

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6833037号
(P6833037)

(45) 発行日 令和3年2月24日 (2021.2.24)

(24) 登録日 令和3年2月4日 (2021.2.4)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 31/7088 (2006.01)

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 31/713 (2006.01)

A 6 1 K 31/713

A 6 1 K 31/7105 (2006.01)

A 6 1 K 31/7105

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

D

A 6 1 K 31/5377 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

N

請求項の数 8 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-530030 (P2019-530030)
 (86) (22) 出願日 平成29年11月20日 (2017.11.20)
 (65) 公表番号 特表2020-513409 (P2020-513409A)
 (43) 公表日 令和2年5月14日 (2020.5.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2017/013154
 (87) 国際公開番号 W02018/105921
 (87) 国際公開日 平成30年6月14日 (2018.6.14)
 審査請求日 令和1年8月13日 (2019.8.13)
 (31) 優先権主張番号 10-2016-0165901
 (32) 優先日 平成28年12月7日 (2016.12.7)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 韓国 (KR)

(73) 特許権者 314000442
 高麗大学校産学協力団
 KOREA UNIVERSITY RE
 SEARCH AND BUSINESS
 FOUNDATION
 大韓民国 02841 ソウル ソンブク
 ク アナムロ 145
 145, Anam-ro Seongb
 uk-gu Seoul 02841,
 Republic of Korea
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脂肪肝の診断または治療のためのロイシンジッパータンパク質の用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 のロイシンジッパータンパク質の N 末端の断片をコードする遺伝子の発現阻
 害剤を有効成分として含み、
 前記発現阻害剤は、配列番号 1 のアミノ酸配列からなる断片をコードする遺伝子に対する
 アンチセンスオリゴヌクレオチド、s i R N A、またはs h R N Aである、脂肪肝の予防
 または治療用薬学的組成物。

【請求項 2】

配列番号 1 のロイシンジッパータンパク質の N 末端の断片の活性阻害剤を有効成分とし
 て含み、
 前記活性阻害剤は、配列番号 1 のアミノ酸配列からなる断片と特異的に結合する抗体；配
 列番号 1 のアミノ酸配列からなる断片をコードする遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌ
 クレオチド、s i R N A、またはs h R N A；およびP h o s p h a t i d y l i n o s
 i t o l - 3 - k i n a s e (P I 3 K) / A k t 阻害剤よりなる群から選ばれるいずれ
 か一つであり、
 前記P h o s p h a t i d y l i n o s i t o l - 3 - k i n a s e (P I 3 K) / A k
 t 阻害剤は、L Y 2 9 4 0 0 2 またはA k t i n h i b i t o r I Vである、脂肪肝
 の予防または治療用薬学的組成物。

【請求項 3】

前記組成物は、A p o l i p o p r o t e i n A 4 の発現を抑制することを特徴とす

る、請求項 1 または 2 に記載の脂肪肝の予防または治療用薬学的組成物。

【請求項 4】

配列番号 1 のロイシンジッパータンパク質の N 末端の断片をコードする遺伝子の発現または配列番号 1 のロイシンジッパータンパク質の N 末端の断片の活性を測定するためのプローブを含む、脂肪肝診断用組成物。

【請求項 5】

前記プローブは、配列番号 1 のロイシンジッパータンパク質の N 末端の断片と特異的に結合する抗体；またはロイシンジッパータンパク質の N 末端の断片をコードする遺伝子と特異的に結合する核酸プローブまたはプライマーである、請求項 4 に記載の脂肪肝診断用組成物。

10

【請求項 6】

インビトロで、配列番号 1 のロイシンジッパータンパク質の N 末端の断片をコードする遺伝子を発現する細胞と候補物質を共に培養し、前記細胞の配列番号 1 のロイシンジッパータンパク質の N 末端の断片をコードする遺伝子の発現を測定する段階を含み、前記候補物質が配列番号 1 のロイシンジッパータンパク質の N 末端の断片をコードする遺伝子の発現を下方制御するとき、脂肪肝の予防または治療用医薬として判別する、脂肪肝の予防または治療用医薬のスクリーニング方法。

【請求項 7】

インビトロで、ロイシンジッパータンパク質を発現する細胞と候補物質を共に培養し、前記細胞のロイシンジッパータンパク質の活性を測定する段階を含み、前記候補物質が配列番号 1 のアミノ酸配列からなる断片の発現を下方制御するとき、脂肪肝の予防または治療用医薬として判別する、脂肪肝の予防または治療用医薬のスクリーニング方法。

20

【請求項 8】

インビトロで、ロイシンジッパータンパク質を発現する細胞と候補物質を培養し、前記細胞のロイシンジッパータンパク質の活性を測定する段階を含み、前記候補物質が配列番号 1 のアミノ酸配列からなる断片と A k t との複合体の形成を減少させるとき、脂肪肝の予防または治療用医薬として判別する、脂肪肝の予防または治療用医薬のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本発明は、脂肪肝の診断または治療のためのロイシンジッパータンパク質の用途に関する。本発明は、韓国未来創造科学部の支援下において課題番号 H I 1 5 C 1 9 0 6 0 1 0 0 1 5 により行われたものであって、上記課題の研究管理専門機関は、「韓国研究財団」、研究事業名は、「疾患克服技術事業」、研究課題名は、「[1 / 3] 糖尿病と糖尿病性血管疾患連携機序研究による代謝性疾患調節物質開発事業」、研究期間は、「2 0 1 5 . 1 1 . 1 2 . - 2 0 1 6 . 1 0 . 3 1 」である。

【0002】

本特許出願は、2 0 1 6 年 1 2 月 0 7 日に韓国特許庁に提出された韓国特許出願第 1 0 - 2 0 1 6 - 0 1 6 5 9 0 1 号に対して優先権を主張し、上記特許出願の開示事項は、本明細書に参照として組み込まれる。

40

【背景技術】

【0003】

脂肪肝は、肝細胞の中に脂肪が蓄積された状態であって、医学的に脂肪が肝全体の重さの 5 % を超過する病的状態を意味する。上記脂肪肝を含む肝疾患は、先進国における 4 0 ~ 5 0 代の成人人口の死亡原因において、癌に続いて深刻な疾患であると報告されている。先進国を含む主要国家の人口のうち 3 0 % は脂肪肝症状を示し、これらのうち 2 0 % は肝硬変に進行し、肝硬変患者の約半数は診断後 1 0 年以内に肝疾患で死亡する。

【0004】

脂肪肝は、大きく、飲みすぎによるアルコール性脂肪肝疾患 (a l c o h o l i c f a

50

t t y l i v e r d i s e a s e) と肥満、糖尿病、高脂血症、薬物などによる非アルコール性脂肪肝疾患 (n o n a l c o h o l i c f a t t y l i v e r d i s e a s e、NAFLD) に分けられる。

【0005】

非アルコール性脂肪肝疾患は、過度のアルコールを摂取しない患者において炎症反応を伴わない単純脂肪肝、およびこれが進行することによる肝細胞の炎症反応、肝線維化および肝硬変を含む広い範囲の疾患を意味する。非アルコール性脂肪肝疾患は、原因によって原発性と続発性に分けられ、原発性は、代謝症候群の特徴である高脂血症、糖尿病、または肥満などにより発生し、続発性は、栄養的原因（急激な体重減少、飢餓、腸バイパス術）、様々な薬物、毒性物質（毒きのこ、細菌毒素）、代謝性原因およびその他要因によって発生することが知られている。原発性要因である代謝症候群の重要な特徴である糖尿病および肥満に関連した非アルコール性脂肪肝疾患は、糖尿病患者の約50%、肥満患者の約76%、肥満を伴う糖尿病患者では大概発生すると知られている。また、アラニンアミノトランスフェラーゼ (A l a n i n e a m i n o t r a n s f e r a s e、ALT) のレベルが増加した糖尿病および肥満患者において生検を実施した結果、脂肪肝炎の発生率は、18~36%であった。

10

【0006】

一方、いくつかの糖尿病または肥満の治療薬剤の投与による脂肪肝疾患の治療効果が知られており、この中でも経口用肥満治療薬として使用されているオルリスタット (O r l i s t a t) の場合、脂肪肝炎患者において肝組織の回復を向上させたという報告がある。また、メトホルミン (M e t f o r m i n) は、糖尿病を伴わない非アルコール性脂肪肝患者において血中肝酵素数値、肝臓の壊死性炎症および線維化を減少させたという報告があり、PPAR (p e r o x i s o m e p r o l i f e r a t o r - a c t i v a t e d r e c e p t o r) の作用物質 (a g o n i s t) であるチアゾリジンジオン (T h i a z o l i d i n e d i o n e、TZD) 系の薬物は、肝臓と筋肉での脂肪の蓄積を抑制し、非アルコール性脂肪肝疾患の動物モデルで肝臓に対して直接的な抗線維化作用を示すという報告がある。しかし、このような治療薬物の開発にもかかわらず（韓国特許10-2013-0103190号公報）、脂肪肝疾患の治療のための有用な薬剤は不十分な状況であり、脂肪肝疾患に対する確立された治療法がないため、適当な運動と食事療法だけが推奨されているのが現状である。

20

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】韓国特許第10-2013-0103190号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、上記のような問題点を解決するために案出されたものであって、本発明者らは、肝臓での脂肪の合成を誘導する物質を導き出すために鋭意研究した結果、ロイシンジッパータンパク質、特にそのN末端部位に存在する特定断片がA p o l i p o p r o t e i n A 4 の発現を向上させて、肝組織内脂肪の蓄積を促進させることを確認し、これに基づいて本発明を完成した。

40

【0009】

これより、本発明の目的は、脂肪肝の予防または治療のためのロイシンジッパータンパク質の用途を提供することにある。

【0010】

これより、本発明の目的は、脂肪肝の診断のためのロイシンジッパータンパク質の用途を提供することにある。

【0011】

本発明の目的は、脂肪肝の予防または治療用医薬の開発のためのロイシンジッパータンパ

50

ク質の用途を提供することにある。

【0012】

しかしながら、本発明が解決しようとする技術的課題は、以上で言及した課題に制限されず、言及されていない他の課題は、下記の記載から当業者に明確に理解され得る。

【課題を解決するための手段】

【0013】

前述したような本発明の目的を達成するために、本発明は、ロイシンジッパータンパク質の発現または活性の阻害剤を有効成分として含む、脂肪肝の予防または治療用薬学的組成物を提供する。

【0014】

本発明の一実施形態として、前記ロイシンジッパータンパク質の発現阻害剤は、ロイシンジッパータンパク質をコードする遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、*siRNA*、または*shRNA*であってもよい。

【0015】

本発明の他の実施形態として、前記ロイシンジッパータンパク質の活性阻害剤は、ロイシンジッパータンパク質と特異的に結合する抗体；配列番号1のアミノ酸配列からなる断片をコードする遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、*siRNA*、または*shRNA*；および *Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)* / *Akt* 阻害剤であってもよい。

【0016】

本発明のさらに他の実施形態として、前記組成物は、*Apolipoprotein A4* の発現を抑制するものであってもよい。

【0017】

また、本発明は、ロイシンジッパータンパク質の発現または活性を測定するためのプローブを含む、脂肪肝診断用組成物を提供する。

【0018】

本発明の一実施形態として、前記ロイシンジッパータンパク質の発現を測定するためのプローブは、ロイシンジッパータンパク質と特異的に結合する抗体；またはロイシンジッパータンパク質をコードする遺伝子と特異的に結合する核酸プローブまたはプライマーであってもよい。

【0019】

本発明の他の実施形態として、前記ロイシンジッパータンパク質の活性を測定するためのプローブは、配列番号1のアミノ酸配列からなる断片と特異的に結合する抗体；または前記断片をコードする遺伝子と特異的に結合する核酸プローブまたはプライマーであってもよい。

【0020】

また、本発明は、インビトロ (*in vitro*) で、ロイシンジッパータンパク質を発現する細胞と候補物質を共に培養し、前記細胞のロイシンジッパータンパク質の発現を測定する段階を含み、前記候補物質がロイシンジッパータンパク質の発現を下方制御するとき、脂肪肝の予防または治療用医薬として判別する、脂肪肝の予防または治療用医薬のスクリーニング方法を提供する。

【0021】

また、本発明は、インビトロ (*in vitro*) で、ロイシンジッパータンパク質を発現する細胞と候補物質を共に培養し、前記細胞のロイシンジッパータンパク質の活性を測定する段階を含み、前記候補物質が配列番号1のアミノ酸配列からなる断片の発現を下方制御するとき、脂肪肝の予防または治療用医薬として判別する、脂肪肝の予防または治療用医薬のスクリーニング方法を提供する。

【0022】

また、インビトロ (*in vitro*) で、ロイシンジッパータンパク質を発現する細胞と候補物質を共に培養し、前記細胞のロイシンジッパータンパク質の活性を測定する段階

10

20

30

40

50

を含み、前記候補物質が配列番号1のアミノ酸配列からなる断片とA k tとの複合体の形成を減少させるとき、脂肪肝の予防または治療用医薬として判別する、脂肪肝の予防または治療用医薬のスクリーニング方法を提供する。

【発明の効果】

【0023】

本発明によれば、ロイシンジッパータンパク質 (L e u c i n e - z i p p e r p r o t e i n)、特にそのN末端部位に存在する特定断片がA p o l i p o p r o t e i n A 4の転写活性を調節することによって、肝組織内脂肪代謝に重要な役割をすることを確認することができたことから、上記本発明のタンパク質またはその断片は、脂肪肝の診断、予防または治療のための標的として活用され得る。

10

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】図1は、L Z I Pの処理濃度 (0、0. 25、0. 5、および1 μ g) によるA p o A 4プロモーターの活性を測定した結果である。

【図2】図2 aは、F l a g - L Z I Pの処理濃度 (0、1、2 μ g) によるA p o A 4 mRNAの発現量の変化を確認した結果であり；および図2 bは、L Z I P s i R N Aの処理濃度 (0、5、10 p m o l / μ l) によるA p o A 4 mRNAの発現量の変化を確認した結果である。

【図3】図3 aは、A d - L Z I Pの処理濃度 (0、5、10、20 M O I) によるA p o A 4タンパク質の発現量の変化を確認した結果であり；および図3 bは、L Z I P s i R N Aの処理濃度 (0、5、10、20 p m o l / μ l) によるA p o A 4タンパク質の発現量の変化を確認した結果である。

20

【図4】図4は、B r e f e l d i n A (B F A)、T u n i c a m y c i n (T M)、またはT h a s i g a r g i n (T G) 処理によるA p o A 4の発現変化を確認した結果である。

【図5】図5 aは、B F Aの処理濃度 (0、5、10、50、100 n g / m l) によるA p o A 4プロモーターの活性を測定した結果であり；図5 bは、B F Aの処理濃度 (0、1、5、10、50、100 n g / m l) によるA p o A 4 mRNAの発現量の変化を確認した結果であり；図5 cは、B F Aの処理時間 (0、1、3、6、10、14 h) によるA p o A 4 mRNAの発現量の変化を確認した結果であり；および図5 dは、B F Aの処理濃度 (0、1、5、10、50、100 n g / m l) によるA p o A 4タンパク質の発現量の変化を確認した結果である。

30

【図6】図6は、B F AおよびL Z I Pの併用投与によるA p o A 4プロモーターの活性を測定した結果である。

【図7】図7 aは、B F AおよびL Z I P s i R N Aの併用投与によるA p o A 4 mRNAの発現量の変化を確認した結果であり；および図7 bは、B F AおよびL Z I P s i R N Aの併用投与によるA p o A 4タンパク質の発現量の変化を確認した結果である。

【図8】図8 aは、B F A処理によるL Z I Pタンパク質の細胞内移動様相を核／細胞質分画法で確認した結果であり；および図8 bは、B F A処理によるL Z I Pタンパク質の細胞内移動様相を蛍光顕微鏡で観察した結果である。

40

【図9】図9 aは、L Z I P N末端の処理濃度 (0、0. 05、0. 1、0. 5 μ g) によるA p o A 4プロモーターの活性を測定した結果であり；9 bは、F l a g - L Z I P N末端の処理濃度 (0、0. 25、0. 5、1 μ g) によるA p o A 4 mRNAの発現量の変化を確認した結果であり；および図9 cは、A d - L Z I P N末端処理濃度 (0、5、10、20 M O I) によるA p o A 4タンパク質の発現量の変化を確認した結果である。

【図10】図10 aは、B F A処理濃度 (50、100、250、500 n g / m l) によるL Z I P N末端タンパク質の分離／生成を確認した結果であり；図10 bは、A d - L Z I P N末端処理濃度 (0、5、10 M O I) によるA p o A 4 mRNAの発現

50

量の変化を確認した結果であり；および図10cは、Ad-LZIP N末端処理濃度（0、5、10MOI）によるApoA4タンパク質の発現量の変化を確認した結果である。

【図11】図11aは、LZIP N末端とAktとの結合有無をインビトロ キナーゼ アッセイ（*in vitro kinase assay*）で確認した結果であり；および図11bは、LZIP N末端とAktとの結合有無をGST プルダウンアッセイ（*GST-pull down assay*）で確認した結果である。

【図12】図12aは、Akt阻害剤で処理することによるApoA4タンパク質の発現変化を確認した結果であり；図12bは、Akt阻害剤で処理することによるLZIP N末端の分離を確認した結果であり；および図12cは、Akt阻害剤で処理することによるLZIP N末端の安定性変化を確認した結果である。

10

【図13】図13aは、ヒト肝細胞株であるHepG2でオレイン酸とLZIP N末端を併用することによる肝細胞内の脂肪の蓄積量を確認した結果であり；および図13bは、マウス初代肝細胞でオレイン酸とLZIP N末端を併用することによる肝細胞内の脂肪の蓄積量を確認した結果である。

【図14】図14は、マウス動物モデルを利用してLZIP N末端で処理することによる肝組織内ApoA4の発現量の変化を確認した結果である。

【図15】図15aは、マウス動物モデルを利用してLZIP N末端で処理することによる肝組織または血しょう内中性脂肪の量の変化を確認した結果であり；および図15bは、マウス動物モデルを利用してLZIP N末端で処理することによる肝組織内中性脂肪をオイルレッドO染色（*Oil Red O*染色）で確認した結果である。

20

【図16】図16は、正常肝組織と肥満による脂肪肝組織とでLZIPまたはApoA4の発現を比較した結果である。

【図17】図17は、正常肝組織とアルコール性脂肪肝組織とでLZIPまたはApoA4の発現を比較した結果である。

【図18】図18は、正常肝組織と非アルコール性脂肪肝組織とでLZIPまたはApoA4の発現を比較した結果である。

【発明を実施するための形態】

【0025】

以下、本発明を詳細に説明する。

30

【0026】

本発明は、脂肪肝の予防または治療のためのロイシンジッパータンパク質の用途を提供する。

【0027】

より具体的に、本発明は、ロイシンジッパータンパク質の発現または活性の阻害剤を有効成分として含む、脂肪肝の予防または治療用薬学的組成物；上記疾患の予防または治療のためのロイシンジッパータンパク質の発現または活性の阻害剤の用途；および治療上有効量のロイシンジッパータンパク質の発現または活性の阻害剤を個体に投与する段階を含む、上記疾患の予防または治療方法を提供する。

【0028】

40

本発明で使用される用語「予防」とは、本発明による薬学的組成物の投与により脂肪肝疾患を抑制したり発病を遅延させるすべての行為を意味する。

【0029】

本発明で使用される用語「治療」とは、本発明による薬学的組成物の投与により脂肪肝疾患に対する症状が好転したり有利に変更されるすべての行為を意味する。

【0030】

本発明の組成物による予防または治療対象疾患である「脂肪肝（*fatty liver*）」は、正常肝で脂肪が占める比率（5%）より多い量の脂肪が肝臓に蓄積された症状を意味する。上記脂肪肝は、飲みすぎによるアルコール性脂肪肝と、肥満、糖尿病、高脂血症または薬物などによる非アルコール性脂肪肝に、大きく分類され得る。アルコール性脂

50

肪肝は、アルコールを多量摂取する場合、肝臓で脂肪合成が促進され、正常なエネルギー代謝が行われないため発生し、非アルコール性脂肪肝は、アルコール以外の原因によって発生し、上記非アルコール性脂肪肝は、脂肪代謝の異常を招く成人病に伴う場合が多いことが知られている。前述したような症状を有する脂肪肝疾患の治療のために、本発明は、ロイシンジッパータンパク質またはこれをコードする遺伝子、より具体的に、ロイシンジッパータンパク質内特定断片またはこれをコードする遺伝子を標的とするという点に技術的特徴がある。

【0031】

本発明でロイシンジッパータンパク質 (LZIP) は、bZIPファミリーの構成員であって、CREB/ATF遺伝子ファミリーに属する。ロイシンジッパータンパク質は、塩基性DNA-結合ドメイン (basic DNA-binding domain) とロイシンジッパードメインを有しており、cAMP応答配列 (cAMP-responsive element (CRE)) とAP-1配列 (AP-1 element) に結合する。また、HCF-1結合タンパク質であることが明らかにされ、細胞増殖と細胞性形質転換を促進し、2個のLxLL-転写補助因子結合モチーフを含んでいる。また、ロイシンジッパータンパク質は、CREB3 (LZIP、Luman)、CREB3L1 (OASIS)、CREB3L2 (BBF2H7)、CREB3L3 (CREB-H)、CREB3L4 (AIBZIP) の5個の構成員からなり、これらは相同性を有しているが、転写因子それぞれの機能は異なる。報告されているロイシンジッパータンパク質の機能としては、CCR1に結合してLkn-1依存性細胞内移動を調節し、CCR2プロモーターに結合してCCR2の発現を調節することなどがあるが、本発明で開示しているように、Apolipoprotein A4の発現および肝組織内脂肪代謝調節については、明らかではないのが現状である。

【0032】

本発明で発現阻害剤は、ロイシンジッパータンパク質をコードする遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA、miRNA、またはこれを含むベクターであってもよく、最も好ましくは、配列番号5からなるsiRNAがあるが、これと同等または類似の効果を示すことができるものであればこれらに制限されるものではない。このようなアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA、miRNAまたはこれらを含むベクターは、当業界に公知の方法を利用して作製することができる。本発明において、上記「ベクター」は、ポリペプチドを暗号化するゲノム内に挿入された外部DNAを含む遺伝子構築物をいう。本発明に関連したベクターは、上記遺伝子を阻害する核酸配列がゲノム内に挿入されたベクターであって、これらのベクターは、DNAベクター、プラスミドベクター、コスミドベクター、バクテリオファージベクター、酵母ベクター、またはウイルスベクターを例示することができる。

【0033】

また、本発明で活性阻害剤は、ロイシンジッパータンパク質の機能低下、好ましくは上記タンパク質機能の検出が不可能になるか無意味なレベルで存在するようにする物質を意味する。より具体的に、上記活性阻害剤は、ロイシンジッパータンパク質と特異的に結合する抗体；ロイシンジッパータンパク質内特定断片をコードする遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA、miRNA、またはこれを含むベクター；ロイシンジッパータンパク質内特定断片の活性を抑制するものであって、AEBSFなどを含むゴルジ体ストレスによるLZIP N末端の切断を阻害する物質、またはLY294002、Akt inhibitor IVなどを含むPI3K/Akt阻害剤であってもよいが、これらに制限されるものではない。

【0034】

上記ロイシンジッパータンパク質内特定断片は、ロイシンジッパータンパク質のN末端に位置し、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなり得、上記配列番号1で表されるアミノ酸配列と、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の配列相同性を有するアミノ酸配列を含むことができる。

【0035】

また、ロイシンジッパータンパク質内特定断片をコードする遺伝子は、好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸をコーディングできるすべての種類の塩基配列を含むことができ、最も好ましくは、配列番号2で表される塩基配列からなり得、上記配列番号2で表される塩基配列と70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の配列相同性を有する塩基配列を含むことができる。

【0036】

本発明の薬学的組成物は、有効成分以外に薬剤学的に適合し、生理学的に許容される添加剤を使用して製造することができ、上記添加剤としては、賦形剤、崩解剤、甘味剤、結合剤、被覆剤、膨張剤、潤滑剤、滑沢剤または香味剤などの可溶化剤を使用することができ

10

【0037】

本発明の薬学的組成物は、投与のために有効成分以外にさらに薬剤学的に許容可能な担体を1種以上含んで薬学的組成物に好適に製剤化することができる。液状溶液に製剤化される組成物において許容可能な薬剤学的担体としては、滅菌および生体に適合したものであって、食塩水、滅菌水、リンガー液、緩衝食塩水、アルブミン注射溶液、デキストロース溶液、マルトデキストリン溶液、グリセロール、エタノールおよびこれら成分のうち1成分以上を混合して使用することができ、必要に応じて抗酸化剤、緩衝液、静菌剤など他の通常の添加剤を添加することができる。また、希釈剤、分散剤、界面活性剤、結合剤および潤滑剤を付加的に添加して、水溶液、懸濁液、乳濁液などのような注射用剤形、丸薬、カプセル、顆粒または錠剤に製剤化することができる。ひいては、当該分野の適切な方法としてRemington's Pharmaceutical Science、MacK Publishing Company、Easton PAに開示されている方法を利用して各疾患によってまたは成分によって好適に製剤化することができる。

20

【0038】

本発明の薬学的組成物の薬剤の製剤形態は、顆粒剤、散剤、被覆錠剤、錠剤、カプセル剤、坐剤、シロップ、汁、懸濁剤、乳剤、点滴剤または注射可能な液剤および活性化化合物の徐放性製剤などが挙げられる。

【0039】

本発明の薬学的組成物は、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、腹腔内、胸骨内、経皮、鼻内、吸入、外用、直腸、経口、眼球内または皮内経路を通じて通常の方式で投与することができる。

30

【0040】

本発明の薬学的組成物の有効成分の有効量は、疾患の予防または治療、または骨成長誘導効果を成すのに要求される量を意味する。したがって、疾患の種類、疾患の重症度、組成物に含有された有効成分および他の成分の種類および含有量、剤形の種類および患者の年齢、体重、一般健康状態、性別および食事、投与時間、投与経路および組成物の比率、治療期間、同時使用される薬物をはじめとする多様な因子によって調節され得る。これらに制限されるものではないが、例えば、成人の場合、1日1回～数回投与時、本発明の阻害剤は、1日1回～数回投与時、化合物の場合、 $0.1 \text{ ng/kg} \sim 10 \text{ g/kg}$ 、ポリペプチド、タンパク質または抗体の場合、 $0.1 \text{ ng/kg} \sim 10 \text{ g/kg}$ 、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA、miRNAの場合、 $0.01 \text{ ng/kg} \sim 10 \text{ g/kg}$ の用量で投与することができる。

40

【0041】

本発明において、「個体」は、ヒト、オランウータン、チンパンジー、マウス、ラット、犬、牛、鶏、豚、ヤギ、羊などを含むか、これらの例に限定されるのではない。

【0042】

また、本発明の他の様態として、脂肪肝の診断のためのロイシンジッパータンパク質の用途を提供する。

【0043】

50

より具体的に、本発明は、ロイシンジッパータンパク質の発現または活性を測定するためのプローブを含む、脂肪肝診断用組成物；上記疾患の診断のためのロイシンジッパータンパク質の発現または活性を測定するためのプローブの用途；および有効量のロイシンジッパータンパク質の発現または活性を測定するためのプローブを個体に投与する段階を含む、上記疾患の診断のための情報提供方法を提供する。

【0044】

本発明の診断用組成物などは、やはり、前述したロイシンジッパータンパク質を利用するので、これら両者に共通した内容は、本明細書の過度な複雑性を避けるために、その記載を省略する。

【0045】

本発明で使用される用語「診断」とは、本発明による組成物の投与により病理状態、すなわち脂肪肝の存在または特徴を確認する行為である。本発明の目的上、生体組織内ロイシンジッパータンパク質または上記ロイシンジッパータンパク質内特定断片の発現または活性が増進された場合、脂肪肝と判断することを意味する。

【0046】

本発明で、上記ロイシンジッパータンパク質の発現を測定するためのプローブは、ロイシンジッパータンパク質と特異的に結合する抗体、または上記タンパク質をコードする遺伝子と特異的に結合する核酸プローブまたはプライマーであってもよく、上記ロイシンジッパータンパク質の活性を測定するためのプローブは、ロイシンジッパータンパク質内特定断片と特異的に結合する抗体、または上記断片をコードする遺伝子と特異的に結合する核酸プローブまたはプライマーであってもよいが、ロイシンジッパータンパク質の発現または活性を測定できる物質であれば、制限されることなく含まれ得る。

【0047】

上記抗体は、ポリクロナール抗体、モノクロナール抗体、ヒト抗体およびヒト化抗体、またはこれらの断片を使用することができる。また、上記抗体断片は、F a b、F a b'、F (a b ') 2 および F v 断片；ディアボディ (d i a b o d y) ；線形抗体；一本鎖抗体分子；および抗体断片から形成された多重特異性抗体などを含むことができる。

【0048】

上記核酸プローブは、自然のまたは変形したモノマーまたは連鎖 (l i n k a g e s) の線形オリゴマーを意味し、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含み、ターゲットヌクレオチド配列に特異的にハイブリダイゼーションすることができ、自然に存在していたりまたは人為的に合成されたものをいう。本発明によるプローブは、単一鎖であってもよく、好ましくはオリゴデオキシリボヌクレオチドであってもよい。本発明のプローブは、天然 d N M P (すなわち、d A M P、d G M P、d C M P および d T M P)、ヌクレオチド類似体または誘導体を含むことができる。また、本発明のプローブは、リボヌクレオチドも含むことができる。例えば、本発明のプローブは、骨格変形したヌクレオチド、例えば、ペプチド核酸 (P N A)、ホスホロチオエート DNA、ホスホロジチオエート DNA、ホスホロジアミダート DNA、アミドー結合された DNA、M M I ー結合された DNA、2' - O - メチル RNA、アルファー DNA およびメチルホスホナート DNA、糖変形したヌクレオチド、例えば、2' - O - メチル RNA、2' - フルオロ RNA、2' - アミノ RNA、2' - O - アルキル DNA、2' - O - アリル DNA、2' - O - アルキニル DNA、ヘキサース DNA、ピラノシル RNA およびアンヒドロヘキシトール DNA、および塩基変形を有するヌクレオチド、例えば、C - 5 置換されたピリミジン (置換基は、フルオロー、プロモー、クロロー、ヨードー、メチルー、エチルー、ビニルー、ホルミルー、エチニルー、プロピニルー、アルキニルー、チアゾリルー、イミダゾリルー、ピリジルーを含む)、C - 7 置換基を有する 7 - デアザプリン (置換基は、フルオロー、プロモー、クロロー、ヨードー、メチルー、エチルー、ビニルー、ホルミルー、アルキニルー、アルケニルー、チアゾリルー、イミダゾリルー、ピリジルー)、イノシンおよびジアミノプリンを含むことができる。

【0049】

上記プライマーは、適切な温度および適切な緩衝液内において適切な条件（すなわち、4種の異なるヌクレオシドトリホスフェートおよび重合反応酵素）下で鋳型一依存的なDNA合成の開始点に作用できる一本鎖オリゴヌクレオチドを意味する。プライマーの適切な長さは、多様な要素、例えば、温度とプライマーの用途によって変化がありえる。また、プライマーの配列は、鋳型の一部配列と完全に相補的な配列を有する必要はなく、鋳型とハイブリダイゼーションされてプライマー固有の作用をすることができる範囲内での十分な相補性を有すれば十分である。したがって、本発明でのプライマーは、鋳型である遺伝子のヌクレオチド配列に完全に相補的な配列を有する必要はなく、この遺伝子配列にハイブリダイゼーションされてプライマーとして作用することができる範囲内で十分な相補性を有すれば十分である。また、本発明によるプライマーは、遺伝子増幅反応に用いられるものが好ましい。上記増幅反応は、核酸分子を増幅する反応を言い、このような遺伝子の増幅反応については、当業界に良く知られており、例えば、重合酵素連鎖反応（PCR）、逆転写重合酵素連鎖反応（RT-PCR）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、転写媒介増幅（TMA）、核酸配列ベース増幅（NASBA）等が含まれ得る。

10

【0050】

本発明の非アルコール性脂肪肝診断用組成物は、キットの形態で含まれ得る。

【0051】

上記キットは、ロイシンジッパータンパク質またはロイシンジッパータンパク質内特定断片の発現または活性を測定できる抗体、プローブまたはプライマーなどを含むことができ、これらの定義は、上述した通りである。

20

【0052】

上記キットがPCR増幅過程に適用される場合、選択的に、PCR増幅に必要な試薬、例えば、緩衝液、DNA重合酵素（例するに、*Thermus aquaticus*（Taq）、*Thermus thermophilus*（Tth）、*Thermus filiformis*、*Thermis flavus*、*Thermococcus litoralis*または*Pyrococcus furiosus*（Pfu）から取得した熱安定性DNA重合酵素、DNA重合酵素補助因子およびdNTPsを含むことができ、上記キットが免疫分析に適用される場合、本発明のキットは、選択的に、二次抗体および標識の基質を含むことができる。ひいては、本発明によるキットは、上記した試薬成分を含む多数の別途パッケージングまたはコンパートメントで作製され得る。

30

【0053】

また、本発明の非アルコール性脂肪肝診断用組成物は、マイクロアレイの形態で含まれ得る。

【0054】

本発明のマイクロアレイにおいて、上記ロイシンジッパータンパク質またはロイシンジッパータンパク質内特定断片の発現または活性を測定できる抗体、プローブまたはプライマーなどは、ハイブリダイゼーションアレイ要素（*hybridizable array element*）として用いられ、基質（*substrate*）上に固定化される。好ましい基質は、適切な堅固性または半堅固性支持体であって、例えば、膜、フィルター、チップ、スライド、ウェハー、ファイバー、磁性ビーズまたは非磁性ビーズ、ゲル、チュービング、プレート、高分子、微小粒子および毛細管を含むことができる。上記ハイブリダイゼーションアレイ要素は、上記基質上に配列され固定化され、このような固定化は、化学的結合方法またはUVのような共有結合的方法により行われ得る。例えば、上記ハイブリダイゼーションアレイ要素は、エポキシ化合物またはアルデヒド基を含むように変形したガラスの表面に結合されてもよく、また、ポリリジンコーティングの表面でUVにより結合され得る。また、上記ハイブリダイゼーションアレイ要素は、リンカー（例えば、エチレングリコールオリゴマーおよびジアミン）を介して基質に結合され得る。

40

【0055】

一方、本発明のマイクロアレイに適用される試料が核酸の場合には、標識され得、マイク

50

ロアレイ上のアレイ要素とハイブリダイゼーションされ得る。ハイブリダイゼーション条件は、多様であり、ハイブリダイゼーション程度の検出および分析は、標識物質によって多様に実施され得る。

【0056】

本発明のさらに他の様態として、本発明は、脂肪肝の予防または治療用医薬の開発のためのロイシンジッパータンパク質の用途を提供する。

【0057】

本発明のスクリーニング方法などは、やはり、上述したロイシンジッパータンパク質を利用するので、これらの両者に共通した内容は、本明細書の過度な複雑性を避けるために、その記載を省略する。

10

【0058】

一実施形態として、本発明は、インビトロ (*in vitro*) で、ロイシンジッパータンパク質を発現する細胞と候補物質を共に培養し、上記細胞のロイシンジッパータンパク質の発現を測定することを含み、上記候補物質がロイシンジッパータンパク質の発現を下方制御するとき、脂肪肝の予防または治療用医薬として判別する、脂肪肝の予防または治療用医薬のスクリーニング方法を提供する。

【0059】

他の実施形態として、本発明は、インビトロ (*in vitro*) で、ロイシンジッパータンパク質を発現する細胞と候補物質を共に培養し、上記細胞のロイシンジッパータンパク質の活性を測定することを含み、上記候補物質がロイシンジッパータンパク質内特定断片の発現を下方制御するとき、脂肪肝の予防または治療用医薬として判別する、脂肪肝の予防または治療用医薬のスクリーニング方法を提供する。

20

【0060】

さらに他の実施形態として、本発明は、インビトロ (*in vitro*) で、ロイシンジッパータンパク質を発現する細胞と候補物質を共に培養し、上記細胞のロイシンジッパータンパク質の活性を測定することを含み、上記候補物質が上記ロイシンジッパータンパク質内特定断片と Akt との複合体の形成を減少させるとき、脂肪肝の予防または治療用医薬として判別する、脂肪肝の予防または治療用医薬のスクリーニング方法を提供する。

【0061】

上記候補物質は、通常の選定方式によってロイシンジッパータンパク質またはその特定断片への転写、翻訳を抑制する物質、またはロイシンジッパータンパク質またはその特定断片の機能または活性を抑制する医薬としての可能性を有するものと推定され、または無作為に選ばれた個別の核酸、タンパク質、ペプチド、その他抽出物または天然物、化合物などが挙げられる。

30

【0062】

その後、候補物質で処理された細胞において、上記遺伝子の発現量、タンパク質の量またはタンパク質の活性を測定することができ、測定の結果、上記遺伝子の発現量、タンパク質の量またはタンパク質の活性が減少することが測定されると、上記候補物質は、脂肪肝を予防または治療できる物質と判断することができる。

【0063】

上記の遺伝子の発現量、タンパク質の量またはタンパク質の活性を測定する方法は、当業界に公知の多様な方法を通じて行われてもよく、例えば、これらに制限されないが、逆転写重合酵素連鎖反応 (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*)、リアルタイム重合酵素連鎖反応 (*real time-polymerase chain reaction*)、ウェスタンブロット、ノーザンブロット、ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*)、放射線免疫分析 (*RIA: radioimmunoassay*)、放射免疫拡散法 (*radioimmunodiffusion*) および免疫沈降分析法 (*immunoprecipitation assay*) 等を利用して行うことができる。

40

50

【0064】

本発明のスクリーニング方法を通じて得た、ロイシンジッパータンパク質またはその特定断片の発現を阻害したりタンパク質の機能を阻害する活性を示す候補物質が脂肪肝の予防または治療用医薬の候補物質になり得る。

【0065】

このような脂肪肝の予防または治療用医薬の候補物質は、以後の脂肪肝治療剤の開発過程でリード化合物（leading compound）として作用するようになり、リード化合物がロイシンジッパータンパク質またはその特定断片の機能に対する抑制効果を示すことができるようにその構造を変形させ、最適化することによって、新しい脂肪肝治療剤を開発することができる。

10

【実施例】

【0066】

以下、本発明の理解を助けるために望ましい実施例を提示する。しかしながら、下記の実施例は、本発明をより容易に理解するために提供されるものに過ぎず、下記実施例によって本発明の内容が限定されるものではない。

【0067】

実施例1. Leucine zipper proteinによるApoA4の発現調節
肝細胞レベルでの脂肪の蓄積および放出に対する調節は、実際の脂肪肝の形成において非常に重要であり、従来の報告によれば、高脂肪食だけでなく、小胞体ストレスによっても組織内脂肪が蓄積され得ることが知られている。このような点に着目して、本発明者らは、小胞体またはゴルジ体ストレス（ER/Golgi stress）により活性化する転写因子の一つであるLeucine zipper protein（以下、LZIPと命名する。）と脂肪肝発病との相関関係の確認を試みた。これに先立って、本実施例では、LZIP処理によるlipoproteinの発現変化を確認し、これと関連したLZIP活性化のための条件および具体的な活性化部位を導き出すことを試みた。

20

【0068】

1-1. 肝細胞株でのLZIPによるApoA4の発現変化
肝細胞株HepG2で、LZIPの処理濃度によるApolipoprotein A4（以下、ApoA4と命名する）のプロモーター活性を測定し、その結果に基づいて、肝細胞株HepG2およびHuh-7を対象としてLZIPの処理または抑制によるApoA4 mRNAおよびタンパク質の発現量の変化の確認を試みた。以下の実施例で、上記LZIPの処理または発現のために、Flag-LZIP（N-末端にFlag epitope（DYKDDDDK）がtaggingされたLZIP配列をクローニングしたpCMV-3 Tag-1 vector）、またはAd-LZIP（C-末端にHA epitopeがtaggingされたLZIP配列をクローニングしたpShuttle-IRES-hrGFP-2 vector）を利用し、上記LZIPの抑制のためには、LZIP siRNA（配列番号5）を利用した。

30

【0069】

その結果、図1に示すように、LZIPの処理濃度（0、0.25、0.5、および1 μg）に依存的にApoA4プロモーターの活性が増加することを確認することができ、図2および図3に示すように、mRNAおよびタンパク質レベルがいずれも、LZIP処理によるApoA4発現増加およびLZIP抑制によるApoA4発現減少を観察することができた。一方、ApoA4は、動脈硬化の緩和および脂肪の単純輸送に関連していると知られているが、肝組織内の役割については報告されたことがないのが現状である。このようなLZIPによる肝細胞でのApoA4発現変化は、肝組織内脂肪の蓄積およびこれに伴う脂肪肝発病の可能性を提示するものである。

40

【0070】

1-2. GolgiストレスによるLZIPの活性化によるApoA4の発現変化
前述したように、LZIPは、小胞体またはゴルジ体ストレス（ER/Golgi stress）により活性化する転写因子であって、小胞体の表面に付着しているタンパク質

50

の一つである。本実施例では、より具体的に、ゴルジ体分裂物質である B r e f e l d i n A (BFA)、小胞体内の糖化プロセスを抑制する T u n i c a m y c i n (TM)、小胞体内カルシウムを欠乏させる T h a s i g a r g i n (TG) でそれぞれ肝細胞を処理して、L Z I P を活性化させた後、これに伴う A p o A 4 の発現変化の確認を試みた。一方、対照群 (C o n) としては、1 μ l の 100% メタノールで処理した群を利用した。

【0071】

また、上記実験で有意的な結果を示した BFA 処理をした場合、再度 A p o A 4 プロモーター活性、A p o A 4 mRNA およびタンパク質発現変化などを確認して、その結果を検証し、L Z I P タンパク質の構造変化および細胞内移動様相を核/細胞質分画法および 10
蛍光顕微鏡を用いて観察することによって、L Z I P の A p o A 4 発現調節のための核心メカニズムを明らかにすることを試みた。上記蛍光顕微鏡の分析では、BFA 処理 (BFA) による L Z I P タンパク質の細胞内移動様相を観察し、このような BFA 処理による移動様相と L Z I P の一部の分離断片である L Z I P N 末端 (GFP tagging) で処理した場合 (L Z I P -N 1-220) と比較して、BFA 処理による L Z I P N 末端の分離 (分解) の有無の確認を試みた。一方、対照群 (C o n) として GFP が t a g g i n g された L Z I P だけで処理した群を利用した。

【0072】

その結果、図 4 に示すように、TM または TG 処理をした場合、A p o A 4 の発現は、対照群と大きな差異を示さないが、BFA により L Z I P が活性化した場合、A p o A 4 の 20
発現は顕著に増加することを確認することができた。また、図 5 に示すように、BFA により活性化した L Z I P は、処理した BFA の濃度 (5、10、50、100 ng/ml) または時間 (1、3、6、10、14 h) に依存的に、A p o A 4 プロモーター活性、A p o A 4 mRNA およびタンパク質の発現を増加させることが分かった。

【0073】

特に、図 6 および図 7 に示すように、BFA 処理による A p o A 4 発現増加は、L Z I P を併用処理するときに顕著であるが、L Z I P の発現を抑制した場合には、肝細胞 H e p G 2 および H u h - 7 の両方で A p o A 4 mRNA およびタンパク質の量が減少し、L Z I P の活性化産物、すなわち L Z I P N 末端も減少したことから、A p o A 4 発現調節において、ゴルジ体ストレスによる L Z I P の活性化が非常に重要な役割を行うことが 30
分かった。一方、上記 BFA による L Z I P N 末端の移動様相を分析した結果、図 8 に示すように、L Z I P N 末端が BFA により L Z I P から分離し、細胞質から核に移動することが分かり (図 8 a 参照)、GFP を利用した蛍光顕微鏡の分析でも、BFA 処理した場合、細胞質に比べて、核で多くの量の L Z I P が発現し、GFP-L Z I P の N 末端も、上記と同様に、核で多くの量の L Z I P N 末端が検出されることを確認することができた (図 8 b 参照)。このような上記結果は、BFA によるゴルジ体ストレスが L Z I P N 末端を分離して活性化させ、活性化した L Z I P N 末端は、核に移動して A p o A 4 プロモーターと結合することによって、その発現を調節することを示すものである。

【0074】

1-3. L Z I P N 末端による A p o A 4 の発現変化
L Z I P N 末端の A p o A 4 発現調節効果を直接的に確認するために、L Z I P N 末端をクローニングして、これを肝細胞株に発現させた後、これに伴う A p o A 4 プロモーター活性、A p o A 4 mRNA およびタンパク質発現の変化を確認した。また、マウスの初代肝細胞を利用して、BFA 処理による L Z I P N 末端の分離の有無およびこれに伴う A p o A 4 mRNA およびタンパク質発現変化を再度検証した。以下の実施例で、上記 L Z I P N 末端処理または発現のために、F l a g - L Z I P - N (N-末端に F l a g e p i t o p e (D Y K D D D D K) が t a g g i n g された L Z I P N 末端配列をクローニングした p C M V - 3 T a g - 1 v e c t o r)、または A d - L Z I P - N (C-末端に H A e p i t o p e がタグされた L Z I P N 末端配列をクロー 50

ニングした pShuttle-IRES-hrGFP-2 vector) を利用した。

【0075】

その結果、図9に示すように、肝細胞株に LZIP N末端を発現させた場合、濃度依存的に ApoA4 プロモーター活性、ApoA4 mRNA およびタンパク質の発現が増加し、このような効果は、全長 LZIP で処理した場合（実施例1-1、図1、2 参考）よりも顕著に増加した結果であった。また、図10に示すように、マウスの初代肝細胞でも上記結果と同様に、BFA 処理による分離した LZIP N末端の増加とこのような増加による ApoA4 mRNA およびタンパク質の発現増加を確認することができたことから、肝細胞または組織内 ApoA4 の発現は、LZIP の活性化産物、その中でも LZIP N末端により調節されることを再度確認することができた。

10

【0076】

実施例2. Akt シグナル機序による LZIP N末端の安定化

PI3K/Akt シグナル伝達系とこれらの抑制物質である PTEN シグナル伝達系は、脂肪肝の形成において非常に重要な役割をすると知られている。このため本実施例では、インビトロ キナーゼ アッセイ (in vitro kinase assay) および GST プルダウンアッセイ (GST-pull down assay) を通じて、本発明の LZIP N末端と Akt との結合の有無を確認した。また、このような結果に基づいて、Akt 阻害剤で処理することによる LZIP N末端タンパク質の量およびこれに伴う ApoA4 タンパク質の発現変化を確認した。

【0077】

その結果、図11に示すように、活性化した Akt と LZIP N末端との結合をそれぞれの実験で観察することができた。これだけでなく、図12に示すように、Akt 阻害剤 (Akt inhibitor IV) で処理した場合、LZIP N末端はもちろん、ApoA4 も顕著に減少した（図12a および図12b）。また、実験過程で合成される新しいタンパク質の発現抑制のために Cycloheximide で処理しつつ、Akt 阻害剤で処理／非処理することが LZIP-N の安定性に及ぼす影響を確認した結果、Akt 阻害剤で処理した場合、LZIP-N の安定性が早期に減少することを確認することができた（図12c）。したがって、上記の発現変化は、PI3K/Akt シグナル伝達系と分離した LZIP N末端との相互作用により調節されることが分かった。

20

【0078】

実施例3. LZIP N末端と肝細胞または組織内脂肪の蓄積との関連性

本実施例では、上記実施例1および2の結果に基づいて、肝組織内脂肪の蓄積、すなわち、脂肪肝の発病と LZIP N末端処理による ApoA4 の発現変化との関連性を確認することを試みた。具体的には、ヒト肝細胞株である HepG2 またはマウス初代肝細胞に脂肪の蓄積を引き起こすオレイン酸 (oleic acid; OA) と併用して LZIP N末端で処理した後、これらの肝細胞内脂肪の蓄積量をオレイン酸単独処理の場合と比較した。また、マウス動物モデルを対象として LZIP N末端処理による肝組織内 ApoA4 発現量および脂肪の蓄積量の変化を in vivo で確認した。具体的には、LZIP N末端を含むウイルスを静脈注射を通じてマウスに投与し、その3日後、上記マウスから肝組織を摘出して、対照群 (Ad-GFP) と ApoA4 の発現量、中性脂肪の比率などを比較分析した。

30

40

【0079】

その結果、図13に示すように、オレイン酸と併用して LZIP N末端処理をした場合、オレイン酸単独処理群に比べて肝組織内脂肪の蓄積量が増加することが分かった。このような傾向は、LZIP N末端の処理濃度に依存し、特にマウス初代肝細胞に 20 MOI の LZIP N末端処理をした場合、上記脂肪の蓄積量がオレイン酸単独処理群に比べて約 2.5 倍まで増加することが分かった。また、LZIP N末端を投与したマウスの肝組織は、図14および図15に示すように、対照群に比べて ApoA4 発現量が顕著に増加し、肝組織内中性脂肪の比率は増加した反面、血清内中性脂肪の比率は減少することを確認し、オイルレッドO染色 (Oil Red O染色) を通じてこれに伴う病理組

50

組織学的所見である肝組織内脂肪の蓄積を観察することができた。上記結果からLZIP N末端による肝組織内ApoA4の増加は、脂肪の蓄積を引き起こし、これは、脂肪肝発病の主要な機序であることが分かった。

【0080】

実施例4. 多様なヒト脂肪肝組織でのLZIPおよびApoA4の発現

上記実施例3では、マウスの肝細胞またはマウスを対象として肝組織内脂肪の蓄積効果を確認することができた反面、本実施例では、ヒトでもこのような効果が観察されることができると確認しようとした。具体的には、肥満による脂肪肝、アルコール性脂肪肝、または非アルコール性脂肪肝組織を対象として正常肝組織とLZIPおよびApoA4発現量を比較した。

10

【0081】

その結果、図16～図18に示すように、肥満による脂肪肝、アルコール性脂肪肝、および非アルコール性脂肪肝のいずれもが、正常肝組織に比べてLZIPおよびApoA4の発現量が高いことを確認することができた。

【0082】

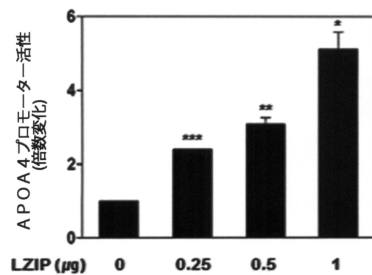
上記の結果を総合してみると、LZIP、特にLZIP N末端は、lipoproteinの輸送に関連したApoA4タンパク質の肝組織内発現を調節し、これに伴い、肝臓での脂肪の蓄積に重要な役割を行うことが分かることから、上記LZIP N末端は、脂肪肝の診断および治療のための核心的な標的因子として活用され得る。

【0083】

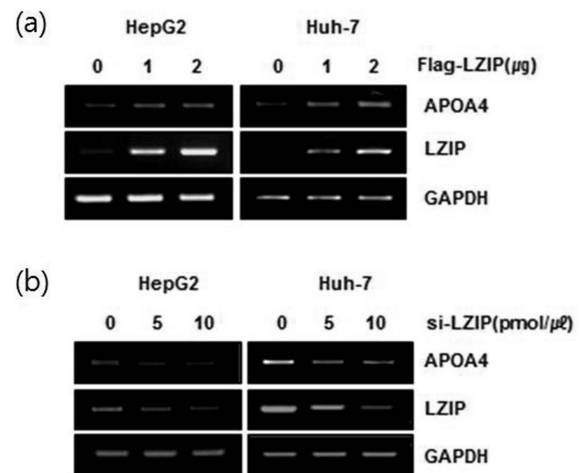
20

前述した本発明の説明は、例示のためのものであり、本発明の属する技術分野における通常の知識を有する者は、本発明の技術的思想や必須の特徴を変更することなく、他の具体的な形態に容易に変形が可能であることを理解することができる。したがって、以上で記述した実施例は、すべての面において例示的なものであり、限定的でないものと理解しなければならない。

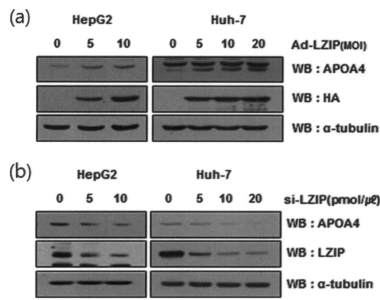
【図1】



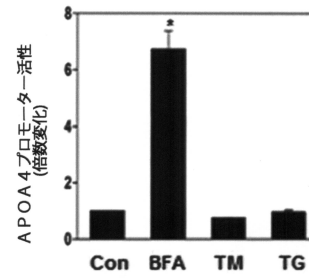
【図2】



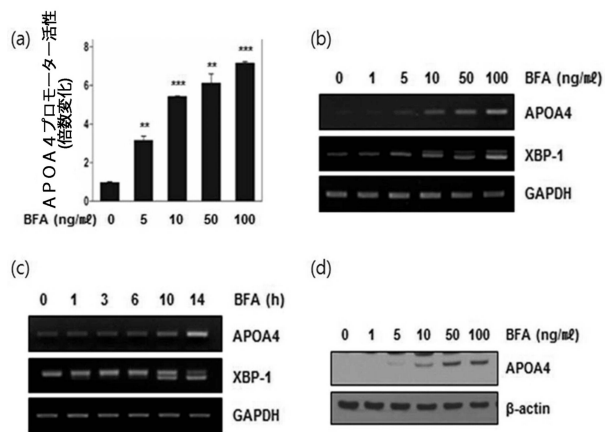
【図 3】



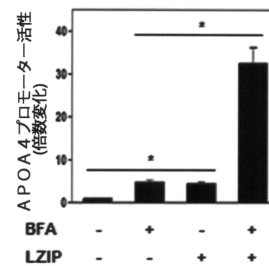
【図 4】



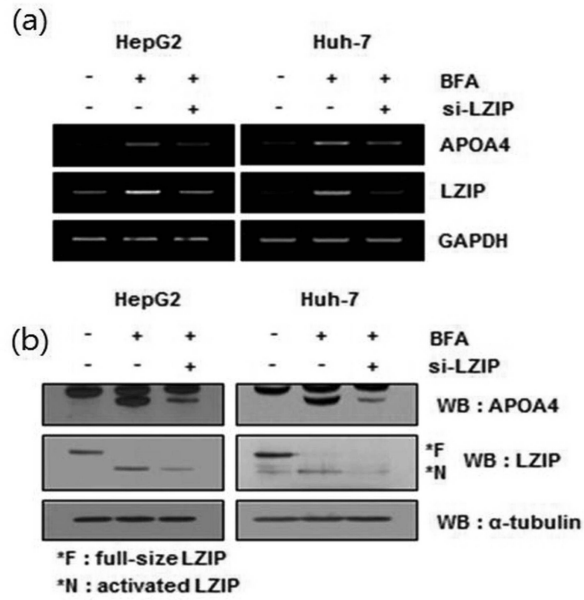
【図 5】



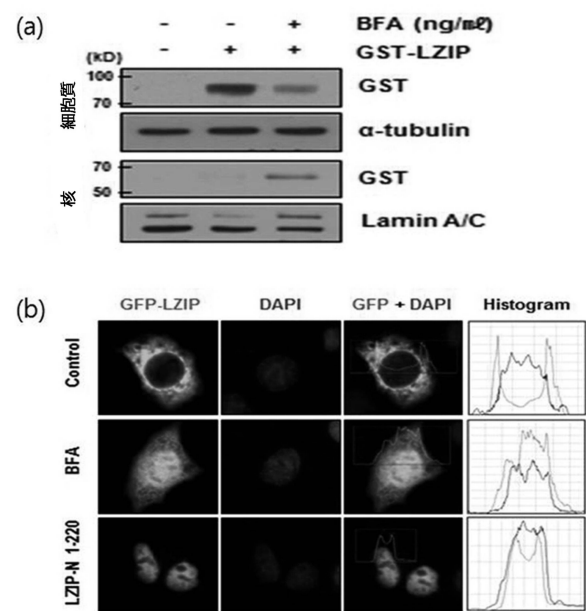
【図 6】



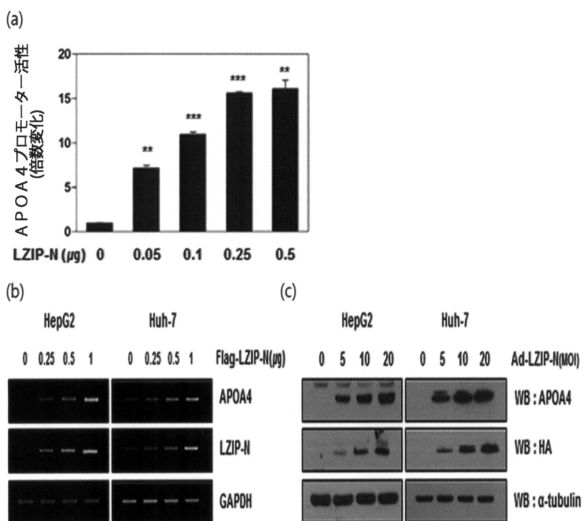
【図 7】



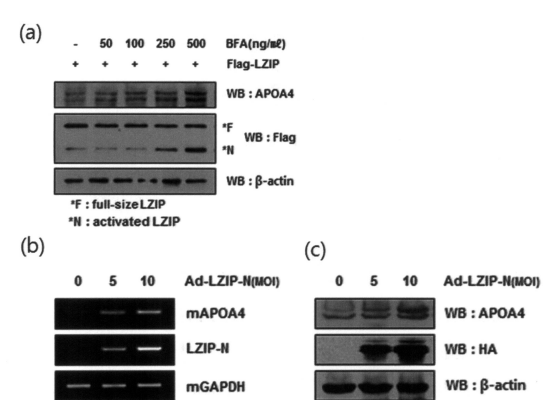
【図 8】



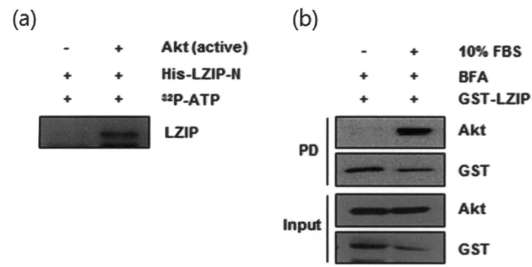
【図 9】



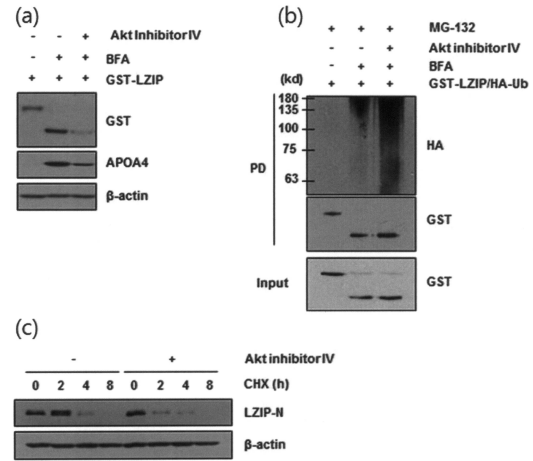
【図 10】



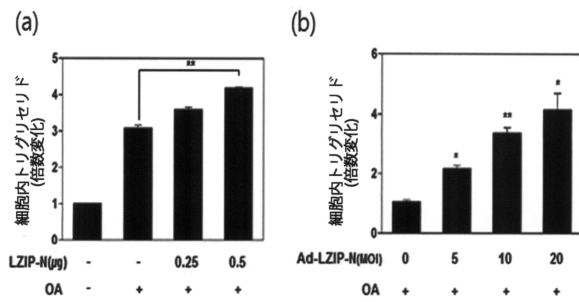
【図 1 1】



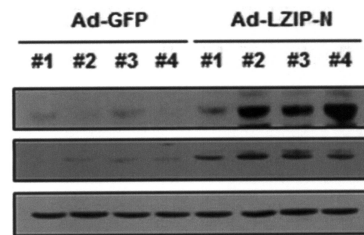
【図 1 2】



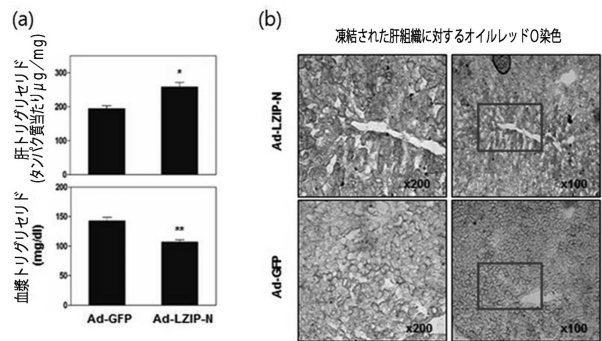
【図 1 3】



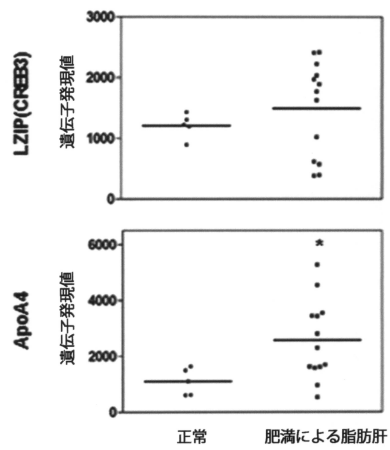
【図 1 4】



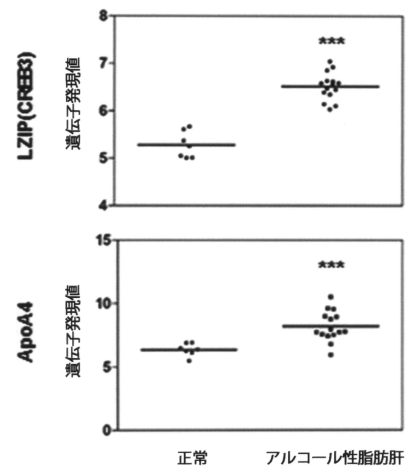
【図 1 5】



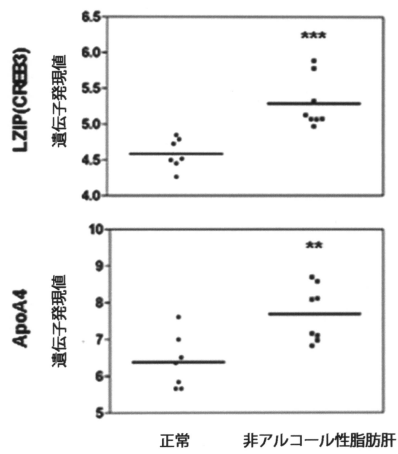
【図 16】



【図 17】



【図 18】



【配列表】

0006833037000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	31/428 (2006.01)	A 6 1 K	31/5377
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 K	31/428
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/16
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
C 1 2 Q	1/6851 (2018.01)	G 0 1 N	33/15 Z
		C 1 2 Q	1/6851 Z

(74)代理人 100133400

弁理士 阿部 達彦

(72)発明者 コ, ジェサン

大韓民国 0 7 3 2 4 ソウル、ヨンドゥンポード、ヨイドンロー 3ーギル、1 0、1 0 1ー2
4 0 1 (ヨイドードン、ヨイド ザイ アパート)

(72)発明者 カン, ミンス

大韓民国 1 0 2 4 3 キョンギード、コヤンシー、イルサンソーク、ヒョンジュンロー、6 1、
5 0 1ー1 0 1 (タニョンードン、タニョン マウル 5 ダンジ アパート)

審査官 梅田 隆志

(56)参考文献 WANG, Y. et al., Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2 0 1 5年1 1月, Vol.16, No.1
1, pp.678-689.

XU, X. et al., Journal of Lipid Research, 2 0 1 4年 5月, Vol.55, No.5, pp.850-859.

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 1 / 7 0 8 8

A 6 1 K 3 1 / 4 2 8

A 6 1 K 3 1 / 5 3 7 7

A 6 1 K 3 1 / 7 1 0 5

A 6 1 K 3 1 / 7 1 3

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

A 6 1 P 1 / 1 6

A 6 1 P 4 3 / 0 0

C 1 2 Q 1 / 6 8 5 1

G 0 1 N 3 3 / 1 5

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)