

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 8 月 9 日(09.08.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/105630 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 5/071* (2010.01)
C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/052321
- (22) 国際出願日: 2012 年 2 月 1 日(01.02.2012)
- (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 2011-022172 2011 年 2 月 3 日(03.02.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人広島大学(HIROSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7398511 広島県東広島市鏡山一丁目 3 番 2 号 Hiroshima (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 加藤 幸夫(KATO Yukio) [JP/JP]; 〒7348553 広島県広島市南区霞一丁目 2 番 3 号 国立大学法人広島大学大学院医歯薬学総合研究科内 Hiroshima (JP). 河本健(KAWAMOTO Takeshi) [JP/JP]; 〒7348553 広島県広島市南区霞一丁目 2 番 3 号 国立大学法人広島大学大学院医歯薬学総合研究科内 Hiroshima (JP). 藤本 勝巳(FUJIMOTO Katsumi) [JP/JP]; 〒7348553 広島県広島市南区霞一丁目 2 番 3 号

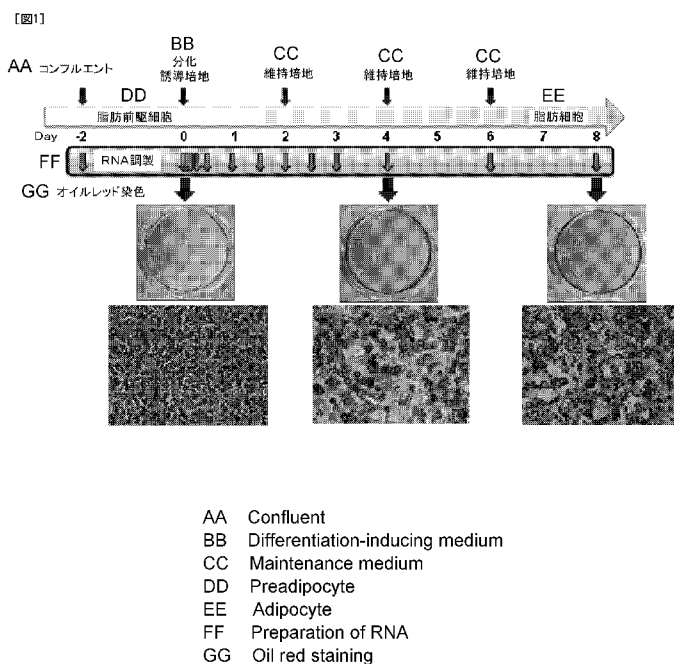
国立大学法人広島大学大学院医歯薬学総合研究科内 Hiroshima (JP). 能城 光秀(NOSHIRO Mitsuhide) [JP/JP]; 〒7348553 広島県広島市南区霞一丁目 2 番 3 号 国立大学法人広島大学大学院医歯薬学総合研究科内 Hiroshima (JP).

- (74) 代理人: 木村 満(KIMURA Mitsuru); 〒1010054 東京都千代田区神田錦町二丁目 7 番地 協販ビル 2 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR TESTING DISEASES ASSOCIATED WITH LIPID METABOLISM, AND METHOD FOR ASSESSMENT OF PROPHYLACTIC AND/OR THERAPEUTIC AGENT FOR DISEASES ASSOCIATED WITH LIPID METABOLISM

(54) 発明の名称: 脂質代謝関連疾患の検査方法、ならびに脂質代謝関連疾患の予防および／または治療剤の評価方法



(57) Abstract: Provided are a reliable method for testing diseases associated with lipid metabolism and a method for assessing a prophylactic and/or therapeutic agent for diseases associated with lipid metabolism, each of which utilizes the more specific mechanism of action with other adipogenesis-related factors in DEC1 and the influence of circadian rhythm. The method for testing diseases associated with lipid metabolism is characterized in that the expression amount of at least one adipogenesis-related gene, of which the circadian rhythm is induced by DEC1, on the basis of the circadian rhythm in a sample collected from a subject is employed as a measure. Preferably, the sample is a biological sample containing an adipocyte, an adipose tissue or a substance secreted from an adipocyte.

(57) 要約: より具体的なDEC1における他の脂肪関連因子との作用機序および概日リズムの影響を利用した、確実性を有する脂質代謝関連疾患の検査方法、ならびに脂質代謝関連疾患の予防および／または治療剤の評価方法を提供する。脂質代謝関連疾患の検査方法は、被検体から採取した試料における、DEC1により概日リズムを誘導される少なくとも一

つの脂肪関連遺伝子の概日リズムに基づく発現量を指標とすることを特徴とする。好ましくは、当該試料は、脂肪細胞、脂肪組織、または、脂肪細胞から分泌される物質を含む生体試料のいずれかである。



MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：

脂質代謝関連疾患の検査方法、ならびに脂質代謝関連疾患の予防および／または治療剤の評価方法

技術分野

[0001] 本発明は、脂肪調節因子 D E C 1 を利用する、脂質代謝関連疾患の検査方法、ならびに脂質代謝関連疾患の予防および／または治療剤の評価方法に関する。

背景技術

[0002] 脂質代謝関連疾患、例えば、メタボリックシンドローム・肥満は多因子性疾患であり、病態または病因には不明な点が多い。その為、多くの製薬会社がメタボリックシンドローム・肥満の診断、予防および治療薬等を研究、開発している。

[0003] 近年報告されたメタボリックシンドローム・肥満等に関連する脂肪調節因子として、例えば、basic helix-loop-helix型転写調節因子である D E C 1（種々の動物において、S H A R P - 2、S T R A 1 3 または B H L H B 2 ともいう）が挙げられる（特許文献 1 参照）。さらに、特許文献 2 には、D E C 1 と脂肪酸代謝との関係が示されており、根拠として D E C 1 制御に基づくマウス筋芽細胞株における脂肪酸の β 酸化（脂肪酸を酸化して脂肪酸アシル C o A を生成し、アセチル C o A を取り出す代謝経路）の抑制に係る実施例が記載されている。

[0004] さらに、D E C 1 は脂肪酸代謝調節に関連する因子である以外にも、多様な機能を持っていることが知られている。その一つとして、D E C 1 は体内時計自体を制御する時計転写因子でもあり、概日リズムにおける発現をしていることが分かっている。例えば、特許文献 3 および非特許文献 1 には、分子時計としての D E C 1 の役割が詳細に記載されており、D E C 1 を用いて概日リズムを調節する方法が記載されている。具体的には、E - b o x エン

ハンサを通してDEC1を用い、同様に分子時計として機能しているCLOCKおよびBMAL1の誘発する転写活性化を制御し調節する方法が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特表2006-514113号公報

特許文献2：特開2009-167117号公報

特許文献3：特開2005-204501号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Kawamoto, T., M. Noshiro, F. Sato, K. Maemura, N. Takeda, R. Nagai, T. Iwata, K. Fujimoto, M. Furukawa, K. Miyazaki, S. Honma, K. Honma, and Y. Kato., 2004, A novel autofeedback loop of Dec1 transcription involved in circadian rhythm regulation., Biochem Biophys Res Commun 313, 117-124

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 前述したとおり、特許文献2には、DEC1と脂肪酸代謝との関係が示されており、DEC1制御に基づく肝細胞での脂肪酸 β 酸化代謝経路における抑制に係る実施例が記載されている。しかし、メタボリックシンドローム・肥満等が関連する全ての脂肪酸代謝調節、すなわち脂肪細胞での脂肪の貯蔵等をも含む脂肪酸代謝におけるDEC1の作用は未だ完全には実証されていない。さらに、脂肪調節因子（脂肪酸代謝調節因子）としてのDEC1と、他の脂肪関連因子との具体的な作用機序についても解明されていない。

[0008] このような場合、脂肪調節因子のDEC1制御を、メタボリックシンドローム・肥満等の診断、予防および副作用のない実用的な治療薬等の研究、開発において直接的に繋げ、利用することは難しい。

[0009] また、特許文献3に記載されているように、一般的にDEC1は概日リズム

ムにおける発現をしている。その為、DEC1制御による脂肪酸代謝の作用機序が明らかとなった場合でも、メタボリックシンドローム・肥満等の診断、予防および副作用のない実用的な治療薬等の研究、開発には、当該DEC1の概日リズムでの発現を考慮しなければならない。

[0010] しかし、前述したように、DEC1が他の脂肪関連因子とどのように作用しているかは完全には明らかとなっていない為、当該DEC1の概日リズム発現と脂肪酸代謝調節とを単純に組み合わせるのみでは、メタボリックシンドローム・肥満等の診断、予防および副作用のない実用的な治療薬等の研究、開発が可能であるとは言い難い。

[0011] 本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、より具体的なDEC1における他の脂肪関連因子との作用機序および概日リズムの影響を利用した、確実性を有する脂質代謝関連疾患の検査方法、ならびに脂質代謝関連疾患の予防および／または治療剤の評価方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 上記目的を達成する為、本発明者らは、ルシフェラーゼレポーターアッセイ、クロマチン免疫沈降法（ChIPアッセイ）、ゲルシフトアッセイおよびリアルタイムPCR等の実験方法を用い、核内受容体によるDec1の発現調節機構の解析、マウス3T3-L1細胞の脂肪分化モデルを用いたDEC1の役割解析、および、DEC1ノックアウトマウスの脂肪分化・脂質代謝調節における標的遺伝子の解析（実施例参照）を行った。

[0013] 本発明者らが鋭意研究を重ねた結果、DEC1は脂肪関連遺伝子カセット全体の概日リズムを誘導するとともに、脂肪分化、脂肪代謝およびアディポサイトカイン産生を統合的に制御する転写因子であることが解明された（DEC1-脂肪関連遺伝子系）。具体的には、まず、ROR α がDEC1発現を促進し、DEC1がPPAR γ のパートナーのRXR α に結合する。その結果、PPAR γ 2:RXR α 作用が抑制され、PPAR γ 2とその標的遺伝子群の発現も抑制される。最後には、脂肪代謝抑制および脂肪分化抑制に至ることが解明された。

- [0014] なお、Choらの最近の報告でも、DEC1は核内受容体等とヘテロ二量体をつくるRXR α と相互作用し、抑制因子として機能することがわかっている (Cho, Y., M. Noshiro, M. Choi, K. Morita, T. Kawamoto, K. Fujimoto, K. Kato, and M. Makishima, 2009, The basic helix-loop-helix proteins differentiated embryo chondrocyte (Dec) 1 and DEC2 function as corepressors of retinoid X receptors., Mol Pharmacol 76, 1360-1369 参照)。
- [0015] さらに、このようなDEC1-脂肪関連遺伝子系は、主として脂肪組織選択的に作動するということも示唆された。具体的には、肝臓の場合、DEC1により概日リズムを誘導される脂肪関連遺伝子は少ないか、または存在しないということが解明された(実施例および比較例参照)。
- [0016] そこで、本発明の第1の態様に係る脂質代謝関連疾患の検査方法は、被検体から採取した試料における、DEC1により概日リズムを誘導される少なくとも一つの脂肪関連遺伝子の概日リズムに基づく発現量を指標とすることを特徴とする。
- [0017] 好ましくは、前記試料は、脂肪細胞、脂肪組織、または、脂肪細胞から分泌される物質を含む生体試料のいずれかであることを特徴とする。
- [0018] また、好ましくは、前記少なくとも一つの脂肪関連遺伝子は、Abca1、Acs11、Adfp、Agpat2、Cd36、Cidec、Fabp4、Fasn、Gpat3、Lipe、Lpin1、Plin、Pnpla2、S3-12、Cebp α 、Cebp β 、Cebp δ 、c-Jun、Klf-4、Klf-15、Retn、Acot2、Chka、Klf-5、Pgcl α 、Srebp2、Tc10-like、IL-6、Rbp4、Adipoqおよび/またはLeptinであることを特徴とする。
- [0019] より好ましくは、前記少なくとも一つの脂肪関連遺伝子は、アディポサイトカインの発現に関連する遺伝子であることを特徴とする。
- [0020] さらに好ましくは、前記アディポサイトカインは、アディポネクチンであることを特徴とする。

[0021] 本発明の第2の態様に係る脂質代謝関連疾患の予防および／または治療剤の評価方法は、

被験物質の存在下および非存在下での、被検体から採取した試料における、DEC1により概日リズムを誘導される少なくとも一つの脂肪関連遺伝子の概日リズムに基づく発現量を測定する測定工程と、

前記被験物質の非存在下での前記試料における前記少なくとも一つの脂肪関連遺伝子の概日リズムに基づく発現量に対する、前記被験物質の存在下での前記試料における前記少なくとも一つの脂肪関連遺伝子の概日リズムに基づく発現量を比較する比較工程と、

を含むことを特徴とする。

[0022] 好ましくは、前記試料は、脂肪細胞、脂肪組織、または、脂肪細胞から分泌される物質を含む生体試料のいずれかであることを特徴とする。

[0023] また、好ましくは、前記少なくとも一つの脂肪関連遺伝子は、Abca1、Acs11、Adfp、Agpat2、Cd36、Cidec、Fabp4、Fasn、Gpat3、Lipe、Lpin1、Plin、Pnpla2、S3-12、Cebp α 、Cebp β 、Cebp δ 、c-Jun、Klf-4、Klf-15、Retn、Acot2、Chka、Klf-5、Pgc-1 α 、Srebp2、Tc10-like、IL-6、Rbp4、Adipoqおよび／またはLeptinであることを特徴とする。

[0024] より好ましくは、前記少なくとも一つの脂肪関連遺伝子は、アディポサイトカインの発現に関連する遺伝子であることを特徴とする。

[0025] さらに好ましくは、前記アディポサイトカインは、アディポネクチンであることを特徴とする。

発明の効果

[0026] 本発明によれば、より具体的なDEC1における他の脂肪関連因子との作用機序および概日リズムの影響を利用した、確実性を有する脂質代謝関連疾患の検査方法、ならびに脂質代謝関連疾患の予防および／または治療剤の評価方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

- [0027] [図1]マウス 3 T 3 - L 1 細胞の脂肪分化の経時変化を示す図である。
- [図2]マウス 3 T 3 - L 1 細胞の脂肪分化過程における分化関連および脂質代謝遺伝子の発現を示す図である。
- [図3]脂肪細胞における中性脂肪代謝関連遺伝子を示す図である。
- [図4]N I H 3 T 3 細胞系における D E C 1 の P P R E レポーターへの影響を示す図である。
- [図5]マウス 3 T 3 - L 1 細胞系における D E C 1 の P P R E レポーターへの影響を示す図である。
- [図6]P p a r γ 2、L p l、PerilipinおよびResistinの各遺伝子の P P R E 領域に係る C h I P アッセイの結果を示す図である。
- [図7]D E C 1 が直接作用するタンパク質を解析した免疫沈降法の結果を示す図である。
- [図8]D E C 1 による標的遺伝子発現抑制の二重の機構を示す図である。
- [図9]実施例に係る D E C 1 ノックアウトマウスが時計遺伝子の発現に及ぼす影響を示す図である。
- [図10]実施例に係る D E C 1 ノックアウトマウスが脂肪代謝調節因子の発現に及ぼす影響を示す図である。
- [図11]実施例に係る D E C 1 ノックアウトマウスが中性脂肪代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響を示す図である。
- [図12]実施例に係る D E C 1 ノックアウトマウスがその他の脂質代謝酵素遺伝子の発現に及ぼす影響を示す図である。
- [図13]実施例に係る D E C 1 ノックアウトマウスがアディポサイトカインの発現に及ぼす影響を示す図である。
- [図14]実施例に係る D E C 1 ノックアウトマウスの脂肪代謝調節遺伝子、中性脂肪代謝関連遺伝子およびアディポサイトカインの発現のリズム性を示す図である。
- [図15]脂肪組織での D E C 1 ノックアウトマウスが脂肪関連遺伝子の発現に

及ぼす影響を示す図である。

[図16]肝臓でのDEC1ノックアウトマウスが脂肪関連遺伝子の発現に及ぼす影響を示す図である。

発明を実施するための形態

[0028] 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。本明細書において「含む」または「含有する」といった表現は、「からなる」または「から構成される」という意も含むものとする。

[0029] (脂質代謝関連疾患の検査方法)

本発明の実施の形態1は、脂質代謝関連疾患の検査(診断)方法に関する。具体的には、被検体から採取した試料における、DEC1により概日リズムを誘導される少なくとも一つの脂肪関連遺伝子の概日リズムに基づく発現量を指標とすることを特徴とする。

[0030] なお、本明細書において「脂質代謝関連疾患」とは、脂質代謝(体内における脂肪の流れ)に関連している多くの疾患を意味する。例えば、メタボリックシンドロームまたは肥満等を挙げることができる。本明細書において「被検体」とは、検査対象となり得る生物、例えば動物、植物または微生物等を意味する。特に、動物(最も好ましくは、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、サル、ウシ、ブタ、ウマ、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ネコまたはイヌ等の哺乳動物)が好ましい。

[0031] 本明細書において、「試料」とは、前述した任意の被検体から採取することが可能であり、かつ「DEC1により概日リズムを誘導される少なくとも一つの脂肪関連遺伝子の概日リズムに基づく発現量」を測定することが可能である、当業者が一般的に利用しうる任意の対象試料を意味する。例えば、細胞、組織または液体成分等の生体試料が挙げられる。後の実施例において詳細に説明するが、DEC1-脂肪関連遺伝子系は、脂肪組織選択的に作動することが示唆される。その為、このような試料は脂肪細胞、脂肪組織、または、脂肪細胞から分泌される物質を含む生体試料のいずれかが好ましい。

[0032] 最も好ましくは、被検体から採取した試料とは、ヒトから採取した脂肪細

胞から分泌される物質を含む末梢血である。試料の採取方法については、被検体および試料に適宜合った当業者が一般的に利用しうる任意の方法において採取することが可能である。例えば、ヒトの末梢血を採取する場合には、注射器等により静脈から5 m l程度の末梢血を採取すればよい。

[0033] 「DEC1により概日リズムを誘導される脂肪関連遺伝子」は、脂肪代謝調節因子の発現に関連する遺伝子、中性脂肪代謝関連遺伝子、その他の脂質代謝酵素遺伝子およびアディポサイトカインの発現に関連する遺伝子等が含まれ、かつこれらのうちDEC1によって概日リズムを誘導されるものを意味する。特に、Abca1、Acs11、Adfp、Agpat2、Cd36、Cidec、Fabp4、Fasn、Gpat3、Lipe、Lpin1、Plin、Pnpla2、S3-12、Cebp α 、Cebp β 、Cebp δ 、c-Jun、Klf-4、Klf-15、Retn、Acot2、Chka、Klf-5、Pgcl α 、Srebp2、Tc10-like、IL-6、Rbp4、Adipoqおよび／またはLeptinが好ましい。

[0034] このうち、前述したように、被検体の試料としてヒトの末梢血を採取する場合には、アディポサイトカインの発現に関連する遺伝子が好ましく、例えばAdipoq（アディポネクチン）、IL-6、Leptin、Rbp4および／またはRetn等を挙げることができる。これらのうち、アディポネクチンが最も好ましい。

[0035] これらの脂肪関連遺伝子の概日リズムに基づく発現量（一日24時間周期で変動する発現量）の測定方法は、被検体および試料に適宜合わせ、当該技術分野において公知である方法なら限定されない。例えば、転写産物の発現量は、細胞または組織から調整したTotal RNAでの定量リアルタイムPCRまたはノザンブロットング等により測定され得る。また、翻訳産物の発現量は、細胞または組織から抽出液を調製し、免疫学的手法により測定され得る。免疫学的手法としては、放射性同位元素免疫測定法（RIA法）、ELISA法または蛍光抗体法等により測定され得る。

[0036] 具体的には、例えば、まず複数の脂質代謝関連疾患の検体および非脂質代

謝関連疾患の検体（検体によって異なるが、被検体と同齢および同姓等の同条件の正常かつ健康な検体が好ましい）から採取した末梢血内の、（少なくとも一つ以上の）アディポサイトカインの概日リズムに基づく発現量のデータを定量リアルタイムPCR等によって収集しておく。次に、当該概日リズム全体におけるそれぞれの検体の発現量の平均データと、定量リアルタイムPCR等によって測定した被検体から採取した末梢血の当該概日リズム全体とを比較することによって、被検体が脂質代謝関連疾患であるか否かを検査（診断）することができる。

[0037] また、概日リズム全体において比較せずとも、概日リズムにおける任意の時間帯においても、脂質代謝関連疾患であるか否かを検査（診断）することができる。具体的には、例えば、まず同様に、複数の脂質代謝関連疾患の検体および非脂質代謝関連疾患の検体の末梢血中のアディポサイトカインの時間帯別の概日リズムの平均データをRIA法等によって収集しておく。次は、被検体から末梢血を採取し、アディポサイトカインの量をRIA法等により測定する。平均データと被検体から採取した末梢血中のアディポサイトカインの量とを比較する際に、当該平均データにおいて、被検体から末梢血を採取した時間帯における、当該時間帯の平均データでのアディポサイトカインの量と比較することによって、被検体が脂質代謝関連疾患であるか否かを容易に検査（診断）することができる。

[0038] これらのように、概日リズムを有して発現するDEC1により、前述したような特定の脂肪関連遺伝子が特定の概日リズムを持って発現するという現象を利用した検査方法のことを、本明細書においては、DEC1により概日リズムを誘導される脂肪関連遺伝子の概日リズムに基づく発現量を指標とする検査方法、として示している。

[0039] すなわち、本明細書における「（概日リズムに基づく）発現量を指標とする」とは、正常かつ健康な同種の検体から採取した同種の試料における、DEC1により概日リズムを誘導される少なくとも一つの同脂肪関連遺伝子の概日リズムに基づく発現量と比較した場合において、当該被検体の概日リズ

ムに基づく発現量がどのように変化しているのか（例えば、同様の概日リズムを有しているか否か、時間帯による発現量が同様であるか否か、または同様の位相を有しているか否か等）を判断するという意味を示す。より具体的には、当該被検体の概日リズムに基づく発現量の変化が比較対象と同様の場合は非脂質代謝関連疾患（正常かつ健康）であるとの検査結果である可能性が高く、前述したような差異を有する場合は脂質代謝関連疾患であるとの検査結果である可能性が高い。非脂質代謝関連疾患（正常かつ健康）である場合の概日リズムに基づく発現量の変化パターンについては、後述の実施例および図14を参照されたい。

[0040] なお、一つ以上の脂肪関連遺伝子の概日リズムに基づく発現量を指標としても構わない為、多変量解析を用いることも可能である。例えば、前述と同様に、採取した末梢血から予めアディポサイトカインの概日リズムに基づく発現量のデータを収集しておき、統計ソフト等を用いたクラスタリング（好ましくは完全連結法の階層的クラスタリング）解析を行い検査することも可能である。

[0041] このように、本実施の形態1に係る脂質代謝関連疾患の検査方法では、本発明者らによって解明された、より具体的なDEC1における他の脂肪関連因子との作用機序および概日リズムの影響が利用されている。この場合、概日リズムに合致した脂質代謝関連疾患の検査（診断）ができる為、より確実性を有する検査（診断）をすることが可能となり、また、実用的な（例えば、薬の投与時間等を取り入れた）脂質代謝関連疾患の予防薬および／または治療薬等の研究、開発に直接的に繋げて利用することも可能となる。

[0042] 特に、試料を脂肪細胞、脂肪組織、または、脂肪細胞から分泌される物質を含む生体試料とした場合、本発明者らによりDEC1-脂肪関連遺伝子系は脂肪組織選択的に作動することが示唆された為、脂肪組織のみに作用・発現する薬剤等を利用し、副作用が少ない脂質代謝関連疾患の予防薬および／または治療薬等の研究、開発が可能となる。また、試料をヒトの末梢血とし、アディポサイトカインの発現量を指標として検査、すなわち診断を行う場

合には、生きているヒトに対し苦痛を伴わずに正確な脂質代謝関連疾患の診断を行うことができる為、さらに有利な効果を奏する。

[0043] (脂質代謝関連疾患の予防および／または治療剤の評価方法)

本発明の実施の形態2は、脂質代謝関連疾患の予防および／または治療剤の評価方法に関する。なお、本明細書において「脂質代謝関連疾患の予防および／または治療剤の評価方法」とは、「脂質代謝関連疾患の予防および／または治療剤のスクリーニング方法」の意を含む。

[0044] 本実施の形態2では、具体的には、測定工程と比較工程とを含む。測定工程とは、被験物質の存在下および非存在下での、被検体から採取した試料における、DEC1により概日リズムを誘導される少なくとも一つの脂肪関連遺伝子の概日リズムに基づく発現量を測定する工程である。比較工程とは、被験物質の非存在下での試料における当該少なくとも一つの脂肪関連遺伝子の概日リズムに基づく発現量に対する、当該被験物質の存在下での当該試料における当該少なくとも一つの脂肪関連遺伝子の概日リズムに基づく発現量を比較する工程である。

[0045] 本明細書において「被験物質」とは、脂質代謝関連疾患の予防および／または治療剤となるか否かの評価の対象となり得るあらゆる物質を意味する。例えば、低分子化合物、核酸またはポリペプチド等が挙げられる。低分子化合物、核酸またはポリペプチド等は、天然物から抽出および精製されたものであってもよく、人工的に合成されたものであっても構わない。また、精製されたものに限らず、未精製のものでも被験物質として使用することができる。また、新規な物質に限らず、公知の物質またはその改良物であってもよい。例えば、既存の治療薬もしくは予防薬またはその誘導体であっても、評価をすることが可能である。

[0046] なお、被検体から採取した試料の意味および好ましい例、DEC1により概日リズムを誘導される少なくとも一つの脂肪関連遺伝子の概日リズムに基づく発現量の意味および好ましい例、ならびにその発現量の測定方法については、前述の実施の形態1と同様である。

[0047] 本実施の形態2は、具体的には、例えば、まず脂質代謝関連疾患の被検体から採取した末梢血の、（少なくとも一つ以上の）アディポサイトカインの概日リズムに基づく発現量を定量リアルタイムPCR等によって測定しておく。次に、被検体に対し被験物質の経口投与または静脈内投与等を行う。その後、同様に被検体から採取した末梢血のアディポサイトカインの概日リズムに基づく発現量を定量リアルタイムPCR等によって測定し、それぞれの測定した当該概日リズムに基づく発現量を比較することによって、当該被験物質が脂質代謝関連疾患の予防および／または治療剤であるか否かを評価することができる。

[0048] また、概日リズム全体において比較せずとも、概日リズムにおける任意の時間帯においても、脂質代謝関連疾患の治療剤であるか否かを評価することができる。具体的には、例えば、まず脂質代謝関連疾患の被検体の末梢血中のアディポサイトカインの発現量を特定の時間帯においてRIA法等によって測定しておく。次に、同様に、被検体に対し被験物質の経口投与または静脈内投与等を行う。その後、最初に測定した特定の時間帯と同様の時間帯において、被検体から採取した末梢血のアディポサイトカインの発現量をRIA法等によって測定する。最後に、それぞれの測定した当該発現量を比較することによって、当該被験物質が脂質代謝関連疾患の予防および／または治療剤であるか否かを評価することができる。

[0049] また、それぞれの測定した概日リズム全体または特定の時間帯の発現量を比較することによる脂質代謝関連疾患の治療剤等となるか否かの評価は、例えば、予め非脂質代謝関連疾患の検体（検体によって異なるが、例えば、被検体と同齢および同姓等の同条件の正常かつ健康な検体が好ましい）の概日リズム全体または特定の時間帯における発現量を測定しておき、これらを基準とすればよい。すなわち、被験物質非存在下では概日リズム全体または特定の時間帯における発現量が当該測定基準と離れていた被検体の測定結果が、被験物質存在下では当該測定基準に近づくか否か判断すればよい。例えば、当該測定基準と比較し、同様の概日リズムを有するようになるか否か、時

間帯による発現量が同様となるか否か、または同様の位相を有するようになるか否か等を判断すればよい。判断の結果、当該測定基準に近づいた場合、脂質代謝関連疾患の治療剤等となる可能性が高い。

[0050] なお、一つ以上の脂肪関連遺伝子の概日リズムに基づく発現量を測定・比較しても構わない為、多変量解析を用いることも可能である。例えば、前述の実施の形態1と同様に、統計ソフト等を用いたクラスタリング（好ましくは完全連結法の階層的クラスタリング）解析を行い検査することも可能である。

[0051] このように、本実施の形態2に係る脂質代謝関連疾患の予防および／または治療剤の評価方法では、前述の実施の形態1と同様に、より具体的なDEC1における他の脂肪関連因子との作用機序および概日リズムの影響が利用されている。この場合、概日リズムに合致した脂質代謝関連疾患の予防および／または治療剤の評価ができる為、より正確に評価・スクリーニングをすることが可能となる。すなわち、実用的な（例えば、薬の投与時間等を取り入れた）脂質代謝関連疾患の予防薬および／または治療薬等の研究、開発に直接的に繋げて利用することも可能となる。

[0052] 特に、前述の実施の形態1と同様に、試料を脂肪細胞、脂肪組織、または、脂肪細胞から分泌される物質を含む生体試料とした場合、脂肪組織のみに作用・発現する薬剤等を利用し、副作用が少ない脂質代謝関連疾患の予防薬および／または治療薬等の研究、開発が可能となる。さらに、試料をヒトの末梢血とし、アディポサイトカインの発現量を基準として評価（スクリーニング）を行う場合には、生きているヒトに対し苦痛を伴わず、ヒトに対して直接的な脂質代謝関連疾患の予防薬および／または治療薬がスクリーニングできることも思慮される為、新薬に対し大いに貢献する可能性が高い。

[0053] また、本発明者らにより示唆された、DEC1-脂肪関連遺伝子系の脂肪組織特異的な作用機序を考慮すると、脂肪組織におけるDec1およびDEC1により概日リズムを誘導される脂肪関連遺伝子の発現量調節を利用した、脂質代謝系の調節方法が示唆される。

[0054] 前述の実施の形態1と同様に、DEC1により概日リズムを誘導される脂肪関連遺伝子は、Abca1、Acs11、Adfp、Agpat2、Cd36、Cidec、Fabp4、Fasn、Gpat3、Lipe、Lpin1、Plin、Pnpla2、S3-12、Cebp α 、Cebp β 、Cebp δ 、c-Jun、Klf-4、Klf-15、Retn、Acot2、Chka、Ldlr、Klf-5、Pgc-1 α 、Rgs2、Rxra、Srebp2、Tc10-like、IL-6、Rbp4、Adipoqおよび／またはLeptin等が挙げられる。なお、当該脂質代謝系の調節方法には、これらの他にもDec1自身も含まれる。

[0055] 簡潔に説明すると、Dec1およびDEC1により概日リズムを誘導される脂肪関連遺伝子の発現の阻害剤（例えば、RNAi等）あるいは促進剤（例えば、薬剤、成長因子またはホルモン等）を利用し、脂質代謝を促進あるいは調整することによって、脂質代謝系を正常に調節する。このような脂質代謝の調節により、脂質代謝関連疾患（メタボリックシンドロームおよび肥満等）の改善が示唆される。

[0056] より具体的に説明すると、前述したように、DEC1-脂肪関連遺伝子系が作動する脂肪組織においては、Dec1も含めDEC1により概日リズムを誘導される脂肪関連遺伝子の発現は概日リズムを有している。そこで、脂質代謝関連疾患の被検体における少なくとも一つ以上のこれらの遺伝子の発現の概日リズム全体を測定し、非脂質代謝関連疾患の検体における少なくとも一つ以上のこれらの遺伝子の発現の概日リズム全体に近似するよう、前述のDec1およびDEC1により概日リズムを誘導される脂肪関連遺伝子の発現の阻害剤あるいは促進剤を概日リズムに基づき投与等行う脂質代謝系の調節方法が示唆される。すなわち、前述したような、適切な薬の投与時間が開発可能であることを意味する。

実施例

[0057] まず、マウス3T3-L1細胞の脂肪分化過程における、分化関連および脂質代謝遺伝子の発現に与えるDEC1の役割について実験を行い検討した

。

[0058] マウス 3T3-L1 細胞を、6-well プレートを用い、インスリン $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、イソブチルメチルキサンチン $500 \mu\text{M}$ およびデキサメタゾン $1 \mu\text{M}$ を含む培地にて分化誘導をしながら培養し、2 日後ごとにインスリン $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ を含む分化維持培地に交換しながら培養した。後にリアルタイム PCR を行うため、分化誘導前 2 日から、分化誘導後 8 日まで経時的に RNA 回収を行っておいた。

[0059] 図 1 は、マウス 3T3-L1 細胞の脂肪分化の経時変化を示す図である。図 1 に示すように、最終的な脂肪分化は、オイルレッド染色にて確認した。その結果、油滴は分化誘導後 4 日目には見られ、分化誘導後 8 日目にはかなりの油滴を有する細胞が観察された。

[0060] 次に、前述の回収した RNA サンプルを用い、脂肪分化段階における様々な脂肪分化関連および脂質代謝関連遺伝子の発現パターンをリアルタイム PCR にて解析する実験を行った。図 2 は、マウス 3T3-L1 細胞の脂肪分化過程における分化関連および脂質代謝遺伝子の発現を示す図である。図 2 のグラフは、それぞれの発現レベルの最大値を 100 (%) とした相対値 (%) で以て示されている。図 2 に示すように、脂肪分化誘導初期に c-Fos および c-Jun といった前初期遺伝子の発現量が上昇し、そのすぐ後に C/ebp β が上昇する。分化誘導 2 日目からは、脂肪分化において最も重要とされる Ppar γ 、Ror α および Lpl 等が上昇し、最終的には Fabp4、Lipin、Mgl1 および Perilipin 等の脂肪代謝関連遺伝子が上昇し、脂肪分化が進む。

[0061] ROR α および DEC1 が、PPAR γ に作用し、脂肪分化抑制因子として機能することは背景技術として知られている。しかし、前述したように、DEC1 は他の脂肪関連因子も含め、ROR α さらには PPAR γ とどのような作用で機能しているか、詳細は完全には明らかとなっていない。そこで、本発明者らは、DEC1 と PPAR γ との関連性についてより詳細に調べた。

[0062] 図3は、脂肪細胞における中性脂肪代謝関連遺伝子を示す図である。図3に示すように、脂肪細胞における中性脂肪代謝経路は、Very low density lipoprotein (VLDL) 等から遊離脂肪酸 (FFA、free fatty acid) を取り込み、中性脂肪を再合成し油滴として蓄積するとともに、必要に応じて遊離脂肪酸を放出する。なお、調べた14遺伝子全てのmRNA発現レベルが野生型で同様の概日リズムを有し、Dec1ノックアウトで夜間に上昇し当該リズム性を減少させた(図3右下グラフ、および後述の(実施例)参照)。

[0063] ここで、後に(実施例)にて具体的に説明するが、本発明者が鋭意研究した結果、脂肪組織における脂質関連遺伝子の多くがDec1により発現抑制されていることが明らかとなった。これらの遺伝子は、PPAR γ のターゲットであると示唆される。このことを検証するために、同定されているPPREコンセンサス配列(配列番号1に示す(39))を含む領域を三個繋いだDNAを組み込んだConsensusPPRE-Lucと、同定されているLp1のPPREのエLEMENT(配列番号2に示す(40))を含む領域を三個繋いだDNAを組み込んだLp1-PPRE-Lucとで、ルシフェラーゼレポーターを構築した(PGL-4 Minimalプロモーターを含む)。次いで、DEC1、PPAR γ 、および、PPAR γ とヘテロ二量体を形成するRXR α の発現プラスミドと共に、脂肪分化後のNIH3T3細胞にFuGENE HD Transfection Reagentを用いて導入し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。RXR α およびPPAR γ のそれぞれのリガンドとして、9-cis retinoic acid (5×10^{-7} M) およびtroglitazone (5×10^{-6} M) を培養液に加えた。

[0064] 図4は、NIH3T3細胞系におけるDEC1のPPREレポーターへの影響を示す図である。なお、図4の上のグラフの実験系では、 $n=3$ 、 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ であり、同様の実験を繰り返し行い再現性を確認した。図4の下に示す概要図は、当該実験系による結果を示している。すなわち、PPAR γ およびRXR α は、ConsensusPPRE-LucおよびLp

l-PPRE-Lucのプロモーター活性を促進した。一方、DEC1は、両プロモーターに対するRXR α -PPAR γ ヘテロ二量体による促進効果を抑制した。

[0065] 同様に、脂肪分化能を有するマウス3T3-L1細胞系に変えて実験を行った。同様の方法にて、分化前(Preadipocytes)と脂肪分化後(Adipocytes)との両方のマウス3T3-L1細胞に導入し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。図5は、マウス3T3-L1細胞系におけるDEC1のPPREレポーターへの影響を示す図である。図5に示すように、PPAR γ およびRXR α は、ConsensusPPRE-LucおよびLp1-PPRE-Lucのプロモーター活性を促進した。一方、DEC1は、両プロモーターに対するRXR α -PPAR γ ヘテロ二量体による促進効果を抑制した。また、DEC1単独では殆ど影響しなかった。

[0066] 次に、脂質代謝関連遺伝子のPPREへのDEC1の結合について解析する実験を行った。

[0067] 後に(実施例)にて詳細に述べるDec1ノックアウトマウスで発現レベルが上昇した脂質代謝関連遺伝子の中で、Lp1、Perilipin、および、Resistin等は、PPAR γ の標的としてPPREサイトが同定されている。また、マウスまたはヒトのPpar γ 遺伝子には、エクソンの使い分けで生じるアイソフォームPPAR γ 1とPPAR γ 2とが知られており、それぞれのプロモーターも異なる。後者のPpar γ 2遺伝子は、PPAR γ 自身の標的となり、そのおおよその結合サイトが解析されている。そこで、これらの情報に基づいて、四つの遺伝子Ppar γ 2、Lp1、Perilipin、および、Resistinに対するDEC1の結合をクロマチン免疫沈降法(ChIPアッセイ)にて検討した。これらのPPREを含むプロモーター領域には、E-Boxは存在しない。そこで、脂肪分化誘導後6日目のマウス3T3-L1細胞をサンプリングし、Ppar γ 2、Lp1、Perilipin、および、ResistinのPPRE領域に対し、DEC1抗体を用いて共沈してくるDNA断片について各遺伝子のPPRE領域を増幅するプライマーを設計し、PCR解析を行っ

た。

[0068] 図6は、P p a r γ 2、L p l、PerilipinおよびResistinの各遺伝子のP P R E領域に係るCHIPアッセイの結果を示す図である。図6に示すように、P p a r γ 2、L p l、PerilipinおよびResistinのいずれの遺伝子においても、D E C 1が結合しているという結果が出た。

[0069] このように、D E C 1タンパクがR X R α -P P A R γ ヘテロ二量体に作用することが明らかとなったが、そのどちらのタンパク質へ直接作用を持つのかを調べるために免疫沈降法で解析した。Flagを付したD E C 1タンパク質、Flagのみ、P P A R γ およびR X R α の四つのタンパク質を組み合わせ、これらをH E K 2 9 3細胞系で発現させ、その後D E C 1抗体で沈降させたものにP P A R γ またはR X R α の何れのタンパクが共沈殿してくるかを調べた。図7は、D E C 1が直接作用するタンパク質を解析した免疫沈降法の結果を示す図である。図7に示すように、R X R α は単独でも、P P A R γ 共存でも、D E C 1によって沈降してきたが、P P A R γ はR X R α が共存しなければ沈降してこなかった。この結果から、D E C 1が結合するのはR X R α タンパク質であることが明らかになった。

[0070] 図8は、D E C 1による標的遺伝子発現抑制の二重の機構を示す図である。すなわち、図8は、上述した種々の結果を模式的に示した図である。具体的には、P p a r γ 遺伝子はP P A R応答配列P P R Eを持っており、自身の遺伝子産物P P A R γ タンパクによっても制御されている。P P A R γ の標的遺伝子も同様の制御を受ける。D E C 1は核内受容体のパートナーであるR X R α に結合し、その標的遺伝子を抑制する。すなわち、D E C 1はP p a r γ 遺伝子の転写抑制と、P P A R γ 生成の低下による抑制の二つのモードで抑制制御することが考えられる。P p a r γ 遺伝子自身とその標的遺伝子がD E C 1によって抑制されることにより、R X R α -P P A R γ ヘテロ二量体の作用はD E C 1の制御を強く受けていると思われる。それによって、R X R α -P P A R γ の多様な作用がD E C 1の影響を受けることが示唆される。

[0071] 以下、実施例および比較例を用いて本発明をより詳細に説明するが、実施例および比較例は本発明を限定するものではない。

[0072] (実施例)

本実施例では、Dec1ノックアウトマウスが、時計関連遺伝子および脂肪関連遺伝子に及ぼす影響について検討した。

[0073] Dec1ノックアウトマウスは、inGenious Targeting LaboratoryのC57BL/6Jマウスを使用した(Nakashima A. et al, 2008, DEC1 modulates the circadian phase of clock gene expression., Mol Cell Biol 28, 4080-4092参照)。雄性の生後4から6ヶ月の野生型マウス(WT)およびDec1ノックアウト(-/-)マウスを、12時間ごとの明暗条件下において2から3週間飼育し、6時間ごとに各グループ3匹ずつ合計24匹屠殺し、腹腔内鼠径部白色脂肪を採取した。

[0074] このように採取した脂肪組織からRNAを抽出し、定量リアルタイムPCRによって各遺伝子の発現量の概日リズムを調査した。この際、RNAはTRIzol reagent (Invitrogen) を用いて抽出し、Total RNAはRNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて精製した。定量リアルタイムPCRは、精製したTotal RNA (0.5 μ g) からReverTraAce (東洋紡) を用いてcDNAを合成し、ABI Prism 7900 sequence detection system (Applied Biosystems) を用いて解析を行った。

[0075] 各遺伝子の発現量の測定には、それぞれに特異的なCustomized Taqman プローブとプライマーとの組み合わせ、またはUniversal Taqman Probe (Roche Diagnostics) とプライマーとの組み合わせを使用した。

[0076] 図9は、実施例に係るDEC1ノックアウトマウスが時計遺伝子の発現に及ぼす影響を示す図である。詳細には、時計遺伝子Dec1、Dec2、Rora、Rev-erb α 、Bmal1、Clock、Dbp、Per2およびNpas2における、ZT (Zeitgeber Time) 4、ZT10、ZT16およびZT22での発現量を示している。ZT0は点灯時刻、ZT12は消灯時刻である。なお、Dec1以外は、左側のグラフが野生型マウスであり

、右側のグラフがDEC1ノックアウト（－／－）マウスである。

[0077] 以下、同様に脂肪関連遺伝子の発現量を測定した結果を示す。図10は、実施例に係るDEC1ノックアウトマウスが脂肪代謝調節因子の発現に及ぼす影響を示す図である。詳細には、脂肪代謝調節因子c-Fos、c-Jun、Cebpa、Cebpb、Cebpδ、Klf4、Klf15およびPpargにおける、ZT4、ZT10、ZT16およびZT22での発現量を示している。

[0078] 図11は、実施例に係るDEC1ノックアウトマウスが中性脂肪代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響を示す図である。詳細には、中性脂肪関連遺伝子Lpl、Acsl1、Cd36、Gpat3、Agpat2、Lipin、Dgat2、Plin、Adipophilin (Adfp)、Cidec、S3-12、Atgl、LipeおよびMgl1における、ZT4、ZT10、ZT16およびZT22での発現量を示している。

[0079] 図12は、実施例に係るDEC1ノックアウトマウスがその他の脂質代謝酵素遺伝子の発現に及ぼす影響を示す図である。詳細には、その他の脂質代謝酵素遺伝子Abca1、Fabp4、FasnおよびAcataにおける、ZT4、ZT10、ZT16およびZT22での発現量を示している。図13は、実施例に係るDEC1ノックアウトマウスがアディポサイトカインの発現に及ぼす影響を示す図である。詳細には、アディポサイトカインのAdiponectin (Adipoq)、Resistin (Retn) およびLeptinにおける、ZT4、ZT10、ZT16およびZT22での発現量を示している。

[0080] 図10ないし図13に示すように、これらの脂肪関連遺伝子の発現量の概日リズムは、野生型マウスと比較し有意に低下するもの、上昇するものまたは変化が少ないものなど、様々な遺伝子による個別差があった。しかし、これらを観察すると、野生型マウスには、多くの脂肪関連遺伝子に発現量の共通する概日リズムの変化パターンが存在することが観察された。また、このような共通する変化パターンは、野生型マウスとDEC1ノックアウトマウスのいずれにも観察され、それぞれの共通する概日リズムの変化パターンは

異なるパターンであることも確認された。

[0081] 図14は、実施例に係るDEC1ノックアウトマウスの脂肪代謝調節遺伝子、中性脂肪代謝関連遺伝子およびアディポサイトカインの発現のリズム性を示す図である。図14の各グラフは、図10ないし図13に示した脂肪関連遺伝子から数個の遺伝子のグラフを選別し、発現量の概日リズムの変化パターンが確認し易いよう、野生型マウスでの発現量の概日リズムの変化パターンを線により繋いだものである。図14に示すように、野生型マウスの場合、脂肪代謝調節遺伝子、中性脂肪代謝関連遺伝子およびアディポサイトカインの発現量の概日リズムの変化パターンは、ZT10にピークを持つ概日リズムが観察された。一方、DEC1ノックアウトマウスの場合、いずれの脂肪代謝調節遺伝子、中性脂肪代謝関連遺伝子およびアディポサイトカインの発現量の概日リズムの変化パターンでも夜間に発現の上昇が観察され、さらにはリズム性が失われたり、位相がずれたりしていた。

[0082] すなわち、DEC1が作用機構に含まれる、多くの脂肪代謝調節遺伝子、中性脂肪代謝関連遺伝子およびアディポサイトカインの野生型での発現量の概日リズムの変化パターン（具体的には、マウスの場合、ZT4からZT10にかけて上昇し、ZT10にピークを持ち、ZT10からZT16へ、さらにはZT22へと発現量が減少する変化パターン）を指標とすることにより、これら脂肪代謝調節遺伝子、中性脂肪代謝関連遺伝子およびアディポサイトカインの発現が関連する脂肪代謝関連疾患についての検査、さらには脂肪代謝関連疾患に対する予防薬または治療薬等の開発に繋がることが考えられる。

[0083] 図15は、脂肪組織でのDEC1ノックアウトマウスが脂肪関連遺伝子の発現に及ぼす影響を示す図である。すなわち、図10ないし図13により示された結果を簡単に表にしたものである。図15では、脂肪関連遺伝子を、脂肪代謝調節因子、中性脂肪代謝関連遺伝子、その他の脂質代謝酵素遺伝子、およびアディポサイトカインに分けて記載されている。

[0084] また、Rhythm in WTの欄には、野生型のマウスにおいて当該遺伝子の発

現に概日リズムがあるか否かが記載されており、ある場合にはRhysmicと記載されている（記載されていない場合は、概日リズムを有さないか、または発現していない事を意味する）。UpまたはDown by Dec 1 KOの欄は、具体的にどの時間帯において低下または上昇したかが記載されている（記載されていない場合は、野生型マウスと比較しても変化がない、または変化が少ない事を意味する）。

[0085] （比較例）

本比較例では、前述の実施例におけるDec 1ノックアウトマウスの脂肪組織の脂肪関連遺伝子に及ぼす影響と、Dec 1ノックアウトマウスの肝臓の脂肪関連遺伝子に及ぼす影響とについて検討した。

[0086] 実施例において前述した方法と同様の方法において、野生型マウスおよびDec 1ノックアウト（－／－）マウスの肝臓を採取し、採取した肝臓からRNAを抽出し、定量リアルタイムPCRによって各遺伝子の発現量の概日リズムを調査した。

[0087] なお、本比較例においては、前述の図15のように結果を簡単に表にしたもののみを示す。図16は、肝臓でのDec 1ノックアウトマウスが脂肪関連遺伝子の発現に及ぼす影響を示す図である。図16に示すように、肝臓における脂肪関連遺伝子のうち同様の概日リズムを有するものは少なかった。また、概日リズムを有している場合でも、脂肪組織（図10ないし図15）と比較すると、Dec 1のノックアウトによる各脂肪関連遺伝子の発現量の変化に共通性が少なく、発現量が増加する時間帯はランダムである場合が多かった。

[0088] この結果から、DEC 1は、脂肪組織選択的に脂肪関連遺伝子カセット全体の概日リズムを誘導するとともに、脂肪分化、脂肪代謝およびアディポサイトカイン産生を統合的に制御する転写因子であることが考えられる。すなわち、脂質代謝関連疾患の診断、予防薬または治療薬等の効率的な開発・研究の為には、肝臓における脂肪関連遺伝子により解析を行うのではなく、脂肪細胞、脂肪組織または脂肪細胞から分泌される物質を含む生体試料（特に

、アディポサイトカイン）等における脂肪関連遺伝子により解析を行うべきであることが示唆される。

[0089] 本発明は、上記発明の実施の形態および実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

[0090] 本明細書の中で明示した論文および公開特許公報等の内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

[0091] 本出願は、2011年2月3日に提出された日本国特許出願2011-22172号に基づく。本明細書中に、日本国特許出願2011-22172号の、明細書、特許請求の範囲、図面全体を参照として取り込むものとする。

産業上の利用可能性

[0092] 本発明者らが鋭意研究を重ねた結果、DEC1は脂肪関連遺伝子カセット全体の概日リズムを誘導するとともに、脂肪分化、脂肪代謝およびアディポサイトカイン産生を統合的に制御する転写因子であることが解明された（DEC1-脂肪関連遺伝子系）。さらに、当該DEC1-脂肪関連遺伝子系は、脂肪組織選択的に作動するということも示唆された。

[0093] そこで、本発明によれば、より具体的なDEC1における他の脂肪関連因子との作用機序および概日リズムの影響を利用した、確実性を有する脂質代謝関連疾患の検査方法、ならびに、脂質代謝関連疾患の予防および／または治療剤の評価方法を提供することができる。

請求の範囲

- [請求項1] 被検体から採取した試料における、DEC1により概日リズムを誘導される少なくとも一つの脂肪関連遺伝子の概日リズムに基づく発現量を指標とすることを特徴とする、脂質代謝関連疾患の検査方法。
- [請求項2] 前記試料は、脂肪細胞、脂肪組織、または、脂肪細胞から分泌される物質を含む生体試料のいずれかであることを特徴とする、請求項1に記載の脂質代謝関連疾患の検査方法。
- [請求項3] 前記少なくとも一つの脂肪関連遺伝子は、Abca1、Acs11、Adfp、Agpat2、Cd36、Cidec、Fabp4、Fasn、Gpat3、Lipe、Lpin1、Plin、Pnpla2、S3-12、Cebp α 、Cebp β 、Cebp δ 、c-Jun、Klf-4、Klf-15、Retn、Acot2、Chka、Klf-5、Pgc-1 α 、Srebp2、Tc10-like、IL-6、Rbp4、Adipoqおよび／またはLeptinであることを特徴とする、請求項1または2に記載の脂質代謝関連疾患の検査方法。
- [請求項4] 前記少なくとも一つの脂肪関連遺伝子は、アディポサイトカインの発現に関連する遺伝子であることを特徴とする、請求項1ないし3のいずれか1項に記載の脂質代謝関連疾患の検査方法。
- [請求項5] 前記アディポサイトカインは、アディポネクチンであることを特徴とする、請求項4に記載の脂質代謝関連疾患の検査方法。
- [請求項6] 被験物質の存在下および非存在下での、被検体から採取した試料における、DEC1により概日リズムを誘導される少なくとも一つの脂肪関連遺伝子の概日リズムに基づく発現量を測定する測定工程と、
前記被験物質の非存在下での前記試料における前記少なくとも一つの脂肪関連遺伝子の概日リズムに基づく発現量に対する、前記被験物質の存在下での前記試料における前記少なくとも一つの脂肪関連遺伝子の概日リズムに基づく発現量を比較する比較工程と、

を含むことを特徴とする、脂質代謝関連疾患の予防および／または治療剤の評価方法。

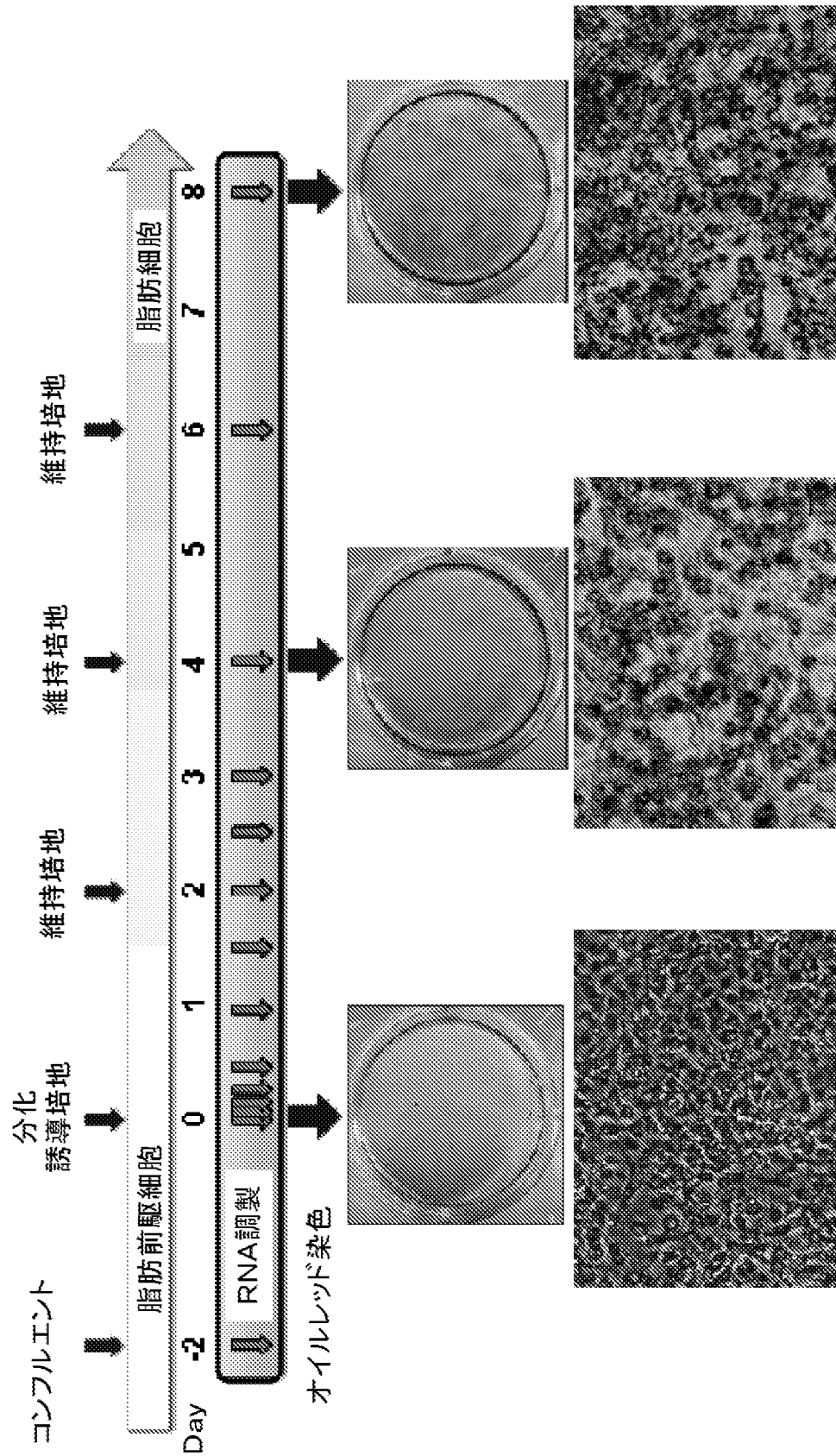
[請求項7] 前記試料は、脂肪細胞、脂肪組織、または、脂肪細胞から分泌される物質を含む生体試料のいずれかであることを特徴とする、請求項6に記載の脂質代謝関連疾患の予防および／または治療剤の評価方法。

[請求項8] 前記少なくとも一つの脂肪関連遺伝子は、*Abca1*、*Acs11*、*Adfp*、*Agpat2*、*Cd36*、*Cidec*、*Fabp4*、*Fasn*、*Gpat3*、*Lipe*、*Lpin1*、*Plin*、*Pnpla2*、*S3-12*、*Cebp α* 、*Cebp β* 、*Cebp δ* 、*c-Jun*、*Klf-4*、*Klf-15*、*Retn*、*Acot2*、*Chka*、*Klf-5*、*Pgc-1 α* 、*Srebp2*、*Tc10-like*、*IL-6*、*Rbp4*、*Adipoq*および／または*Leptin*であることを特徴とする、請求項6または7に記載の脂質代謝関連疾患の予防および／または治療剤の評価方法。

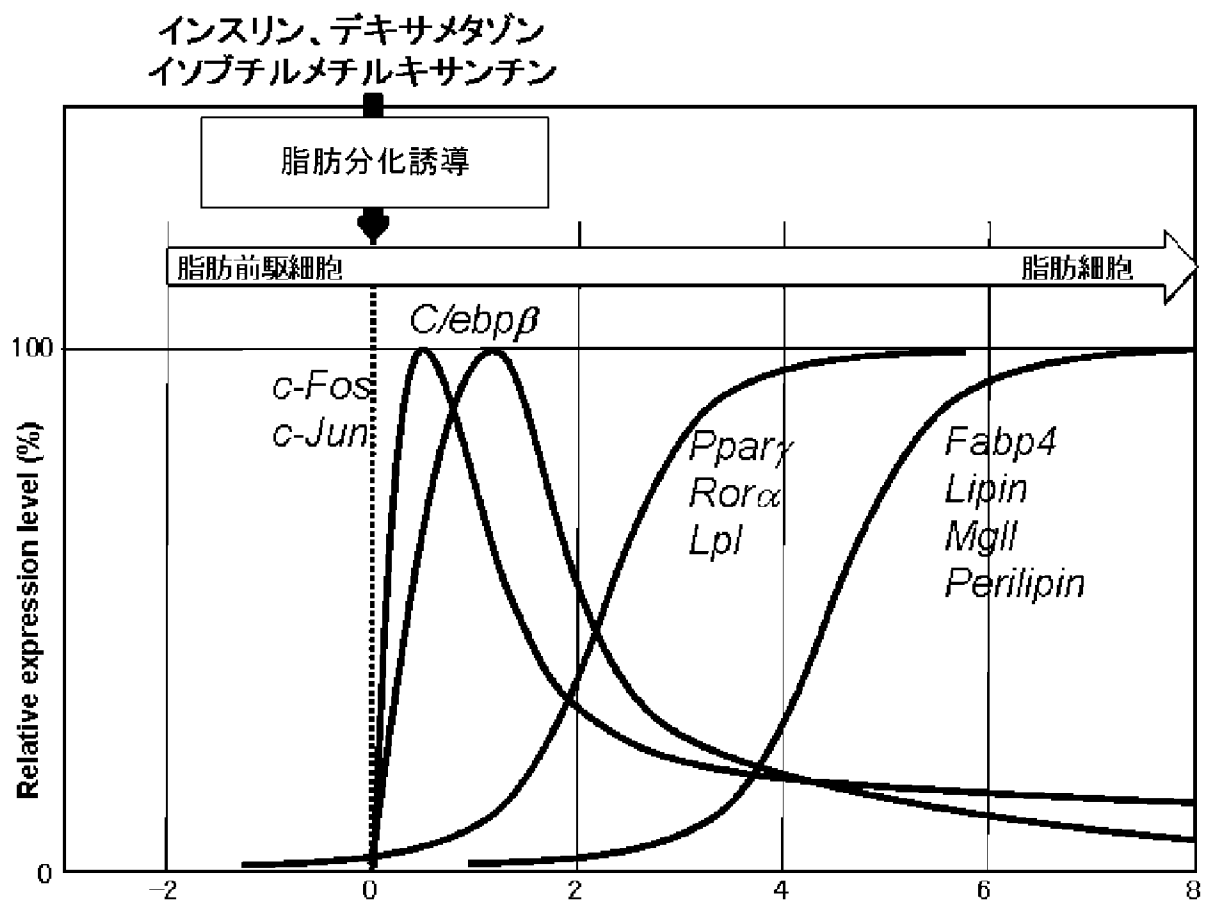
[請求項9] 前記少なくとも一つの脂肪関連遺伝子は、アディポサイトカインの発現に関連する遺伝子であることを特徴とする、請求項6ないし8のいずれか1項に記載の脂質代謝関連疾患の予防および／または治療剤の評価方法。

[請求項10] 前記アディポサイトカインは、アディポネクチンであることを特徴とする、請求項9に記載の脂質代謝関連疾患の予防および／または治療剤の評価方法。

[図1]

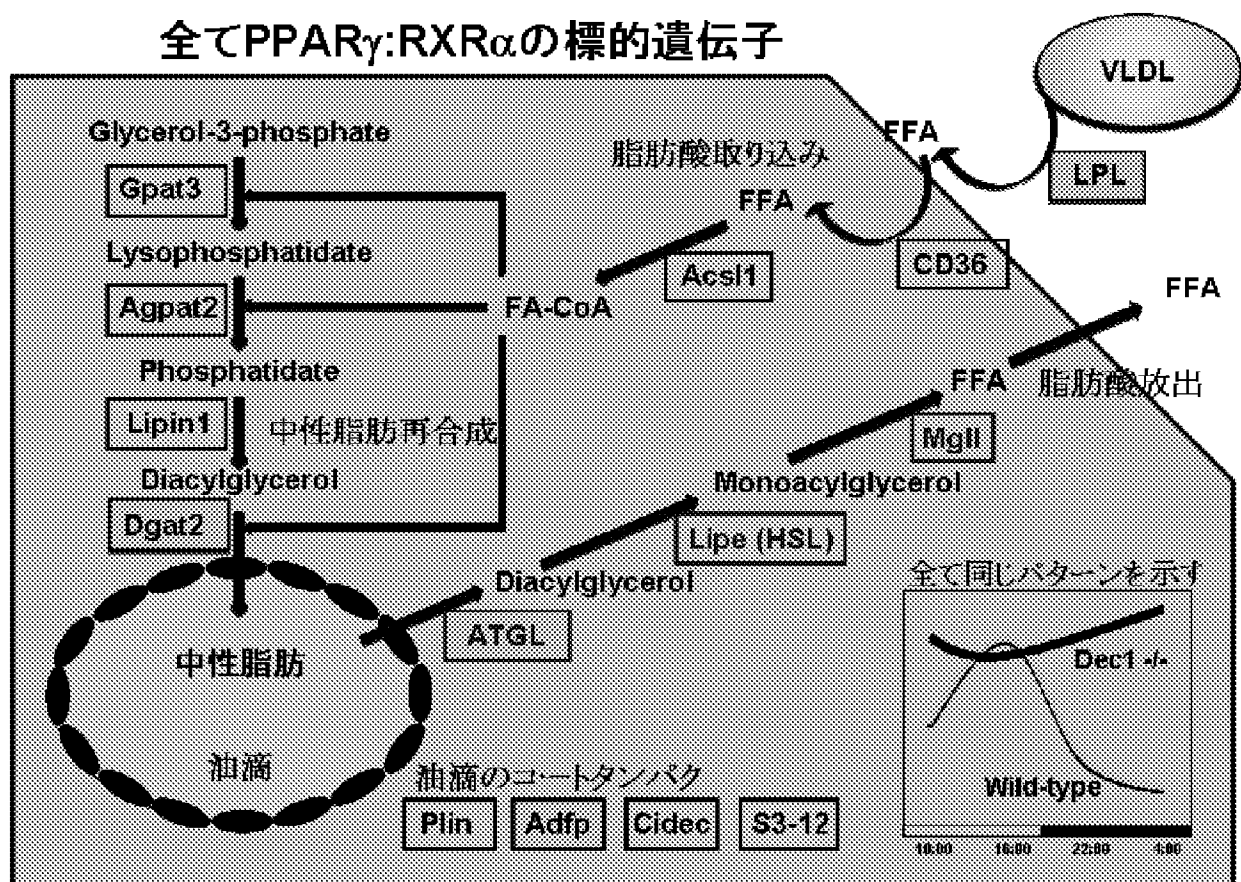


[図2]

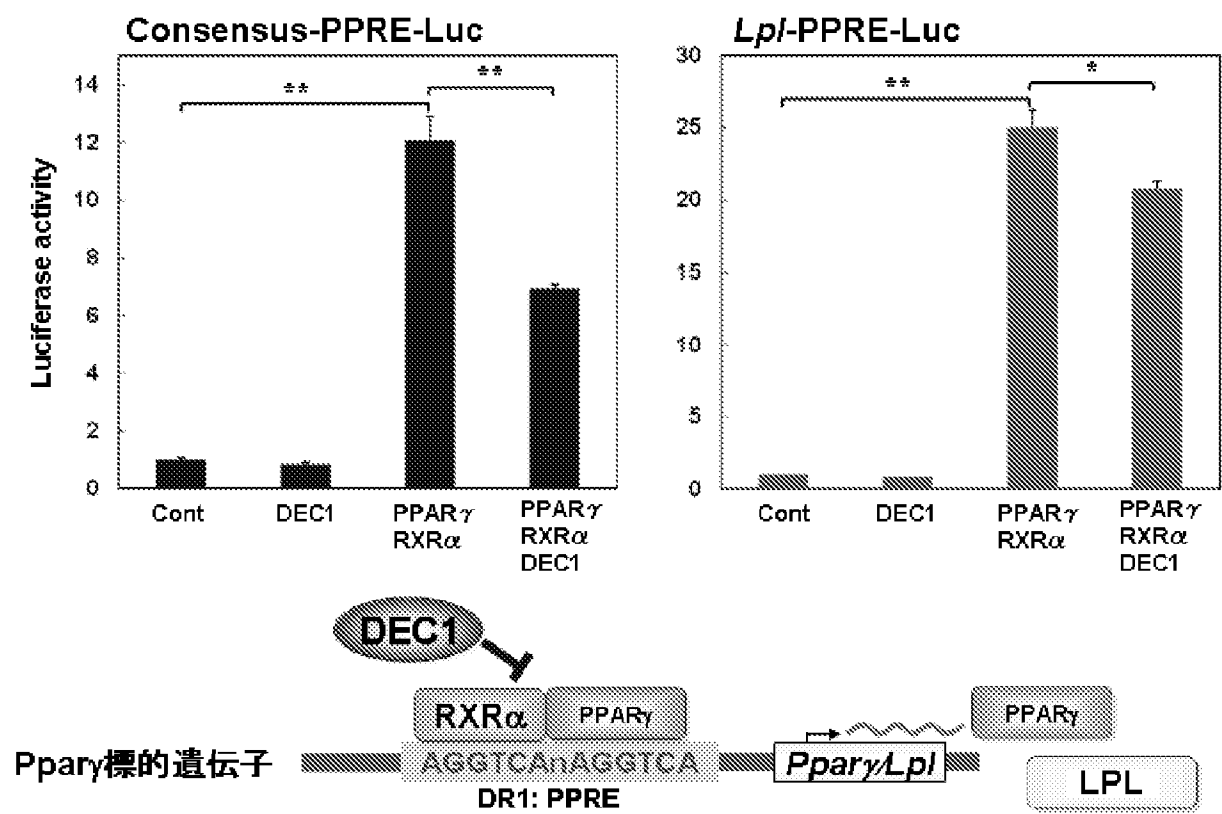


[図3]

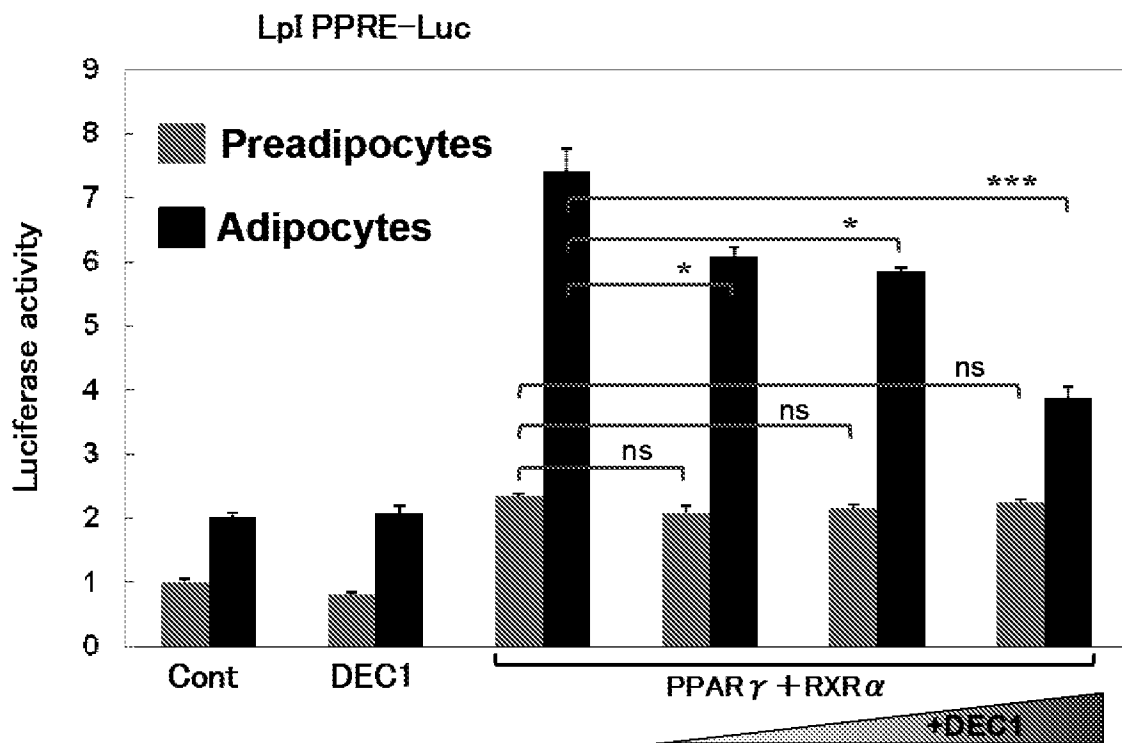
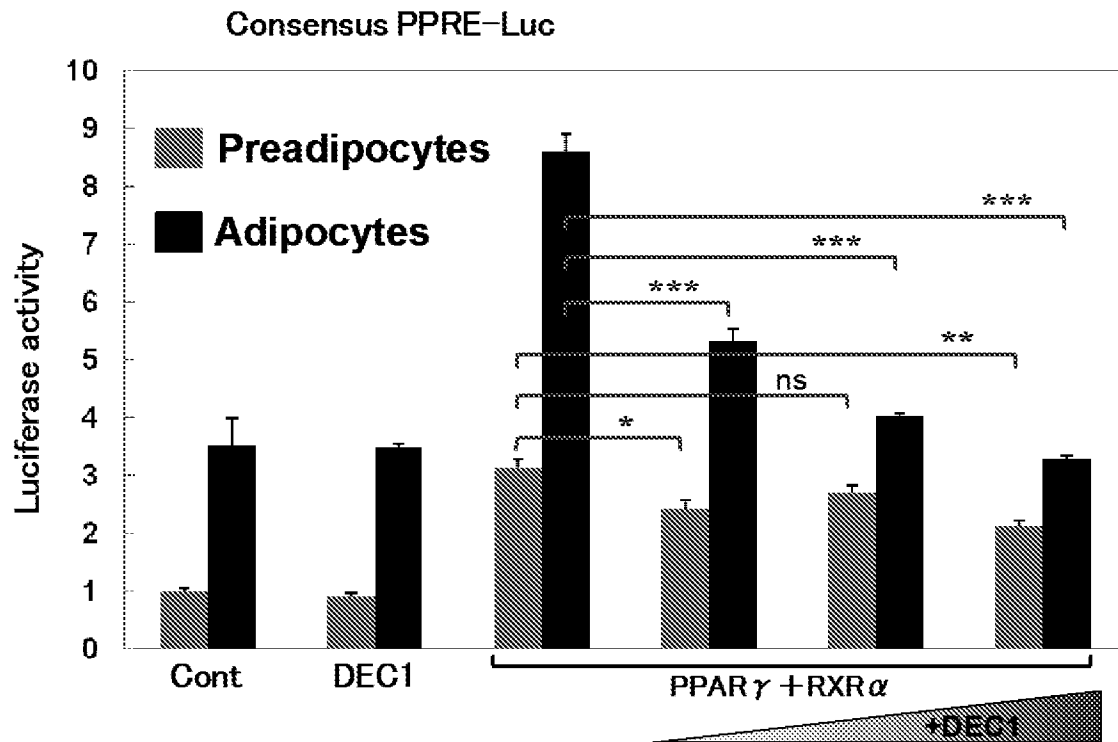
全てPPAR γ :RXR α の標的遺伝子



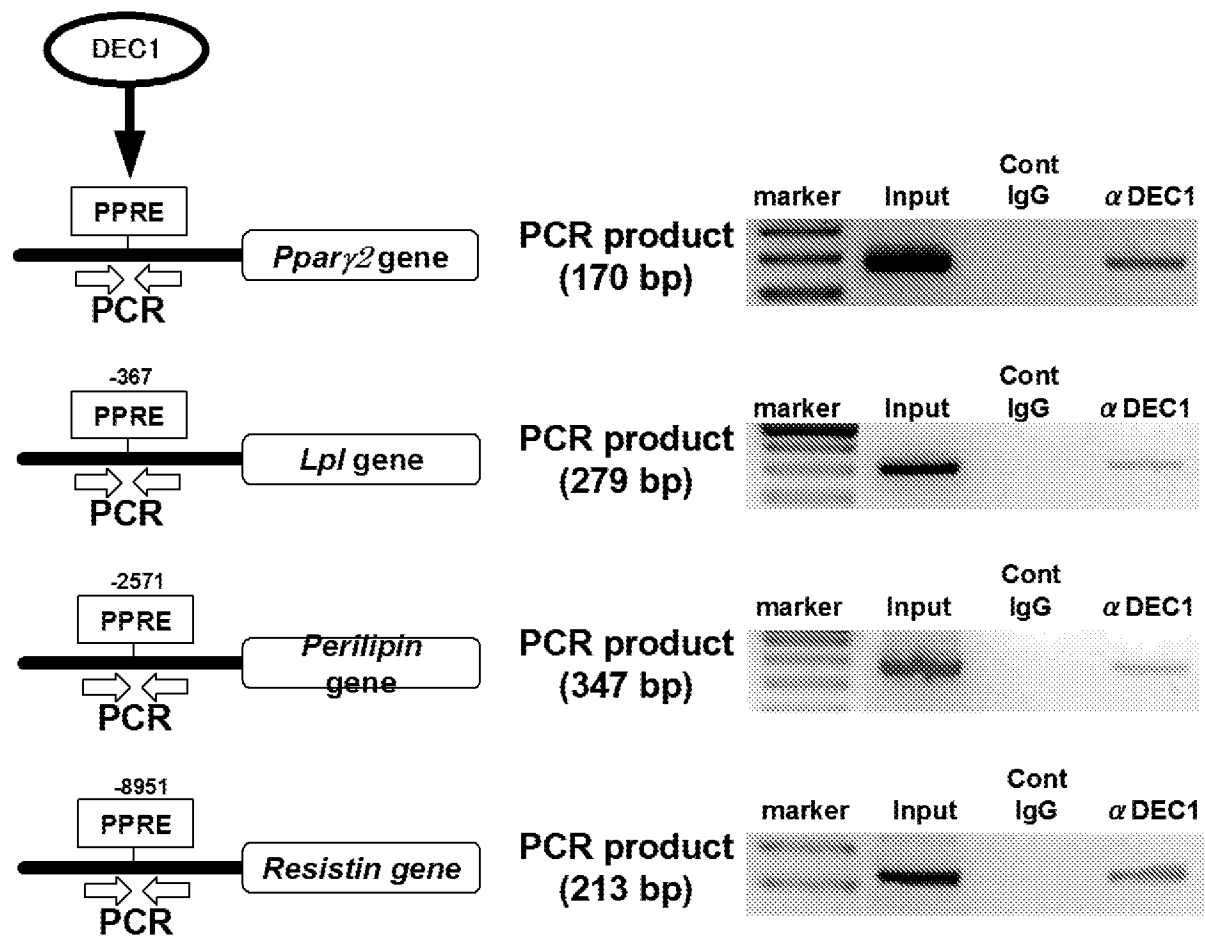
[図4]



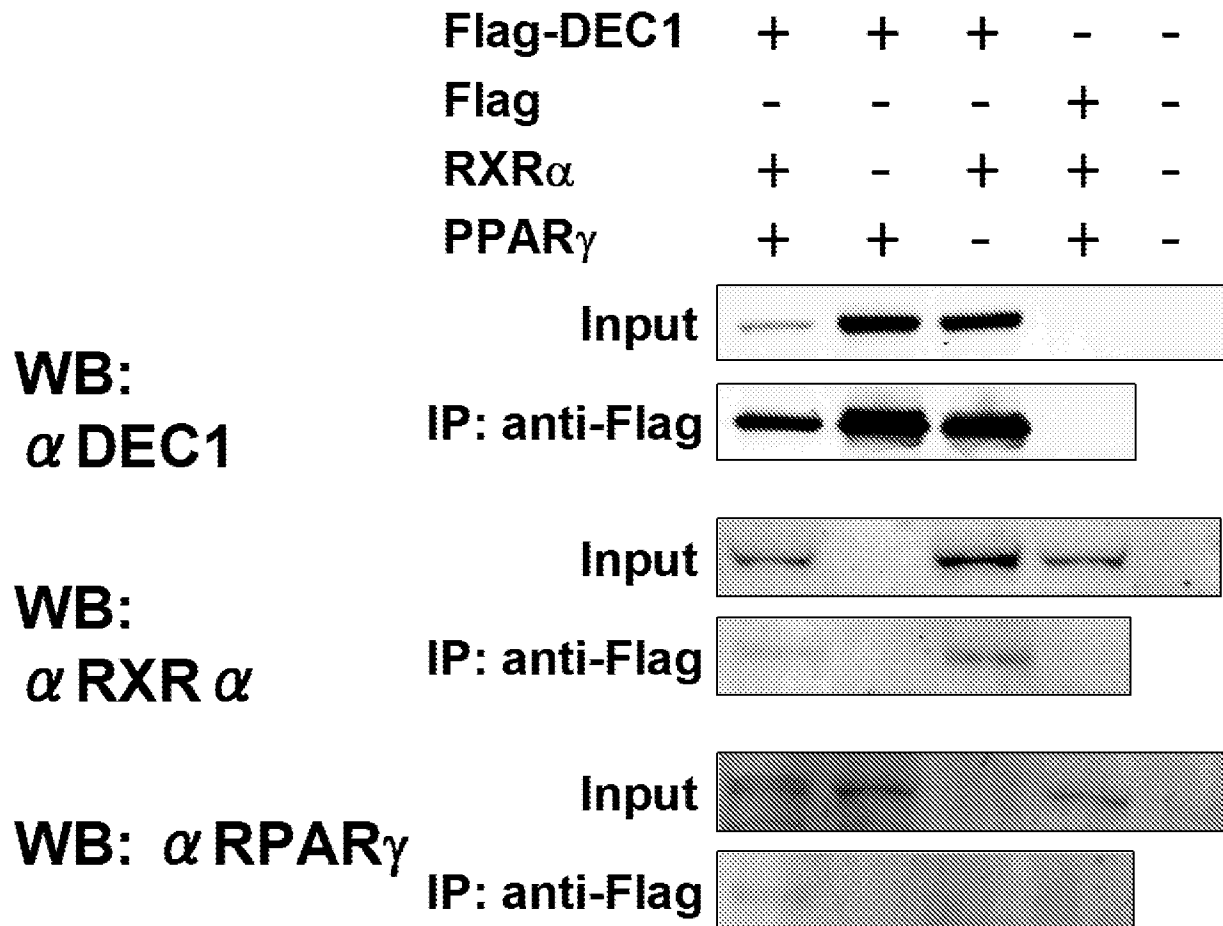
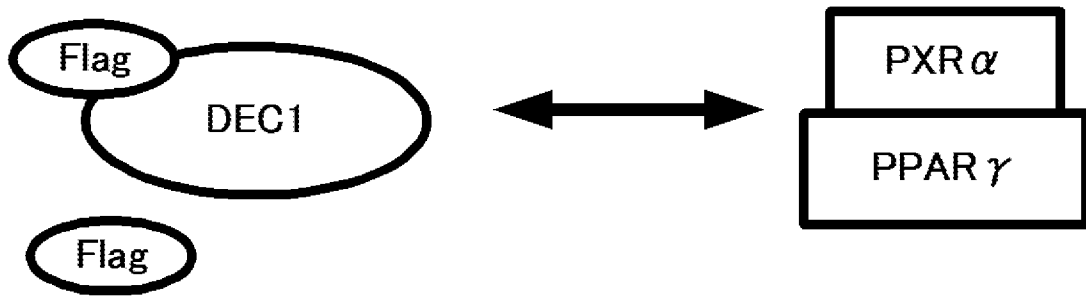
[図5]



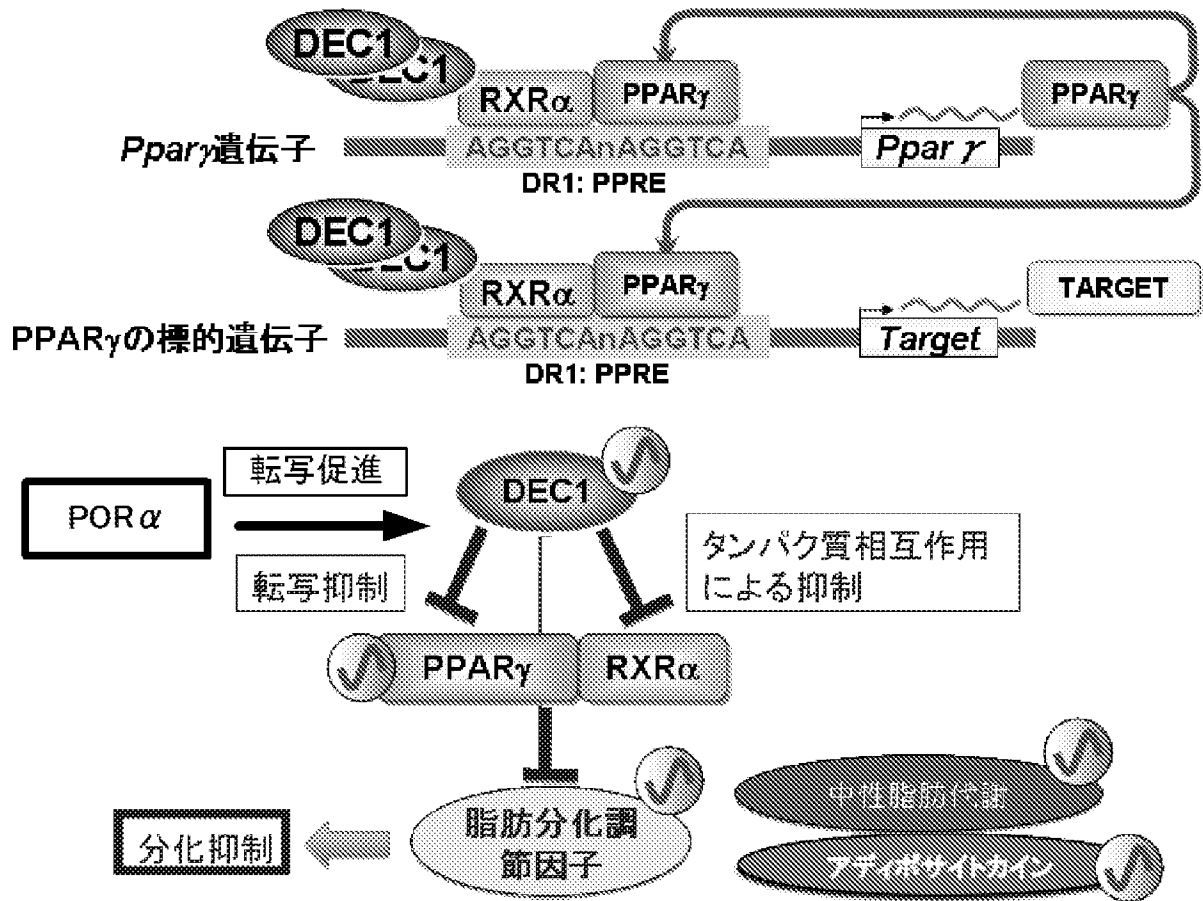
[図6]



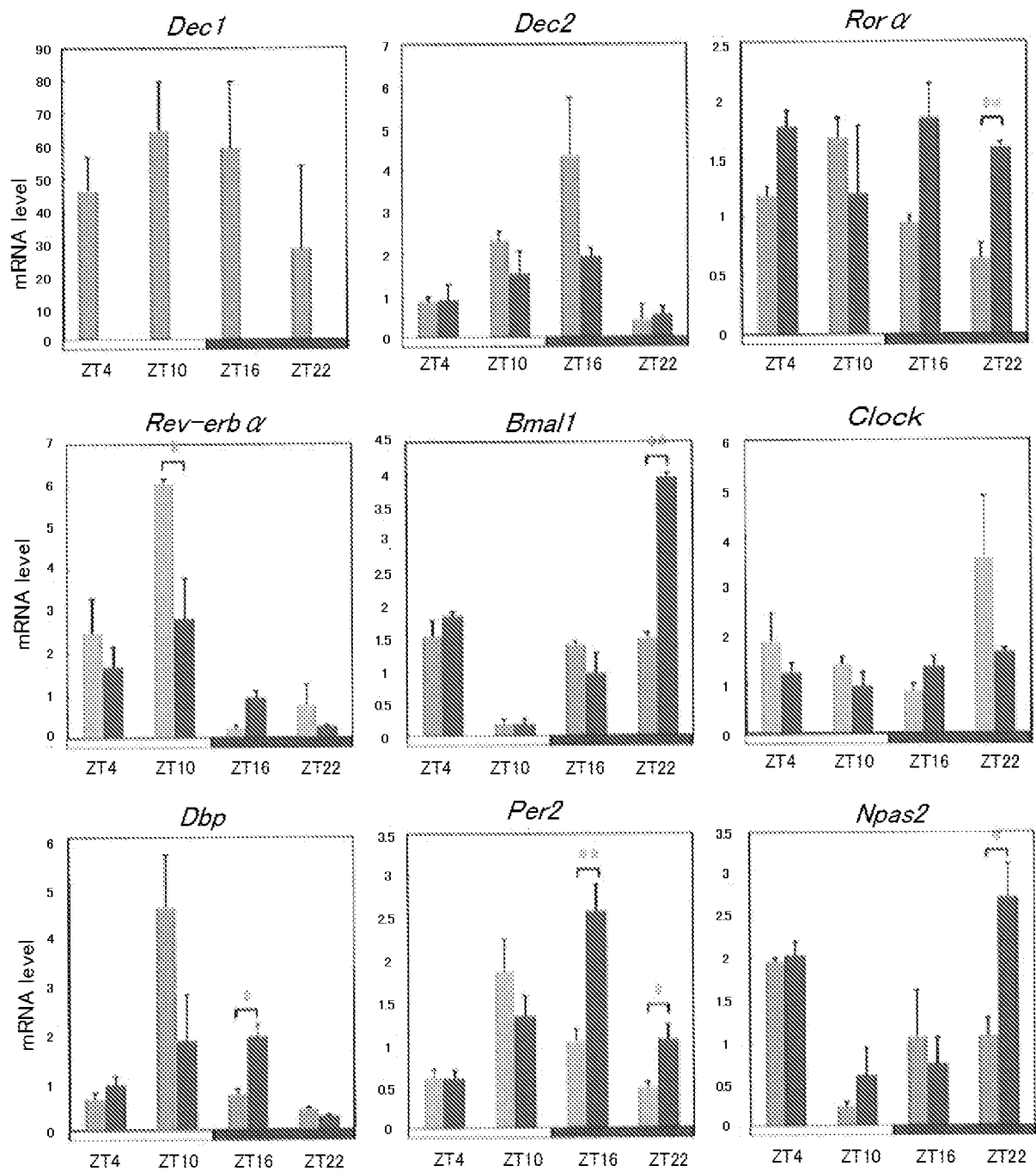
[図7]



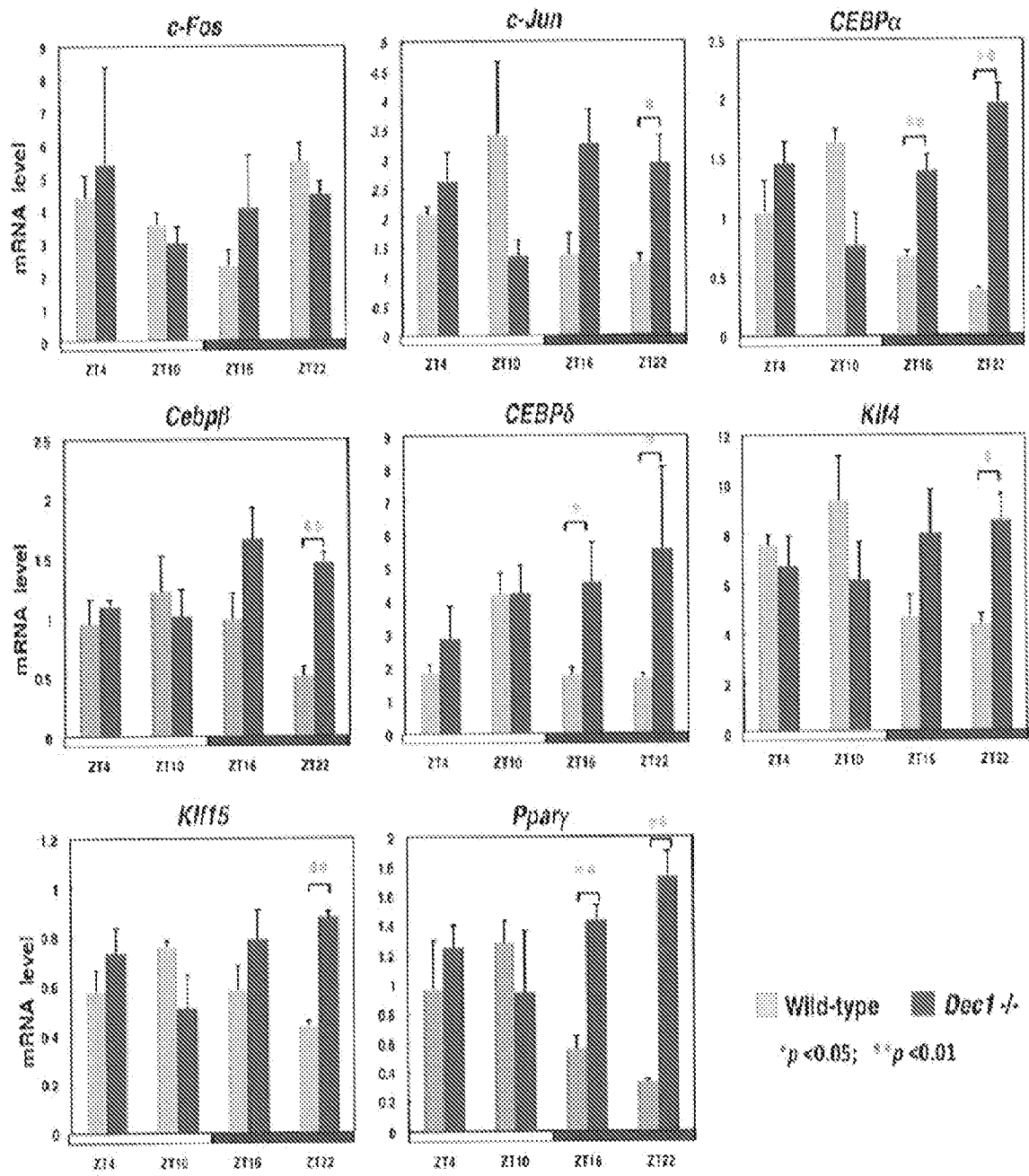
[図8]



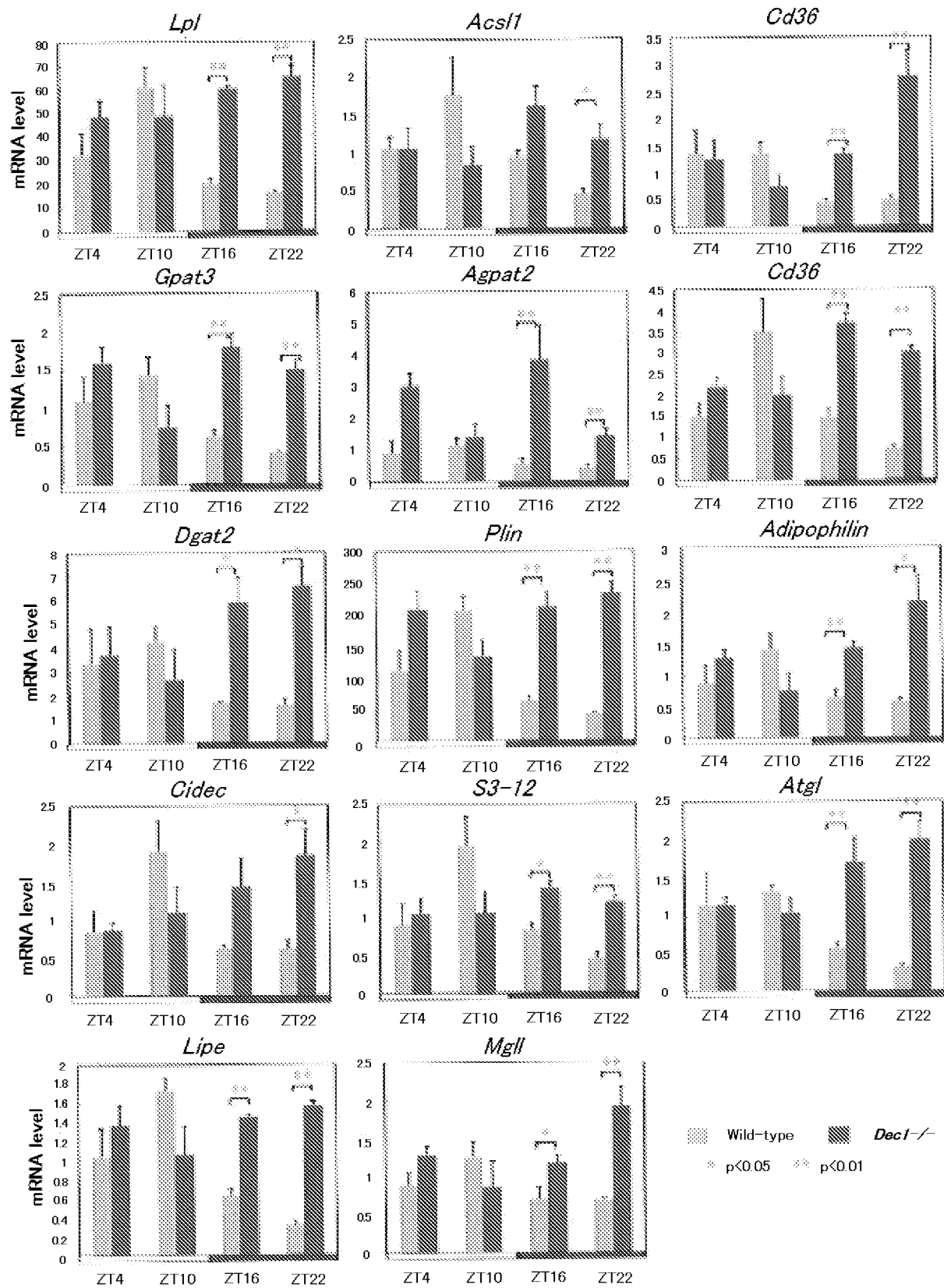
[図9]



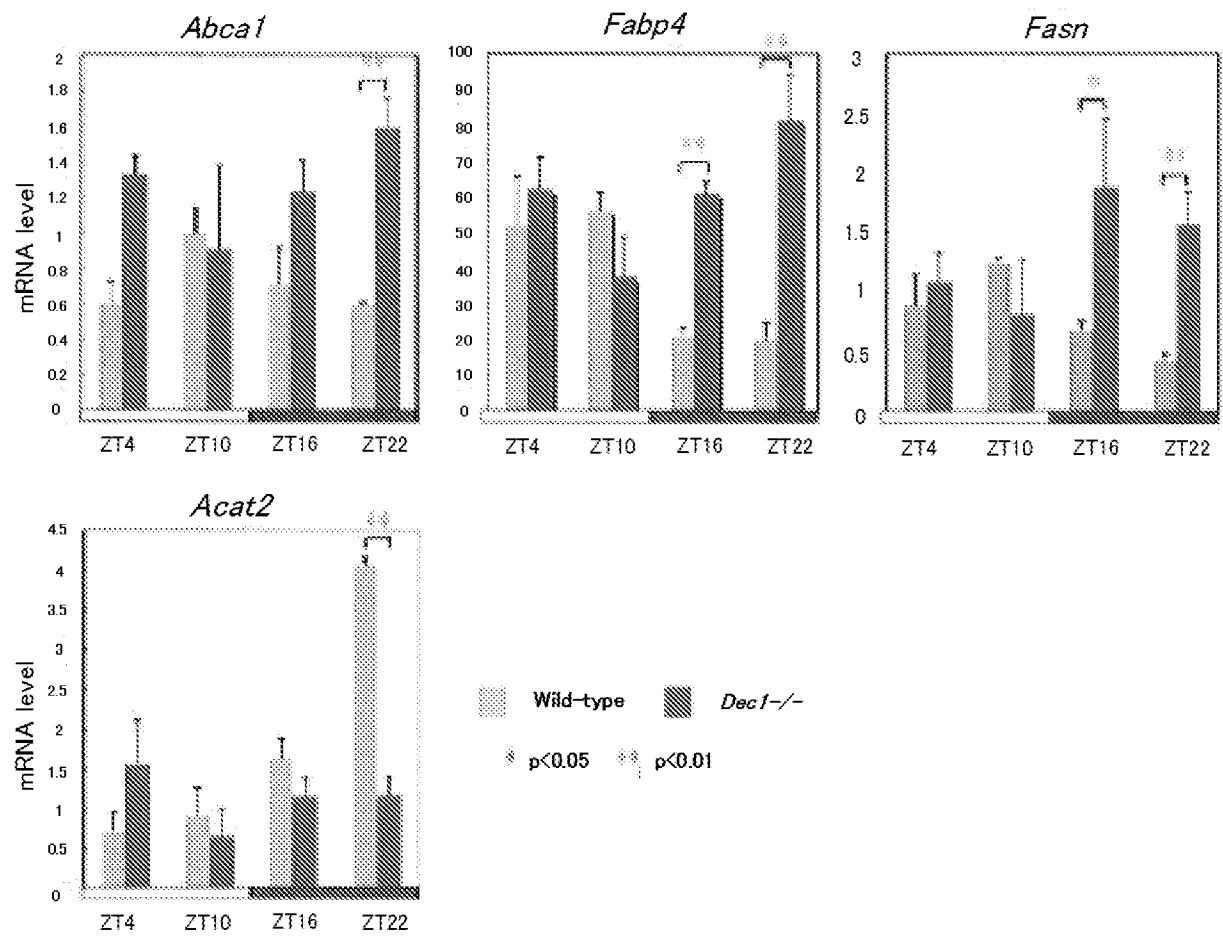
[図10]



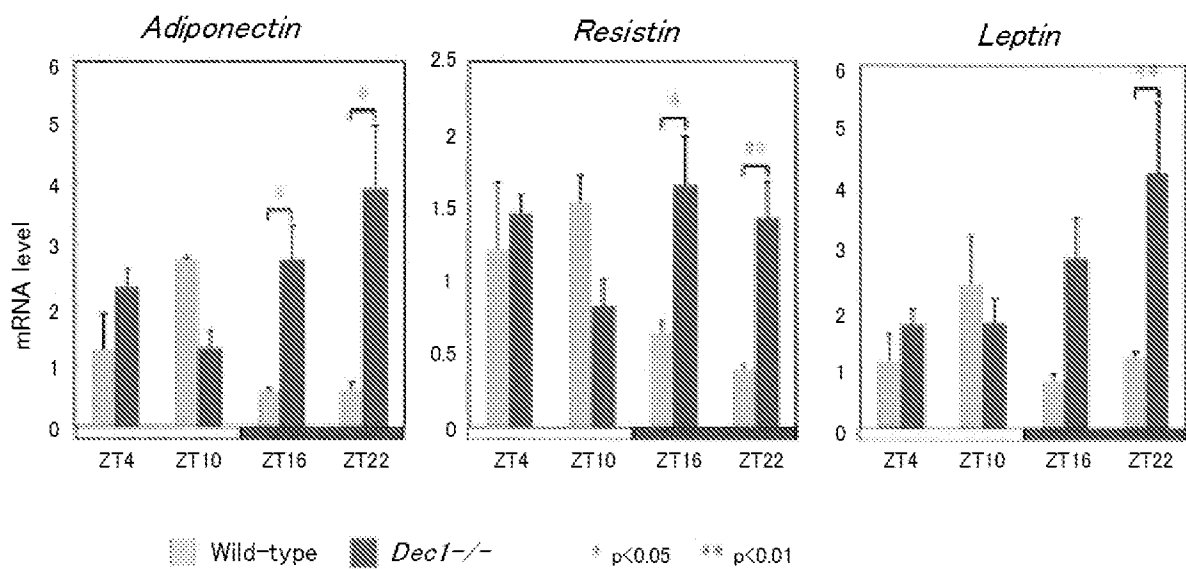
[Figure 11]



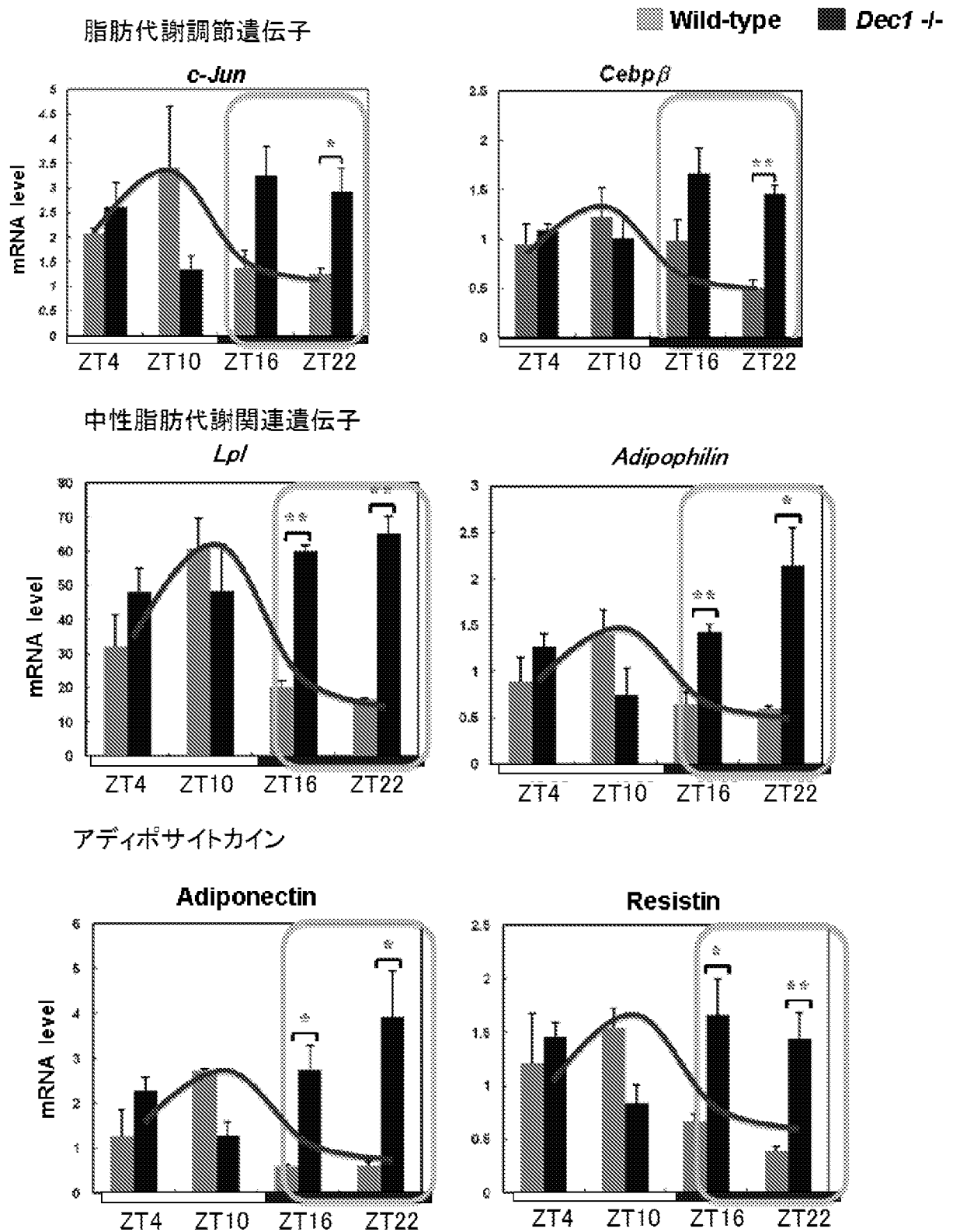
[図12]



[図13]



[図14]



[図15]

遺伝子	脂肪代謝調節因子	Rhythm in WT	Up by Dec1 KO	Down by Dec1 KO
Cebp α	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), α	Rhythmic	Up at ZT16&22	
Cebp β	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), β	Rhythmic	Up at ZT16&22	
Cebp δ	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), δ	Rhythmic	Up at ZT16&22	
c-Jun	jun oncogene	Rhythmic	Up at ZT16&22	
Klf-4	Kruppel-like factor 4	Rhythmic	Up at ZT16&22	
Klf-15	Kruppel-like factor 15	Rhythmic	Up at ZT16&22	
Klf-5	Kruppel-like factor 5	Rhythmic		Down at ZT22
Pgc-1 α	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 α	Rhythmic		Down at ZT22
Rgs2	regulator of G-protein signaling 2	Rhythmic		
RXR α	retinoid X receptor, α	Rhythmic		
Srebp2	sterol regulatory element binding transcription factor 2	Rhythmic		Down by Dec1 KO
Tc10-like	ras homolog gene family, member J (Rhoj)	Rhythmic	Up by Dec1 KO	

遺伝子	中性脂肪代謝関連遺伝子	Rhythm in WT	Up by Dec1 KO	Down by Dec1 KO
Acs1l	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	Rhythmic	Up at ZT16&22	
Adfp	adipophilin	Rhythmic	Up at ZT16&22	
Agpat2	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2	Rhythmic	Up at ZT16&22	
Cd36	CD36 antigen, thrombospondin receptor	Rhythmic	Up at ZT16&22	
Cidec	cell death-inducing DFFA-like effector c	Rhythmic	Up at ZT16&22	
Gpat3	acyl-CoA:glycerol-3-phosphate acyltransferase 3	Rhythmic	Up at ZT16&22	
Lipe	hormone sensitive lipase, HSL	Rhythmic	Up at ZT16&22	
Lpin1	lipin 1 phosphatidate phosphatase activity	Rhythmic	Up at ZT16&22	
Plin	perilipin 1, lipid droplet-associated protein	Rhythmic	Up at ZT16&22	
Atgl	adipose triglyceride lipase, Pnpla2	Rhythmic	Up at ZT16&22	
S3-12	Perilipin 4	Rhythmic	Up at ZT16&22	

遺伝子	その他の脂質代謝酵素遺伝子	Rhythm in WT	Up by Dec1 KO	Down by Dec1 KO
Abca1	ATP-binding cassette, sub-family A, member 1	Rhythmic	Up at ZT4, 16&22	
Fabp4	fatty acid binding protein 4, adipocyte	Rhythmic	Up at ZT4, 16&22	
Fasn	fatty acid synthase	Rhythmic	Up at ZT4, 16&22	
Acat2	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2	Rhythmic		Down at ZT22
Chk α	choline kinase α	Rhythmic	Up at ZT4	Down at ZT16&22
Ldlr	low density lipoprotein receptor	Rhythmic		

遺伝子	アディポサイトカイン	Rhythm in WT	Up by Dec1 KO	Down by Dec1 KO
Retn	resistin, response to insulin stimulus	Rhythmic	Up at night	
IL-6	interleukin 6	Rhythmic		Down at ZT6&10
Rbp4	retinol binding protein 4, plasma	Rhythmic		Down at ZT6&10
Adipoq	adiponectin, C1Q and collagen domain containing	Rhythmic	Up at night	
Leptin	energy reserve metabolic process	Rhythmic	Up at night	

[図16]

遺伝子	脂肪代謝調節因子	Rhythm in WT	Up by Dec1 KO	Down by Dec1 KO
Cebp α	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), α			
Cebp β	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), β	Rhythmic		
Cebp δ	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), δ		Up at ZT10-22	
c-Jun	jun oncogene			
Klf-4	Kruppel-like factor 4			
Klf-15	Kruppel-like factor 15	Rhythmic		
Klf-5	Kruppel-like factor 5	Rhythmic	Up at ZT4	Down at ZT16&22
Pgc-1 α	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 α	Rhythmic	Up at ZT10	
Rgs2	regulator of G-protein signaling 2	Rhythmic		
RXR α	retinoid X receptor, α		Up at ZT4	
Srebp2	sterol regulatory element binding transcription factor 2			
Tc10-like	ras homolog gene family, member J (Rhoj)			

遺伝子	中性脂肪代謝関連遺伝子	Rhythm in WT	Up by Dec1 KO	Down by Dec1 KO
Acs1l	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	Rhythmic	Up at ZT4&10	
Adfp	adipophilin			
Agpat2	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2	Rhythmic		
Cd36	CD36 antigen, thrombospondin receptor			
Cidec	cell death-inducing DFFA-like effector c			
Gpat3	acyl-CoA:glycerol-3-phosphate acyltransferase 3			
Lipe	hormone sensitive lipase, HSL			
Lpin1	lipin 1 phosphatidate phosphatase activity			
Plin	perilipin 1, lipid droplet-associated protein	Rhythmic		
Atgl	adipose triglyceride lipase, Pnpla2			
S3-12	Perilipin 4			

遺伝子	その他の脂質代謝酵素遺伝子	Rhythm in WT	Up by Dec1 KO	Down by Dec1 KO
Abca1	ATP-binding cassette, sub-family A, member 1	Rhythmic	Up at ZT4	
Fabp4	fatty acid binding protein 4, adipocyte		Up at ZT10&16	
Fasn	fatty acid synthase	Rhythmic		Down at ZT16
Acat2	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2	Rhythmic		Down at ZT16
Chk α	choline kinase α	Rhythmic	Up at ZT16	
Ldlr	low density lipoprotein receptor	Rhythmic		

遺伝子	アディポサイトカイン	Rhythm in WT	Up by Dec1 KO	Down by Dec1 KO
Retn	resistin, response to insulin stimulus			
IL-6	interleukin 6			
Rbp4	retinol binding protein 4, plasma			
Adipoq	adiponectin, C1Q and collagen domain containing			
Leptin	energy reserve metabolic process			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/052321

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68(2006.01) i, C12N15/09(2006.01) i, C12N5/071(2010.01) n

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)

C12Q1/68, C12N15/09, C12N5/071

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)

CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ANDO, H. et al., Rhythmic Messenger Ribonucleic Acid Expression of Clock Genes and Adipocytokines in Mouse Visceral Adipose Tissue, Endocrinology, 2005, Vol.146, No.12, pp.5631-5636	1-10
A	SUKUMARAN, S. et al., Circadian Variations in Gene Expression in Rat Abdominal Adipose Tissue and Relationship to Physiology, Physiol. Genomics, 2010, Vol.42A, pp.141-152	1-10
A	JP 2006-514113 A (Fibrogen, Inc.), 27 April 2006 (27.04.2006), & US 2004/0235082 A1 & EP 1578431 A2 & WO 2004/052285 A2	1-10

☒ 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
16 February, 2012 (16.02.12)

Date of mailing of the international search report
28 February, 2012 (28.02.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/052321

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	IIZUKA, K. et al., Regulation of Lipogenesis via BHLHB2/DEC1 and ChREBP feedback looping, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, Vol.374, pp.95-100	1-10
P,A	GARAULET, M. et al., An Approximation to the Temporal Order in Endogenous Circadian Rhythms of Genes Implicated in Human Adipose Tissue Metabolism, J. Cell. Physiol., 2011.08, Vol.226, pp.2075-2080	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)n

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. C12Q1/68, C12N15/09, C12N5/071

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

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

CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	ANDO, H. et al., Rhythmic Messenger Ribonucleic Acid Expression of Clock Genes and Adipocytokines in Mouse Visceral Adipose Tissue, Endocrinology, 2005, Vol.146, No.12, pp.5631-5636	1-10
A	SUKUMARAN, S. et al., Circadian Variations in Gene Expression in Rat Abdominal Adipose Tissue and Relationship to Physiology, Physiol. Genomics, 2010, Vol.42A, pp.141-152	1-10

☒ 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

1 6 . 0 2 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

2 8 . 0 2 . 2 0 1 2

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 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

藤井 美穂

4 N

4 4 3 4

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

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 請求項の番号
A	JP 2006-514113 A (ファイブローゲン インコーポレーテッド) 2006.04.27, & US 2004/0235082 A1 & EP 1578431 A2 & WO 2004/052285 A2	1-10
A	IIZUKA, K. et al., Regulation of Lipogenesis via BHLHB2/DEC1 and ChREBP feedback looping, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, Vol.374, pp.95-100	1-10
P, A	GARAULET, M. et al., An Approximation to the Temporal Order in Endogenous Circadian Rhythms of Genes Implicated in Human Adipose Tissue Metabolism, J. Cell. Physiol., 2011.08, Vol.226, pp.2075-2080	1-10