
A	KINGSLEY, D.M. et al., Genetic ablation of a mouse gene expressed specifically in brain, EMBO.J., 1990, Vol.9, No.2, pages 395 to 399	1-6
A	HOSAKA, M. et al., Identification of a chromogranin A domain that mediates binding to secretogranin III and targeting to secretory granules in pituitary cells and pancreatic beta-cells, Mol.Biol.Cell, 2002, Vol.13, No.10, pages 3388 to 3399	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 January, 2006 (11.01.06)

Date of mailing of the international search report
17 January, 2006 (17.01.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01), C12Q1/68(2006.01), G01N33/15(2006.01), G01N33/50(2006.01)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01), C12Q1/68(2006.01), G01N33/15(2006.01), G01N33/50(2006.01)

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	OTTIGER, H. P. et al, 1B1075: a brain- and pituitary-specific mRNA that encodes a novel chromogranin/secretogranin-like component of intracellular vesicles, J Neurosci, 1990, Vol.10, No.9, pp.3135-3147	1-6
A	OKINGSLEY, D. M. et al, Genetic ablation of a mouse gene expressed specifically in brain, EMBO J, 1990, Vol.9, No.2, pp.395-399	1-6

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

* 引用文献のカテゴリー

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

の日の後に公表された文献

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

国際調査を完了した日

11.01.2006

国際調査報告の発送日

17.01.2006

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

飯室 里美

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4 B

2 9 3 6

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	HOSAKA, M. et al, Identification of a chromogranin A domain that mediates binding to secretogranin III and targeting to secretory granules in pituitary cells and pancreatic beta-cells, Mol Biol Cell, 2002, Vol.13, No.10, pp.3388-3399	1-6