

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-509795

(P2006-509795A)

(43) 公表日 平成18年3月23日(2006.3.23)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 3
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D 4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N 4 C 0 8 5
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-558072 (P2004-558072)	(71) 出願人	597011463
(86) (22) 出願日	平成15年12月11日 (2003.12.11)		ノバルティス アクチエンゲゼルシャフト
(85) 翻訳文提出日	平成17年6月13日 (2005.6.13)		スイス国、4056 バーゼル、リヒトシ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/014078		ユトラーセ 35
(87) 国際公開番号	W02004/052094	(74) 代理人	100062144
(87) 国際公開日	平成16年6月24日 (2004.6.24)		弁理士 青山 稜
(31) 優先権主張番号	60/432, 854	(74) 代理人	100067035
(32) 優先日	平成14年12月12日 (2002.12.12)		弁理士 岩崎 光隆
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100064610
			弁理士 中嶋 正二
		(72) 発明者	ハオ・リ
			アメリカ合衆国07959ニュージャージ
			ー州ウォーレン、ストロベリー・レイン2
			番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インスリンシグナル伝達調節異常と関係する症状の処置方法

(57) 【要約】

本発明は、インスリンシグナル伝達経路に関与するタンパク質の同定方法を開示する。また、本発明はインスリンシグナル伝達経路の調節異常と関係する病的症状を処置、予防または改善するための新規治療薬の開発に適する標的を開示する。また、本発明は当該症状を処置、予防または改善する方法、そのための医薬組成物、ならびにインスリンシグナル伝達経路の調節異常と関係する病的症状を処置するための治療上有用な化合物の同定方法に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

インスリンシグナル伝達経路の調節異常と関係する病的症状を処置、予防または改善する方法であって、表 4 または表 5 に開示のタンパク質からなる群より選択されるタンパク質のモジュレーターの有効量を、それを必要とする対象に投与することを含む方法。

【請求項 2】

当該症状が II 型糖尿病である請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

当該症状が A 型インスリン抵抗性症候群である請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

当該モジュレーターが、当該対象における当該タンパク質の生化学的機能を阻害するものである請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 5】

当該モジュレーターが、当該タンパク質に対する 1 種以上の抗体またはそのフラグメントであり、その場合の当該抗体またはそのフラグメントが、当該対象における当該タンパク質の生化学的機能を阻害し得るものである、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

当該モジュレーターが、当該対象における当該タンパク質の生化学的機能を向上させるものである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

当該モジュレーターが、当該対象における当該タンパク質の遺伝子発現を阻害するものである、請求項 1 記載の方法。

20

【請求項 8】

当該モジュレーターが、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせん DNA、リボザイム、RNA アプタマー、siRNA、二本鎖 RNA および一本鎖 RNA からなる群より選択される 1 種以上の物質を含んでなり、ここで当該物質が、当該タンパク質の遺伝子発現を阻害するように設計されたものである、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

当該モジュレーターが、当該対象における当該タンパク質の遺伝子発現を上昇させるものである、請求項 1 に記載方法。

30

【請求項 10】

インスリンシグナル伝達経路の調節異常と関係する病的症状を処置、予防または改善する方法であって、表 4 または表 5 に開示のタンパク質からなる群より選択されるタンパク質のモジュレーターの有効量を含んでなる医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む方法。

【請求項 11】

当該症状が II 型糖尿病である請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

当該症状が A 型インスリン抵抗性症候群である請求項 10 記載の方法。

【請求項 13】

当該モジュレーターが、当該対象における当該タンパク質の生化学的機能を阻害するものである、請求項 10 記載の方法。

40

【請求項 14】

当該モジュレーターが、当該タンパク質に対する 1 種以上の抗体またはそのフラグメントであり、ここで当該抗体またはそのフラグメントが、当該対象における当該タンパク質の生化学的機能を阻害し得るものである、請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

当該モジュレーターが、当該対象における当該タンパク質の生化学的機能を向上させるものである、請求項 10 記載の方法。

【請求項 16】

50

当該モジュレーターが、当該対象における当該タンパク質の遺伝子発現を阻害するものである、請求項 10 記載の方法。

【請求項 17】

当該モジュレーターが、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせん DNA、リボザイム、RNA アプタマー、siRNA、二本鎖 RNA および一本鎖 RNA からなる群より選択される 1 種以上の物質を含んでなり、ここで当該物質が、当該タンパク質の遺伝子発現を阻害するように設計されたものである、請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

当該モジュレーターが、当該対象における当該タンパク質の遺伝子発現を上昇させるものである、請求項 10 に記載方法。

【請求項 19】

インスリンシグナル伝達経路の調節異常と関係する病的症状を処置、予防または改善するために有用なモジュレーターを同定する方法であって、表 4 または表 5 に開示のタンパク質からなる群より選択されるタンパク質の生化学的機能を調整する候補モジュレーターの能力を分析することを含む方法。

【請求項 20】

当該方法が、当該症状の動物モデルにおいて観察される病理学的影響を改善させる同定されたモジュレーターの能力について分析することをさらに含む、請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

当該方法が、当該症状を有する対象の臨床研究において観察される病理学的影響を改善させる同定されたモジュレーターの能力について分析することをさらに含む、請求項 19 記載の方法。

【請求項 22】

当該症状が II 型糖尿病である請求項 19 記載の方法。

【請求項 23】

当該症状が A 型インスリン抵抗性症候群である請求項 19 記載の方法。

【請求項 24】

インスリンシグナル伝達経路の調節異常と関係する病的症状を処置、予防または改善するために有用なモジュレーターを同定する方法であって、表 4 または表 5 に開示のタンパク質からなる群より選択されるタンパク質の遺伝子発現を調整する候補モジュレーターの能力を分析することを含む方法。

【請求項 25】

当該方法が、当該症状の動物モデルにおいて観察される病理学的効果を逆転させる同定された阻害モジュレーターの能力について分析することをさらに含む、請求項 24 記載の方法。

【請求項 26】

当該方法が、当該症状を有する対象の臨床研究において観察される病理学的影響を改善させる同定された阻害モジュレーターの能力について分析することをさらに含む、請求項 24 記載の方法。

【請求項 27】

当該症状が II 型糖尿病である請求項 24 記載の方法。

【請求項 28】

当該症状が A 型インスリン抵抗性症候群である請求項 24 記載の方法。

【請求項 29】

インスリンシグナル伝達経路の調節異常と関係する病的症状を処置、予防または改善する必要のある対象において、有効量の表 4 または表 5 に開示のタンパク質からなる群より選択されるタンパク質に対するモジュレーターを含有してなる医薬組成物。

【請求項 30】

当該症状が II 型糖尿病である請求項 29 記載の医薬組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 3 1】

当該症状が A 型インスリン抵抗性症候群である請求項 2 9 記載の医薬組成物。

【請求項 3 2】

当該モジュレーターが、当該タンパク質の生化学的機能を阻害するものである、請求項 2 9 記載の医薬組成物。

【請求項 3 3】

当該モジュレーターが、当該タンパク質に対する 1 種以上の抗体またはそのフラグメントであり、ここで当該抗体またはそのフラグメントが、当該タンパク質の生化学的機能を阻害し得るものである、請求項 2 9 記載の医薬組成物。

【請求項 3 4】

当該モジュレーターが、当該タンパク質の生化学的機能を向上させるものである、請求項 2 9 記載の医薬組成物。

【請求項 3 5】

当該モジュレーターが当該タンパク質の遺伝子発現を阻害するものである、請求項 2 9 記載の医薬組成物。

【請求項 3 6】

当該モジュレーターが、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせん DNA、リボザイム、RNA アプタマー、siRNA、二本鎖 RNA および一本鎖 RNA からなる群より選択される 1 種以上の物質を含んでなり、ここで当該物質が、当該タンパク質の遺伝子発現を阻害するように設計されたものである、請求項 2 9 記載の医薬組成物。

【請求項 3 7】

当該モジュレーターが、当該タンパク質の遺伝子発現を上昇させるものである、請求項 2 5 記載の医薬組成物。

【請求項 3 8】

インスリンシグナル伝達経路の調節異常と関係する病的症状に罹患し、表 4 または表 5 に開示のタンパク質からなる群より選択されるタンパク質に対するモジュレーターでの処置に適した候補となり得る対象の診断方法であって、当該対象から採取した生体サンプル中いずれか 1 種以上の当該タンパク質の mRNA レベルを分析することを含み、ここで対照と比較して変化したレベルを有する対象は、モジュレーター処置に適する候補であり得るとすることを含む方法。

【請求項 3 9】

インスリンシグナル伝達経路の調節異常と関係する病的症状に罹患し、表 4 または表 5 に開示のタンパク質からなる群より選択されるタンパク質に対するモジュレーターでの処置に適した候補となり得る対象の診断方法であって、当該対象から採取した生体サンプル中いずれか 1 種以上の当該タンパク質のレベルを検出すること含み、ここで対照と比較して変化したレベルを有する対象は、モジュレーター処置に適する候補であり得るとすることを含む方法。

【請求項 4 0】

インスリンシグナル伝達経路の調節異常と関係する病的症状を処置、予防または改善する方法であって、

(a) 対象において、表 4 または表 5 に開示のタンパク質からなる群より選択されるタンパク質の mRNA レベルについて分析すること；および

(b) 当該タンパク質の mRNA レベルが対照と比較して変化している対象に、当該症状の病的影響を処置、予防または改善するために、有効量の当該タンパク質に対するモジュレーターを投与すること；

を含む方法。

【請求項 4 1】

当該症状が II 型糖尿病である請求項 4 0 記載の方法。

【請求項 4 2】

当該症状が A 型インスリン抵抗性症候群である請求項 4 0 記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4 3】

当該モジュレーターが、当該タンパク質の遺伝子発現を上昇させるものである、請求項 4 0 記載の方法。

【請求項 4 4】

当該モジュレーターが、当該タンパク質の遺伝子発現を阻害するものである、請求項 4 0 記載の方法。

【請求項 4 5】

インスリンシグナル伝達経路の調節異常と関係する病的症状を処置、予防または改善する方法であって、

(a) 対象において、表 4 または表 5 に開示のタンパク質からなる群より選択されるタンパク質のレベルについて分析すること；そして

(b) 当該タンパク質のレベルが対照に比較して変化している対象に、当該症状の病的影響を処置、予防または改善するために、有効量の当該タンパク質に対するモジュレーターを投与すること；

を含む方法。

【請求項 4 6】

当該症状が II 型糖尿病である請求項 4 5 記載の方法。

【請求項 4 7】

当該症状が A 型インスリン抵抗性症候群である請求項 4 5 記載の方法。

【請求項 4 8】

当該モジュレーターが、当該タンパク質の生化学的機能を向上させるものである、請求項 4 5 記載の方法。

【請求項 4 9】

当該モジュレーターが、当該タンパク質の生化学的機能を阻害するものである、請求項 4 5 記載の方法。

【請求項 5 0】

生体サンプル中、表 4 または表 5 に開示のタンパク質からなる群より選択されるタンパク質の mRNA レベルを検出する診断キットであって、

(a) 表 4 または表 5 に示したポリペプチドもしくはそのフラグメントのポリヌクレオチド；

(b) (a) のポリヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列；

(c) (a) のポリヌクレオチドによりエンコードされる本発明の表 4 または表 5 のポリペプチド；

(d) (c) のポリペプチドに対する抗体；

(e) (a) のポリヌクレオチドに相補的な RNA i 配列；

を含んでなり、その場合、成分 (a)、(b)、(c)、(d) または (e) が実質的な成分を含み得る、キット。

【請求項 5 1】

生体サンプル中、表 4 または表 5 に開示のタンパク質からなる群より選択されるタンパク質のレベルを検出する診断キットであって、

(a) 表 4 または表 5 に示したポリペプチドもしくはそのフラグメントのポリヌクレオチド；

(b) (a) のポリヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列；

(c) (a) のポリヌクレオチドによりエンコードされる本発明の表 4 または表 5 のポリペプチド；

(d) (c) のポリペプチドに対する抗体；

(e) (a) のポリヌクレオチドに相補的な RNA i 配列；

を含んでなり、その場合、成分 (a)、(b)、(c)、(d) または (e) が実質的な成分を含み得る、キット。

【請求項 5 2】

10

20

30

40

50

インスリンシグナル伝達経路の遺伝的修飾因子を同定する方法であって、

(a) D p 1 1 0^{D 9 5 4 A} を含むポリペプチドをエンコードする DNA 配列を含んでなるゲノムを有するトランスジェニックハエを提供し(当該 DNA 配列は組織特異的制御配列に操作可能に結合している)、そして当該 DNA 配列を発現し、ここで当該 DNA 配列の発現がトランスジェニック表現型を提示する当該ハエにおいて生じること;

(b) 当該トランスジェニックハエと、既知もしくは予測される遺伝子に突然変異を含むハエを交配させること;そして

(c) 当該 DNA 配列と当該突然変異を担持し、対照と比較してトランスジェニック表現型の修飾された発現を提示するハエについて、当該交配の子孫をスクリーニングすること;

を含む方法。

10

【請求項 5 3】

当該 DNA 配列が D p 1 1 0^{D 9 5 4 A} をエンコードし、当該組織特異的発現制御配列が眼特異的エンハンサーである ey - Gal4 を含んでなる、請求項 5 2 記載の方法。

【請求項 5 4】

当該 DNA 配列の発現が「小眼」表現型を提示する当該ハエにて生じる、請求項 5 3 記載の方法。

【請求項 5 5】

インスリンシグナル伝達経路の調節異常と関係する病的症状を処置、予防または改善する治療薬開発のための標的を同定する方法であって、請求項 5 2 の方法に従い同定した遺伝子修飾因子のヒト相同体を同定することを特徴とする方法。

20

【請求項 5 6】

当該症状が II 型糖尿病である請求項 5 5 記載の方法。

【請求項 5 7】

当該症状が A 型インスリン抵抗性症候群である請求項 5 5 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はインスリンシグナル伝達経路に関与するタンパク質を同定する方法、インスリンシグナル伝達経路の調節異常と関係する病的症状を処置するために有用な化合物を同定する方法、ならびにインスリンシグナル伝達経路の調節異常と関係する症状を処置、予防または改善するための方法および医薬組成物に関する。

30

【背景技術】

【0002】

多くの細胞プロセスの調節には、関連タンパク質のネットワークを介して細胞を經由する細胞外情報の伝達が関与している。シグナル伝達メカニズムにおける障害は、特定の疾患と関連している可能性があり、例えば、II 型糖尿病もしくはインスリン非依存性糖尿病 (NIDDM) が、主としてインスリンシグナル伝達経路の障害によるものと考えられている。

【0003】

インスリンシグナル伝達の分子メカニズムについては、広範に概括論評されている (Avruch, J. (1998). Mol Cell Biochem 182, 31 - 48; Combettes - Souverain, M., and Isad, T. (1998). Diabetes Metab 24, 477 - 89; Kahn, B. B. (1998) Cell 92, 593 - 6; Virkamaki, A., et al. (1999). J Clin Invest 103, 931 - 43)。線虫およびショウジョウバエでの最近の遺伝子研究は、無脊椎動物および哺乳動物におけるインスリン経路の顕著な保存性を示している (Paradis, S. et al. (1999) Genes Dev 13, 1438 - 52; Weinkove, D., and Leever, S. J. (2000). Curr Opin Genet Dev 10, 75 - 80)。さらに、インスリン経路の多くの局面が、ヒトとショウジョウバエとの間で保存されている。例えば、ヒトのインスリンシグナル伝達に関与する最近知られた遺伝子の殆どすべてが、ショウジョウバエにも見出され、同様の生化学的機能を有している。

40

50

【0004】

本出願人は、インスリンシグナル伝達経路に関わるタンパク質を同定する方法を、モデル系としてショウジョウバエを用いて本明細書に開示する。当該方法を用いて、本出願人は、インスリンシグナル伝達経路に関わる数種の新規タンパク質を発見し、それを本明細書に記載する。これらのタンパク質および当該タンパク質をエンコードする遺伝子が、インスリンシグナル伝達経路の調節異常と関係する糖尿病および他の病的症状を処置、予防または改善するための治療薬開発の医薬標的としての役割を果たし得ることが、本明細書にて予測されている。

【発明の開示】

【0005】

本出願は、インスリンシグナル伝達経路に関与するタンパク質を同定するために、トランスジェニックショウジョウバエを使用する方法について開示する。本方法により同定されるショウジョウバエ遺伝子のヒト相同体は、インスリンシグナル伝達経路の調節異常に関係する病的症状を処置、予防または改善する治療薬開発のための適当な標的である。従って、一局面において、本発明は、II型糖尿病およびA型インスリン抵抗性症候群などの当該症状を処置または改善するために有用なモジュレーターを同定する方法であって、a)表4または表5に開示のタンパク質からなる群より選択されるタンパク質の生化学的機能を調整するか、および/または当該タンパク質の遺伝子発現を調整する、候補モジュレーターの能力を分析することを含む方法に関し、そしてさらにb)インスリンシグナル伝達経路の調節異常に関係する病的症状の動物モデルにおいて、および/または当該症状を有する対象の臨床研究において、観察される病理学的影響を改善させる能力について分析することもまた含み得る方法に関する。

10

20

【0006】

もう一つの局面において、本発明は、II型糖尿病およびA型インスリン抵抗性症候群を含むインスリンシグナル伝達経路の調節異常に関係する病的症状を処置、予防または改善する方法であって、表4または表5に開示のタンパク質からなる群より選択されるタンパク質のモジュレーターの有効量を、それを必要とする対象に投与することを含む方法に関し、ここで当該モジュレーターは、例えば、当該タンパク質の生化学的機能を阻害するか、または向上させる。さらなる態様において、前記モジュレーターは、当該タンパク質に対する抗体またはそのフラグメントを含んでなり、ここで当該抗体は、当該対象における当該タンパク質の生化学的機能を阻害し得るものである。

30

【0007】

もう一つの態様において、前記モジュレーターは、表4または表5に開示のタンパク質からなる群より選択されるタンパク質の遺伝子発現を阻害するか、または上昇させる。さらなる態様において、前記モジュレーターは、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせんDNA、リボザイム、RNAアプタマー、siRNA、および二本鎖RNAまたは一本鎖RNAからなる群より選択される1種以上の物質を含んでなり、ここで当該物質は当該タンパク質の遺伝子発現を阻害するように設計されたものである。

【0008】

もう一つの局面において、本発明は、II型糖尿病およびA型インスリン抵抗性症候群を含むインスリンシグナル伝達経路の調節異常に関係する病的症状を処置、予防または改善する方法であって、表4または表5に開示のタンパク質からなる群より選択されるタンパク質のモジュレーターの有効量を含んでなる医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む方法に関する。様々な態様において、当該医薬組成物は、当該タンパク質に対する抗体またはそのフラグメントを含んでなるか(ここで当該抗体が、当該対象における当該タンパク質の生化学的機能を阻害し得るものである)、および/またはアンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせんDNA、リボザイム、RNAアプタマー、siRNA、および二本鎖RNAまたは一本鎖RNAからなる群より選択される1種以上の物質を含んでなる(ここで当該物質が、当該タンパク質の遺伝子発現を阻害するように設計されている)。

40

50

【0009】

もう一つの局面において、本発明は、II型糖尿病およびA型インスリン抵抗性症候群を含むインスリンシグナル伝達経路の調節異常と関係する病的症状を処置、予防または改善する必要のある対象において、有効量の表4または表5に開示のタンパク質からなる群より選択されるタンパク質に対するモジュレーターを含有してなる医薬組成物に関する。一態様において、当該モジュレーターは、例えば、当該タンパク質の生化学的機能を阻害するか、または向上させる。さらなる態様において、当該モジュレーターは当該タンパク質に対する抗体またはそのフラグメントを含んでなり、当該抗体は、例えば、当該タンパク質の生化学的機能を阻害し得るものである。

【0010】

さらなる態様において、当該医薬組成物は、例えば、当該タンパク質の遺伝子発現を阻害するか、または上昇させ得るモジュレーターを含んでなる。さらなる態様において、当該モジュレーターは、当該タンパク質の核酸配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせんDNA、リボザイム、RNAアプタマー、siRNA、または二本鎖RNAあるいは一本鎖RNAからなる群より選択される1種以上の物質を含んでなり、ここで当該物質は、当該タンパク質の遺伝子発現を阻害するように設計されたものである。

10

【0011】

もう一つの局面において、本発明は、インスリンシグナル伝達経路の調節異常と関係する病的症状に罹患し、表4または表5に開示のタンパク質からなる群より選択されるタンパク質に対するモジュレーターでの処置に適切な候補となり得る対象の診断方法であって、当該対象から採取した生体サンプル中いずれか1種以上の当該タンパク質のレベルを検出することを含み、ここで対照と比較して変化したレベルを有する対象は、モジュレーター処置に適切な候補であり得るとすることを含む方法に関する。

20

【0012】

もう一つの局面において、本発明は、インスリンシグナル伝達経路の調節異常と関係する病的症状に罹患し、表4または表5に開示のタンパク質からなる群より選択されるタンパク質に対するモジュレーターでの処置に適した候補となり得る対象の診断方法であって、当該対象から採取した生体サンプル中いずれか1種以上の当該タンパク質のmRNAレベルを分析することを含み、ここで対照と比較して変化したmRNAレベルを有する対象は、モジュレーター処置に適する候補であり得るとすることを含む方法に関する。

30

【0013】

なおさらなる局面においては、II型糖尿病およびA型インスリン抵抗性症候群を含むインスリンシグナル伝達経路の調節異常と関係する病的症状を処置、予防または改善する方法であって、(a)対象において、表4または表5に開示のタンパク質からなる群より選択されるタンパク質のmRNAレベルおよび/またはタンパク質レベルについて分析すること；そして(b)対照と比較して変化したmRNAレベルおよび/またはタンパク質レベルを有する対象に、当該症状の病的効果を処置、予防または改善するために有効量の当該タンパク質に対するモジュレーターを投与すること；を含む方法が提供される。特定の態様において、当該モジュレーターは当該タンパク質の生化学的機能または当該タンパク質の遺伝子発現を阻害するか、または上昇させるものである。

40

【0014】

本発明のさらに別の局面においては、生体サンプル中、表4または表5に開示のタンパク質からなる群より選択されるいずれか1種以上のタンパク質のmRNAレベルまたはタンパク質レベルを検出するために必要な成分を含んでなる分析方法および診断キットが提供され、ここで当該キットは、例えば、表4または表5に開示のタンパク質からなる群より選択されるいずれか1種以上のタンパク質をエンコードするポリヌクレオチド；当該タンパク質に相補性のヌクレオチド配列；当該タンパク質のいずれか1種以上またはそのフラグメントの抗体（当該タンパク質のいずれか1種以上またはそのフラグメントに結合する）；を含んでなる。好適な態様において、かかるキットはキット成分の使用法につき詳

50

述する説明書をも含む。

【0015】

本発明はまた、II型糖尿病およびA型インスリン抵抗性症候群を含むインスリンシグナル伝達経路の調節異常に関係する病的症状を処置、予防または改善するための医薬の製造における、表4または表5に開示のタンパク質からなる群より選択されるタンパク質に対するモジュレーターの使用に関する。一態様において、当該モジュレーターはアンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせんDNA、リボザイム、RNAアプタマー、siRNA、および二本鎖または一本鎖RNAからなる群より選択される1種以上の物質を含んでなり、ここで当該物質は当該タンパク質の遺伝子発現を阻害するように設計されたものである。なおさらなる態様において、当該モジュレーターは当該タンパク質に対する1種以上の抗体またはそのフラグメントを含んでなり、ここで当該抗体またはそのフラグメントは、例えば、当該タンパク質の生化学的機能を阻害し得るものである。

10

【0016】

本発明はまた、医薬として使用するための表4または表5に開示のタンパク質からなる群より選択されるタンパク質に対するモジュレーターに関する。一態様において、当該モジュレーターは、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせんDNA、リボザイム、RNAアプタマー、siRNA、および二本鎖または一本鎖RNAからなる群より選択される1種以上の物質を含んでなり、ここで当該物質は当該タンパク質の遺伝子発現を阻害するように設計されたものである。なおさらなる態様において、当該モジュレーターは、当該タンパク質に対する1種以上の抗体またはそのフラグメントを含んでなり、ここで当該抗体またはそのフラグメントは、例えば、当該タンパク質の生化学的機能を阻害し得るものである。

20

【0017】

もう一つの局面において、本発明はまた、インスリンシグナル伝達経路に関与するタンパク質を同定する方法に関する；当該方法は、優性ネガティブPI3K触媒サブユニットDp110^{D954A}を含むポリペプチドをエンコードするDNA配列を含んでなるゲノムを有するトランスジェニックハエを提供すること（当該DNA配列が組織特異的制御配列に操作可能に結合している）、および当該DNA配列を発現することを含み、その場合に対照と比較して、当該DNA配列の発現がトランスジェニック表現型を提示する当該ハエにおいて生じること；当該トランスジェニックハエと既知もしくは予測される遺伝子に突然変異を含むハエを交配させること；および、当該DNA配列と当該突然変異を担持し、適した対照と比較してトランスジェニック表現型の修飾された発現を提示するハエについて、当該交配の子孫をスクリーニングすること；を含む。一態様において、当該DNA配列はDp110^{D954A}をエンコードし、当該組織特異的発現制御配列は、眼特異的エンハンサーであるey-Gal4を含んでなり、また、当該DNA配列の発現は「小眼」表現型を提示する当該ハエにて生じる。

30

【0018】

特定の態様において、本発明はII型糖尿病およびA型インスリン抵抗性症候群を含むインスリンシグナル伝達経路の調節異常に関係する病的症状を処置、予防または改善する治療薬開発のための薬物標的を同定する方法に関し、該方法は上述の方法により同定されるショウジョウバエタンパク質のヒト相同体を同定することを含む。

40

【0019】

本発明のその他の目的、特徴、利点および局面は、以下の記載から当業者に明らかとなる。しかし、以下の説明および特定の例は、本発明の好適な態様を示すものではあるが、説明を目的とするだけのものであることが理解されるべきである。開示された発明の精神と範囲内での様々な変更と改変が、以下の説明を通読することで、また本開示の他の部分を通読することで当業者に容易に明らかとなる。

【0020】

[図面の簡単な説明]

図1は、ショウジョウバエ導入遺伝子のeyGal4、UAS、Dp110^{D N}およびUA 50

S P T E N 交配の図式である。

図 2 は、X 染色体致死 P 因子挿入系統をスクリーニングするために使用する交配の図式である。

図 3 は、第二染色体致死 P 因子挿入系統をスクリーニングするために使用する交配の図式である。

図 4 は、第三染色体致死 P 因子挿入系統をスクリーニングするために使用する交配の図式である。

【 0 0 2 1 】

[発明の詳細な説明]

本明細書に引用する特許出願、特許および参考文献はすべてその全文を参照により本明細書の一部とする。 10

以下の説明に使用する略号は以下のとおりである：

I R S : インスリンレセプター基質

P I 3 K : ホスホイノシチド 3 - キナーゼ

P D K : 3 ' - ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ

P T E N : 染色体 1 0 から除去されたホスファターゼおよびテンシン相同体

P K B : プロテインキナーゼ B ; A k t 1 としても知られる。

【 0 0 2 2 】

本発明を実施するに際しては、分子生物学、微生物学、および組換え DNA における多くの常套技術を使用する。これらの技法は文献上周知であり、例えば、以下に説明がある 20
: Current Protocols in Molecular Biology, Volumes I, II および III, 1997 (F. M. Ausubel ed.); Sambrookら、1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; DNA Cloning : A Practical Approach, Volumes I および II, 1985 (D. N. Glover ed.); Oligonucleotide Synthesis, 1984 (M. L. Gait ed.); Nucleic Acid Hybridization, 1985, (Hames and Higgins); Transcription and Translation, 1984 (Hames and Higgins eds.); Animal Cell Culture, 1986 (R. I. Freshney ed.); Immobilized Cells and Enzymes, 1986 (IRL Press); Perbal, 1984, A Practical Guide to Molecular Cloning; the series, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, 1987 (J. H. Miller and M. P. Calos eds., Cold Spring Harbor Laboratory); 30
and Methods in Enzymology Vol. 154 and Vol. 155 (それぞれ、Wu と Grossman、および Wu, eds)。よく知られたショウジョウバエの分子遺伝学的技術については、文献: Robert, D.B., Drosophila, A Practical Approach (IRL Press, Washington D.C. 1986) に記載がある。

【 0 0 2 3 】

ハエ保存株についての説明は、<http://flybase.bio.indiana.edu> のフライベース (Fly base) データベースに見出すことができる。

本明細書にて参照したストックセンターは、インディアナ州ブルーミントン (Bloomington) およびハンガリーのセゲド (Szeged) にそれぞれ所在するブルーミントン・ストックセンターおよびセゲド・ストックセンターである。 40

【 0 0 2 4 】

本明細書および添付の特許請求の範囲にて使用する場合、単数形の不定冠詞および定冠詞は、文意が明らかに他のことを示していない限り、複数の意味を含む。従って、例えば、単数形で「抗体」という場合、1 種以上の抗体 (類) および当業者周知のその等価物などを意味する。

【 0 0 2 5 】

本明細書にて使用する場合、「核酸配列」とは、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチドまたはポリヌクレオチド、およびそのフラグメントもしくは部分、さらにゲノム起源もしくは合成起源の DNA または RNA を示し、それらは一本鎖または二本鎖でもよく、かつセンス鎖またはアンチセンス鎖を示し得る。 50

【0026】

本明細書にて使用する場合、用語「アンチセンス」とは、特定のDNAまたはRNA配列に相補性のヌクレオチド配列を示す。用語「アンチセンス鎖」は、核酸鎖が「センス鎖」に相補性である核酸鎖を意味する。アンチセンス分子は、例えば、対象の遺伝子を、相補鎖の合成を可能とするウイルスプロモーターに逆方向に連結することによる合成方法を含む、いずれの方法でも製造可能である。この転写された鎖を細胞に導入する場合、細胞が産生する天然の配列と組合わさり、二本鎖を形成する。結果として、これらの二本鎖はさらなる転写または翻訳を遮断する。「ネガティブ」という表記は、アンチセンス鎖に関して使用し、「ポジティブ」とは、センス鎖に関して使用する。

【0027】

「cDNA」とは、メッセンジャーRNA(mRNA)配列の一部に相補性であるDNAをいい、一般に逆転写酵素を使用してmRNA調製物から合成される。

本明細書にて意図するアンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせんDNA、RNAアプタマー、リボザイム、siRNA、および二本鎖もしくは一本鎖RNAは、核酸配列を指向するものであり、結果として選択したヌクレオチド配列が、遺伝子発現の遺伝子特異的阻害を生じることとなる。例えば、ヌクレオチド配列の知識を駆使して、mRNAに対して最強のハイブリッド形成を生じるアンチセンス分子を設計することができる。同様に、リボザイムは、遺伝子の特定のヌクレオチド配列を認識して、それを切断するように合成され得る(Cech, J. Amer. Med. Assn. 260:3030 (1988))。遺伝子発現の標的阻害に使用するためのかかる分子の設計技術は、当業者周知である。

【0028】

本明細書にて言及する個々のタンパク質/ポリペプチドは、限定されるものではないが、ヒトまたはその他の種からの部分形状、イソ型、変異体、前駆体形状、全長タンパク質、上記いずれかの配列もしくはフラグメントを含む融合タンパク質などを包含するこれらタンパク質のいずれかまたはすべてを含む。当業者にとって明瞭なタンパク質相同体またはオーソログとは、この定義に含まれる。また、この用語はゲノムDNAライブラリーなどのあらゆる種の天然起源から、ならびに発現系を含んでなる遺伝子工学により調製した宿主細胞から単離されたタンパク質、または例えば自動化ペプチドシンセサイザーを使用する化学合成、またはかかる方法の組合せにより調製されるタンパク質を示す。かかるペプチドの単離および調製手段は、技術的に十分に理解されている。

【0029】

本明細書にて使用する場合の用語「サンプル」は、その最も広い意味で使用する。対象からの生体サンプルは、血液、尿、脳組織、初代細胞系、不死化細胞系、またはそのタンパク質活性もしくは遺伝子発現を分析し得るその他の生体物質を含み得る。生体サンプルは例えば、全RNAを遺伝子発現プロファイル分析のために精製し得る血液、腫瘍または他の標品を含んでよい；その分析には、例えば、アフィメトリックス(Affymetrix)チップなどの常套のガラスチップマイクロアレイ技術、RT-PCR、またはその他の常套法を使用する。

【0030】

本明細書にて使用する場合の用語「抗体」とは、エピトープ決定因子に結合し得る未処理の分子ならびにそのフラグメント、例えば、Fa、F(ab')₂、およびFvを示す。特定のポリペプチドに結合する抗体は、免疫抗原として興味のある小ペプチドを含む未処理ポリペプチドまたはフラグメントを用いて調製され得る。動物を免疫するために使用するポリペプチドまたはペプチドは、RNAの翻訳により誘導するか、または化学的に合成することが可能であり、そして担体タンパク質と結合することができる。化学的にペプチドとカップリングされる一般に使用される担体は、ウシ血清アルブミンおよびチログロブリンを含む。次いで、カップリングしたペプチドを動物(例：マウス、ヤギ、ニワトリ、ラットまたはウサギ)の免疫に使用する。

【0031】

本明細書にて使用する場合の用語「ヒト化抗体」は、ヒトの抗体により密接に類似させ

10

20

30

40

50

るために、非抗原結合領域においてアミノ酸が置換わっているが、当初の結合能をなお維持する抗体分子を示す。

【0032】

「治療的有効量」とは、インスリンシグナル伝達経路の調節異常と関係する病的症状を処置、予防または改善するために十分な薬物の量である。

【0033】

本明細書にて使用する場合の「トランスジェニック」生物とは、そのゲノムに外来遺伝物質を挿入された生物を示す。本明細書にて使用する場合、「トランスジェニックハエ」とは、そのゲノムに無作為に挿入された同じまたは他の生物由来のDNA配列を含むショウジョウバエの胚、幼虫および成虫形状である。キイロショウジョウバエが好ましいが、10

【0034】

本明細書にて使用する場合、導入遺伝子の「異所性」発現とは、組織または細胞での、または正常では発現しない特定の発達段階での導入遺伝子の発現を示す。

【0035】

本明細書にて使用する場合、「表現型」とは、遺伝子構成と環境影響の両方により決定される生物の観察可能な物理的または生化学的特性を示す。

【0036】

用語「転写因子」とは、真核細胞において転写の開始または調節に必要なタンパク質を示す。例えば、眼特異的プロモーターGMRは、眼特異的転写因子であるGLASSの結合部位である(Moses, K and Rubin, GM Genes Dev. 5(4):583-93 (1991))。20

【0037】

本明細書にて使用する場合の「UAS」領域とは、GAL-4転写活性化因子により認識される上流の活性化配列を示す。

【0038】

本明細書にて使用する場合、「対照」ハエとは、対照幼虫またはハエが表現型の修飾について試験すべき突然変異をもたない以外、本発明方法にて使用される幼虫またはハエと同じ遺伝子型である幼虫またはハエを示す。

【0039】

本明細書にて使用する場合、「形質転換ベクター」とは、生物のゲノムにDNA断片の組込みを仲介する転移因子技術に使用する修飾された転移因子であり、当業者に熟知されている。30

【0040】

本明細書にて使用する場合、「mRNAの転写上昇」とは、例えば、表4または表5に示したヒトタンパク質などのタンパク質をエンコードする天然の内生遺伝子から転写されるメッセンジャーRNA量が、対照に比べて多いことを示す。表4または表5に開示したヒトタンパク質などのタンパク質のmRNAレベルの上昇は、インスリンシグナル伝達経路の調節異常と関係する病的症状に罹患している個体の組織または細胞に現れ得るもので、当該症状に罹患していない対象でのレベルと比較する。取分け、当該症状に罹患している対象のレベルは、当該症状に罹患していないヒトの対応する組織に認められるmRNA量の少なくとも約2倍、好ましくは少なくとも約5倍、より好ましくは少なくとも約10倍、最も好ましくは少なくとも約100倍であり得る。mRNAのかかる上昇レベルは、健常個体のレベルに比べて、インスリンシグナル伝達経路の調節異常と関係する病的症状を有する個体で、かかるmRNAから翻訳されるタンパク質のレベルを結果として上昇させることとなり得る。40

【0041】

本明細書にて使用する場合、「ショウジョウバエ形質転換ベクター」とは、転移因子配列を含み、かつ生物のゲノムにおいてDNA断片の組込みを仲介し得るDNAプラスミドである。この技術は当業者に熟知されている。

本明細書にて使用する場合、「小眼表現型」では、適切な対照と比較して、眼組織の細50

胞サイズが縮小していることを特徴とする (Leevers, SJ et al. EMBO J. 1996 Dec 2; 15 (23):6584 - 94)。

【0042】

トランスジェニックショウジョウバエを含むトランスジェニック生物を得る方法は、当業者に周知である。例えば、P因子を介する形質転換について一般に用いられる文献は、以下のものである：Spradling, 1986, 「P element mediated transformation」, In *Drosophila* (ショウジョウバエにおけるP因子仲介形質転換) : A practical approach (ed. D. B. Roberts), pp175 - 197, IRL Press, Oxford, UK。EP因子技術は二成分系を示し、酵母Gal4転写活性化因子を利用し、内在性ショウジョウバエ遺伝子の転写を異所性に調節するために使用する。この技術については以下に記載されている (Brand and Perrimon, 1993. 「Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes」 (細胞運命を変え、優性表現型を生成させる手段としての標的遺伝子発現)、Development 118, pp401 - 415 and in : Rorth et al, 1998, 「Systematic gain-of-function genetics in Drosophila」 (ショウジョウバエにおける系統的機能獲得遺伝学) Development, 125(6), pp1049 - 1057)。

10

【0043】

本明細書にて使用する場合、「宿主細胞」とは、何らかの手段、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降、マイクロインジェクション、形質転換、ウイルス感染などにより細胞中に導入された異種DNAを含む原核細胞または真核細胞を示す。

【0044】

本明細書にて使用する場合、「異種」とは、「異なる天然起源の」を意味するか、または非天然状態にあることを意味する。例えば、宿主細胞を別の生物、特に別の種由来のDNAまたは遺伝子で形質転換する場合、その遺伝子はその宿主細胞にとって異種であり、またその遺伝子を担持する宿主細胞の子孫にとっても異種である。同様に、異種とは、同じ天然起源の細胞型由来のヌクレオチド配列であり、かつ同じ天然起源の細胞型に挿入されたものではあるが、非天然状態、例えば、異なるコピー数で存在するか、または異なる調節因子の制御下にあるヌクレオチド配列を示す。

20

【0045】

「ベクター」分子とは、異種核酸を挿入し得る核酸分子であり、また適した宿主細胞に導入し得るものである。ベクターとは好ましくは、1ヶ所以上の複製開始点を有し、その1ヶ所以上の部位に組換えDNAを挿入し得るものである。多くの場合、ベクターは、ベクターを有する細胞を、ベクターをもたない細胞から選択することのできる便利な手段である；例えば、ベクターには薬物耐性遺伝子をエンコードする。一般的なベクターは、プラスミド、ウイルスゲノム、および「人工染色体」(主として酵母およびバクテリアにおいて)を含む。

30

【0046】

「プラスミド」は本明細書において一般的に、当業者の熟知する標準的命名基準に従って、小文字のpから始め、および/またはそれに引続き大文字および/または数字により命名される。本明細書に開示した出発プラスミドは、市販品として入手し得るか、非制限条件で公的に入手し得るか、または既知の公開手法を常法どおりに適用することで、入手可能なプラスミドから構築することができる。本発明により使用し得る多くのプラスミドおよびその他のクローニング・発現ベクターは、周知のものであり、当業者が容易に入手し得る。さらに、当業者は、本発明での使用に適当な多くの他のプラスミドを構築することが可能である。かかるプラスミドならびに他のベクターの性質、構築および使用については、本明細書の開示から当業者に容易に明らかとなる。

40

【0047】

用語「単離」とは、当該物質をそのもとの環境(例えば、天然産の場合には自然環境)から取り出したことを意味する。例えば、生きた動物に存在する天然産のポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、単離されたものではないが、同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドであっても、自然系に共存する物質のあるものまたはすべてから分離したものは

50

、たとえそれが引続き自然系に再導入されたとしても、単離したものである。かかるポリヌクレオチドは、ベクターの一部となり得るか、および/またはかかるポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、成分の一部であり得、なお単離されたものではあるが、かかるベクターまたは成分は、その自然環境の一部ではない。

【0048】

本明細書にて使用する場合、用語「転写制御配列」または「発現制御配列」とは、開始配列、エンハンサー配列、およびプロモーター配列などのDNA配列を示し、操作可能に連結したタンパク質エンコーディング核酸配列の転写を誘発、抑制、または別の制御をする配列である。それらは組織特異的および発生段階特異的である。「ヒト転写制御配列」とは、本発明の表4に示したポリペプチドをエンコードするヒト遺伝子と共に通常見出される転写制御配列であり、それぞれのヒト染色体にて見出される。「非ヒト転写制御配列」はヒトゲノムには見出されない転写制御配列である。

10

用語「ポリペプチド」は、本明細書において、「ポリペプチド類」および「タンパク質(類)」と互換性のある用語として使用される。

【0049】

本発明の表4または表5に示したタンパク質の「化学的誘導体」とは、通常は当該分子の一部ではない付加的な化学的部分を含むポリペプチドである。かかる部分は、前記分子の溶解性、吸収性、生物学的半減期などを改善することができる。前記部分は、あるいは、前記分子の毒性を低下させ、前記分子の不所望の副作用を除去または減弱させ得る。かかる効果を仲介し得る部分は、例えば、レミントンの薬学(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1980))に開示されている。

20

【0050】

表4または表5に示したタンパク質(すなわち、「表4または表5に開示されたタンパク質からなる群より選択されるタンパク質のモジュレーター」)を「調整する」物質の能力とは、限定されるものではないが、当該タンパク質の活性を阻害するか、および/または当該タンパク質の遺伝子発現を阻害する物質の能力である。かかる調整は、当該タンパク質と相互作用する他のタンパク質、例えば、関連調節タンパク質または当該タンパク質により修飾されるタンパク質の能力にも影響し得る。

【0051】

本明細書にて使用する場合、用語「アゴニスト」とは、直接的または間接的にポリペプチド(例:表4または表5に示したポリペプチド)を調整し得、当該ポリペプチドの生物活性を上昇させ得る分子(すなわち、モジュレーター)を示す。アゴニストは、タンパク質、核酸、炭水化物、またはその他の分子を含みうる。遺伝子転写またはタンパク質の生化学的機能を高めるモジュレーターは、それぞれ転写を増大させるか、または当該タンパク質の生化学的性質または活性を刺激するものである。

30

【0052】

本明細書にて使用する場合、用語「アンタゴニスト」または「インヒビター」とは、当該ポリペプチドの生物活性を遮断または阻害するポリペプチド(例:表4または表5に示したポリペプチド)を直接的または間接的に調整し得る分子(すなわち、モジュレーター)を示す。アンタゴニストおよびインヒビターは、タンパク質、核酸、炭水化物、またはその他の分子を含み得る。遺伝子発現またはタンパク質の生化学的機能を阻害するモジュレーターは、それぞれ遺伝子発現または当該タンパク質の生化学的活性を低下させるものである。

40

【0053】

本明細書にて使用する場合、「インスリンシグナル伝達経路の調節異常と関係する病的症状」とは、限定されるものではないが、糖尿病、例えば、II型糖尿病、妊娠糖尿病およびA型インスリン抵抗性症候群である。

【0054】

本明細書にて一般的に言及する場合、表4または表5に開示されたものからなる群より選択されるタンパク質または遺伝子は、ヒト型の遺伝子を示す。

50

【0055】

「インスリンシグナル伝達経路の調節異常と関係する病的症状のインビボ・モデル」は、当業者の熟知する糖尿病のインビボ・モデルを含む。かかるインビボ・モデルは以下を含む：PPAR-ガンマの共通pro12対立遺伝子と2型糖尿病の関連性(Altshuler, D. et al., Nature Genet. 76-80, 2000)、ヒトインスリンレセプター遺伝子の欠陥(Kadowaki, T., et al. Science 240: 787-790, 1988)、マウスにおけるインスリンレセプター基質1遺伝子の欠陥(Abe, H.; et al., J. Clin. Invest. 101: 1784-1788, 1998)、およびヒトにおけるグリコーゲン合成酵素の欠陥(Groop, L. C et al., New Eng. J. Med. 328: 10-14, 1993)。

【0056】

本発明は、モデル生物としてトランスジェニックハエ、すなわちキイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)を使用することを含む方法を開示する(該ハエのゲノムは遺伝子Dp110^{D954A}をエンコードするDNA配列を含んでなる)。常套の発現制御システムを、Dp110^{D954A}ベクターを含む、興味のあるタンパク質の異所性発現を達成するために用いることができる。かかる発現は、生化学経路の障害と変化した表現型の生成を生じ得る。かかる発現制御システムの一つは、DNA配列と組織特異的発現遺伝子の発現制御配列(例：プロモーターまたはエンハンサー)の直接的な融合を伴う。使用し得る組織特異的発現制御システムは、二成分系Gal4-転写活性化システム(Brand and Perrimon, Development 118:401-415 (1993))である。

【0057】

Gal4システムでは酵母の転写活性化因子Gal4を使用し、組織特異的方法で興味のある遺伝子の発現を推進する。Gal4遺伝子は、常套の形質転換システムを用いてハエゲノムに無作為に挿入されており、結果として一時的な組織特異的方法にて発現を推進するゲノムエンハンサーの制御の下にくることとなる。個々のハエの株は確立されているが、これを「ドライバー」と呼称し、これらの挿入を担持する(Brand and Perrimon, Development 118:401-415 (1993))。

【0058】

Gal4システムにおいては、興味のある遺伝子を形質転換ベクターにクローン化し、結果として転写は、UAS配列(Upstream Activating Sequence: 上流活性化配列)、Gal4-応答因子の制御下にある。興味のある配列のUAS遺伝子を担持するハエ株を、組織特異エンハンサーの制御下にGal4遺伝子を発現するハエ株と交配させると、前記遺伝子は組織特異パターンで発現される。

【0059】

成虫組織において容易に可視化し、従って遺伝的スクリーンに使用し得る表現型を生成させるために、ハエ発生の後期において発現を推進するGal4「ドライバー」を、本発明において使用し得る。これらのドライバーを使用すると、発現は翅、眼、脚、異なる感覚器官および脳に欠陥を生じる可能性がある。これらの「ドライバー」は、例えば、無翅(apterous)-Gal4(翅)、エラヴ(elav)-Gal4(CNS)、セブンレス(sevenless)-Gal4、無眼(eyeless)-Gal4(ey-Gal4とも呼称)およびpGMR-Gal4(眼)を含む。Gal4システムの説明とその特異的発現パターンについての記録は、フライ・ベース(<http://flybase.bio.indiana.edu>)にて利用可能である。

【0060】

種々のDNA構築物を、本明細書に記載したトランスジェニック・キイロショウジョウバエを作製するために用いることができる。例えば、前記構築物は、転写される領域の上流にUAS配列を配置する、pUASTベクター(Brand and Perrimon, Development 118:401-415 (1993))にクローン化したDp110^{D954A}配列を含み得る。これら構築物のハエゲノムへの挿入は、P因子組換え、ホボ(Hobo)因子組換え(Blackman et al., EMBO J. 8:211-217 (1989))、相同組換え(Rong and Golic, Science 288:2013-2018 (2000)または当業者既知の他の標準的技術により起こり得る。

【0061】

10

20

30

40

50

上記検討のように、異所性に発現した遺伝子は、特定の生化学的経路の中断により、変化した表現型を生じ得る。同じ生化学的経路において作用する遺伝子の突然変異は、変化した表現型の修飾を引き起こすと予期される。従って、例えば、無眼 - Gal4 および UAS - Dp110^{D954A} の両方を担持するトランスジェニックハエを、インスリンシグナル伝達経路にて作用する遺伝子を同定するために用いることができる；この場合の同定は、このトランスジェニックハエと、既知もしくは予測される遺伝子に突然変異を含むハエを交配し、無眼 - Gal4 / Dp110^{D954A} トランスジェニックハエの変化した表現型について定量的または定性的修飾を示すハエの交配子孫を、対照と比較してスクリーニングすることにより行う。このように、このシステムは、Dp110^{D954A} 産物の機能の解明、ならびにそれらと直接的または間接的に相互作用する他の遺伝子の同定に非常に便利である。スクリーンされ得る突然変異は、限定されるものではないが、既知遺伝子の機能喪失対立遺伝子、欠失株、P因子が生成する「エンハンサー - トラップ」株、およびショウジョウバエのゲノムに Gal4 - 誘発性構築物（その挿入隣接位において遺伝子の異所性発現を活性化し得る）を無作為に挿入することによって生成する機能獲得突然変異などを含む。ここで企図することは、インスリンシグナル伝達経路に關与する遺伝子をこの方法で同定すること、またこれらの遺伝子をインスリンシグナル伝達経路の調節異常と關係する病的症状を処置するための治療薬開発のための標的として使用することである。

10

【0062】

本発明方法により同定され、また本明細書に開示する標的ポリペプチドのヒト相同体の核酸分子は、例えば、標的遺伝子調節において有用な標的遺伝子アンチセンス分子として、および/または標的遺伝子核酸配列の増幅反応におけるアンチセンスプライマーとして、作用し得る。さらに、かかる配列は、リボザイムおよび/または三重らせん配列の一部として、または siRNA または二本鎖もしくは一本鎖 RNA の標的として使用可能であり、遺伝子調節に採用することができる。なおさらに、かかる分子は本明細書に開示するように、診断キットの成分としても使用し得る。

20

【0063】

本発明方法により同定される遺伝子が、正常または野生型遺伝子である場合、この遺伝子を用いて遺伝子の突然変異対立遺伝子を単離することができる。かかる単離は、遺伝的な根拠を有することが判明している、またはその疑いのある過程および障害において好適である。突然変異対立遺伝子は、インスリンシグナル伝達経路の調節異常と關係する病的症状に關連する病的症候に寄与する遺伝子型を有することの判明している、またはその疑いのある個体から単離することが可能であり、その症状としては限定されるものではないが、II型糖尿病またはA型インスリン抵抗性症候群が含まれる (Taylor, S.I and Arioglio, E. (1998) J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol. 9, 419 - 439)。突然変異対立遺伝子および突然変異対立遺伝子産物は、本明細書に記載の診断分析システムに利用し得る。

30

【0064】

突然変異遺伝子の cDNA は、例えば、当業者周知の PCR 技術を用いることにより単離され得る。この場合、第一 cDNA 鎖は、オリゴ - dT オリゴヌクレオチドを、突然変異対立遺伝子を担持すると推定される個体において発現されることが判明している、またはその疑いのある組織から単離した mRNA にハイブリッド形成させることにより、かつ逆転写酵素により新しい鎖を伸長することにより合成され得る。次いで、cDNA の第二鎖は、正常遺伝子の 5' 端に特異的にハイブリッド形成するオリゴヌクレオチドを用いて合成される。これら 2 つのプライマーを用いて、次いで生成物を PCR により増幅し、適当なベクターにクローン化し、当業者周知の方法による DNA 配列解析に付す。突然変異遺伝子の DNA 配列と正常遺伝子を比較することにより、突然変異遺伝子産物の機能の喪失または変化に關与する突然変異を確認することができる。

40

【0065】

別法として、ゲノムまたは cDNA ライブラリーを構築し、突然変異対立遺伝子を担持する疑いのある、またはそのことが判明している個体において、興味のある遺伝子を発現

50

していることが判明している、またはその疑いのある組織由来のDNAまたはRNAそれぞれを用いてスクリーンすることができる。次いで、正常遺伝子またはその適当なフラグメントを標識し、ライブラリー中の相当する突然変異対立遺伝子を同定するためのプローブとして使用する。次いで、この遺伝子を含むクローンを、技術的に日常化した方法により精製し、さらに上記のように配列解析に付すことができる。

【0066】

さらに、突然変異対立遺伝子を担持する疑いのある、またはそのことが判明している個体において、対象の遺伝子を発現していることの判明している、またはその疑いのある組織から単離したDNAまたは合成されたcDNAを利用して、発現ライブラリーを構築することができる。本方法においては、推定突然変異組織が産生する遺伝子産物を発現させ、下記のように、標準的抗体スクリーニング技術を正常遺伝子産物に対して作製した抗体とともに使用し、選抜することができる。(スクリーニング技術についての参照例: Harlow, E. and Lane, eds., 1988, 「Antibodies: A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor)。突然変異が変化した機能を有する発現遺伝子産物を生じる場合(例えば、ミスセンス突然変異の結果として)、ポリクローナル抗体のセットは突然変異遺伝子産物と交差反応する可能性が高い。かかる標識抗体との反応により検出されるライブラリークローンは精製可能であり、上記のように配列解析に付すことができる。

10

【0067】

もう一つの態様において、表4または表5に示したポリペプチドをエンコードする配列を含んでなる核酸、またはその機能的誘導体は、正常な生体機能、例えば、正常なインスリンを介するシグナル伝達を促進するために遺伝子療法により投与することができる。遺伝子療法とは、対象に核酸を投与することにより実施される治療法を示す。本発明のこの態様において、核酸はそのエンコードするタンパク質を産生し、それが正常なインスリンシグナル伝達経路を促進することによって治療効果を仲介する。

20

技術分野にて利用可能な任意の遺伝子療法を、本発明方法により使用し得る。例示となる方法を以下に説明する。

【0068】

好適な局面において、該治療薬は表4または表5のポリペプチドに対する核酸を含んでなり、該核酸は適切な宿主において表4または表5のタンパク質あるいはそのフラグメントもしくはキメラタンパク質を発現する発現ベクターの一部である。取分け、かかる核酸は、表4または表5のタンパク質のコード領域に操作可能に連結するプロモーターを有し、当該プロモーターは誘発性または構成性であり、オプシオンとして組織特異的である。もう一つの特定態様において、核酸分子は、表4または表5のタンパク質のコード配列および他の所望の配列が、ゲノムの所望部位にて相同性組換えを促進する領域で挟まれた核酸として使用され、結果として表4または表5の核酸を染色体内で発現させる(Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932 - 8935; Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435 - 438)。

30

【0069】

該核酸を患者に送達するには、直接的に行うか(この場合は患者を核酸または核酸担持ベクターに直接接触させる)、または間接的に行う(この場合にはインビトロで細胞を核酸により形質転換し、次いで患者に移植する)。これら2つの方法は、それぞれインビボまたはエキソビボ遺伝子療法として知られる。

40

【0070】

特定の態様においては、前記核酸はインビボで直接投与され、これによりエンコードされた産物を産生するために発現される。この方法は、技術上既知の様々な方法、例えば、それを適切な核酸発現ベクターの一部として構築し、それを細胞内に存在するように投与することにより、例えば、欠陥もしくは減弱レトロウイルスまたは他のウイルスベクターを用いて感染させることにより(参照例: 米国特許第4,980,286号公報およびその他の後記文献)、またはむき出しのDNAをそのまま注射することにより、または微粒子

50

衝撃を使用することにより（例：遺伝子銃、バイオリスティック（Biolistic）、デュボン）、または脂質もしくは細胞表面レセプターもしくは形質移入剤でのコーティング、リポソーム、微粒子もしくはマイクロカプセルへの被膜包埋などにより、または核に侵入することの判明しているペプチドに連結して投与することにより、またはレセプターを介したエンドサイトーシスを受けやすいリガンドに連結して投与することなどにより、実施され得る（参照例：米国特許第5,166,320；5,728,399；5,874,297；および6,030,954号公報；これらはすべてその全文を参照により本明細書の一部とする）（これらは該レセプターを特異的に発現する細胞型を標的とするために使用される）。もう一つの態様においては、核酸-リガンド複合体を形成し得、この複合体におけるリガンドは、融合誘導ウイルス性ペプチドを含み、エンドソームを分裂させて核酸のリソソーム分解を回避する。さらにもう一つの態様において、前記核酸は特定レセプターを標的とすることにより、細胞特異的取り込みおよび発現に対しインビボで標的化することができる（参照例：PCT公開WO92/06180；WO92/20316；WO93/14188；およびWO93/20221号公報）。別法として、前記核酸を細胞内に導入し、相同組換えにより発現させるために宿主細胞DNA内に取り込ませることができる（参照例：米国特許第5,413,923；5,416,260；および5,574,205号公報；Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435 - 438）。

10

【0071】

特定の態様においては、表4または表5のポリペプチドをエンコードする核酸を含むウイルスベクターを使用する。例えば、レトロウイルスベクターを使用することができる（参照例：米国特許第5,219,740；5,604,090；および5,834,182号公報）。これらのレトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムのパッケージングと宿主細胞DNAへの組み込みに必要のないレトロウイルス配列を除去するために修飾されている。遺伝子療法に使用される表4または表5のポリペプチドに対する核酸を、ベクターにクローン化し、患者に対しての遺伝子送達を容易にする。

20

【0072】

アデノウイルスは、遺伝子療法に使用され得るその他のウイルスベクターである。アデノウイルスは特に、呼吸器系上皮細胞に遺伝子を送達するための魅力的なビヒクルである。アデノウイルスは、呼吸器上皮細胞に自然に感染し、そこで軽度の疾患を引き起こす。アデノウイルスにもとづく送達系の他の標的は、肝臓、中枢神経系、内皮細胞、および筋肉である。アデノウイルスは、非分裂細胞に感染し得るという利点をもつ。アデノウイルスにもとづく遺伝子療法を実施するための方法については、例えば、米国特許第5,824,544；5,868,040；5,871,722；5,880,102；5,882,877；5,885,808；5,932,210；5,981,225；5,994,106；5,994,132；5,994,134；6,001,557；および6,033,884号公報に記載がある；これらのすべてについてその全文を参照により本明細書の一部とする。

30

【0073】

アデノ随伴ウイルス（AAV）もまた、遺伝子療法での使用に関して提案されている。AAVの調製法および利用法については、例えば、米国特許第5,173,414；5,252,479；5,552,311；5,658,785；5,763,416；5,773,289；5,843,742；5,869,040；5,942,496；および5,948,675号公報に記載がある；これらのすべてについてその全文を参照により本明細書の一部とする。

40

【0074】

遺伝子療法のもう一つの方法は、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウムを介したトランスフェクション、またはウイルス感染などの方法による組織培養における細胞へ遺伝子を転移させることを伴う。通常、転移方法は、選択可能なマーカーを細胞に転移させることを含む。次いで、細胞を選択条件下に置き、転移を取り込み、その転移された遺伝子を発現する細胞を単離する。次いで、これらの細胞を患者に送達する。

50

【 0 0 7 5 】

得られる組換え細胞は、技術上既知の様々な方法で患者に送達され得る。好適な態様においては、上皮細胞を、例えば、皮下に注射する。もう一つの態様においては、組換え皮膚細胞を皮膚移植片として患者に適用する。組換え血液細胞（例；造血幹細胞または始原細胞）は、好ましくは静脈内投与される。使用しようとする場合の細胞量は所望の効果、患者の状態などに依存するが、当業者により決定され得る。

【 0 0 7 6 】

遺伝子療法を目的として核酸を導入し得る細胞は、所望の利用可能な細胞型を包含し、限定されるものではないが、上皮細胞、内皮細胞、角化細胞、線維芽細胞、筋肉細胞、肝細胞；Tリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、巨核球、顆粒球などの血液細胞；種々の幹細胞または始原細胞、特に造血幹細胞または始原細胞、例えば、骨髓、臍帯血、末梢血、胎児肝臓などから得られる細胞を含む。

10

好適な態様において、遺伝子療法に使用する細胞は患者に対して自己由来である。

【 0 0 7 7 】

遺伝子療法に組換え細胞を使用する態様においては、表4または表5に示したポリペプチドの核酸を細胞に導入し、その細胞またはその子孫がポリペプチドを発現し得るようにし、次いでその組換え細胞を治療効果を求めてインビボで投与する。特定の態様においては、幹細胞または始原細胞を使用する。インビボで単離維持し得る幹細胞および/または始原細胞を、潜在的に本発明の態様に従って使用することができる。かかる幹細胞は、限定されるものではないが、造血幹細胞（HSC）、皮膚および腸管内層などの上皮組織の幹細胞、胎児心筋細胞、肝幹細胞（参照例：WO94/08598）、および神経幹細胞（Stemple and Anderson, 1992, Cell 71:973 - 985）を含む。

20

【 0 0 7 8 】

上皮幹細胞（ESC）または角化細胞を、既知方法により皮膚および腸管内層などの組織から得ることができる（Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A:229）。皮膚などの重層上皮組織では、胚層内で幹細胞の有糸分裂により再生が起こる；前記層は基底層に密接している。腸管内層内の幹細胞はこの組織の迅速な再生速度を提供する。患者またはドナーからの皮膚または腸管内層から得られるESCまたは角化細胞は、組織培養で増殖し得る（Pittelkow and Scott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61:771）。ESCがドナーによって提供される場合、宿主対移植片の反応性を抑制する方法（例：緩和な免疫抑制を促進するための照射、薬物または抗体投与）も使用することができる。

30

【 0 0 7 9 】

造血幹細胞（HSC）に関しては、HSCのインビトロでの単離、増殖、および維持に備える何らかの方法を、本発明のこの態様において使用することができる。これを達成し得る技術は、（a）将来の宿主、またはドナーから単離した骨髓細胞由来のHSC培養物を単離および確立すること；または（b）同種異系または異種系であり得るすでに確立した長期HSC培養物を使用すること；を含む。非自己由来HSCは、好ましくは将来の宿主/患者の移植免疫反応を抑制する方法と組合せて使用され得る。本発明の特定の態様において、ヒト骨髓細胞は針吸引により後部腸骨稜から得られ得る（参照例：Kodo et al., 1984, J. Clin. Invest. 73:1377 - 1384）。本発明の好適な態様において、HSCは高濃度で、または実質的に純粋な形状で調製され得る。濃厚化は長期培養の前、その間、またはその後実施可能であり、技術分野上既知の技術により実施され得る。骨髓細胞の長期培養は、例えば、改良デクスター（Dexter）細胞培養法（Dexter et al., 1977, J. Cell Physiol. 91:335）またはウィットロック-ウィット（Witlock - Witte）培養法（Witlock and Witte, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:3608 - 3612）により確立され維持され得る。

40

【 0 0 8 0 】

特定の態様において、遺伝子療法を目的として導入される核酸は、コード領域に操作可能に連結する誘導可能なプロモーターを含んでなり、その結果、適切な転写インデューサーの有無を制御することにより核酸の発現が制御可能となる。

50

【0081】

本発明のさらなる態様は、インスリンシグナル伝達経路の調節異常と関係する病的症状を処置、予防または改善する方法であって、表4または表5に開示のタンパク質からなる群より選択されるタンパク質のモジュレーターの有効量を、それを必要とする対象に投与することを含む方法に関する。一態様において、前記モジュレーターは当該タンパク質に対する1種以上の抗体またはそのフラグメントであり、ここで抗体またはそのフラグメントは、当該対象における当該タンパク質の生化学的機能を阻害し得るものである。

【0082】

本明細書には、1つ以上の異なって発現される遺伝子エピトープを特異的に認識し得る抗体の製造法が記載されている。かかる抗体は、限定されるものではないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体(mAb)、ヒト化またはキメラ化抗体、一本鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fab発現ライブラリーにより産生されるフラグメント、抗イデオタイプ(anti-Id)抗体、および上記いずれかのエピトープ結合フラグメントを含む。かかる抗体は、例えば、生体サンプル中の標的タンパク質の検出にて、あるいはタンパク質の生化学的機能の阻害方法として使用され得る。従って、かかる抗体は疾患処置法の一部として利用され得、および/または診断技術の一部として使用可能であり、それによって例えば、表4または表5に示したポリペプチドの異常レベルについて、またはこれらポリペプチドの異常な形状の存在について、患者をテストすることができる。

10

【0083】

表4または表5のポリペプチドに対する抗体生産のためには、これらのポリペプチドまたはその一部を注射することにより種々の宿主動物を免疫することができる。かかる宿主動物は、限定されるものではないが、ほんの一部を例示すれば、ウサギ、マウス、ヤギ、ニワトリおよびラットを含む。種々のアジュバントを使用し、宿主の種に対応して免疫応答を上昇させることができる；その例は、限定されるものではないが、フロイント(Freund's)(完全および不完全)、水酸化アルミニウムなどの鉱質ゲル、リソレシチンなどの界面活性物質、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、スカシガイヘモシアニン、ジニトロフェノール、およびBCG(カルメット-گرانウシ型結核菌)およびコリネバクテリウム・パルブム(*Corynebacterium parvum*)などの潜在的に有用なヒトアジュバントを含む。

20

【0084】

ポリクローナル抗体は、標的遺伝子産物などの抗原、またはその抗原性機能的誘導体で免疫した動物の血清に由来する抗体分子の不均一な集団である。ポリクローナル抗体の生産のためには、上記のような宿主動物を、表4または表5のポリペプチドまたはその部分を、上記のアジュバントとともに注射により免疫するとよい。

30

【0085】

モノクローナル抗体は、特定の抗原に対する抗体の均一な集団であり、連続的な細胞株培養により抗体分子を生産するための技術により取得することができる。これらの方法は、限定されるものではないが、コーラーとミルシュタインのハイブリドーマ法(Kohler and Milstein, 1975, Nature 256:495 - 497; 米国特許第4,376,110号公報)、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kosbor et al., 1983, Immunology Today 4:72; Cole et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026 - 2030)、およびEBVハイブリドーマ技術(Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77 - 96)を含む。かかる抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgDおよびそのサブクラスを包含する免疫グロブリンクラスのものである。本発明のmAbを産生するハイブリドーマは、インビトロまたはインビボで培養し得る。インビボでの高力価mAbの生産はこの方法を現在の好適な生産方法とする。

40

【0086】

さらに、「キメラ抗体」の生産用に開発された技術(Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81:6851 - 6855; Neuberger et al., 1984, Nature, 312:604 - 608; Ta

50

keda et al., 1985, Nature, 314:452 - 454)、すなわち、適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子を、適切な生物活性を有するヒト抗体分子由来の遺伝子と一緒にスプライシングする方法が使用され得る。キメラ抗体は異なる部分が異なる動物種に由来する分子であり、例えば、マウス mAb の可変領域もしくは超可変領域、およびヒト免疫グロブリン定常領域を有する抗体である。

【0087】

別法として、一本鎖抗体の調製についての記載がある(米国特許第4,946,778号公報; Bird, 1988, Science 242:423 - 426; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879 - 5883; and Ward et al., 1989, Nature 334:544 - 546); この方法を適用して、差次的発現遺伝子 - 一本鎖抗体を調製することができる。一本鎖抗体は、Fv領域の重鎖フラグメントと軽鎖フラグメントをアミノ酸架橋を介して連結し、一本鎖ポリペプチドとすることにより形成し得る。

10

【0088】

最も好ましくは、「ヒト化抗体」の生産に有用な技術を、本明細書に開示したポリペプチド、フラグメント、誘導體、および機能的等価物に対する抗体を製造するために適用することができる。かかる技術は以下に開示されている: 米国特許第5,932,448; 5,693,762; 5,693,761; 5,585,089; 5,530,101; 5,910,771; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,545,580; 5,661,016; および5,770,429号公報; これらのすべてについてその全文を参照により本明細書の一部とする。

20

【0089】

特定のエピトープを認識する抗体フラグメントは、既知技術により生成され得る。例えば、かかるフラグメントは、限定されるものではないが、抗体分子をペプシン消化することによって調製され得る F(ab')₂ フラグメント、F(ab')₂ フラグメントのジスルフィド架橋を還元することにより生成され得る Fab フラグメントを含む。あるいは、Fab発現ライブラリーを構築し(Huse et al., 1989, Science, 246:1275 - 1281)、所望の特異性をもつモノクローナル Fab フラグメントを迅速かつ容易に同定し得るようにすることもできる。

【0090】

本明細書にて検討したように、本発明の抗体は、生体サンプル中、表4または表5に開示したタンパク質レベルを検出する診断キットに、ならびにインスリンシグナル伝達経路の調節異常と関係する病的症状に罹患している対象を診断する方法に、好適に使用され得る; 該対象は表4または表5に開示したタンパク質からなる群より選択されるタンパク質に対するモジュレーターでの処置に適切な候補であり得る。好ましくは、当該検出工程は当該適した組織細胞(例: 生体サンプル)と表4または表5のポリペプチドまたはそのフラグメントに特異的に結合する抗体を接触させ、当該抗体と当該適した組織、細胞もしくはサンプル中のポリペプチドとの特異的な結合を検出することを含み、ここにポリペプチドに対する特異的結合が検出された場合、表4または表5に示したポリペプチドまたはそのフラグメントが存在することを示すとする。

30

【0091】

検出の容易さのために特に好適なのは、サンドイッチ分析であるが、この分析には多くの変法が存在し、そのすべてを本発明が包含するものとする。例えば、典型的なフォワード分析では、非標識抗体を固体基体に固相化し、試験すべきサンプルを結合した分子と接触させる。適当な時間、すなわち、抗体 - 抗原二成分複合体の形成を可能とする十分な時間インキュベートする。この時点で、検出可能なシグナルを誘発し得るレポーター分子で標識した第二抗体を加え、抗体 - 抗原 - 標識抗体の三成分複合体を形成するのに十分な時間インキュベートする。未反応物質を洗い流し、シグナルを観察して抗原の存在を判定するか、または既知量の抗原を含む対照サンプルと比較することにより定量され得る。フォワード分析の変法としては、サンプルと抗体の両方を同時に結合した抗体に加える同時分析法、または標識した抗体と試験すべきサンプルを先ず組合せてインキュベートし、それ

40

50

を非標識表面結合抗体に加えるリバー分析法を含む。これらの技術は当業者周知であり、僅かな変更が可能であることは容易に分かる。本明細書にて使用する場合、「サンドイッチ分析」には基本的な2サイト法に基づくすべての変法を包含するものとする。本発明の免疫分析にとって唯一の制限ファクターは、標識抗体が表4または表5のポリペプチドまたはそのフラグメントに特異的な抗体でなければならないことである。

【0092】

この型の分析で最も一般的に使用されるレポーター分子は、酵素、発蛍光団または放射性核種を含む分子である。酵素免疫分析の場合、酵素は通常グルタールアルデヒドまたは過ヨウ素酸により第二抗体に結合される。しかし、容易に認めうるように、多様な異なる連結技術が存在し、それは当業者周知である。一般的に使用される酵素は、特に、西洋わさびペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼおよびアルカリホスファターゼを含む。特定の酵素とともに使用される基質は、対応する酵素によって水解され、検出可能な色変化を生じるように一般に選択される。例えば、リン酸p-ニトロフェニルはアルカリホスファターゼ接合体との使用に適当であり；ペルオキシダーゼ接合体の場合は、1,2-フェニレンジアミンまたはトルイジンが共通して使用される。発蛍光基質を採用することも可能であり、この場合は上記の色素原基質よりもむしろ蛍光産物を生じる。次いで適した基質含有溶液を三級複合体に加える。前記基質は、第二抗体に連結された酵素と反応し、定量的に可視シグナルを生じる；これをさらに分光光度法により定量して、血清サンプル中に存在する表4または表5のポリペプチドの量を評価する。

10

20

【0093】

あるいは、フルオレセインおよびローダミンなどの蛍光化合物を、その結合能を変えなく抗体に化学的にカップル結合させる。特定の波長光の照射により活性化すると、蛍光色素標識抗体は光エネルギーを吸収し、前記分子の励起状態を誘発し、次いで特徴的な長波長の光を発する。発光は光学顕微鏡により目視検出可能な特徴的な色として現れる。免疫蛍光法とEIA技術は共に、技術分野上十分に確立されており、本発明にとって特に好適である。しかし、他のレポーター分子、例えば、放射同位体、化学発光または生物発光分子を採用することもできる。当業者には必要な用途に合わせて操作をどのように変えるべきか容易に分かる。

【0094】

本発明の医薬組成物はまた、表4または表5に開示したタンパク質の発現を核酸レベルで阻害する物質を含んでなる。かかる分子はリボザイム、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせんDNA、RNAアプタマー、siRNAおよび/または二本鎖もしくは一本鎖RNAを含み、かかるタンパク質をエンコードする核酸の適したヌクレオチド配列に向けたものである。これらの阻害性分子は、当業者により不当な負担または実験なしに常套の技術を用いて創製され得る。例えば、遺伝子発現の変更(例：阻害)は、本明細書にて検討したポリペプチドをエンコードする遺伝子の制御領域、すなわち、プロモーター、エンハンサー、およびイントロンに対するアンチセンス分子、DNAまたはRNAを設計することにより得ることができる。例えば、転写開始部位、例えば、開始部位の-10と+10位置の間の部位に由来するオリゴヌクレオチドを使用することができる。それにもか

30

40

【0095】

同様に、遺伝子発現の阻害は「三重らせん」塩基対合方法を用いても達成され得る。三重らせん対合は、ポリメラーゼ、転写因子、または調節分子が結合するために十分に開くための二重らせんの能力を阻害するために有用である。三重DNAを使用する最近の治療薬の進歩は文献に記載されている(Gee, J.E. et al. (1994) In: Huber, B.E. and B. I. Carr, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co., Mt. Kisco,

50

N.Y.)。これらの分子はまた、転写産物がリボソームに結合するのを防止することにより、mRNAの翻訳を遮断するように設計されてもよい。

【0096】

リボザイム、酵素RNA分子を、RNAの特異的切断を触媒することにより遺伝子発現を阻害するために使用してもよい。リボザイムの作用メカニズムは、リボザイム分子が相補性の標的RNAに配列特異的にハイブリッド形成し、次いでエンドヌクレアーゼによる切断を伴う。使用し得る例としては、工学的に調製した「ハンマーヘッド型」または「ヘアピン」モチーフリボザイム分子を含み、遺伝子配列のエンドヌクレアーゼによる切断を特異的かつ効率的に触媒するように設計することができる。可能性のあるRNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、以下の配列：GUA、GUUおよびGUCを含むリボザイム切断部位について標的分子を走査することによりまず同定される。同定した後、切断部位を含む標的遺伝子の領域に相当する15個ないし20個のリボヌクレオチドの短鎖RNA配列について、該オリゴヌクレオチドを実施不可能とし得る二次構造の特徴を評価することができる。候補標的の適合性もまた、リボヌクレアーゼ保護分析を用いて、相補性オリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成のし易さについて試験することにより評価することができる。

10

【0097】

リボザイム法は、細胞をリボザイムに暴露するか、またはかかる小RNAリボザイム分子の細胞中での発現を誘発することを含む(Grassi and Marini, 1996, *Annals of Medicine* 28: 499 - 510; Gibson, 1996, *Cancer and Metastasis Reviews* 15: 287 - 299)。本明細書にて検討した遺伝子の少なくとも一つに相当するmRNAに対して標的としたハンマーヘッド型リボザイムおよびヘアピン型リボザイムの細胞内発現を利用して、前記遺伝子によりエンコードされるタンパク質を阻害することができる。

20

【0098】

リボザイムは、リボザイム配列を取り込むRNAオリゴヌクレオチドの形状で、細胞に直接送達されるか、または所望のリボソームRNAをエンコードする発現ベクターとして細胞に導入されることができる。リボザイムは、mRNAを切断するのに触媒として有効な十分な数でインピボにて通常通りに発現し、それによって細胞でのmRNAの存在量を改変する(Cotten et al., 1989 *EMBO J.* 8:3861 - 3866)。特に、通常の周知の規則に従って設計し、例えば、標準的ホスホロアミダイト化学により合成したDNA配列をコードするリボザイムは、tRNAをエンコードする遺伝子のアンチコドンステムおよびループにおける制限酵素部位に結合可能であり、それを次いで技術分野上常套の方法により興味のある細胞に形質転換し、発現させることができる。好ましくは、誘発可能なプロモーター(例：グルココルチコイドまたはテトラサイクリン応答要素)をこの構築物に導入し、リボザイム発現を選択的に制御し得るようにする。飽和使用のために、高度かつ構成的に活性なプロモーターを使用することができる。tDNA遺伝子(すなわち、tRNAをエンコードする遺伝子)はそのサイズが小さいこと、転写が高率であること、また異なる種類の組織にて遍在的に発現するために、この適用において有用である。

30

【0099】

それ故、リボザイムは、mRNA配列を事実上開裂するように通常設計され、また細胞はかかるリボザイム配列をコードするDNAで常法どおりに形質転換され、制御可能かつ触媒として有効な量のリボザイムを発現するようにすることができる。従って、細胞内の実質的にいずれのRNA種についても、その存在量を加減または不安定にさせることができる。

40

【0100】

リボザイム配列は、アンチセンスヌクレオチドについて記載したのと本質的に同じ方法で改変可能である；例えば、リボザイム配列は改変された塩基部分を含み得る。

また、RNAアプタマーも細胞中に導入されるか、または細胞中で発現されて、RNA存在量または活性を改変することができる。RNAアプタマーはTatおよびRevRNA(Good et al., 1997, *Gene Therapy* 4: 45 - 54)などのタンパク質に対して特異的なRN

50

Aリガンドであり、その翻訳を特異的に阻害し得るものである。

【0101】

遺伝子発現の遺伝子特異的阻害も常套の二本鎖または一本鎖RNA技術を用いて達成し得る。かかる技術についてはその記載が国際特許出願WO99/32619号公報（その全文を参照により本明細書の一部とする）に見出し得る。さらに、siRNAも遺伝子発現を阻害する手段として有用であると証明されている（Cullen, BR Nat. Immunol. 2002 Jul;3(7):597-9, Martinez, J. et al. Cell 2002 Sept.6;110(5):563）。

【0102】

本発明のアンチセンス分子、三重らせんDNA、RNAアプタマー、dsRNA、ssRNA、siRNAおよびリボザイムは、技術分野上、核酸分子合成の既知方法により調製し得る。これらは固相ホスホルアミダイト化学合成などのオリゴヌクレオチドを化学的に合成する技術を含む。別法として、RNA分子は本明細書にて検討したポリペプチドの遺伝子をエンコードするDNA配列をインビトロ転写およびインビボ転写により生成させることができる。かかるDNA配列を、T7またはSP6などの適当なRNAポリメラーゼプロモーターをもつ広範なベクターに取り込ませることができる。別法として、アンチセンスRNAを、構成的にまたは誘導可能に合成するcDNA構築物を細胞株、細胞または組織に導入することができる。

【0103】

ベクターは多くの利用可能な手段により細胞または組織に導入可能であり、インビボ、インビトロまたはエキソビボで使用され得る。エキソビボ療法では、ベクターを患者から取り出した幹細胞に導入可能であり、その同じ患者に戻す自己移植のためにクローン増殖することができる。トランスフェクションによる送達およびリボソーム注射による送達は、技術分野上周知の方法により達成され得る。

【0104】

本明細書に開示したタンパク質のmRNAレベルの検出は、鎖長が少なくとも約20ヌクレオチドの単離したヌクレオチド配列と、生体サンプルを接触させるか、またはさらに生体サンプル由来の単離RNAもしくはDNA分子を接触させることからなる；該ヌクレオチド配列は高ストリンジェントな条件下（例：0.1×SSPEまたはSSC、0.1%SDS、65℃）で、表4または表5に示したポリペプチドをエンコードする単離ヌクレオチド配列とハイブリッド形成する。ハイブリッド形成条件は、高度にストリンジェントであるか、またはやや高度にストリンジェントであってもよい。前記核酸分子がデオキシオリゴヌクレオチド（「オリゴ」）である場合、高ストリンジェントな条件とは、6×SSC/0.05%ピロリン酸ナトリウム中、37℃（14塩基オリゴに対して）、48℃（17塩基オリゴに対して）、55℃（20塩基オリゴに対して）、および60℃（23塩基オリゴに対して）で洗浄することを示しうる。様々な組成物の核酸に対してのかかるストリンジェントな条件の適切な範囲は以下の文献に記載されている：Krause and Aaronson (1991), Methods in Enzymology, 200:546-556；さらに上記 Maniatis et al.。

【0105】

一部の事例において、機能不全と関連する遺伝子の変異した形状の検出は、該遺伝子の発現不足、発現過剰または変化した空間的もしくは一過性の発現を原因とする疾患、または該疾患に対する罹病性の診断に加え得るか、または診断を確定する診断手段を提供する。該遺伝子に突然変異をもつ個体は種々の技術によりDNAレベルで検出され得る。

【0106】

診断用の核酸、特にmRNAは、対象の細胞、例えば、血液、尿、唾液、組織生検または剖検材料から取得され得る。ゲノムDNAは検出のために直接使用され得るか、または分析前にPCRもしくは他の増幅技術を用いることにより酵素的に増幅され得る。RNAまたはcDNAもまた、同様の様式で使用され得る。欠失および挿入は、正常の遺伝子型と比較して、増幅産物のサイズに変化のあることにより検出され得る。点突然変異は、増幅したDNAを、表4または表5に開示した遺伝子がエンコードするポリペプチドをエンコードする標識化ヌクレオチド配列にハイブリッド形成させることにより同定され得る。

完全にマッチした配列は、RNアーゼ消化によるか、または融解温度差により、ミスマッチ二重鎖と識別され得る。DNA配列相違はまた、変性剤の存在下または不存在下のゲル中、DNAフラグメントの電気泳動移動度の変化により、または直接的なDNA配列決定により検出され得る（例：Myers et al., Science (1985) 230:1242）。特定位置での配列変化はまた、RNアーゼとS1保護などのヌクレアーゼ保護分析、または化学的切断法により解明され得る（参照：Cotton et al., Proc Natl Acad Sci USA (1985) 85: 4397 - 4401）。さらに、かかるヌクレオチド配列について、表4または表5のポリペプチドまたはフラグメントをエンコードするヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドプローブのアレイを構築して、例えば、遺伝子突然変異の効率的なスクリーニングを実施し得る。アレイによる技術は周知かつ一般的に適用可能であり、遺伝子発現、遺伝子連鎖、および遺伝子可変性を含む分子遺伝学の様々な問題を処理するために使用され得る（参照例：M. Chee et al., Science, Vol 274, pp 610 - 613 (1996)）。

10

【0107】

診断分析は、表4または表5に示したポリペプチドの遺伝子における突然変異の上記方法による検出を介して、疾患に対する感受性を診断または判定する方法を提供する。さらに、かかる疾患は、ポリペプチドまたはmRNAのレベルが異常に低下または上昇している対象に由来するサンプルから判定することを含む方法により診断され得る。発現の低下または上昇は、ポリヌクレオチド定量用の技術分野上既知の方法を用いて、RNAレベルで測定され得る；かかる方法は、例えば、PCR、RT-PCRなどの核酸増幅、RNアーゼ保護、ノーザンブロットングおよび他のハイブリダイゼーション法である。宿主由来のサンプル中、本発明のポリペプチドなど、タンパク質レベルの決定に使用され得る分析技術は、当業者周知である。かかる分析法は、放射性免疫分析、競合結合分析、ウエスタンブロット分析およびELISA分析などである。

20

【0108】

従って、もう一つの局面において、本発明はmRNAレベル（またはタンパク質レベル）を検出する診断キットに関し、該キットは：

- (a) 表4または表5に示したポリペプチドもしくはそのフラグメントのポリヌクレオチド；
 - (b) (a)のポリヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列；
 - (c) (a)のポリヌクレオチドがエンコードする本発明の表4または表5のポリペチド；
 - (d) (c)のポリペプチドに対する抗体；
 - (e) (a)のポリヌクレオチドに相補的なRNAi配列；
- を含んでなる。

30

認識すべきことは、かかるキットにおいて、(a)、(b)、(c)、(d)または(e)は実質的な成分を含み得ることである。かかるキットは、疾患または疾患に対する感受性の診断、特に、インスリンシグナル伝達経路の調節異常と関係する疾患または症状、例えば、II型糖尿病またはA型インスリン抵抗性症候群の診断に有用である。

【0109】

本発明のヌクレオチド配列は、染色体存在部位にとっても有用である。前記配列は、個々のヒト染色体上の特定の位置を特異的に標的とし、また特定の位置とハイブリッド形成することができる。染色体に関連する配列のマッピングは、これらの配列と遺伝子関連疾患を相関させる上で重要な第一段階である。配列が正確な染色体位置に配置されると、染色体上の配列の物理的位置を遺伝子地図データと相関させることができる。かかるデータは、例えば、ヒトのメンデルの遺伝の法則（V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man）に見出される（ジョン・ホプキンス大学ウェルシュ（Welch）医学図書館からオンラインで利用可能）。同じ染色体領域に位置決定した遺伝子と疾患の関係を、次いで、連鎖解析により確認する（物理的に隣接する遺伝子の同時遺伝）。

40

【0110】

罹患および非罹患個体間のcDNAまたはゲノム配列の差異もまた、決定され得る。罹

50

患個体の一部または全部に、正常個体にはない突然変異が観察される場合、その場合の突然変異は該疾患の原因因子であるとみなす。

【0111】

本発明のさらなる態様は、上記に検討した治療効果のいずれかを目的とする医薬組成物を、医薬的に許容可能な担体、添加物または賦形剤と共に投与することに関する。かかる医薬組成物は、例えば、表4または表5に示したポリペプチド、擬似薬、アゴニスト、アンタゴニスト、表4または表5のポリペプチドもしくはその遺伝子の機能のインヒビターまたは他のモジュレーターなどを含んでなる。前記組成物は単独で、または安定化化合物などの少なくとも1種の他の薬剤と組合せて投与され得る；前記組成物は無菌の生物適合性医薬担体、例えば、限定されるものではないが、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、および水と共に投与され得る。前記組成物は患者に単独で、または他の作用因子、薬物またはホルモンと組合せて投与され得る。

10

【0112】

さらに、上記のタンパク質、アンタゴニスト、抗体、アゴニスト、アンチセンス配列または他のモジュレーターは、他の適切な治療剤と組合せて投与され得る。組合せ療法に使用する適切な薬剤の選択は、通常薬学の原則に従って、当業者がなし得る。治療剤の組合せは、インスリンシグナル伝達経路の異常と関連する病的症状の処置、予防または改善を実施するために相乗的に作用し得る。この方法を用いて、各薬剤の低用量での治療効果を達成することが可能であり、従って、悪影響を及ぼす副作用の可能性を低下させることができる。表4または表5に示したヒト・ポリペプチドおよび当該ポリペプチドをエンコードする遺伝子のアンタゴニスト、アゴニストおよび他のモジュレーターは、技術上一般的に知られた方法を用いて調製し得る。

20

【0113】

本発明が包含する医薬組成物は、例えば、限定されるものではないが、経口、静脈内、筋肉内、関節内、動脈内、骨髄内、硬膜下腔内、脳室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、腸管内、局所的、舌下、または直腸経由を含む多くの投与経路により投与され得る。

【0114】

有効成分に加えて、これらの医薬組成物は、有効成分を医薬として使用し得る製剤に加工することを容易にする添加物と補助剤を含んでなる適当な医薬的に許容可能な担体を含んでいてよい。製剤化技術と投与に関するさらなる詳細については、レミントンの薬学（マーク・パブリッシング（Maack Publishing Co.）、イーストン、ペンシルヴェニア）に見出し得る。

30

【0115】

経口投与用の医薬組成物は、技術分野上周知の医薬的に許容可能な担体を用いて、経口投与に適する投与形態に製剤化することができる。かかる担体は、前記医薬組成物を患者が服用するために、錠剤、丸剤、糖衣丸、カプセル、液剤、ゲル剤、シロップ、スラリー、懸濁液などとして製剤化することを可能とする。

【0116】

経口用医薬製剤は、活性化合物と固体添加剤を組合せて得られ、所望により得られる混合物を磨砕し、顆粒混合物を加工処理し、所望により適当な補助剤を添加した後、錠剤または糖衣錠コアを得る。適当な添加剤は、炭水化物またはタンパク質賦形剤、例えば、乳糖、スクロース、マンニトールまたはソルビトールなどの糖類；トウモロコシ、コムギ、コメ、バレイショ、またはその他の植物からのデンプン；メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、またはナトリウム・カルボキシメチルセルロースなどのセルロース；アラビアゴム、トラガカントなどのガム；およびゼラチンおよびコラーゲンなどのタンパク質である。所望により、崩壊剤または可溶化剤、例えば、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸、またはその塩（アルギン酸ナトリウムなど）を加え得る。

40

【0117】

糖衣錠コアは、濃厚糖溶液などの適当なコーティング剤とともに使用され得る；該糖溶液は、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カーボポールゲル、ポリエチレン

50

グリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、および適当な有機溶媒もしくはその溶媒混合物をも含有し得る。製品の確認のために、または活性化合物の量、すなわち、用量を特徴づけるために、染料または色素を錠剤もしくは糖衣コーティング剤に加えてもよい。

【0118】

経口的に使用し得る医薬製剤は、押し込み式ゼラチン製カプセル、ならびにグリセロールもしくはソルビトールなどでコーティングした軟封入ゼラチン製カプセルを含む。押し込み式カプセルは、乳糖もしくはデンプンなどの賦形剤または結合剤、タルクもしくはステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤、および所望によれば安定化剤などと混合した有効成分を含み得る。軟カプセルにおいて、活性化合物を、安定化剤の存在下または不存在下

10

【0119】

非経口投与に適する医薬製剤は水溶液、好ましくは、ハックス溶液、リンガー溶液または生理緩衝食塩水などの生理的に適合する緩衝液中で製剤化され得る。水性注射懸濁液は、懸濁液の粘性を増す物質、例えば、ナトリウム・カルボキシメチルセルロース、ソルビトール、またはデキストランなどを含み得る。さらに、活性化合物の懸濁液は、適した油状注射懸濁液として調製され得る。適当な親油性溶媒またはビヒクルは、ゴマ油などの脂肪油、オレイン酸エチルもしくはトリグリセリドなどの合成脂肪酸エステル、またはリポソームを含む。非脂質ポリカチオンアミノポリマーは送達にも使用され得る。所望により

20

【0120】

局所または鼻腔投与用には、特定の障壁を通過させるのに適切な浸透剤を製剤において使用する。かかる浸透剤は一般に技術分野上既知である。

本発明の医薬組成物は、技術分野上既知の方法、例えば、常套の混合、溶解、顆粒化、糖衣製剤、溶離、懸濁化、被包形成、封じ込み、または凍結乾燥工程などによる技術分野上既知の方法により製造され得る。

【0121】

該医薬組成物は、塩として提供可能であり、例えば、限定されるものではないが、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸を含む多くの酸と一緒に形成され得る。塩は対応する遊離塩基の形状であるよりも、水性または他のプロトン性溶媒により可溶性となる傾向がある。他の事例にて好適な製剤は凍結乾燥粉末であり、以下のいずれかまたは全部を含有し得る：1～50 mMヒスチジン、0.1%～2%スクロース、および2～7%マンニトール、pH範囲4.5～5.5；これを使用前に緩衝液と組み合わせる。

30

【0122】

医薬組成物を調製した後、それを適した容器に入れ、適応症状の処置についてのラベルを貼付する。かかるラベルには、投与量、投与回数、および投与方法が含まれうる。

本発明での使用に適した医薬組成物とは、使用目的を達成するために有効な量の有効成分を含有する組成物である。有効用量の判断は当業者の能力内のことである。

40

【0123】

いずれの化合物についても、治療的有效用量は、例えば、腫瘍細胞の細胞培養分析において、または通常、マウス、ウサギ、イヌ、もしくはブタなどの動物モデルにおいて評価され得る。動物モデルは、適した投与濃度範囲および経路を判定するためにも使用され得る。かかる情報は、さらにヒトにおける有用な投与用量と経路を決定するために使用され得る。

【0124】

治療有効用量とは、症候または症状を改善する有効成分の量を示す。治療の有効性および毒性は、細胞培養または実験動物における標準的医薬手法により、例えば、ED50（母集団の50%に治療的に有効な用量）およびLD50（母集団の50%が死に至る用量

50

)として判定され得る。毒性作用と治療作用間の用量比が治療指数であり、LD50/ED50の比として表わされる。大きな治療指数を示す医薬組成物が好ましい。細胞培養分析と動物実験から得られるデータを、ヒトで使用する投与量範囲を公式化するために使用する。かかる組成物に含まれる投与量は、毒性がわずかであるかまたは毒性のないED50を含む循環濃度の範囲内であることが好ましい。投与量はこの範囲内で、採用する投与形態、患者の感受性、および投与経路によって変わる。

【0125】

正確な投与量は、処置を必要とする対象に関係する因子を考慮して医師が判定する。投与量と投与は、活性部分のレベルが十分となるように、または所望の作用を維持するように調整される。考慮すべき因子は、病状の重篤度、対象の全身の健康状態、対象の年齢、体重および性別、食事、投与時間と頻度、薬物の組合せ、反応感受性、および治療に対する耐性/応答を含む。長時間作用型医薬組成物を、3~4日ごとに1回、1週間ごとに1回、2週間ごとに1回投与するが、これは特定剤形の半減期およびクリアランス速度に左右される。

10

【0126】

通常の投与量は、投与経路にもよるが、総用量約1gまでとして、0.1~100,000マイクログラムで変わり得る。特定の投与量と送達方法に関する手引きは、文献に提供されており、また一般にその技術分野の医師が入手し得る。当業者はヌクレオチドについて、タンパク質またはそのインヒビターについてとは異なる剤形を採用することがある。同様に、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、特定の細胞、条件、部位などに特異的である。タンパク質の経口投与に適切な医薬製剤については、例えば、米国特許第5,008,114; 5,505,962; 5,641,515; 5,681,811; 5,700,486; 5,766,633; 5,792,451; 5,853,748; 5,972,387; 5,976,569; および6,051,561号公報に記載がある。

20

以下の実施例により本発明を説明するが、いかなる意味でもその範囲を限定するものではない。

【実施例】

【0127】

以下に示す実施例を実施するために以下の方法を採用する：

ハエ培養

ハエ(キイロショウジョウバエ; ブルーミントン・ストックセンターおよびセゲド・ストックセンター)を、すべて当業者の熟知する方法に従って、標準のトウモロコシ粉末餌で飼育する。すべての交配を、簡便な方法を用いて25°Cで実施する。平均体、または組換えを防止し、少なくとも1個の優性形態学的マーカーを担持する特別な染色体を使用し、CyO、TM3およびTM6Bを含める。使用したハエはすべて白色遺伝子座のw¹¹¹⁸突然変異体対立遺伝子を担持する。本明細書で言及していない突然変異および標準的ショウジョウバエ遺伝子の命名についてはすでに記載があり、当業者の熟知するところである(Lindsley, D. L., and Zimm, G. (1992). *The Genome of Drosophila melanogaster* (New York: Academic Press); <http://flybase.bio.indiana.edu>)。

30

【0128】

ハエ保存株

ey-Gal4株(「無眼-Gal4」ともいう)株は、ブルーミントン・ストックセンター(ブルーミントン、イリノイ)から入手する。この株において、酵母転写因子Gal4は、ハエの眼の前駆体細胞および成熟細胞にて発現する。UAS-Dp110^{D954A}およびUAS-PKB株を用いる(Leevers et al, *EMBO J.* 1996 Dec 2;15(23):6584-94; Staveley, et al. *Curr Biol.* 1998 May 7;8(10):599-602)。EP挿入株はブルーミントン・ストックセンターおよびセゲド・ストックセンターから入手する。

40

【0129】

ハエの遺伝子交配

ey-Gal4とUAS-Dp110^{D954A}導入遺伝子両方を有する組換え第二染色体

50

の生成につき、以下に記載する：w ; ey - Gal4 / CyO八工を、yw ; UAS - Dp1 1 0^{D 9 5 4 A}八工と交配する。遺伝子型w / y w ; ey - Gal4 / UAS - Dp1 1 0^{D 9 5 4 A}の未交配娘を、w / Y ; Sp / CyO ; MKRS, ry / TM2, ry オスと交配する。遺伝子型 w / Y ; ey - Gal4, UAS - Dp1 1 0^{D 9 5 4 A} / CyO ; MKRS, ry / TM2, ry / + をもつオスの子孫を、小眼表現型にもとづき選択し、w / w ; Sp / CyO ; MKRS, ry / TM2, ry 未交配のメスと交配し、w ; ey - Gal4, UAS - Dp1 1 0^{D 9 5 4 A} / CyO ; MKRS, ry / TM2, ry / + 保存株を確立する。

【0130】

X染色体EP挿入系統を用いる交配

X染色体EP挿入系統のスクリーニングに使用する交配につき、以下に記載する：X染色体EP挿入系統 (EP(X)) のオスを w ; ey - Gal4, UAS - Dp1 1 0^{D 9 5 4 A} / CyO ; MKRS, ry / TM2, ry / + のメスと交配する。遺伝子型EP(X) / w ; ey - Gal4, UAS - Dp1 1 0^{D 9 5 4 A} / + およびw / Y ; ey - Gal4, UAS - Dp1 1 0^{D 9 5 4 A} / + の成虫子孫を比較のために選択する。

【0131】

八工を、ツアイス製解剖顕微鏡 (カール・ツアイス・インク、ゾーンウッド、ニューヨーク) 下で検討する。少なくとも5匹のEP(X) / w ; ey - Gal4, UAS - Dp1 1 0^{D 9 5 4 A} / + 八工の眼について、少なくとも5匹のw / Y ; ey - Gal4, UAS - Dp1 1 0^{D 9 5 4 A} / + の眼と比較する (上記参照)。2群の八工の平均眼サイズが目視検査で有意に異なっているならば、EP(X)系統を有力な陽性株として選択する。次いで、多数の八工の眼サイズを測定することにより統計的解析を行う (下記参照)。

【0132】

第二染色体EP挿入系統を用いる交配

第二染色体EP挿入系統のスクリーニングに使用する交配につき、以下に記載する：第二染色体EP挿入系統 (EP(2)) のオスまたは未交配メスを w ; ey - Gal4, UAS - Dp1 1 0^{D 9 5 4 A} / CyO ; MKRS, ry / TM2, ry / + 未交配メスまたはオスと交配する。少なくとも5匹のey - Gal4, UAS - Dp1 1 0^{D 9 5 4 A} / CyOの子孫の八工の眼を、同じ性別の少なくとも5匹のey - Gal4, UAS - Dp1 1 0^{D 9 5 4 A} / EP(2)子孫八工の眼と比較する。EP(X)系統の場合と同じ基準を用いて有力な陽性EP(2)株を選択した。同様に統計解析を用いて陽性株を確認する。

【0133】

第三染色体EP挿入系統を用いる交配

第三染色体EP挿入系統のスクリーニングに使用する交配につき、以下に記載する：ストックセンターから入手したEP(3)を、TM3またはTM6B平均体により平均化する。第三染色体EP挿入系統 (EP(3)) のオスまたは未交配メスを w ; ey - Gal4, UAS - Dp1 1 0^{D 9 5 4 A} / CyO ; MKRS, ry / TM2, ry / + 未交配メスまたはオスと交配する。少なくとも5匹のey - Gal4, UAS - Dp1 1 0^{D 9 5 4 A} / + ; EP(3) / + の子孫の八工の眼を、同じ性別の少なくとも5匹のey - Gal4, UAS - Dp1 1 0^{D 9 5 4 A} / + ; 平均体 / + 子孫八工の眼と比較する。EP(X)系統の場合と同じ基準を用いて有力な陽性EP(3)株を選択した。同様に統計解析を用いて陽性株を証明する。

【0134】

八工眼サイズの統計解析

各それぞれの遺伝子型について、20匹の八工の眼をキャノンデジタルカメラ付きのツアイス解剖顕微鏡を使用して、写真を撮る (コダック・プロフェッショナルDCS520、イーストマン・コダック、ロチェスター、ニューヨーク)。画像処理はフォトショップ5.0ソフトウェアにより行う (アドベ・システムス・インコーポレーテッド、サンホセ、カリフォルニア)。眼のサイズを見積もるために (写真にもとづく二次元表面積)、眼は楕円形に近似させ、さらに眼の長軸 (a) と短軸 (b) の両方を測定する。眼のサイズは $((a + b) / 4)^2$ として計算する。学生t-検定 (片側二標本不等分散) を用いて、2つの遺伝子型の眼の平均サイズ間に統計的有意差 ($p < 0.05$) があるか

を試験する。t - 検定を適用する前に、眼のサイズのデータまたはその log 変換値をコルモゴロフ - スミルノフ (Kolmogorov - Smirnov) 試験を用いて正規性について試験する (Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. (1981) Biometry. W.H.Freeman and Company, New York. 716pp)。ウインドウズ版 2.03 用シグマスタット (SPSS インク、シカゴ、イリノイ) を眼のサイズの統計解析に使用する。EP(X) 挿入は X 染色体上にあるので、EP(X)/Y; +/+ x X/X; ey - Gal4, UAS - Dp110^{D954A} / 平均体は、遺伝子型 EP(X)/X; ey - Gal4, UAS - Dp110^{D954A} / + をもつが、内部比較に必要な遺伝子型 X/X; UAS - Dp110^{D954A} / + はもたない子孫を生じる。従って、外部 X/X; UAS - Dp110^{D954A} / + のハエを使用する (表 2 参照)。

【0135】

10

遺伝子分析法の開発

2つの確立された遺伝子技術を用いて、本明細書に記載のトランスジェニック・ショウジョウバエを創製する。その一つは遺伝子の組織特異的転写用の二成分 Gal4 / UAS システムである。このシステムでは、組織 X において酵母転写因子 Gal4 を発現するハエ株 (しばしば、Gal4 系統または Gal4 ドライバーという) を、遺伝子 Y に融合した Gal4 結合部位 UAS (上流活性化配列; upstream activation sequence) (UAS - Y) を有する導入遺伝子を担持するハエ株と交配する。従って、その子孫では遺伝子 Y が組織 X において特異的に発現する。

【0136】

使用したその他の遺伝的方法は、EP 因子突然変異誘発である (Rorth, P., et al. 1998 Development 125, 1049 - 57)。EP 因子は、一端に UAS 配列と基礎プロモーターを含む合成修飾 P 因子である。EP 因子は、しばしば遺伝子の 5' 端でショウジョウバエゲノムに任意に挿入され得る。EP 因子は UAS 配列と基礎プロモーターを含む唯一の末端をもち非対称であるため、近傍遺伝子上の EP 挿入の効果が挿入された EP 因子の配向の影響を受ける。EP 因子の UAS と基礎プロモーターを含む末端に隣接して位置する遺伝子は、しばしば GAL4 依存的に発現することが示されている。しかし、EP 挿入はまた近傍遺伝子のシス - エlement を破壊し、Gal4 非依存性様式でその発現に影響する。EP 挿入株の大型コレクションが公的に入手し得る (参照: www.fruitfly.org)。

20

【0137】

RNA レベルのリアルタイム PCR 解析

30

N6 ランダムプライマー (ロシュ・アプライド・サイエンス、インディアナポリス、インディ) を、逆転写反応に使用する。各転写単位のプライマー対とプローブは、アプライド・バイオシステムズ (フォスターシティ、カリフォルニア) から商品として入手可能である。リアルタイム PCR は、ABI プリズム 7700 配列検出システムを用いて製造業者 (アプライド・バイオシステムズ) の指図に従い実施する。25 μl の反応中、プライマー濃度は 0.2 pmol / μl であり、プローブ濃度は 0.1 μM である。サイクルは 50 で 2 分間、95 で 10 分間、次いで 95 で 15 秒、60 で 1 分間を 40 サイクルとする。データを、ABI プリズム 7700 配列検出システム (アプライド・バイオシステムズ) 用のユーザープレタン # 2 マニュアルに記載された相対標準曲線法を用いて解析する。RNA レベルはすべて常套の方法に従い、各サンプル中のリボソームタンパク質 rp49 遺伝子の内在性 RNA レベルを使用することにより正規化する。X 染色体 EP 系統株については、EP / + 未交配メスを hspGal4 / CyO オスと交配する。遺伝子型 EP / Y; hspGal4 / + のメスの子孫を集め、1 バイアルあたりハエ 10 匹を 8 バイアル作る。4 バイアルを 25 に維持し、4 バイアルを 6 サイクルの熱ショックに付し、各サイクルでの休息は 37 で 1 時間、および 25 で 3 時間とする。常套の方法を用い、総 RNA を、熱ショック後の各熱ショックバイアルおよび非熱ショックバイアルからのハエ 10 匹から調製する。遺伝子型 + / Y; hspGal4 / +、遺伝子型 EP / Y; + / CyO、遺伝子型 + / Y; + / CyO の子孫を同様に処理し、総 RNA を調製する。従って、各 EP 系統株の各転写分析単位について、以下のデータ表を得る (ただし、hs は熱ショックを示し、nhs は非熱ショックを示す) :

40

50

【表 1】

表 1 A

遺伝子型	熱ショック	転写単位のRNAレベル (平均値、正規化)
EP/Y;hspGal4/+	nhs	A
EP/Y;hspGal4/+	hs	A'
+/Y;hspGal4/+	nhs	B
+/Y;hspGal4/+	hs	B'
EP/Y; +/CyO	nhs	C
EP/Y; +/CyO	hs	C'
+/Y;+/CyO	nhs	D
+/Y;+/CyO	hs	D'

10

【0138】

ステューデントの t - 検定を用い、値 A と A' の間に統計的差があるかどうかを判定する。差がある場合、Gal4 と EP 間の相互作用を介して作用し得る熱ショック依存性効果があることを示している。熱ショック単独、Gal4 単独および EP 単独の独立した効果を補正するために、 $(A' / A) / ((B' / B + C' / C + D' / D) / 3)$ の比を決定し、転写単位 RNA レベルに対する EP の Gal4 依存性効果を示すために用いる (表 4、「Gal4 効果」の欄参照)。EP 挿入は、近傍転写単位のシス調節エレメントの機能を挿入点で破壊する。この挿入効果は Gal4 から独立している (表 4、「挿入効果」の欄参照)。この効果を判定するために、ステューデントの t - 検定を用い、値 C と D の間に統計的差があるかどうかを判定する。差が存在する場合、C / D 比は転写単位 RNA レベルに対する EP の挿入効果を示すために用いる。

20

【0139】

同じ方法を用いて、第二染色体と第三染色体 EP 細胞株を解析する。

実施例 1

初期遺伝子スクリーン

ショウジョウバエ・インスリンシグナル伝達経路に関与するタンパク質を同定するための遺伝子修飾因子スクリーンを基礎として容易に可視可能な成虫表現型を生成させるために、ハエの眼におけるこの経路機能の破壊を検討した。これは、(1) 眼がハエにとって本質的ではないこと、(2) 眼の表現型が容易にスコア化されること、また (3) 成長過程の眼のインスリンシグナル伝達を低下させると小眼表現型を生じること、を理由とする (Leevers, SJ et al, EMBO J. 1996 Dec 2;15(23):6584 - 94)。

30

【0140】

小眼表現型にもとづく遺伝子修飾因子スクリーンが機能するためには、該表現型が既知のインスリンシグナル伝達遺伝子の発現レベルを変化させることにより修飾し得るものでなければならないと、我々は理由付けた。これは我々が観察した事実である。小眼表現型は UAS - PKB 導入遺伝子経由、ショウジョウバエ PKB の過剰発現により抑制され、PI3K の下流で作用する。逆に、小眼表現型はまた、PTEN の過剰発現により増強され、PI3K にアンタゴニスト様に作用する (参照: Goberdhan, D. C. et al. (1999) Genes Dev 13, 3244 - 58.; Huang, H., et al., Development 126, 5365 - 72)。これらの結果は我々が EP 挿入株 (近傍遺伝子の GAL4 - 依存性過剰発現をしばしば引き起こす) を用いる遺伝子修飾因子スクリーンにより、インスリンシグナル伝達経路において新しい遺伝子を同定し得ることを証明している。これらの遺伝子は、インスリンシグナル伝達においてポジティブに作用するか (小眼表現型のサプレッサー)、あるいはネガティブに作用し得る (小眼表現型のエンハンサー)。

40

【0141】

我々は発育途上の眼に Gal4 を発現する ey - Gal4 導入遺伝子、および UAS - Dp1

50

10^{D954A} 導入遺伝子を用いることにより、ショウジョウバエ P I 3 K 触媒単位の優性ネガティブ型を発現させ得る (Hazelett, D. J., et al. (1998). Development 125, 3741 - 51.; Leever, S.J. et al., EMBO J. 1996 Dec 2;15(23):6584 - 94)。

【0142】

本明細書にて検討するように、ey - Gal4 および UAS - Dp110^{D954A} 導入遺伝子両方を含む染色体を担持するハエは、野生型対照のハエと比べて小さな眼をもつ。この小さな眼の浸透度が100%であることは、このインスリン経路において Dp110^{D954A} タンパク質の強力な阻害効果を示している。

【0143】

ショウジョウバエゲノムは約14,000個の予測遺伝子を含む (Adams et al., 2000 Science 287 2185 - 95)。これらの遺伝子は予測転写産物によって規定される (場合により転写単位または「セラ転写産物」(CTまたはCG)という;参照:www.Celera.com)。既知機能および予測される機能にもとづき、これらの遺伝子または転写単位は、異なる機能カテゴリーまたは「ビン(bin)」に分類される。公的に利用可能なEP株を解析すると、該株が483遺伝子(CT)の開始コドン(ATG)から上流に10Kbの距離内に挿入されたEP因子をもつ1536EP株であることが分かる。これらの遺伝子は、プロテインキナーゼ/ホスファターゼ、シグナル伝達分子、トランスポーター、リガンド結合タンパク質、転写因子、酵素およびその他のタイプの分子の機能的ビンに属する。機能的ビンカテゴリーは、セラ・ショウジョウバエ・ジャンボリー・リリース1 (Celera Drosophila Jamboree Release 1)にもとづく。

【0144】

初期スクリーンとして、プロテインキナーゼ/ホスファターゼまたはその相互作用因子をエンコードする68の予測遺伝子に隣接して挿入されたEP因子を有する112EP株を、ey - Gal4 UAS - Dp110^{D954A} 染色体と上記のように検討した成虫子孫の眼をもつハエに交配する。3種のEP株はDp110^{D954A}、EP(3)3553、EP(X)0382およびEP(3)3459が誘発する小眼表現型を抑制し得るものであり、それを以下に記載する:

【0145】

EP(3)3553 / PDK

統計解析が確認するのは、EP(3)3553がDp110^{D954A}のサプレッサーであることである。XX; ey - Gal4 UAS - Dp110^{D954A} / + ハエの眼の平均サイズは、 $8.39 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$ であり、一方その姉妹のXX; ey - Gal4 UAS - Dp110^{D954A} / + ; EP(3)3553 / + ハエの眼の平均サイズは、 $1.19 \times 10^{-1} \text{ mm}^2$ である。2つの平均には有意に差がある ($p < 0.001$ 、以降ステューデントのt-検定)。XY; ey - Gal4 UAS - Dp110^{D954A} / + ハエの眼の平均サイズは、その兄弟XY; ey - Gal4 UAS - Dp110^{D954A} / + ; EP(3)3553 / + ハエの平均サイズよりも小さい ($7.39 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$ 対 $9.29 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$ 、 $p < 0.001$)。これらの結果は、EP(3)3553がDp110^{D954A}を原因とする小眼表現型を抑制することを示す。下記表1参照。

【表 2】

表 1 : EP(3)3553 は Dp110^{D954A} を抑制する

1	2	3	4
遺伝子型 ^a	平均 ^b (眼サイズ mm ²)	S.D. ^c	n ^d
1 XX; ey-Gal4, UAS-Dp110 ^{D954A} /+; EP(3)3553/+	1.19×10 ⁻¹	1.43×10 ⁻²	20
2 XX; ey-Gal4, UAS-Dp110 ^{D954A} /+; +/+	8.39×10 ⁻²	1.60×10 ⁻²	20
3 XY; ey-Gal4, UAS-Dp110 ^{D954A} /+; EP(3)3553/+	9.20×10 ⁻²	1.02×10 ⁻²	20
4 XY; ey-Gal4, UAS-Dp110 ^{D954A} /+; +/+	7.39×10 ⁻²	1.18×10 ⁻²	20

10

a) 交配 X/Y;+/+; EP(3)3553/TM6B,Tb × XX; ey - Gal4, UAS - Dp110^{D954A}/Cy0; +/+ の略記子孫表現型。TM6BおよびCy0は平均体染色体である(上記方法の項参照)。

b) スチューデントの t - 検定は行 1 と行 2 の平均が p < 0.001 の有意なレベルで異なることを示し、行 3 および行 4 の平均は p < 0.001 の有意なレベルで異なることを示す。

c) S.D. は標準偏差を表す。

d) 測定した眼の総数。

【0146】

EP(3)3553 は第三染色体上、ショウジョウバエ遺伝子 Pk61C の 5' 末端非コード配列に挿入された EP 因子を有するが、この八工は哺乳動物の PDK1 のオーソログである(ジェンバンク受託番号 NM_002613)(<http://flybase.bio.indiana.edu>)。Pk61C は、EP(3)3553 挿入部位の両側の 10 Kb 領域内に見出される唯一の遺伝子である。EP(3)3553 因子に対する Pk61C 遺伝子の相対位置は、Pk61C の 5' 末端が EP(3)3553 因子の UAS 含有末端近位となるような位置である(<http://flybase.bio.indiana.edu>)。従って、GAL4 がショウジョウバエ PDK1 の発現を誘発すると期待される。PDK1 はインスリンシグナル伝達経路において PI3K の下流で作用することが知られているので、PDK1 の過剰発現が Dp110^{D954A} 誘発表現型を抑制すると予測される。従って、インスリンシグナル伝達経路に PDK1 が関与するとすれば、Dp110^{D954A} 誘発小眼表現型のサプレッサーとしての EP(3)3553 の同定は、我々の遺伝子スクリーンをインスリン経路に関する分子の同定に使用し得ることを、強く示唆する。

20

30

【0147】

EP(X)0382 / SHP - 2

統計的解析では、EP(X)0382 が Dp110^{D954A} 過剰発現により誘発される小眼表現型を有意に抑制することも確認する。EP(X)0382 / X; ey - Gal4, UAS - Dp110^{D954A} / + 八工の眼の平均サイズ(1.04 × 10⁻¹ mm²)は、X; ey - Gal4, UAS - Dp110^{D954A} / + 八工の平均サイズ(9.05 × 10⁻² mm²; p < 0.0001)よりも有意に大きく、EP(X)0382 が Dp110^{D954A} の機能を抑制することを示している。下記表 2 参照。

40

【表 3】

表 2 : EP(X)0382はDp110^{D954A}を抑制する

1	2	3	4	5
遺伝子型 ^a	平均 (眼サイズ mm ²)	平均 ^b (補正眼サイズ; mm ²)	S. D. ^c	n
1 XX; ey-Gal4, UAS-Dp110 ^{D954A} /+	9.05×10 ⁻²	9.05×10 ⁻²	1.06×10 ⁻²	20
2 XY; ey-Gal4, UAS-Dp110 ^{D954A} /+	7.24×10 ⁻²	7.24×10 ⁻²	1.04×10 ⁻²	20
3 EP(X)0382/X; ey-Gal4, UAS-Dp110 ^{D954A} /+	1.06×10 ⁻¹	1.04×10 ⁻¹	9.72×10 ⁻³	20
4 XY; ey-Gal4, UAS-Dp110 ^{D954A} /+	7.38×10 ⁻²	7.24×10 ⁻²	9.87×10 ⁻³	20

10

a) 行 1 および 2 は、ストック w / Y ; ey - Gal4 , U A S - D p 1 1 0 ^{D 9 5 4 A} / C y O の略記表現型を示す。行 3 ~ 4 は、交配 EP(X)0382 / Y ; + / + x w / w ; ey - Gal4 , U A S - D p 1 1 0 ^{D 9 5 4 A} / C y O の略記子孫表現型を示す。CyO は平均体染色体である (上記方法の項参照)。

b) 行 1 ~ 2 のハエは同胞である。行 3 ~ 4 のハエは同胞である。しかし、行 1 ~ 2 のハエは行 3 ~ 4 の同胞ではない。従って、彼らは眼の大きさを含め、身体の大きさに影響する幾分異なる成長条件を経験しているはずである。従って、それらの間で意味のある眼のサイズの比較のために、行 3 ~ 4 の測定した眼のサイズは、共通の表現型 XY ; ey - Gal4 , U A S - D p 1 1 0 ^{D 9 5 4 A} / + (行 2、欄 1 ; 行 4、欄 1) のハエは同じ平均眼サイズをもつべきであるという仮定にもとづき補正する。行 3 ~ 4 で測定した 20 個の眼のそれぞれを、ファクター 0.981 により補正する (7.24 × 10⁻² / 7.38 × 10⁻²、欄 3 参照)。この欄は補正した眼サイズの平均を示す。ステューデントの t - 検定は行 1 と行 3 の平均が p < 0.001 の有意レベルで異なることを示す。

20

c) 標準偏差は補正した眼サイズにもとづく。

【0148】

EP(X)0382 株は X 染色体上、ショウジョウバエ遺伝子コルクスクリュウ (csw) (ヒトタンパク質チロシンホスファターゼ SHP - 2 遺伝子のハエオースログである) (ジェンバンク受託番号 NM__002834) の 5' 末端に挿入された EP 因子を有する。挿入部位は csw cDNA (ジェンバンク受託番号 U19909 ; www.fruitfly.org) の開始部位の 201ヌクレオチド上流である。EP(X)0382 因子に対する csw 遺伝子の相対位置は、csw の 5' 末端が EP(X)0382 因子の非 UAS 含有末端に近位となるような位置である。EP(X)0382 挿入部位の他の側の 10 Kb 領域内に見出される他の遺伝子はない。定量的リアルタイム RT - PCR を用い、csw RNA レベルに対する EP の作用は分析のレベルで検出可能であった。

30

【0149】

SHP - 2 および csw は、PDGF レセプターおよび EDG レセプターの関与する経路など、レセプターチロシンキナーゼシグナル伝達経路においてポジティブな役割を演じることが示されている (Allard et al., (1996). Development 122, 1137 - 46; Bennett, A. M., et al. (1994). Proc Natl Acad Sci U S A 91, 7335 - 9; Feng, G. S. et al. (1993) Science 259, 1607 - 11; Perkins, L. A., et al., (1996). Dev Biol 180, 63 - 81; Vogel, W., et al. 1993 Science 259, 1611 - 4; .Xiao, S., et al. (1994) J Biol Chem 269, 21244 - 8)。

40

【0150】

SHP - 2 はまたインスリンシグナル伝達に関わっているが、しかし、それがポジティブの役割を果たしているのか、ネガティブの役割を果たしているのかは現在未知である (Kharitononkov, A. et al., (1995). J Biol Chem 270, 29189 - 93; Maegawa, H., et al. (1999) J Biol Chem 274, 30236 - 43.; Myers, M. G., et al. (1998) J Biol Chem 273, 26908 - 14; Ugi, S., et al. J Biol Chem 271, 12595 - 602)。

50

【0151】

SHP-2は哺乳動物のインスリンシグナル伝達経路において既知遺伝子であるため、それは本明細書に開示した修飾因子スクリーンを用いて、ヒト糖尿病に関連する分子の同定に使用し得ることを示唆している。

【0152】

EP(3)3459 / KIAA0336

EP(3)3459によるDp110^{D954A}誘発小眼表現型の抑制は統計的に有意である。XXおよびXYハエ両方において、EP(3)3459挿入の存在は、ey-Gal4, UAS-Dp110^{D954A} / +ハエの眼の平均サイズを増加させる (XXハエ: $9.71 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$ 対 $9.09 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$ 、 $p < 0.05$; XYハエ: $8.10 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$ 対 $7.13 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$ 、 $p < 0.003$)。以下の表3参照。

【表4】

表3: EP(3)3459はDp110^{D954A}を抑制する

1	2	3	4
遺伝子型 ^a	平均 ^b (眼サイズ; mm ²)	S.D.	n
1 XX; ey-Gal4, UAS-Dp110 ^{D954A} /+; EP(3)3459/+	9.71×10^{-2}	1.14×10^{-2}	20
2 XX; ey-Gal4, UAS-Dp110 ^{D954A} /+; +/+	9.09×10^{-2}	1.10×10^{-2}	20
3 XY; ey-Gal4, UAS-Dp110 ^{D954A} /+; EP(3)3459/+	8.10×10^{-2}	8.75×10^{-3}	20
4 XY; ey-Gal4, UAS-Dp110 ^{D954A} /+; +/+	7.13×10^{-2}	1.03×10^{-2}	20

a) 交配X/Y; +/+; EP(3)3459/TM6B,Sb,Tb x X/X; ey-Gal4, UAS-Dp110D954A/Cy0; +/+の略記子孫遺伝子型。TM6BおよびCy0は平均体染色体である(上記方法の項参照)。

b) スチューデントのt-検定は行1と行2の平均が $p < 0.05$ の有意レベルで異なることを示す。行3と行4の平均は $p < 0.003$ の有意レベルで異なる。

【0153】

EP(3)3459株は第三染色体上、ショウジョウバエ・カゼインキナーゼII-アルファ・サブユニット相互作用因子-3 (CKII- ϵ -i3、ジェンバンク受託番号AF090440)の5'末端から上流の約5Kbに挿入されたEP因子を有する。CKII- ϵ -i3の5'末端はEP(3)3459因子の非-UAS-含有末端近位にある。EP(3)3459挿入部位の他の側には、10Kb領域内に遺伝子は認められなかった。定量的RT-PCR(タックマン; Taqman)実験によると、このEP因子はCKII- ϵ -i3の4倍の発現喪失を引き起こすことを示す。

CKII- ϵ -i3のヒト相同体はヒトKIAA0336遺伝子であると思われる(ジェンバンク受託番号AB002334)(Nagase, T., et al. (1997) DNA Res 4, 141-50)。

【0154】

KIAA0336遺伝子は1583個のアミノ酸からなるタンパク質をエンコードするが、既知の機能はもたない。KIAA0336を規定するcDNAは脳組織由来であった。KIAA0336遺伝子はすべての組織範疇で発現されるが、ライフセック(LifeSeq)(登録商標)ゴールド5.1にもとづく顎口腔系は例外である。血液系および免疫系から配列決定されたcDNAクローン総数の中で、KIAA0336遺伝子由来cDNAクローンの百分比により判定されるように、それは血液系および免疫系において最高の発現を示す。顎口腔系ライブラリーにおけるKIAA0336遺伝子由来cDNAクローンの明白な欠如は、血液系および免疫系のライブラリーからの648,215の配列決定クローンと比較して、顎口腔系ライブラリーから配列決定したcDNAクローン(10,988)がより少数であることによるものである。

【0155】

CkII - i3 はCKII サブユニットとのツーハイブリッド相互作用を介して同定された（参照：ジェンバンク注釈、ジェンバンク受託番号AF090440）。これはCKIIコンセンサスリン酸化部位をもつ推定核タンパク質をエンコードする。CkII - i3の機能は報告されていないが、CKIIインヒビターが核抽出物のインスリン誘発DNA-結合活性を遮断し、CKIIサブユニットがインビトロでインスリンレセプター基質-1（IRS-1）と相互作用するというを示すデータにもとづくと、CKIIはインスリンシグナル伝達経路に関わっていると思われる（Kim, S. J., and Kahn, C. R. (1997) Biochem J 323, 621-7.; Li et al., 1999）。ここで期待されることは、ヒトCkII - i3のオーソログであるKIAA0336が、インスリンシグナル伝達経路において役割を果たし、それがそのままインスリンシグナル伝達経路の調節異常と関係する病的症状を処置、予防または改善するための治療薬開発の適切な薬物標的であることである。

10

【0156】

このように、我々は発育途上の眼においてショウジョウバエ・ホスホイノシチド3-キナーゼ（PI3K）の優性ネガティブ形状を発現させた。その結果、成虫のハエでは小眼の表現型を生じる。小眼表現型は、インスリンシグナル伝達経路においてPI3Kの下流で作用するプロテインキナーゼB（PKB）の過剰発現により抑制される（Lasko, P. Clin Genet. 2002 Nov;62(5):358-67）が、このことは小眼表現型が遺伝子修飾因子のスクリーン用分析として使用し得ることを示唆している。我々の研究では、小眼表現型を抑制する3つの突然変異を同定した。1つの突然変異は3'-ホスホイノシチド依存性キナーゼ1遺伝子（PK1）のショウジョウバエ・オーソログに関連がある。もう一つの突然変異はタンパク質チロシンホスファターゼSHP-2遺伝子のショウジョウバエ・オーソログに関連がある。PK1およびSHP-2はともに、哺乳動物のインスリンシグナル伝達経路における既知遺伝子であり、そのスクリーンがヒトの糖尿病に関係する分子を同定し得ることを示唆している。第三の突然変異はショウジョウバエ遺伝子CkII - i3に関連があり、そのヒトのオーソログはKIAA0336である。

20

【0157】

実施例2

タンパク質の同定

上記の方法を用い、インスリンシグナル伝達経路において役割を果たすと思われるタンパク質を同定した。下記表4にそれらの遺伝子とそのヒト相同体（「ベストhu」の欄に掲載）（ならびに上で検討したKIAA0336）を示す。遺伝子スクリーンではサプレッサーを同定し、それを抑制の強度に対応して分別した；S1は最強、S4は最弱を示し、NDは未判定を示す。

30

【表5】

表4：修飾因子

遺伝子	EP	メス	オス	セレラ・転写体	Ga14- 効果	挿入体 効果	ベスト hu	ベストhuブラ ストpE 値	
FMR2 タンパク質	EP(2)2172	S1	S1	CG8817(lilli)	no	0.53x	NM_002025	1.E-14	
スクレトシホスファターゼ (ER-UDPase)	EP(2)2172	S1	S1	CT10292	2.2x	0.79x			
イソトヘキサキスリン酸キナーゼ3	EP(2)2440	S1	S1	CT28369	2.7x	0.60x	NM_054111	5.E-39	10
RNA ホリメラーゼ I 16Kd サブユニット	EP(2)2483	S2	S1	CT29944/CG10685	70x	1.34x			
脳腫瘍	EP(2)2483	S2	S1	CG10719			NM_033279.1	5.E-37	
ニューロキニン 3	EP(2)2615	S1	S1	CT12983	5.5x	no	NM_018977	7.E-68	
網膜芽腫結合タンパク質 5	EP(3)3121	S1	S1	CT17654	35x	1.9x	<u>NM_005057.1</u>	0.E+00	
ホリホフチ鎖放出因子 1	EP(3)3121	S1	S1	CT17696	no	0.78x			
システインリンゲチン酸質 (CSP)	EP(3)3141	S1	S2	CT19114	no	0.5x	S70516	7.E-40	
仮定タンパク質	EP(3)3141	S1	S2	CT36401	13x	no	NM_016472	6.E-10	
転写因子 ADF-1 (ADH 遠位因子1)	EP(3)3354	S1	S1	CT16251	36x	no	none		20
膜タンパク質 TMS-2	EP(3)3355	S1	S1	CT15063	7x	no	<u>AB033079.1</u>	6.E-90	
未知	EP(3)3355	S1	S1	CT14836	no	0.05x	XM_046613.1	4.E-22	
				(軸索連結不可)					
3-ホスフィリノ依存性プロテインキナーゼ-1	EP(3)3553	S1	S1	CT42509	140x				
仮定タンパク質	EP(3)3628	S1	S1	CT5336	10x	no	<u>NM_015343.1</u>	6.E-37	
SH3 ドメイン含有タンパク質 SH3d19	EP(3)3634	S1	S1	CT22037	2.4x	no	XM_037453	1.E-12	
ホリ (rC)-結合タンパク質 3	EP(3)3638	S1	S2	contig_4403_1			NM_020528.1	1.E-76	
核 RNA-会合タンパク質アルファ	EP(3)3652	S1	S2	CT37030			NM_022917	1.E-98	30

【表 6】

カセインキナーゼ I, カンマ 3	EP(3)3852	S1	S2	gish				NM_004384.1	1.E-170
アシルコリンエステラーゼ A テーヒト"ロゲ"ナーゼ", 短鎖/分枝鎖前駆体 (ACADSB)	EP(3)3880	S2	S1	CT12987	no	0.80x		NM_001809	1.E-142
リボソームタンパク質L28	EP(3)3880	S2	S1	CT21207	1.6x	no			
ミトコンドリア脂肪酸"標的"アミノ酸 1	EP(3)3723	S1	S1	CT18415	4.5x	no		NM_002480	8.E-73
GP1 トランスミグ"ナーゼ"	EP(X)0427	S1	S1	CT14360	24x	1.8x		XM_039844	1.E-118
不良 hu/mo 相同体	EP(X)0427	S1	S1	CT14236	no	no			
マウス・ブレイク"ロゲ"ナーゼ B	EP(X)1101	S2	S1	CT30795	no	0.54x		NM_001908.1	1.E-106
不良 hu/mo 相同体	EP(X)1101	S2	S1	CT31077	7.8x	no			
乱髪様キナーゼ 2/SNAPE	EP(X)1413	S1	S1	CG2829/CG12482				NM_008852.1	1.E-148
ブ"ロゲ"ナーゼ SNAK									
CK11-7/7A-13 (K1AA0336)	EP(3)3459	S5	S5	CG3217	no	0.26x		AB002334	2.3E-6
ク"リコ"ニン・ク"ルコシルトランスフェラーゼ"活性	EP(2)2045	S2	S2	CG9480	ND	ND		NM_004130.2	3.00E-93
CO モノオキシゲ"ナーゼ"	EP(2)2389	S2	S2	CG8776	ND	ND		NM_024843.2	9.00E-26
CO モノオキシゲ"ナーゼ"	EP(2)2389	S2	S2	CG8788	ND	ND		NM_020185.1	2.00E-57
Na-K 輸送体	EP(2)2454	S1-2	S2	CG8258	ND	ND		NM_001677.1	2.00E-33
DNA結合タンパク質トランスクリプター"ナーゼ"	EP(3)3097	S2	S2	CG7187	ND	ND		NM_018070.2	5.00E-47
DNA結合タンパク質トランスクリプター"ナーゼ"	EP(3)3097	S2	S2	CG7985	ND	ND		NM_173620.1	1.00E-43
シャペロン活性	EP(3)3141	S1	S2	CG8395	ND	ND		NM_173650.1	3.00E-25
ヒ"キチン"特異"プロテ"ナーゼ"	EP(3)3187	S2	S3	CG5488	ND	ND		NM_017944.2	1.00E-144
SH3/SH2 ア"ファ"クタータンパク質	EP(3)3474	S3	S2	CG31163	ND	ND		NM_015278.1	3.00E-31
SAM,ホ"インテ"ト"メイン									
カセインキナーゼ I, カンマ 3 活性	EP(3)3852	S1	S2	CG8983	ND	ND		NM_004384.1	1.00E-170

10

20

【表7】

アシルCoA テンヒトログナーゼ	EP(3)3660	S2	S1	CG3902	ND	ND	NM_001609.1	1.00E-141	
ヘキソキナーゼ・リソホスファチシン酸 アシルトランスフェラーゼ	EP(X)0352	S1-2	S2	CG3001	ND	ND	NM_000189.3	1.00E-119	
ヘキソキナーゼ・リソホスファチシン酸 アシルトランスフェラーゼ	EP(X)0352	S1-2	S2	CG32699	ND	ND	NM_017839.1	2.00E-68	
カルホキシヘプタチターゼ H	EP(X)0356	S2	S2	CG4122	ND	ND	NM_001304.3	0	
sec. 輸送膜タンパク質アテノ シルホモスティナーゼ	EP(X)1007	S3	S2	CG9195	ND	ND	NM_004866.2	1.00E-64	10
sec. 輸送膜タンパク質アテノ シルホモスティナーゼ	EP(X)1007	S3	S2	CG11654	ND	ND	NM_000687.1	0	
a/b ヒドロラーゼ	EP(X)1101	S2	S1	CG33174	ND	ND	NM_006133.1	0	
遺伝子	EP	メス	オス	セレー・転写体	Ga14-	挿入体	ベスト hu	ベストhuプラス トP E 値	
FMR2 プロテイン	EP(2)2172	S1	S1	CG8817(lilili)	no	0.53x	NM_002025	1.E-14	
スクレオシトシホスファターゼ (ER-UDPアーゼ)	EP(2)2172	S1	S1	CT10292	2.2x	0.79x			20
イノシトル・ヘクスキリン酸キナーゼ 3	EP(2)2440	S1	S1	CT28369	2.7x	0.60x	NM_054111	5.E-39	
RNA ホリメラーゼ I 16Kd サブユニット	EP(2)2483	S2	S1	CT29944/CG10685	70x	1.34x			
脳腫瘍	EP(2)2483	S2	S1	CG10719			NM_033279.1	5.E-37	
ニューロリギン 3	EP(2)2615	S1	S1	CT12983	5.5x	no	NM_018977	7.E-68	
網膜芽腫結合タンパク質 5	EP(3)3121	S1	S1	CT17654	35x	1.9x	<u>NM_005057.1</u>	0.E+00	
ホルパチド鎖放出因子 1	EP(3)3121	S1	S1	CT17696	no	0.78x			
システインリンケタンパク質 (CSP)	EP(3)3141	S1	S2	CT19114	no	0.5x	S70516	7.E-40	
仮定タンパク質	EP(3)3141	S1	S2	CT36401	13x	no	NM_016472	6.E-10	
転写因子 ADF-1 (ADH 遠位因子1)	EP(3)3354	S1	S1	CT16251	36x	no	none		30
膜タンパク質 TMS-2	EP(3)3355	S1	S1	CT15063	7x	no	<u>AB033079.1</u>	6.E-90	
未知	EP(3)3355	S1	S1	CT14836	no	0.05x	XM_046613.1	4.E-22	
				(軸索連結不可)					
3-ホスホイノシトリン依存性プロテインキナーゼ-1	EP(3)3553	S1	S1	CT42509	140x				
仮定タンパク質	EP(3)3628	S1	S1	CT5336	10x	no	<u>NM_015343.1</u>	6.E-37	
SH3 ドメイン含有タンパク質 SH3d19	EP(3)3634	S1	S1	CT22037	2.4x	no	XM_037453	1.E-12	
ホリ (rC)-結合タンパク質 3	EP(3)3638	S1	S2	contig_4403_1			NM_020528.1	1.E-76	40
核 RNA-会合タンパク質アルファ	EP(3)3652	S1	S2	CT37030			NM_022917	1.E-98	
カゼインキナーゼ I, ガンマ 3	EP(3)3652	S1	S2	gish			<u>NM_004384.1</u>	1.E-170	
アシルCoA テンヒトログナーゼ, 短鎖/分枝鎖前駆体 (ACADSB)	EP(3)3660	S2	S1	CT12987	no	0.60x	NM_001609	1.E-142	

【表 8】

リホソームタンパク質L26	EP(3)3660	S2	S1	CT21207	1.6x	no		
ミトコンドリアタンパク質標的サブユニット1	EP(3)3723	S1	S1	CT18415	4.5x	no	NM_002480	8.E-73
GPI トランスミターゼ	EP(X)0427	S1	S1	CT14360	24x	1.6x	XM_039644	1.E-118
不良 hu/mo 相同体	EP(X)0427	S1	S1	CT14236	no	no		
マウス・プロテオロガフィンB	EP(X)1101	S2	S1	CT30795	no	0.54x	<u>NM_001908.1</u>	1.E-106
不良 hu/mo 相同体	EP(X)1101	S2	S1	CT31077	7.8x	no		
乱髪様キナーゼ2/SNARE プロテインキナーゼ	EP(X)1413	S1	S1	CG2829/CG12462			NM_006852.1	1.E-146
SNAK								
CKII-アルファ-i3 (KIAA0336)	EP(3)3459	S5	S5	CG3217	no	0.26x	AB002334	2.3E-6

10

【0158】

タンパク質（表4に掲載の遺伝子）（すなわち、「修飾因子遺伝子」）がインスリンシグナル伝達と代謝に関与していることを証明するために、修飾因子遺伝子の摂動がインスリン応答配列（IRS）制御レポーター遺伝子の発現レベルに変化を起こすかどうか、検討することができる。インスリンシグナル伝達経路を活性化すると、インスリン応答配列に結合するフォークヘッド転写因子が阻害されることが知られている。従って、修飾因子によるインスリンシグナル伝達レベルの変化は、IRS制御遺伝子の発現レベルの変化につながる可能性がある。さらに、インスリンシグナル伝達経路はグルコースと脂質の代謝を制御するので、修飾因子遺伝子の摂動がハエのグリコーゲンまたは脂質の変化を起こすかどうか検討することができる。

20

【0159】

インスリンシグナル伝達経路を活性化する遺伝子およびそれを抑制する遺伝子の両方を同定するために、遺伝子スクリーンを設計する。しかし、インスリンシグナル伝達経路を刺激することが糖尿病の処置に必要であるため、インスリンシグナル伝達を正常に阻害する遺伝子が好適な薬物目標となり得る。

【0160】

実施例3

抑制修飾スクリーン

ハエのPI3Kの優性ネガティブ型により誘発される優性表現型（以後、Dp110^D_Nと記載）にもとづく、上に検討した遺伝子スクリーンに加えて、インスリンシグナル伝達経路においてさらに既知の遺伝子、PTEN、ISPのネガティブレギュレーターを用いて、同様の遺伝子スクリーニング法を開発することもできる。

30

【0161】

眼の発育途上におけるPTENの過剰発現もまた小眼表現型の原因となり、眼のDp110^D_Nの過剰発現に続いて観察される眼の表現型は、PTENの過剰発現によりさらに強調される。この二重突然変異トランスジェニックハエの保存株は、Dp110^D_NとPTENの両方を過剰発現し得るものであり、tub:Gal80導入遺伝子の存在下に維持される。この導入遺伝子からのGal80の構成性発現はGal4タンパク質に結合して、Gal4を介する転写活性を遮断する。これが結局ISP成分の過剰発現と関連する生存度の低下を回復させる遺伝子修飾因子の蓄積を停止させる。

40

【0162】

この2つの表現型の相加効果にもとづき、サブレッサースクリーンを確立し得る。増強された小眼表現型はスクリーンにより適合し、機能喪失突然変異に対するヘテロ接合性と関連する遺伝子産物の2倍の減少は、顕著な表現型の抑制、すなわち、Dp110^D_NとPTENの両方の同時過剰発現から生じる感作ISP表現型に関し、ハプロ不足となる挿入突然変異を生じることとなる。

【0163】

50

公的に入手可能な P 因子突然変異の解析によると、2000 を超える P 因子挿入が遺伝子産物発現を停止させる遺伝子領域内に存在することが分かる。これら P 因子の一つを含むハエの保存株は、遺伝子発現を 50% 低下させると言われる。選抜した P 因子は 2 つのタイプのものである。P 因子の第一のタイプはミニホワイト遺伝子 (mw) を含み、ホワイト 1118 バックグランドに発現された場合に赤い眼の表現型を生じる。P 因子の第二のタイプはミニローズ遺伝子 (rw) を含み、ホワイトプラスとローズマイナスバックグランドで発現された場合、ばら色の眼の表現型を生じる。eyGal4、UAS Dp110^D^N、UASPTEN、および tubGal80 を含むハエ保存株は、P 因子が導入されたときに証拠となり得るように 2 つのバックグランド内に含めなければならない。

【0164】

組換え保存株の創製

eyGal4、UAS Dp110^D^N、および UASPTEN 導入遺伝子はすべて第二染色体上にあり、図 1 に示すように共に組み換えられ得る。w; eyGal4, UAS - Dp110^D⁹⁵⁴^A / CyO; MKRS, ry / TM2, ry / + 保存株の創製についてはすでに記載した。次いで、この保存株を、標準のショウジョウバエ遺伝的方法を用いてホワイト 1118 バックグランドならびにローズマイナスバックグランド中の UAS - PTEN と組み換えた。

【0165】

tub - Gal80 の導入

tub - Gal80 はブルーミントン・ストックセンター経由で公的に入手し得る。利用し得る導入遺伝子突然変異体は X 染色体上にある。導入遺伝子を、標準のショウジョウバエ遺伝子転移交配法を用いて、CyO 平均体染色体上の新しい位置に転置する。次いで、tub - Gal80 CyO をホワイト 1118 バックグランドならびにローズマイナスバックグランド中に入れ、Sco 第二平均体染色体に平均化する。次いで、tub - Gal80 CyO 保存株を eyGal4, UAS Dp110^D^N, UASPTEN / CyO 保存株と交配させ、eyGal4, UAS Dp110^D^N, UASPTEN / tub - Gal80 CyO を創製する。これらはホワイト 1118 バックグランドならびにローズマイナスバックグランド中で実施する。

【0166】

X 染色体ホモ接合致死性 P 因子挿入のスクリーンのためのハエの交配を図 2 に示す。

第二染色体ホモ接合致死性 P 因子挿入のスクリーンのためのハエの交配を図 3 に示す。

第三染色体ホモ接合致死性 P 因子挿入のスクリーンのためのハエの交配を図 4 に示す。

【0167】

実施例 4

さらなるタンパク質の同定

上記の方法を用い、インスリンシグナル伝達経路に役割を果たすと思われるさらなるタンパク質を同定した。以下の P 因子挿入は、Dp110^D^N および PTEN の過剰発現を原因とする小眼表現型に抑制効果を示した。これらの遺伝子およびそのヒト相同体を以下の表 5 に示す。

10

20

30

【表 9】

表 5 : 修飾因子

ハエ 遺伝子	機能	P 因子	CG	ヒト 相同体	ヒト名称	プラス e 値
CG9187	未知	10156	CG9187	NM_021067	KIAA0188 遺伝子産物	1.60E-45
Sac1	ホスホイリシト ⁶ ・ホスファ ターゼ ⁶ Dsacl	10156	CG9128	NM_014016	アクチン 1 サブレッサー 1	4.90E-115
Gprk2	G プロテイン結合レセ プター キナーゼ ²	10351	CG17998	NM_005308	G プロテイン結合レセプター ・キナーゼ ⁵	3.30E-91
mei-P19	未知	11592	CG9924	NM_003563	小斑点型 POZ プロテイン	4.40E-126
CG7134	タンパク質チロシン/セリン /スレオニンホスファターゼ ⁶	12038	CG7134	NM_033313	CDC14 同族体 A	5.60E-64
プリンジ ⁶	アセチルグルコサミドトラン スフェラーゼ ⁶ ; トランスフェ ラーゼ ⁶ ; グリコシル基転 移; UDP-グルコシルト ランスフェラーゼ ⁶	12109	CG10580	NM_002405	マニックプリンジ ⁶ 相同体	5.60E-49
CG31132	未知	12155	CG31132	NM_017934	フレクストリン相同ドメイン 相互作用 タンパク質	1.40E-55
アリアト ⁶ ネ2	ユビキチン-プロテイン リカラーゼ ⁶	12341	CG5709	NM_006321	アリアト ⁶ ネ相同体 2 全トラ ンス-レチノイン酸誘発性 リンケ ⁶ フィンガー	3.90E-83
CG5429	未知	11487	CG5429	NM_003766	ヘクリン 1	1.30E-55
CG5991	ホスファチジルセリン テ ⁶ カルホ ⁶ キシラーゼ ⁶	11487	CG5991	NM_014338	ホスファチジルセリン テ ⁶ カルホ ⁶ キシラーゼ ⁶	1.80E-47
CG5261	ジ ⁶ ヒト ⁶ ロリホ ⁶ アミト ⁶ S- アセチルトランスフェラーゼ ⁶	12171	CG5261	NM_001931	ジ ⁶ ヒト ⁶ ロリホ ⁶ アミト ⁶ S-アセチ ルトランスフェラーゼ ⁶	4.10E-37

10

20

30

【 0 1 6 8 】

実施例 6

さらなる修飾因子スクリーン

ハエ P I 3 K の優性ネガティブ形状が誘発する優性表現型にもとづく、上に検討した遺伝子スクリーンに加えて、インスリンシグナル伝達経路における他の既知遺伝子を用い、新規遺伝子スクリーニング法を開発し得る。上記のごときスクリーンは「選択」にもとづくスクリーンであるため、取分け望ましい。さらに、蛍光レポーターにもとづく遺伝子スクリーンをも使用し得る。この方法の利点はそれが高処理能力自動化に適用し得ることである。例えば、インスリン経路が F K H R 型のフォークヘッド転写因子の活性を制御することは既知である。蛍光レポーターを、蛍光マーカー発現を制御するためにフォークヘッド結合部位を用いて作製することができる。蛍光ショウジョウバエ幼虫ソーターで選抜したこのレポーターを担持するハエは、インスリン経路において新規の遺伝子を同定するための効率的なシステムとなる。

40

50

【図面の簡単な説明】

【0169】

【図1】図1は、ショウジョウバエ導入遺伝子のeyGal4、UAS、Dp110^{DN}およびUASPTEN交配の図式である。

【図2】図2は、X染色体致死P因子挿入システムをスクリーニングするために使用する交配の図式である。

【図3】図3は、第二染色体致死P因子挿入システムをスクリーニングするために使用する交配の図式である。

【図4】図4は、第三染色体致死P因子挿入システムをスクリーニングするために使用する交配の図式である。

【図1】

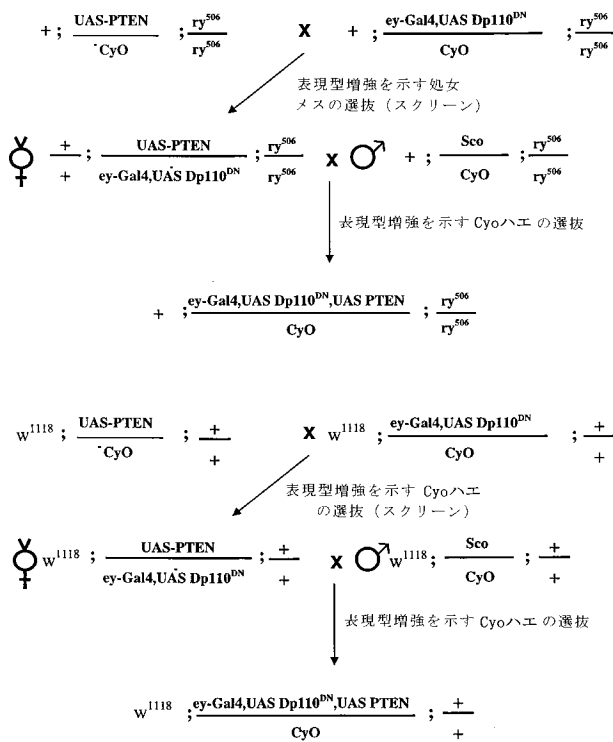


FIGURE 1

【図2】

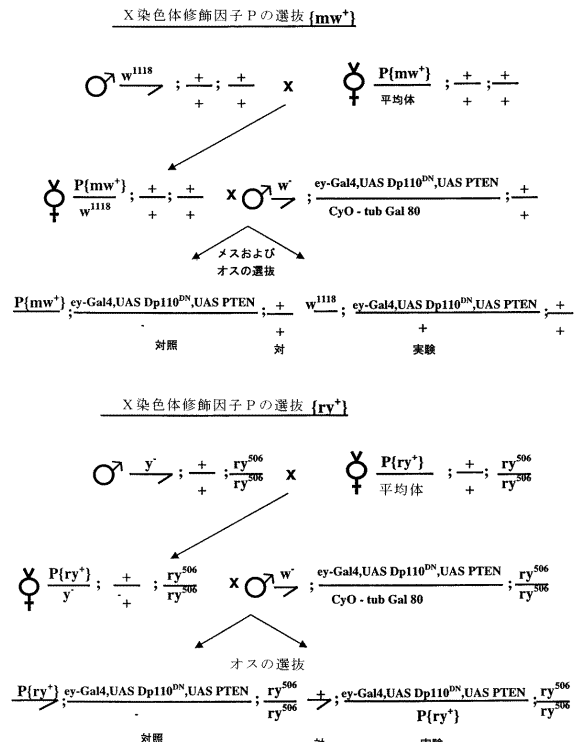


FIGURE 2

【 図 3 】

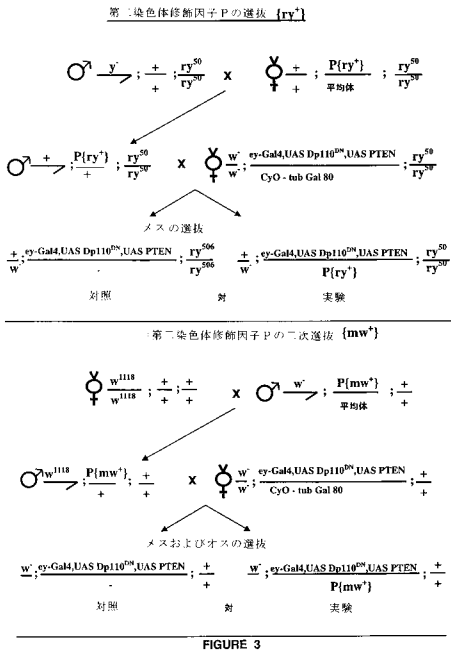


FIGURE 3

【 図 4 】

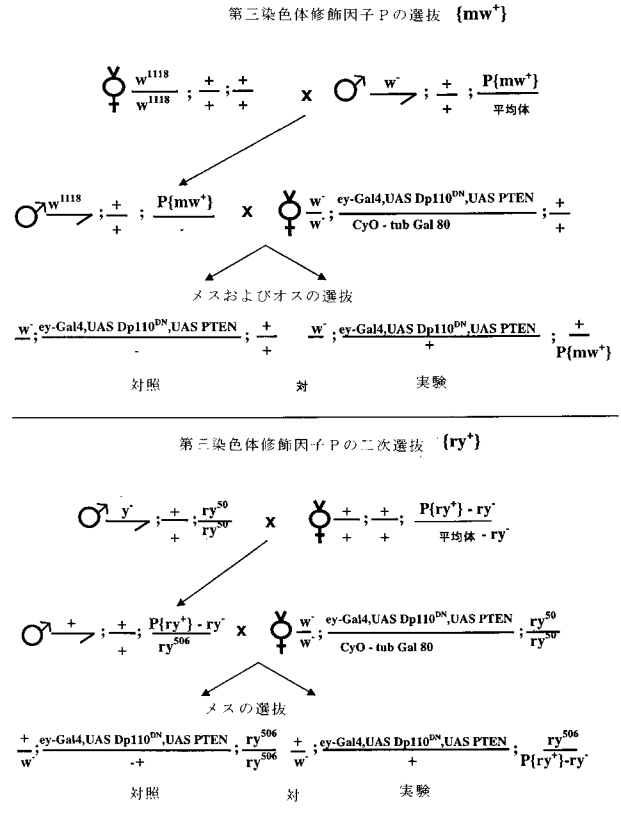


FIGURE 4

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/EP 03/14078										
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A01K67/033 C07K14/435 C12Q1/68												
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A01K C07K C12Q												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X	BOEHNI R ET AL: "AUTONOMOUS CONTROL OF CELL AND ORGAN SIZE BY CHICO, A DROSOPHILA HOMOLOG OF VERTEBRATE IRS1-4" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 97, no. 7, 25 June 1999 (1999-06-25), pages 865-875, XP000877263 ISSN: 0092-8674 page 870, column 2, paragraph 2 "Experimental Procedures" page 872, column 2, paragraph 3 -page 873, column 2, paragraph 1 --- -/-	52-54										
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in an annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>*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</td> </tr> <tr> <td>*E* earlier document but published on or after the international filing date</td> <td>*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</td> </tr> <tr> <td>*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)</td> <td>*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.</td> </tr> <tr> <td>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>*G* document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*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	*E* earlier document but published on or after the international filing date	*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	*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)	*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.	*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*G* document member of the same patent family	*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*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											
E earlier document but published on or after the international filing date	*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											
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)	*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.											
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*G* document member of the same patent family											
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report										
4 May 2004		13/05/2004										
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Favre, N										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP 03/14078

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LEEVERS S J ET AL: "THE DROSOPHILA PHOSPHOINOSITIDE 3-KINASE DP110 PROMOTES CELL GROWTH" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 15, no. 23, 1996, pages 6584-6594, XP000877417 ISSN: 0261-4189 cited in the application the whole document	52-54
A	RORTH P ET AL: "SYSTEMATIC GAIN-OF-FUNCTION GENETICS IN DROSOPHILA" DEVELOPMENT, COMPANY OF BIOLOGISTS, CAMBRIDGE,, GB, vol. 125, no. 6, March 1998 (1998-03), pages 1049-1057, XP000863084 ISSN: 0950-1991 cited in the application "Material and Methods" "Discussion" abstract	52-54
A	NAGASE T ET AL: "PREDICTION OF THE CODING SEQUENCES OF UNIDENTIFIED HUMAN GENES VII. THE COMPLETE SEQUENCES OF 100 NEW CDNA CLONES FROM BRAIN WHICH CAN CODE FOR LARGE PROTEINS IN VITRO" DNA RESEARCH, UNIVERSAL ACADEMY PRESS, JP, vol. 4, no. 2, 1997, pages 141-150, XP001052821 ISSN: 1340-2838 cited in the application the whole document	1-18, 24-51
A	WO 00/78940 A (HAFEN ERNST ;UNIV ZUERICH (CH)) 28 December 2000 (2000-12-28) the whole document	52-54
A	DJORDJEVIC S ET AL: "Structural insight into substrate specificity and regulatory mechanisms of phosphoinositide 3-kinases" TIBS TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, ELSEVIER PUBLICATION, CAMBRIDGE, EN, vol. 27, no. 8, 1 August 2002 (2002-08-01), pages 426-432, XP004373664 ISSN: 0968-0004 the whole document	52-54

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/14078

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOZMA SARA C ET AL: "Regulation of cell size in growth, development and human disease: PI3K, PKB and S6K." BIOESSAYS: NEWS AND REVIEWS IN MOLECULAR, CELLULAR AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY. ENGLAND JAN 2002, vol. 24, no. 1, January 2002 (2002-01), pages 65-71, XP009030256 ISSN: 0265-9247 the whole document -----	52-54

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 03/14078**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 1-18 and 40-49 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP 03 /14078

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-18 (partially), 19-23 (completely), 24-51 (partially) and 55-57 (completely)

The subject-matter of independent claim 1 and of dependent claims 2-9 is fundamentally unclear (Article 6 PCT) for the following reasons:

The expression "pathological conditions associated with dysregulation of the insulin pathway" has no well-recognised meaning in the art and leaves the skilled reader in doubt with regard to its scope. The only definition provided by the description (page 16, lines 1-3) is that this expression "includes, but is not limited to", diabetes and Type A syndrome of insulin resistance.

In view of the numerous biochemical pathways wherein the insulin pathway might be involved (see for instances all the documents mentioned in the search report), a meaningful search could only be carried out for diabetes and Type A syndrome of insulin resistance.

The expression "a modulator of a protein" also has no well-recognised meaning in the art. Moreover, this expression only describes a desirable property of the entity but does not define said entity in terms of technical features. The use of this expression hence leaves the skilled reader in doubt with regard to its exact scope. This lack of clarity is further increased by the reference to "a protein selected from the group consisting of those disclosed in Table 4 or Table 5" (see below). In the present case, a meaningful search could only be carried out for the modulator classes mentioned in the description, i.e. those explicitly mentioned in e.g. dependent claims 5 (see also below) and 8.

In view of the content of Tables 4 and/or 5, the expression "a protein selected from the group consisting of those disclosed in Table 4 or Table 5" is absolutely unclear. This lack of clarity arises from the fact that the tables do not disclose/describe proteins. In fact, these tables appear to relate to Drosophila genes, some of them being referred to as "unknown", to transcripts and to "best human homologues".

In view of the description, it appears that said expression "a protein selected from the group consisting of those disclosed in Table 4 or Table 5" should be understood as referring to the proteins coded by the best human homologues (see e.g. page 2, lines 12-15). It is however to be noted that for a number of the Drosophila genes listed in the tables no human homolog is indicated. Moreover, others have merely been "predicted by automated computational analysis" and/or their function is not known, so that it is absolutely not possible to search for a modulator of their function.

In Example 1, three Drosophila genes and their best human homologues (PDK, SHP-2 and KIAA0336) have been identified, using the method of independent claim 52, as being "genetic modifiers" of the insulin pathway. Of these three genes, only EP(3)3459/KIAA0336 is disclosed (twice in Table 4: page 57, line 19 and page 59, line 13) in Table 4 or 5 and is therefore claimed.

The fundamental lack of clarity of independent claim 1 and of dependent

International Application No. PCT/ EP 03 /14078

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

claims 2-9 makes it impossible to perform a meaningful search of the subject-matter of these claims over their whole scope. With regard to the subject-matter of claims 1-9, the International Search has therefore been limited to:

A method to treat, prevent or ameliorate diabetes or Type A syndrome of insulin resistance comprising administering to a subject a effective amount of a modulator as defined in claims 5 of 8 of the protein coded by the KIAA0336 gene.

The subject-matter of claims 10-18 does not differ from that defined in claims 1-9. The search of subject-matter of these claims has hence also been restricted accordingly.

The subject-matter of claims 19-23 relies on the biochemical function of the protein disclosed in Table 4 or 5, i.e. protein coded by the KIAA0336 gene (see above). Since the protein coded by the KIAA0336 gene does not have a known function (see the description: page 54, lines 12-13), a meaningful search of the subject-matter of these claims is not possible.

Moreover, the arguments presented with regard to the subject-matter of claims 1-9 also apply for the subject-matter of claims 24-51, the search of which also been restricted accordingly.

In addition, the subject-matter of independent claim 55 and dependent claims 56 and 57 refer to genetic modifiers identified according to the method of claim 52.

Such a genetic modifier is however not a product produced by the screening method of claim 52, which relate to methods of identification. It is rather a product that has been identified using said method. The mere fact that the genetic modifier has been identified by the method of screening method of claim 52 is however not a technical feature of said modifier. Moreover, this fact does not provide any information regarding possible technical features of said modifier.

Since the modifiers of claims 55-57 are not defined in terms of technical features, it is not possible to perform a meaningful search of their subject-matter.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/14078

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0078940	A	28-12-2000	WO 0078940 A1	28-12-2000
			AU 4160599 A	09-01-2001
			CA 2375484 A1	28-12-2000
			EP 1187912 A1	20-03-2002
			JP 2003503677 T	28-01-2003

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
	C 1 2 N 15/00	Z

(81) 指定国 EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, I
E, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, D
M, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LT, LU, LV, MA, MD, MK, MN, MX, NI
, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SE, SG, SK, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, UA, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZW

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ08 QQ42 QQ53 QQ61 QQ91 QR32 QR42
QR50 QR55 QR62 QR66 QR72 QR77 QS03 QS25 QS28 QS34
QS36 QS39 QX01
4C084 AA13 AA17 NA14 ZC35
4C085 AA13 AA14 BB17 CC21 DD88 EE01

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2006509795A5	公开(公告)日	2007-01-25
申请号	JP2004558072	申请日	2003-12-11
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	诺华股份公司		
[标]发明人	ハオリ		
发明人	ハオ・リ		
IPC分类号	A61K45/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P3/10 C12Q1/68 G01N33/53 C12N15/00		
CPC分类号	C07K14/43581 A01K67/0339		
FI分类号	A61K45/00 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P3/10 C12Q1/68.A G01N33/53.D C12N15/00.Z		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ91 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS03 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZC35 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB17 4C085/CC21 4C085/DD88 4C085/EE01		
优先权	60/432854 2002-12-12 US		
其他公开文献	JP2006509795A		

摘要(译)

本发明公开了一种鉴定胰岛素信号传导途径中涉及的蛋白质的方法。本发明还治疗与胰岛素信号传导途径失调有关的病理状况，公开了一种用于预防或改善对新疗法的发展合适的靶。本发明还涉及治疗，预防或改善症状的方法，其药物组合物，以及鉴定治疗上有用的化合物的方法，所述化合物用于治疗与胰岛素信号传导途径失调相关的病理状况。。