

(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2018-521332
(P2018-521332A)

(43) 公表日 平成30年8月2日(2018.8.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/6876 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6876 Z N A Z	4 B O 6 3
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
C 1 2 Q 1/6897 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6897	
C 1 2 Q 1/66 (2006.01)	C 1 2 Q 1/66	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 24 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-519665 (P2018-519665)
 (86) (22) 出願日 平成28年6月24日 (2016.6.24)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年12月26日 (2017.12.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2016/006731
 (87) 国際公開番号 W02016/209013
 (87) 国際公開日 平成28年12月29日 (2016.12.29)
 (31) 優先権主張番号 10-2015-0091189
 (32) 優先日 平成27年6月26日 (2015.6.26)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

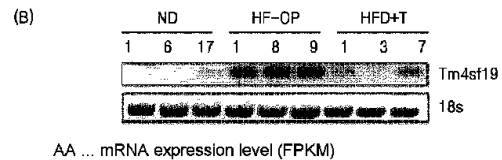
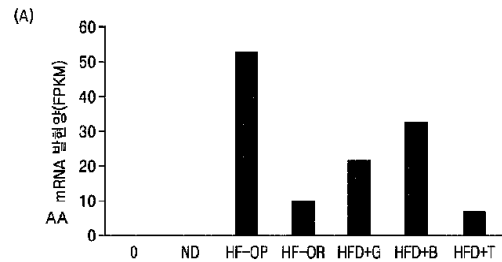
(71) 出願人 517453933
 ジーアイエルオー インコーポレイテッド
 大韓民国, 06671 ソウル, ソチョー
 グ, ヒョリョンーロ, 231, 3エフ
 (74) 代理人 110000338
 特許業務法人HARAKENZO WOR
 LD PATENT & TRADEMA
 RK
 (72) 発明者 キム, ソン ジン
 大韓民国, 06667 ソウル, ソチョー
 グ, ミョンドルーロ, 91, ルーム901
 (72) 発明者 パク, ス ジン
 大韓民国, 12151 キョンギード, ナ
 ムヤンジューシ, ホピョンーロ, 94, 2
 106-1401

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肥満診断用マーカーTM4SF19、及びそれを利用した方法

(57) 【要約】

TM4SF19に特異的に結合する物質を含む肥満診断用組成物及びキット、それを利用した肥満を診断する方法を利用すれば、肥満を効率的に診断することができ、またTM4SF19を阻害する肥満治療用候補物質をスクリーニングする方法によって、肥満を治療することができる候補物質を効率的に選別することができる。



AA ... mRNA expression level (FPKM)

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

T M 4 S F 1 9 タンパク質、あるいはその断片に特異的に結合する抗体、抗原結合断片またはポリペプチド、あるいは前記 T M 4 S F 1 9 タンパク質をコーディングするヌクレオチド配列に特異的に結合するプローブ、プライマーセットまたはヌクレオチドを含む肥満診断用組成物。

【請求項 2】

前記 T M 4 S F 1 9 タンパク質は、配列番号 5 ないし 8 のうちいずれか一つの配列を含むものであり、前記 T M 4 S F 1 9 タンパク質をコーディングするヌクレオチド配列は、配列番号 1 ないし 4 のうちいずれか一つの配列を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の組成物。

10

【請求項 3】

前記抗体、抗原結合断片またはポリペプチドは、T M 4 S F 1 9 の膜貫通ドメイン d 及び/またはそのリンカー地域に結合することを特徴とする請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

請求項 1 ないし 3 のうちいずれか 1 項に記載の組成物、及びそれを検出するための試薬を含む肥満診断用キット。

【請求項 5】

個体から分離された試料と、T M 4 S F 1 9 タンパク質、あるいはその断片に特異的に結合する抗体、ペプチド、タンパク質、またはそれらの組み合わせ、あるいは前記 T M 4 S F 1 9 をコーディングするヌクレオチド配列に特異的に結合するプローブ、プライマー、ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせと、を接触させて形成される複合体から、T M 4 S F 1 9 の発現量を測定する方法。

20

【請求項 6】

前記発現量測定は、R T - P C R、R N a s e 保護分析法 (R P A)、ノーザンブロットティング、及び D N A チップから選択された 1 以上の方法によることを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記発現量測定は、ウエスタンブロットティング、E L I S A (enzyme linked immunosorbent assay)、放射線免疫分析、放射免疫拡散法、オクタロニー免疫拡散法、ロケット免疫電気泳動、組織免疫染色、免疫沈澱分析法、補体固定分析法、F A C S (fluorescence activated cell sorting) またはタンパク質チップから選択された 1 以上の方法によることを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記試料は、個体の脂肪前駆細胞または脂肪細胞を含むことを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

T M 4 S F 1 9 のプロモーターヌクレオチド配列を含む細胞に試験物質を接触させる段階と、

前記細胞において、T M 4 S F 1 9 のプロモーター活性を測定する段階と、

40

前記 T M 4 S F 1 9 のプロモーター活性が対照群に比べて低下する試験物質を選別する段階と、を含む肥満治療用候補物質をスクリーニングする方法。

【請求項 10】

前記プロモーターヌクレオチド配列は、T M 4 S F 1 9 タンパク質をコーディングする配列の 5' 末端から、- 8 0 2 配列ないし - 1 9 6 4 配列であることを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

T M 4 S F 1 9 タンパク質またはその断片、あるいはそれをコーディングするヌクレオチド配列を含む細胞に試験物質を接触させる段階と、

前記試料において、T M 4 S F 1 9 タンパク質またはその断片、あるいはそれをコーデ

50

ィングするヌクレオチド配列と複合体を形成し、T M 4 S F 1 9 タンパク質の機能を阻害する、あるいはT M 4 S F 1 9 タンパク質の発現を阻害する試験物質を選別する段階と、これらを含む肥満治療用候補物質をスクリーニングする方法。

【請求項 1 2】

前記試験物質は、T M 4 S F 1 9 の膜貫通ドメイン d 及び / またはそのリンカー地域に結合することを特徴とする請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記試験物質は、T M 4 S F 1 9 タンパク質と G r p 7 8 タンパク質との結合を阻害することを特徴とする請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記試験物質は、脂肪前駆細胞の分化を阻害することを特徴とする請求項 1 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、T M 4 S F 1 9 に特異的に結合する物質を含む肥満診断用組成物及びキット、及びそれを利用した肥満を診断する方法、及びT M 4 S F 1 9 を阻害する物質をスクリーニングする方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

肥満 (obesity) は、体脂肪が健康に有害な影響を及ぼすほどに過度に蓄積された医学的状态をいう。肥満は、各種成人病の発病と非常に深い関連性があり、肥満度が高くなるほど、糖尿病、胆石症、高血圧、心臓疾患及び脳卒中を含む多様な疾病の有病率が上昇する。

【0 0 0 3】

肥満は、遺伝的、文化的、環境的な要因など複合的原因によって発生する。特に、現代に入っては、過剰な熱量摂取または高脂肪食餌による肥満の有病率が上昇している。

【0 0 0 4】

肥満は、体質量指数 (B M I : body mass index)、体脂肪率及び胴回りなど多様な尺度による診断が可能である。しかし、かような診断方法は、限定された身体的特性だけに依存する診断方法であるために、それらの尺度だけでは、肥満の正確な診断は困難である。従って、肥満を起こす生物学的メカニズムを基に、肥満診断に使用されるバイオマーカーを発掘し、それを利用して、高い正確度で肥満を診断することができる方法を開発する必要がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 5】

一様相は、T M 4 S F 1 9 に特異的に結合する物質を含む肥満診断用組成物及びキットを提供する。

【0 0 0 6】

他の様相は、個体の肥満を診断するためのT M 4 S F 1 9 の発現量を測定する方法を提供する。

【0 0 0 7】

他の様相は、T M 4 S F 1 9 を阻害する肥満治療用候補物質をスクリーニングする方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 8】

前記課題を解決するために、本発明は、T M 4 S F 1 9 タンパク質、またはその断片に特異的に結合する抗体、抗原結合断片またはポリペプチド、あるいは前記T M 4 S F 1 9 タンパク質をコーディングするヌクレオチド配列に特異的に結合するプローブ、プライマ

10

20

30

40

50

ーセットまたはヌクレオチドを含む肥満診断用組成物を提供する。

【0009】

本発明が解決しようとする課題は、前記組成物、及びそれを検出するための試薬を含む肥満診断用キットを提供する。

【0010】

本発明が解決しようとする課題は、個体から分離された試料と、T M 4 S F 1 9 タンパク質、あるいはその断片に特異的に結合する抗体、ペプチド、タンパク質、またはそれらの組み合わせ、あるいは前記T M 4 S F 1 9 をコーディングするヌクレオチド配列に特異的に結合するプローブ、プライマー、ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせを接触させて形成される複合体からT M 4 S F 1 9 の発現量を測定する方法を提供する。

10

【0011】

本発明が解決しようとする課題は、T M 4 S F 1 9 タンパク質またはその断片、あるいはそれをコーディングするヌクレオチド配列を含む細胞に試験物質を接触させる段階と、前記試料において、T M 4 S F 1 9 タンパク質またはその断片、あるいはそれをコーディングするヌクレオチド配列と複合体を形成し、T M 4 S F 1 9 タンパク質の機能を阻害する、あるいはT M 4 S F 1 9 タンパク質の発現を阻害する試験物質を選別する段階と、これらを含む肥満治療用候補物質をスクリーニングする方法を提供する。

【発明の効果】

【0012】

一様相によるT M 4 S F 1 9 に特異的に結合する物質を含む肥満診断用組成物及びキットは、肥満診断に効率的に使用される。

20

【0013】

他の様相による個体の肥満を診断するためのT M 4 S F 1 9 の発現量を測定する方法は、肥満診断に効率的に使用される。

【0014】

他の様相によるT M 4 S F 1 9 を阻害する肥満治療用候補物質をスクリーニングする方法によれば、肥満を治療することができる候補物質を効率的に選別することができる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1A】食餌によるT M 4 S F 1 9 mRNA発現量を、mRNAシーケンシング分析を介して測定した結果を示すグラフである。

30

【図1B】食餌によるT M 4 S F 1 9 mRNA発現量をRT-PCRで増幅して測定した結果を示す図面である。

【図2】脂肪前駆細胞の培養及び分化のモデルを示す模式図である。

【図3】脂肪細胞の分化時、T M 4 S F 1 9 の発現量増加を示す模式図である。

【図4A】T M 4 S F 1 9 過発現脂肪前駆細胞株と対照群との経時的脂肪蓄積を比較したところを示すイメージである。

【図4B】T M 4 S F 1 9 過発現脂肪前駆細胞株と対照群との経時的脂肪蓄積を、OD420の光学密度を測定して定量したところを示すグラフである。

【図5A】T M 4 S F 1 9 の過発現が、脂肪分化マーカーであるC/EBP mRNAの発現を増加させたところを示すグラフである。

40

【図5B】T M 4 S F 1 9 の過発現が、脂肪分化マーカーであるPPAR mRNAの発現を増加させたところを示すグラフである。

【図6】T M 4 S F 1 9 過発現細胞株の脂肪細胞分化マーカーの発現量をタンパク質レベルで測定したところを示す図面である。

【図7】脂肪前駆細胞の分化前後において、T M 4 S F 1 9 と結合するタンパク質を免疫沈降反応させたところを示す図面である。

【図8A】食餌によるT M 4 S F 1 9 mRNAの相対的な発現量を示すグラフである。

【図8B】食餌によるGrp78 mRNAの相対的な発現量を示すグラフである。

【図9A】脂肪細胞分化前後のT M 4 S F 1 9 及びGrp78の細胞内結合を示す図面で

50

ある。

【図 9 B】 293T 細胞で過発現された T M 4 S F 1 9 及び G r p 7 8 の結合を示す図面である。

【図 1 0】 T M 4 S F 1 9 の欠失コンストラクトを示す模式図である。

【図 1 1】 T M 4 S F 1 9 の欠失突然変異と G r p 7 8 との結合有無を示す図面である。

【図 1 2】 T M 4 S F 1 9 過発現細胞株において、G r p 7 8 の発現を抑制した場合、脂肪細胞分化マーカーの発現が減少したところを示す図面である。

【図 1 3】 T M 4 S F 1 9 プロモーター部位の欠失コンストラクトを示す模式図である。

【図 1 4】 T M 4 S F 1 9 の欠失プロモーターコンストラクトを製造し、そのプロモーター活性を測定したところを示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0016】

一様相は、膜貫通 4 L 6 ファミリメンバー 1 9 (T M 4 S F 1 9 : transmembrane 4 L six family member) の発現量を測定することができる物質を含む肥満診断用組成物を提供する。

【0017】

前記 T M 4 S F 1 9 タンパク質は、ヒト由来またはマウス (Mus musculus) 由来のタンパク質や、猿、牛、馬などの他の哺乳動物においても、同一タンパク質が発現され、ヒト由来の T M 4 S F 1 9 は、3 種以上の異性体を有することができる。前記 T M 4 S F 1 9 は、それぞれ GenBank Accession No. NM_001204897.1 (配列番号 1)、NM_001204898.1 (配列番号 2)、NM_138461.3 (配列番号 3)、NM_001160402.1 (配列番号 4) を含む mRNA から、それぞれ NP_001191826.1 (配列番号 5)、NP_001191827.1 (配列番号 6)、NP_612470.2 (配列番号 7)、NP_001153874.1 (配列番号 8) で示されるアミノ酸配列を含むペプチドまたはタンパク質に翻訳される。前記配列番号 1 ないし 4 の mRNA、及び配列番号 5 ないし 8 のタンパク質と、一部ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列が一致しないとしても、生物学的に同等な活性を有するヌクレオチド配列またはアミノ酸配列は、T M 4 S F 1 9 の mRNA または T M 4 S F 1 9 タンパク質と見なされる。

【0018】

前記 T M 4 S F 1 9 をコーディングするヌクレオチドは、配列番号 1 ないし 4 のうちいずれか一つと、60% 以上、例えば、70% 以上、80% 以上、90% 以上、95% 以上、99% 以上あるいは 100% の配列同一性を有する塩基配列を有するものである。また、前記 T M 4 S F 1 9 をコーディングするヌクレオチドは、前記配列番号 1 ないし 4 のうちいずれか一つの塩基配列において、1 個以上の塩基、2 個以上の塩基、3 個以上の塩基、4 個以上の塩基、5 個以上の塩基、6 個以上の塩基または 7 個以上の塩基が異なる配列を有するヌクレオチドである。

【0019】

前記 T M 4 S F 1 9 タンパク質は、配列番号 5 ないし 8 のうちいずれか一つと、60% 以上、例えば、70% 以上、80% 以上、90% 以上、95% 以上、99% 以上あるいは 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むものである。また、前記 T M 4 S F 1 9 タンパク質は、前記配列番号 5 ないし 8 のうちいずれか一つの塩基配列において、1 個以上の塩基、2 個以上の塩基、3 個以上の塩基、4 個以上の塩基、5 個以上の塩基、6 個以上の塩基または 7 個以上の塩基が変化された配列を有するヌクレオチドである。

【0020】

用語「肥満 (obesity)」は、健康に悪影響を及ぼすほど体脂肪が過度に蓄積された状態を意味する。個体の BMI (body mass index) 指数、胴回り、体脂肪率、または個体の T M 4 S F 1 9 の発現量を測定し、前記数値が対照群に比べて高い場合、肥満にかけたと判断することができる。肥満は、食べ過ぎまたは高脂肪食餌などの食習慣、遺伝的要

10

20

30

40

50

因、他の疾病、感染、運動不足または社会的要素などの多様な要因によるものである。

【0021】

前記 T M 4 S F 1 9 の発現量を測定することができる物質は、T M 4 S F 1 9 タンパク質、あるいはその断片に特異的に結合する抗体、抗原結合断片、ポリペプチド、タンパク質、またはそれらの組み合わせである。

【0022】

用語「抗体」とは、抗原性部位に対して指示される特異的な免疫グロブリンを意味する。前記抗体は、肥満診断マーカーである T M 4 S F 1 9 に対して特異的に結合する抗体を意味し、T M 4 S F 1 9 遺伝子を発現ベクターにクローニングし、T M 4 S F 1 9 遺伝子によってコーディングされる T M 4 S F 1 9 タンパク質を得て、得られた T M 4 S F 1 9 タンパク質から、当該技術分野の一般的な方法によって抗体を製造することができる。前記抗体の形態は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を含み、全ての免疫グロブリン抗体が含まれる。前記抗体は、2個の全長軽鎖及び2個の全長重鎖を有する完全な形態だけではなく、2個の軽鎖及び2個の重鎖を有する完全な形態の完全な抗体の構造を有さないが、抗原性部位に対して指示される特異的な抗原結合部位（結合ドメイン）を有し、抗原結合機能を保有している、抗体分子の機能的断片も含む。

10

【0023】

前記 T M 4 S F 1 9 の発現量を測定することができる物質は、T M 4 S F 1 9 をコーディングするヌクレオチド配列に特異的に結合するプローブ、プライマー、ヌクレオチド配列、またはそれらの組み合わせである。

20

【0024】

T M 4 S F 1 9 遺伝子のヌクレオチド配列が公知されているので、当業者は、前記配列を基に、それら遺伝子の配列に対して特異的に結合するプライマーまたはプローブに、当該技術分野の一般的な方法によってデザインすることができる。

【0025】

用語「プローブ」とは、mRNAなどのヌクレオチドと、特異的に結合をなすことができる、短くは、数塩基あるいは、長くは、数百塩基に該当するRNAまたはDNAなどのヌクレオチド断片を意味し、放射性元素などに標識されており、特定mRNAの存在有無、含量（発現量）を確認することができる。該プローブは、オリヌクレオチド（oligonucleotide）プローブ、単鎖DNA（single strand DNA）プローブ、二重鎖DNA（double strand DNA）プローブ、RNAプローブなどの形態に作製される。本発明の一具体例によれば、肥満マーカーである T M 4 S F 1 9 遺伝子の mRNA と相補的なプローブを利用して混成化を実施し、混成化程度を介して、mRNA の発現量を測定することにより、肥満のいかん及び程度を測定することができる。適切なプローブの選択及び混成化条件は、当該技術分野に公知された技術によって、適切に選択することができる。

30

【0026】

用語「プライマー」は、短い自由3末端水酸化基（free 3' hydroxyl group）を有するヌクレオチド配列であり、相補的なテンプレート（template）と塩基対を形成することができる、テンプレート鎖コピーのための開始地点として作用する短いヌクレオチド配列をいう。該プライマーは、適切な緩衝溶液及び温度において、重合反応のための試薬（すなわち、DNAポリメラーゼ/重合酵素または逆転写酵素）、及び異なる4種のヌクレオシド三リン酸の存在下で、DNA合成を開始することができる。本発明の一具体例によれば、マーカー T M 4 S F 1 9 の mRNA のプライマーセットを利用してPCR増幅を実施し、所望の T M 4 S F 1 9 タンパク質の発現量測定を介して、肥満を診断することができる。PCR（polymerase chain reaction）条件及びプライマーセット長は、当業界に公知された技術によって適切に選択される。

40

【0027】

用語「ヌクレオチド」は、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを示し、特別に言及されていない限り、自然ヌクレオチドの類似体、及び糖部位または塩基部位が変形された類似体を含んでもよい。

50

【0028】

前記プローブ、プライマーまたはヌクレオチドは、ホスホルアミジット (phosphoramidite) 固体支持体合成法や、その他広く公知された方法を利用して、化学的に合成することができる。かようなヌクレオチド配列は、また当該技術分野に公知された多様な方法を介して変形させることができる。かような変形の例としては、メチル化、キャップ化、天然ヌクレオチド1以上の同族体への置換、及びヌクレオチド間の変形、例えば、荷電されていない連結体 (例: メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホロアミデート、カルバメートなど)、または荷電された連結体 (例: ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど) への変形がある。

【0029】

前記プローブ、プライマーまたはヌクレオチドは、長さが10ないし100ヌクレオチド (以下、「nt」とする)、10ないし90nt、10ないし80nt、10ないし70nt、10ないし60nt、10ないし50nt、10ないし40nt、10ないし30nt、10ないし25nt、20ないし100nt、30ないし90nt、40ないし80nt、50ないし70nt、20ないし60nt、20ないし50nt、30ないし40nt、20ないし30nt、あるいは20ないし25ntである。

【0030】

前記TM4SF19タンパク質またはその遺伝子のmRNA発現量は、肥満マウスの脂肪組織及び脂肪前駆細胞において、特異的に増加するので、前記本発明による肥満診断用組成物は、肥満が疑われる患者の脂肪細胞または脂肪前駆細胞でのTM4SF19遺伝子発現量を測定し、肥満診断に利用される。

【0031】

他の様相は、TM4SF19の発現量を測定することができる物質を含む肥満診断用キットを提供する。

【0032】

前記肥満診断用キットは、肥満診断マーカーであるTM4SF19タンパク質の発現量を、その遺伝子のmRNAまたはそのタンパク質の発現量測定を介して測定することにより、肥満を診断することができる。前記肥満診断用キットは、前述のTM4SF19タンパク質の発現量を測定することができる物質、すなわち、TM4SF19タンパク質に特異的に結合する抗体、抗原結合断片、ポリペプチドまたはタンパク質、TM4SF19タンパク質をコーディングする遺伝子に特異的に結合するプライマーまたはプローブ、ヌクレオチド、あるいはそれらの組み合わせを含むだけでなく、そのキットが利用するTM4SF19タンパク質発現量を測定する分析方法に適する1以上の他の構成成分組成物、溶液または装置を含んでもよい。

【0033】

一具体例によれば、本発明の肥満診断用キットは、TM4SF19タンパク質のmRNAの発現量を測定するためのキットである場合、RT-PCR (real time polymerase chain reaction) を行うために必要な必須要素を含むキットでもある。RT-PCRキットは、マーカー遺伝子のmRNAに対する特異的なそれぞれのプライマー対以外にも、テストチューブ、または他の適切なコンテナ、反応緩衝液、デオキシリボヌクレオチド (dNTPs)、Taq-ポリメラーゼ及び逆転写酵素のような酵素、DNase、RNase抑制剤、DEPC水 (DEPC-water)、滅菌水などを含んでもよい。また、定量対照群で使用される遺伝子に特異的なプライマー対を含んでもよい。

【0034】

他の具体例によれば、本発明の肥満診断用キットは、TM4SF19タンパク質に対して特異的に結合する抗体、抗原結合断片、ポリペプチド、タンパク質抗体の免疫学的検出のために、基質、適する緩衝溶液、発色酵素または蛍光物質で標識された二次抗体、発色基質を含んでもよい。前記基質は、ニトロセルロース膜、ポリビニル樹脂で合成された96ウェルプレート、ポリスチレン樹脂で合成された96ウェルプレート、及びガラススライドガラスなどが利用され、該発色酵素は、ペルオキシダーゼ (peroxidase)、アルカリ

10

20

30

40

50

ンホスファターゼ (alkaline phosphatase) が使用され、該蛍光物質は、F I T C、R I T Cなどが使用され、該発色基質は、2, 2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (A B T S) または o-フェニレンジアミン (O P D)、テトラメチルベンジジン (T M B) などが使用される。

【0035】

さらに他の具体例によれば、本発明のキットは、タンパク質またはそのタンパク質をコーディングする遺伝子の m R N A 発現量を測定することのできる、肥満診断用マイクロアレイでもある。前記肥満診断用マイクロアレイは、前記本発明のマーカを利用して、当該技術分野に公知された方法によって、当業者が容易に製造することができ、一具体例によれば、前記 T M 4 S F 1 9 タンパク質をコーディングする遺伝子の m R N A、またはその断片に該当する配列の c D N A がプローブとして基板に付着しているマイクロアレイである。

10

【0036】

前記キットで言及された用語または要素のうち、請求された組成物に係わる説明で言及されたようなことは、前に請求された組成物に係わる説明で言及されたようなものであると理解される。

【0037】

他の様相は、個体の肥満を診断するための T M 4 S F 1 9 の発現量を測定する方法を提供する。

【0038】

前記方法は、個体から分離された試料と、T M 4 S F 1 9 に特異的に結合する物質とを接触させて形成された複合体の量を測定し、T M 4 S F 1 9 の発現量を測定する段階を含んでもよい。

20

【0039】

前記診断の対象になる個体は、哺乳動物でもある。前記哺乳動物は、ヒト、マウス (mouse)、鼠 (rat)、牛、山羊、豚、馬、羊、犬、猫、あるいはその組み合わせでもある。前記試料は、個体の細胞、脂肪前駆細胞、脂肪細胞、またはそれらに由来する細胞を含んでもよい。

【0040】

前記 T M 4 S F 1 9 発現量測定は、T M 4 S F 1 9 タンパク質の発現量を測定するか、あるいは T M 4 S F 1 9 の m R N A の量を測定するものである。

30

【0041】

前記 T M 4 S F 1 9 のタンパク質の発現量測定は、前記タンパク質に対して特異的に結合する抗体、抗原結合断片、ポリペプチドまたはタンパク質を利用して、タンパク質の発現量を確認することができる。そのために、分析方法としては、ウェスタンブロッティング、E L I S A (enzyme linked immunosorbent assay)、放射線免疫分析 (R I A : radioimmunoassay)、放射免疫拡散法 (radioimmunodiffusion)、オクタロニー (ouchterlony) 免疫拡散法、ロケット (rocket) 免疫電気泳動、組織免疫染色、免疫沈澱分析法 (immunoprecipitation assay)、補体固定分析法 (complement fixation assay)、F A C S (fluorescence activated cell sorting) 及びタンパク質チップ (protein chip) などがある。かような分析方法は、当該技術分野において当業者であるならば、公知された技術を利用して適切に遂行することができる。

40

【0042】

前記 T M 4 S F 1 9 の m R N A の発現量は、前記 m R N A に対して特異的に結合するプローブ、プライマーまたはヌクレオチドを利用して測定することができる。そのために、分析方法としては、R T - P C R、R N a s e 保護分析法 (R P A : R N a s e protection assay)、ノーザンブロッティング (northern blotting)、あるいは D N A チップなどがある。かような分析方法は、当該技術分野において当業者であるならば、公知された技術を利用して適切に遂行することができるであろう。

【0043】

50

前記方法によれば、個体の試料、及び正常対照群の T M 4 S F 1 9 タンパク質の発現量を比較することにより、肥満を診断することができる。具体的には、肥満が疑われる患者の試料と、正常対照群の T M 4 S F 1 9 タンパク質の発現量とを測定して比較し、個体の試料において、T M 4 S F 1 9 タンパク質の発現量がさらに増加する程度によって、肥満いかん及びその程度を測定することができる。

【 0 0 4 4 】

前記方法で言及された用語または要素のうち、請求された組成物及びキットに係わる説明において言及されたようなことは、先に請求された組成物及びキットに係わる説明で言及されたようなところと理解される。

他の様相は、T M 4 S F 1 9 を阻害する肥満治療用候補物質をスクリーニングする方法を提供する。

【 0 0 4 5 】

本発明の実施例によれば、T M 4 S F 1 9 タンパク質が肥満に関与すると公知されている G r p 7 8 と結合し、それによって、脂肪前駆細胞の分化及び脂肪蓄積を促進することを確認したので、脂肪前駆細胞または脂肪細胞において、T M 4 S F 1 9 の発現を阻害する物質、または T M 4 S F 1 9 活性を阻害する物質は、肥満の治療に効果的な候補物質にもなる。

【 0 0 4 6 】

前記 G r p 7 8 は、マウス (Mus musculus) 由来のタンパク質や、ヒト、猿、牛、馬などの他の哺乳動物においても、同一タンパク質が発現される。前記 G r p 7 8 は、uniprot 参照番号 P 2 0 0 2 9 で示される配列を含むタンパク質である。前記配列と一部配列が一致しないとしても、生物学的に同等な活性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質は、G r p 7 8 タンパク質と見なされる。

【 0 0 4 7 】

前記 T M 4 S F 1 9 の発現を阻害する物質は、T M 4 S F 1 9 のプロモーター配列に特異的に結合して転写を阻害する物質、または T M 4 S F 1 9 の m R N A と結合して翻訳を阻害する抗体、ポリペプチド、タンパク質またはヌクレオチドなどの物質である。

【 0 0 4 8 】

前記スクリーニング方法は、T M 4 S F 1 9 のプロモーターヌクレオチド配列を含む試料に、試験物質を接触させる段階を含んでもよい。前記試料は、哺乳類から分離された細胞、脂肪細胞、脂肪前駆細胞、またはそれらに由来する細胞を含んでもよい。

【 0 0 4 9 】

前記スクリーニング方法は、前記試験物質が添加された試料において、T M 4 S F 1 9 のプロモーターの活性を測定する段階を含んでもよい。前記 T M 4 S F 1 9 のプロモーター配列は、T M 4 S F 1 9 のプロモーター 3 0 0 0 内にある S R E B P 転写因子または P P A R 転写因子の結合部位である。

【 0 0 5 0 】

前記スクリーニング方法は、前記試料において、T M 4 S F 1 9 のプロモーター活性を測定する段階を含んでもよい。前記プロモーター活性測定は、当該技術分野において、当業者であるならば、公知された技術を利用して、T M 4 S F 1 9 プロモーターに標識遺伝子を連結し、連結された標識遺伝子の発現を測定することにより、測定することができる。

【 0 0 5 1 】

前記 T M 4 S F 1 9 のプロモーター活性が、対照群に比べて低下している場合、試料に添加された試験物質は、肥満治療用候補物質と判断することができる。

【 0 0 5 2 】

前記スクリーニング方法は、T M 4 S F 1 9 タンパク質またはその断片、あるいはそれをコーディングするヌクレオチド配列を含む試料に、試験物質を接触させる段階を含んでもよい。前記試料は、哺乳類から分離された細胞、脂肪細胞、脂肪前駆細胞、またはそれらに由来する細胞を含んでもよい。

10

20

30

40

50

【0053】

前記スクリーニング方法は、前記試験物質が添加された試料において、TM4SF19タンパク質またはその断片、あるいはそれをコーディングするヌクレオチド配列と複合体を形成する試験物質を選別する段階を含んでもよい。前記複合体の検出は、当該技術分野において、当業者であるならば、公知された技術を利用して適切に遂行することができる。

【0054】

また、前記TM4SF19の活性を阻害する物質は、TM4SF19とGrp78との結合を阻害する物質でもある。前記TM4SF19とGrp78との結合を阻害する物質は、抗体、ポリペプチド、タンパク質またはヌクレオチドなどの物質でもある。前記物質は、TM4SF19とGrp78との結合部位、またはTM4SF19の膜貫通ドメイン、及び/またはそのリンカー部分に結合する物質でもある。

10

【0055】

前記方法で言及された用語または要素のうち、請求された組成物、キット及び診断方法に係わる説明で言及されたようなことは、請求された組成物、キット及び診断方法に係わる説明で言及されたようなところであると理解される。

【0056】

他の様相は、TM4SF19を阻害する肥満治療用薬学的組成物、及びそれを利用して肥満を治療する方法を提供する。

【0057】

また、本発明の実施例によれば、TM4SF19タンパク質が、肥満に關与すると公知されているGrp78と結合し、それによって、脂肪前駆細胞の分化及び脂肪蓄積を促進することを確認したので、脂肪前駆細胞または脂肪細胞において、TM4SF19の発現を阻害する物質、またはTM4SF19の活性を阻害する物質は、肥満の予防及び治療に効果的であるということが分かる。

20

【0058】

前記組成物及び方法で言及された用語または要素のうち、請求された組成物、キット、診断方法及びスクリーニング方法に係わる説明で言及されたようなことは、組成物、キット、診断方法及びスクリーニング方法に係わる説明で言及されたようなところであると理解される。

30

【実施例】

【0059】

以下、本発明について、実施例を介してさらに詳細に説明する。しかし、それら実施例は、本発明について例示的に説明するためのものであり、本発明の範囲は、それら実施例に限定されるものではない。

(実施例1. 肥満マーカーとしてのTM4SF19の確認)

(1-1. 伝統天産物を利用した肥満マーカーとしてのTM4SF19発掘)

肥満に治療効果があると知られた伝統天然物を投与した食餌誘導肥満動物モデルの副睾丸白色脂肪の転写体RNAシーケンシング分析を介して、伝統天然物に特異的に反応する肥満マーカーを発掘した。

40

【0060】

具体的には、正常食餌または高脂肪食餌のC57BL/6Jマウスに、太陰調胃湯、緑茶あるいは防風通聖散を添加した飼料を食べさせた動物モデルを考案した。前記マウスの副睾丸白色脂肪組織を得て、組織0.1g当たり1mLのTRIzol (Invitrogen, Grand Island, NY・米国)を添加して溶かした後、遠心分離して上澄み液を取った。得られた上澄み液に、クロロホルム200 μ Lを添加し、20分間遠心分離して上澄み液を取った。得られた上澄み液に、同量のイソプロパノールを添加した後、10分間遠心分離し、RNAペレットを得た。前記RNAペレットを、75% (v/v) エタノールで洗浄し、RNAペレットを乾燥させた後、ジエチルピロカルボネート (DEPC: diethylpyrocarbonate) 水に溶かして試料を準備した。準備された試料は、Theragen Co., Ltd.に依頼

50

し、mRNAシーケンシング分析を進めた。

【0061】

図1Aは、正常食餌（ND）、高脂肪食餌に高く反応する群（HF-OP）、高脂肪食餌に少なく反応する群（HF-OR）、高脂肪食餌+太陰調胃湯（HFD+T）、高脂肪食餌+防風通聖散（HFD+B）、あるいは高脂肪食餌+緑茶（HFD+G）を食べさせたマウスの副睾丸白色脂肪でのFPKM（fragment per kb exon model）によるTM4SF19の遺伝子発現を示している。mRNAシーケンシング分析結果、TM4SF19 mRNAは、正常食餌によっては、ほとんど発現されていないが、高脂肪食餌によってその発現量が非常に増加し、伝統天然物によって、その発現が抑制されるということが分かった。

10

〔1-2. 食餌によるTM4SF19 mRNAの発現量確認〕

追加して、各個体別TM4SF19 mRNA量を、PCRで増幅して再検証した。図1Bから分かるように、RNAシーケンシング結果と同一に、TM4SF19 mRNA量が、高脂肪食餌によって増加し、太陰調胃湯によって減少するということを確認することができた。前記PCRに使用されたプライマーは、下記表1の通りである。

【0062】

【表1】

マウス TM4SF19 フォワードプライマー	GGCTGTGATTTGCTTTGTCA (配列番号 9)
マウス TM4SF19 リバースプライマー	AGCTGGAGGAGGCTGATACA (配列番号 10)

20

【0063】

（実施例2. 脂肪細胞の分化によるTM4SF19の発現量確認）

脂肪前駆細胞である3T3-L1を利用して、TM4SF19が脂肪細胞分化に及ぼす影響を確認した。

【0064】

図2は、脂肪前駆細胞の培養及び分化のモデルの模式図を示している。脂肪前駆細胞である3T3-L1を、10%牛胎児血清（BCS: bovine calf serum）、100ユニット/mLのペニシリン及び100 µg/mLストレプトマイシンを添加したDMEM培地で、37℃、5% CO₂ インキュベーターで培養した。細胞の分化を誘導するために、細胞を、10%（v/v）FBSが含有されたDMEM培養液に、分化誘導剤DMI（デキサメタゾン、イソブチル-メチルキサンチン（IBMX）及びインシュリン）の存在下で2日間培養した。2日後、細胞培養液を、インシュリンだけ添加された培養液で交換した。さらに2日後、細胞培養液を、10%（v/v）FBSだけ添加された培養液で2日ごとに培地を交換し、脂肪細胞を得た。その後、得られた脂肪細胞から、実施例1のような方法を利用してRNAを得た。前記表1に示されたプライマーセットを利用して、RT-PCR方法で、TM4SF19の発現量を確認した。

30

【0065】

DMIを添加した後、0日後、2日後、4日後及び8日後、TM4SF19の発現量を確認して見た結果、図3のように、脂肪細胞分化が進むにつれ、TM4SF19 mRNA量が増加するということを確認することができた。

40

【0066】

（実施例3. TM4SF19過発現が脂肪細胞分化に及ぼす影響確認）

〔3-1. TM4SF19過発現細胞株の製造〕

TM4SF19が脂肪細胞分化に及ぼす影響を確認するために、TM4SF19過発現を誘導した3T3-L1細胞株を確立した。

【0067】

ウイルスベクターであるLPCX（Laboratory of Cell Regulation and Carcinogenesis, NIH）に、N末端に3個のヘマグルチニン（HA: hemagglutinin）エピトープが付いている3HA-TM4SF19をクローニングして入れた後、製造されたウイルスベクターを3T3-L1細胞に感染させ、TM4SF19の過発現細胞株を確立した。TM

50

4 S F 1 9 m R N A の過発現程度は、R T - P C R で確認した。前記 P C R で使用されたプライマーは、下記表 2 に示されている。

【 0 0 6 8 】

【表 2】

ヒト TM4SF19 フォワードプライマー	TATCCTGGGACTGAGCCTTG (配列番号 11)
ヒト TM4SF19 リバースプライマー	CTTCGACAGAGCCCACTCTT (配列番号 12)

【 0 0 6 9 】

〔 3 - 2 . 脂肪細胞の脂肪蓄積確認 〕

D M I で 3 T 3 - L 1 細胞の分化を誘導した後、オイルレッド O 染色法で、脂肪細胞の脂肪滴形成程度及び脂肪蓄積程度を確認した。図 4 A は、オイルレッド O 染色法によって染色された脂肪細胞の脂肪形成程度を示すイメージであり、図 4 B は、脂肪細胞の脂肪蓄積程度を示すものであり、染色された脂肪細胞にイソプロパノールを添加した後、常温でインキュベーションした後、ポリビニル樹脂で合成された 9 6 ウェルプレート、及びポリスチレン樹脂で合成された 9 6 ウェルプレートに移した後、O D ₄₂₀ で光学密度を測定して定量した値を示している。

10

【 0 0 7 0 】

図 4 A 及び図 4 B のように、T M 4 S F 1 9 過発現脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化が進むほど、対照群に比べ、細胞の脂肪蓄積が著しく増加したということを確認した。

【 0 0 7 1 】

〔 3 - 3 . 脂肪細胞の脂肪分化マーカー発現量確認 〕

次に、脂肪細胞分化を誘導した後、脂肪分化マーカーである C / E B P と P P A R との m R N A 量をリアルタイム定量的重合酵素連鎖反応 (real time quantitative P C R) を介して確認した。このときに使用されたプライマーは、下記表 3 の通りである。

20

【 0 0 7 2 】

【表 3】

C/EBP α フォワードプライマー	GTGTGCACGTCTATGCTAAACCA (配列番号 13)
C/EBP α リバースプライマー	GCCGTTAGTGAAGAGTCTCAGTTTG (配列番号 14)
PPAR γ フォワードプライマー	CGCTGATGCACTGCCTATGA (配列番号 15)
PPAR γ リバースプライマー	AGAGGTCCACAGAGCTGATTCC (配列番号 16)

30

【 0 0 7 3 】

その結果、図 5 A 及び図 5 B でのように、T M 4 S F 1 9 過発現された細胞において、C / E B P と P P A R との m R N A 量が、対照群の C / E B P と P P A R との発現量に比べ、著しく増加したということが観察された。

また、タンパク質レベルでの脂肪細胞分化マーカーの発現量を比較した。対照群 L P C X と T M 4 S F 1 9 過発現細胞株とに、R I P A バッファを加えて遠心分離し、上澄み液を得た。得られた上澄み液からタンパク質を分離させ、S D S - P A G E ゲルで電気泳動した後、P V D F にタンパク質を移した後、脂肪細胞分化マーカーの抗体を付け、発現量を確認した。3 H A が標識された T M 4 S F 1 9 は、H A (Y - 1 1 , Santa Cruz Biotech) であり、マーカー遺伝子は、脂肪細胞分化マーカー抗体サンプルキット (adipogenesis marker antibody sample kit , # 1 2 5 8 9 , Cell Signaling) で確認した。図 6 は、T M 4 S F 1 9 過発現細胞株の脂肪細胞分化マーカーの発現量を、タンパク質レベルで測定したところを示している。

40

【 0 0 7 4 】

その結果、図 6 でのように、アジポネクチン (adiponectin) 、 C / E B P 及び P P A R 、脂肪酸結合タンパク質 4 (F A B P 4) 、脂肪酸合成剤 (fatty acid synthase) 、アセチルコーエイカルボキシラーゼ、及び脂肪液滴膜の形成に作用するペリリピン (perilipin) の発現量が対照群に比べ、T M 4 S F 1 9 過発現細胞株で著しく増加したということを確認することができた。かような結果から、T M 4 S F 1 9 が、脂肪細胞分化

50

に關与する主要シグナルに作用するというを確認することができる。

【0075】

(実施例4 . T M 4 F 1 9 と結合するタンパク質 G r p 7 8 の発掘)

T M 4 S F 1 9 の役割や作用メカニズムについて、既知の報告がないので、脂肪細胞の分化時、T M 4 S F 1 9 と結合するタンパク質を発掘するために、分化前 (preadipocyte) 及び分化8日後 (D 8) に、それと結合するタンパク質を、免疫沈降反応で確認した。その結果、図7に示されているように、結合可能性を示すバンドが確認された。

【0076】

その後、さらなる分析のために、T M 4 S F 1 9 過発現細胞量を増やし、十分な量のタンパク質が、脂肪細胞分化8日後に得られるようにした。その後、ホルムアルデヒド交差結合 (formaldehyde cross-linkng) を行わせ、免疫沈降反応を行った。免疫沈降されたタンパク質は、coomassieブルーで染色し、S D S - P A G E ゲルに下りて分離した。分離されタンパク質バンドを切り、質量分析法 (mass-spectrometry) によるタンパク質分析を行った。分析されたさまざまな候補タンパク質において、肥満に關与すると知られた G r p 7 8 (uniprot - MOUSE、P 2 0 0 2 9) を選定し、食餌による G r p 7 8 発現の差を確認する追加実験を進めた。

10

【0077】

その結果、図8A及び図8Bでのように、T M 4 S F 1 9 遺伝子と G r p 7 8 遺伝子との発現は、高脂肪食餌 (H F) において、正常食餌 (N D) より増加し、高脂肪食餌 + 太陰調胃湯 (H F D - T) によって減少するというを確認することができた。

20

【0078】

(実施例5 . T M 4 S F 1 9 と G r p 7 8 との結合確認)

脂肪細胞分化前 (D 0) と脂肪細胞分化後 (D 7) との T M 4 S F 1 9 と G r p 7 8 との細胞内 (endogenous) 結合を確認した。

【0079】

具体的には、細胞内の T M 4 S F 1 9 と G r p 7 8 との結合を確認するために、T M 4 S F 1 9 過発現細胞のタンパク質を、分化前後に分けて分離した後、H A で免疫沈降反応を行った。得られたタンパク質は、G r p 7 8 抗体 (N - 2 0 , Santa Cruz Biotech) を使用して免疫プロットングした。T M 4 S F 1 9 と G r p 7 8 との in vitro 結合を確認するために、3 H A - T M 4 S F 1 9 と flag - G r p 7 8 とに対して、2 9 3 T 細胞 (A T C C) に、ポリエチレンイミン (P E I) を送達体として利用して、形質注入 (transfection) した。その後、抗 flag 抗体 (M 2 , Sigma) を利用して免疫沈降し、その収得物を、抗 H A 抗体 (Y - 1 1 , Santa Cruz Biotech) で確認した。

30

【0080】

その結果、図9Aから分かるように、細胞分化後、2つのタンパク質の結合が確認された。また、図9Bから分かるように、2つのタンパク質を293Tに過発現させた後、in vitro 結合を確認した結果、2つのタンパク質が結合するということが分かった。

【0081】

(実施例6 . T M 4 S F 1 9 と G r p 7 8 との結合部位確認)

T M 4 S F 1 9 は、4個の膜貫通ドメイン (transbrane domain) で構成されており、いまのところ、それ以外に知られたドメインはない。それを基準に、T M 4 S F 1 9 と G r p 7 8 との結合部位を確認するために、図10のように、N末端に G S T が標識された4種 (A、B、C及びD) の T M 4 S F 1 9 ドメイン欠失突然変異を製造した。具体的には、3 H A - T M 4 S F 1 9 をテンプレートとして、下記表4のプライマーを利用して、重合酵素連鎖反応を介して、所望の T M 4 S F 1 9 ドメイン欠失突然変異を製造した。N末端には、G S T が標識されたベクター (p G E X - 2 T , Smith and Johnson , Gene 6 7 : 3 1 , (1 9 8 8)) に、適切な酵素で切って付けてクローニングした。

40

【0082】

【表 4】

		配列	制限酵素
ヒト TM4SF19 全長	フォワード*	GATCGGATCCGTGTCCTCTCCCTGCACGCA (配列番号 17)	BamHI
	リバース	GATCGGGCCGCTCACTTCTCGCAGAGGCTGC (配列番号 18)	NotI
ヒト TM4SF19 D1	フォワード*	GATCGGATCCGTGTCCTCTCCCTGCACGCA (配列番号 19)	BamHI
	リバース	GATCGGGCCGCTCACTCAACAGGTAGGTGACA (配列番号 20)	NotI
ヒト TM4SF19 D2	フォワード*	GATCGGATCCGTGTCCTCTCCCTGCACGCA (配列番号 21)	BamHI
	リバース	GATCGGGCCGCTCACTGAAGCAGCGTATCTC (配列番号 22)	NotI
ヒト TM4SF19 D3	フォワード*	GATCGGATCCATGAAGAGTGGGCTCTGTGCGAAG (配列番号 23)	BamHI
	リバース	GATCGGGCCGCTCACTTCTCGCAGAGGCTGC (配列番号 24)	NotI
ヒト TM4SF19 D4	フォワード*	GATCGGATCCATGCTGTATGACCGTTGCTCTG (配列番号 25)	BamHI
	リバース	GATCGGGCCGCTCACTTCTCGCAGAGGCTGC (配列番号 26)	NotI

10

【 0 0 8 3 】

その結果、図 1 1 のように、TM4SF19 野生型、TM4SF19 C 及び D の突然変異が Grp78 と結合するところが観察された。従って、膜貫通ドメイン d 及びそのリンカー地域が、前記 TM4SF19 及び Grp78 の 2 つのタンパク質の結合に必要な部分であるということを確認することができた。

【 0 0 8 4 】

(実施例 7 . Grp78 を介した TM4SF19 の脂肪細胞分化確認)

TM4SF19 過発現が脂肪細胞分化を増加させるメカニズムを確認するために、TM4SF19 が過発現された細胞株に、下記表 5 に示されたマウス siRNA を添加し、RNA 干渉 (RNA interference) を誘発させることにより、Grp78 の発現を抑制させた。

20

【 0 0 8 5 】

具体的には、GRP78 siRNA と、形質注入を容易にする溶液である Invitrogene 社の Lipofectamine RNA iMAX を、メーカーで提示する方式通り反応させて結合体を形成させ、それを TM4SF19 過発現 NIH-3T3L1 細胞株に処理し、siRNA による GRP78 の発現抑制を誘導した。Grp78 の発現抑制程度は、リアルタイム qPCR で確認した。

【 0 0 8 6 】

30

【表 5】

GRP78-siRNA-1	CCGTACATTCAAGTTGATATT (配列番号 27)
	AATATCAACTTGAATGTACGG (配列番号 28)
GRP78-siRNA-2	CCCTTACACTTGGTATTGAAA (配列番号 29)
	TTTCAATACCAAGTGTAAAGG (配列番号 30)

【 0 0 8 7 】

前記細胞株の脂肪細胞分化能を確認した結果、図 1 2 のように、対照群に比べ、脂肪細胞分化能が低下するということが分かった。従って、TM4SF19 が、Grp78 を介して脂肪細胞分化を増加させるということが分かった。

40

【 0 0 8 8 】

(実施例 8 . TM4SF19 プロモーター転写因子結合部位の確認)

TM4SF19 のプロモーター 1964 には、脂肪細胞分化に重要な 3 個の SREBP 結合部位がある。図 1 3 のような TM4SF19 の欠失プロモーターコンストラクトを製造するために、NIH-3T3L1 脂肪前駆細胞において、誘電体 DNA (gDNA) をキットを利用して抽出した。下記表 6 に明記されたプライマーを利用して、重合酵素連鎖反応 (PCR) を介して、所望の TM4SF19 の欠失プロモーター量を増幅させた。増幅させた TM4SF19 欠失プロモーターの末端部位に、プロモーター分析に多く活用され、発光酵素 (luciferase) を有した pGL3-basic ベクター (Promega) を適切な制限酵素で切って付けてクローニングした。プロモーター分析のために、

50

クローニングされた T M 4 S F 1 9 の欠失プロモーターコンストラクトを、N I H - 3 T 3 L 1 細胞に、P E I を利用して注入し、N I H - 3 T 3 L 1 細胞の脂肪分化を誘導した。脂肪分化が終わった後、細胞を溶解させ、発光酵素に反応する基質を入れ、発光酵素の活性を測定することにより、T M 4 S F 1 9 欠失プロモーター活性を測定した。

【 0 0 8 9 】

【 表 6 】

プロモーター地域		配列	制限酵素
マウス TM4SF19-1964~ +397	フォワード*	GATCAGATCTGGACCCAGCACTCTCCTG (配列番号 31)	BglIII
	リバース	GATCAAGCTTAGGAGAACAAGAAAGTGGAG (配列番号 32)	HindIII
マウス TM4SF19-802~ +397	フォワード*	GATCAGATCTCACTCCACTTCCAGAATTTGTGA (配列番号 33)	BglIII
	リバース	GATCAAGCTTAGGAGAACAAGAAAGTGGAG (配列番号 34)	HindIII
マウス TM4SF19-350~ +397	フォワード*	GATCAGATCTAGAAATTTCTCGGGTATTAGT (配列番号 35)	BglIII
	リバース	GATCAAGCTTAGGAGAACAAGAAAGTGGAG (配列番号 36)	HindIII
マウス TM4SF19+173~ +397	フォワード*	GATCAGATCTTCGCCTGGGACAGAATGATT (配列番号 37)	BglIII
	リバース	GATCAAGCTTAGGAGAACAAGAAAGTGGAG (配列番号 38)	HindIII
マウス TM4SF19+273~ +397	フォワード*	GATCAGATCTGCAGGACCTTCCCGACCCTG (配列番号 39)	BglIII
	リバース	GATCAAGCTTAGGAGAACAAGAAAGTGGAG (配列番号 40)	HindIII

10

20

【 0 0 9 0 】

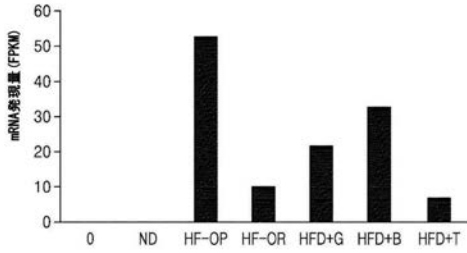
その結果、図 1 4 でのように、- 1 9 6 4 と - 8 0 2 との部位の有無により、プロモーター活性度が大差を示すということを確認することにより、該プロモーター部位が、脂肪分化時、重要な役割を果たすということを確認した。また、前記部位に主に作用する転写因子を分析した結果、脂肪分化に重要な役割を果たすと知られた S R E B P が結合する部位であるということを確認した。

30

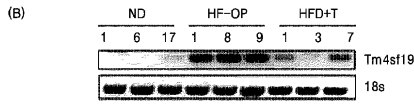
【 0 0 9 1 】

従って、前記 T M 4 S F 1 9 プロモーター 1 9 6 4 及び T M 4 S F 1 9 プロモーター 8 0 2 の間に結合する物質をスクリーニングし、肥満治療剤の候補物質を発掘することができるということを確認した。

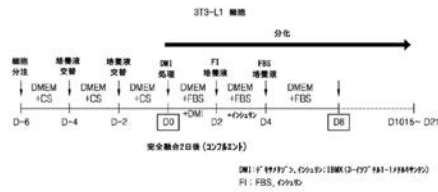
【 図 1 A 】



【 図 1 B 】



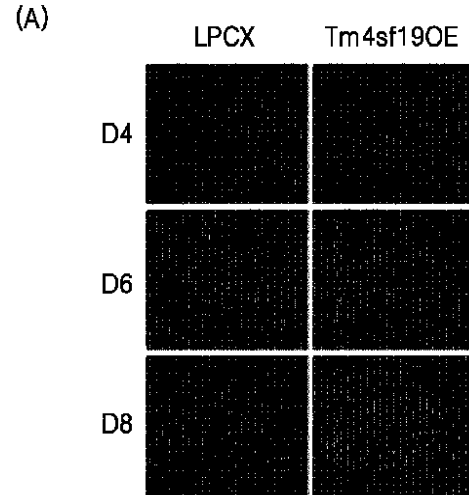
【 図 2 】



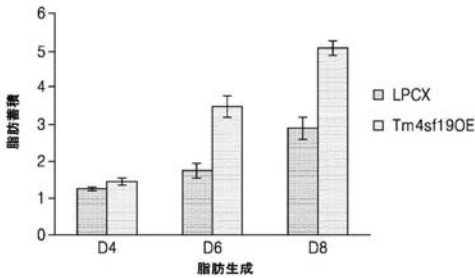
【 図 3 】



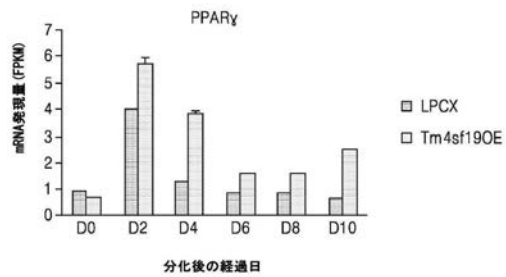
【 図 4 A 】



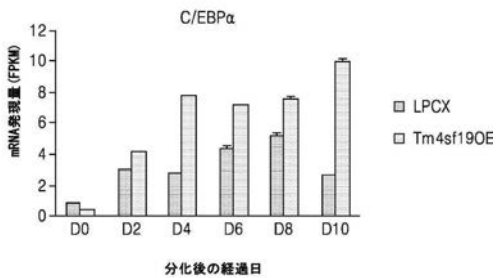
【 図 4 B 】



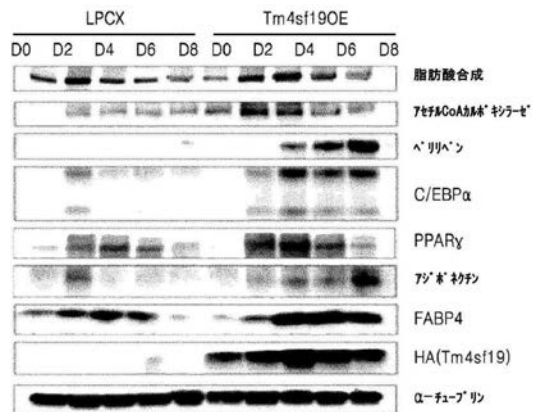
【 図 5 B 】



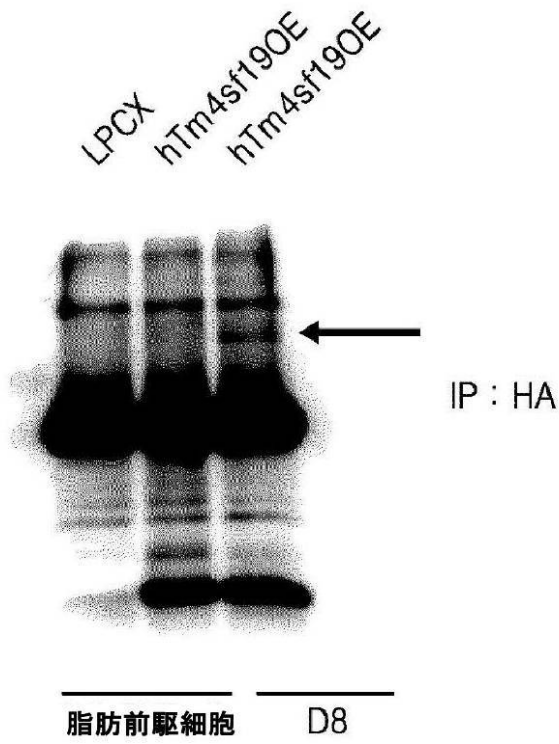
【 図 5 A 】



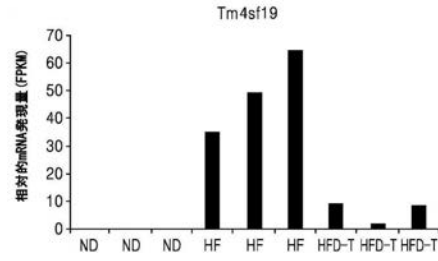
【 図 6 】



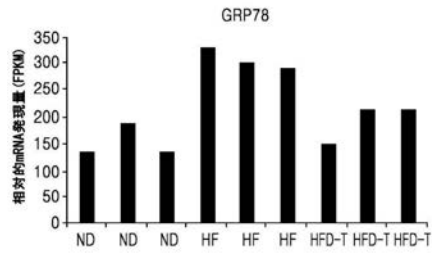
【 図 7 】



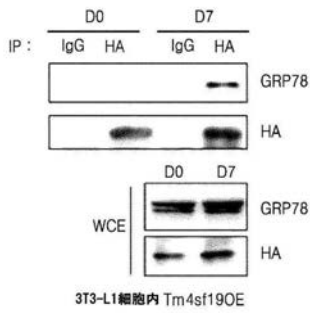
【 図 8 A 】



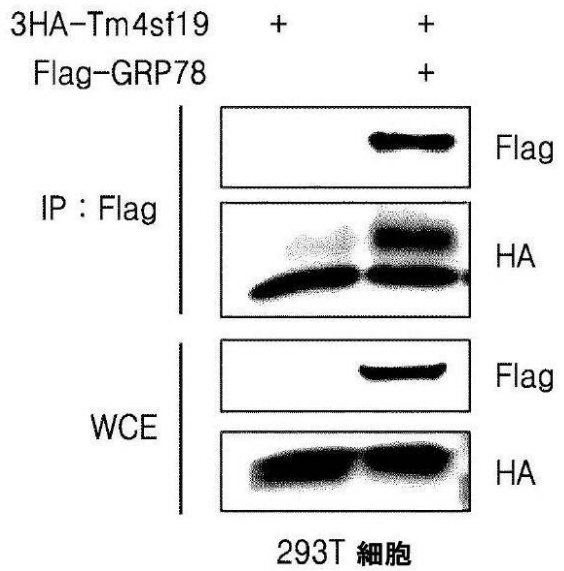
【 図 8 B 】



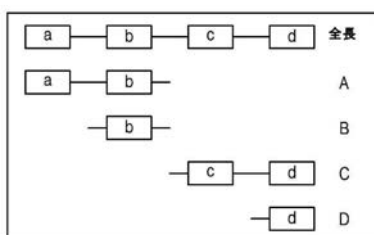
【 図 9 A 】



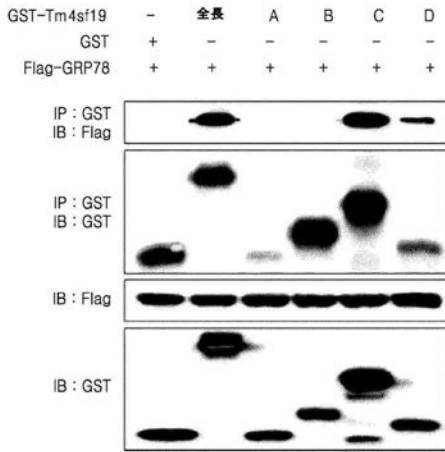
【 図 9 B 】



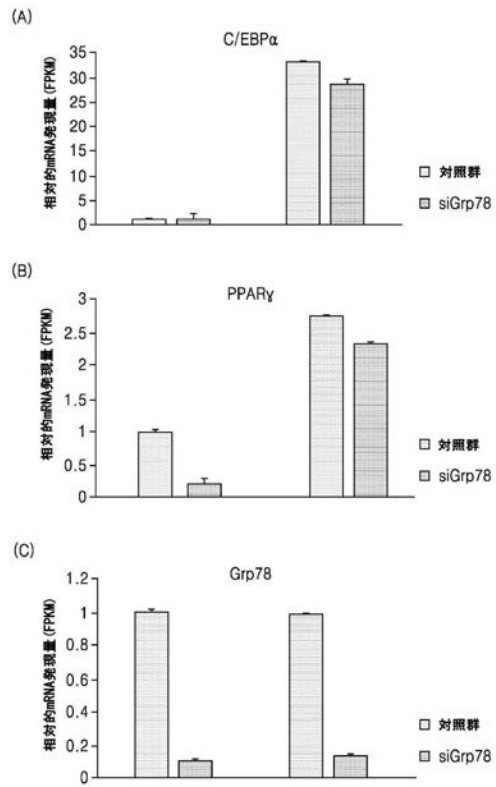
【 図 10 】



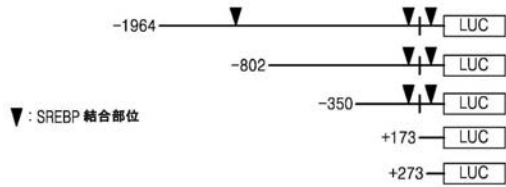
【 图 1 1 】



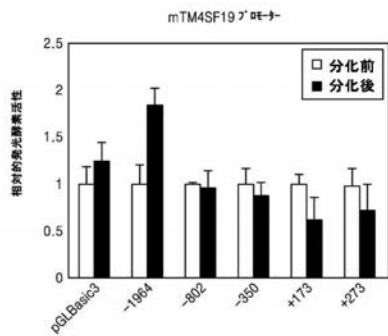
【 图 1 2 】



【 图 1 3 】




【 图 1 4 】



【配列表】

2018521332000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2016/006731
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>G01N 33/53(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i</i> 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) G01N 33/53; C12N 15/11; C12Q 1/68; C40B 30/04; G01N 33/50		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: TM4SF19, obesity, marker		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2015-0051524 A (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 13 May 2015 See abstract; claims 1, 3-6 and 8-10; paragraph [0033].	1-2,4-9,11
A		3,10,12-14
Y	LI, Jiayu et al., "Global Correlation Analysis for MicroRNA and Gene Expression Profiles in Human Obesity", Pathology-Research and Practice, (Electronic publishing) 14 January 2015, vol. 211, no. 5, pages 361-368 See abstract; table 1.	1-2,4-9,11
Y	NCBI, GenBank accession no. NM_001204897.1 (15 March 2015) See sequence.	2
A	US 2013-0005600 A1 (OLEK, Sven) 03 January 2013 See abstract; claims 1, 6 and 9-10.	1-14
A	WO 2008-122422 A1 (DEUTSCHES INSTITUT FUR ERNAHRUNGSFORSCHUNG STIFTUNG DES OFFENTLICHEN RECHTS VERTRETEN DURCH DEN STIFTUNGSVORSTAND) 16 October 2008 See abstract; claim 1.	1-14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 09 NOVEMBER 2016 (09.11.2016)		Date of mailing of the international search report 10 NOVEMBER 2016 (10.11.2016)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members


International application No.

PCT/KR2016/006731

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2015-0051524 A	13/05/2015	KR 10-1560706 B1	15/10/2015
US 2013-0005600 A1	03/01/2013	EP 2354242 A1	10/08/2011
		JP 2013-518574 A	23/05/2013
		WO 2011-095564 A1	11/08/2011
WO 2008-122422 A1	16/10/2008	DK 2129801 T3	03/11/2014
		EP 1978105 A1	08/10/2008
		EP 2129801 A1	09/12/2009
		EP 2129801 B1	06/08/2014
		HR P20141019 T1	19/12/2014
		SI 2129801 T1	31/12/2014

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2016/006731

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 33/53(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/53; C12N 15/11; C12Q 1/68; C40B 30/04; G01N 33/50 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: TM4SF19, 비만, 마커		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2015-0051524 A (경북대학교 산학협력단) 2015.05.13 요약; 청구항 1, 3-6 및 8-10; 단락 [0033] 참조.	1-2, 4-9, 11
A		3, 10, 12-14
Y	LI, JIAYU 등, 'Global correlation analysis for microRNA and gene expression profiles in human obesity', Pathology-Research and Practice, (전자공개)2015.01.14, 제211권, 제5호, 361-368 페이지 초록; 표 1 참조.	1-2, 4-9, 11
Y	NCBI, GenBank accession no. NM_001204897.1 (2015.03.15) 서열 참조.	2
A	US 2013-0005600 A1 (OLEK, SVEN) 2013.01.03 요약; 청구항 1, 6 및 9-10 참조.	1-14
A	WO 2008-122422 A1 (DEUTSCHES INSTITUT FUR ERNAHRUNGSFORSCHUNG STIFTUNG DES OEFFENTLICHEN RECHTS VERTRETEN DURCH DEN STIFTUNGSVORSTAND) 2008.10.16 요약; 청구항 1 참조.	1-14
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2016년 11월 09일 (09.11.2016)	국제조사보고서 발송일 2016년 11월 10일 (10.11.2016)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 이은규 전화번호 +82-42-481-3580	

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2015년 1월)

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2016/006731

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2015-0051524 A	2015/05/13	KR 10-1560706 B1	2015/10/15
US 2013-0005600 A1	2013/01/03	EP 2354242 A1	2011/08/10
		JP 2013-518574 A	2013/05/23
		WO 2011-095564 A1	2011/08/11
WO 2008-122422 A1	2008/10/16	DK 2129801 T3	2014/11/03
		EP 1978105 A1	2008/10/08
		EP 2129801 A1	2009/12/09
		EP 2129801 B1	2014/08/06
		HR P20141019 T1	2014/12/19
		SI 2129801 T1	2014/12/31

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 33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	M
G 0 1 N 33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
		G 0 1 N	33/15	Z

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ

Fターム(参考) 2G045 AA25

4B063 QA01 QA13 QA19 QA20 QQ02 QQ08 QQ22 QQ42 QQ52 QQ79
 QR02 QR32 QR35 QR48 QR55 QR62 QR72 QR77 QS05 QS25
 QS33 QS34 QS36 QX01 QX02

专利名称(译)	用于诊断肥胖的标记TM4SF19，以及使用它的方法		
公开(公告)号	JP2018521332A	公开(公告)日	2018-08-02
申请号	JP2018519665	申请日	2016-06-24
[标]发明人	キムソンジン パクスジン		
发明人	キム,ソン ジン パク,ス ジン		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/6876 C12N15/12 C12Q1/6897 C12Q1/66 G01N33/50 G01N33/15		
CPC分类号	A61K39/3955 C07K16/28 C12N5/0653 C12N15/1096 C12Q1/68 G01N33/5308 G01N33/6893 G01N2333/705 G01N2500/10 G01N2800/044 G16H10/40		
FI分类号	G01N33/53.D C12Q1/6876.ZNA.Z C12N15/12 C12Q1/6897 C12Q1/66 G01N33/53.M G01N33/50.Z G01N33/15.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA25 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ22 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR02 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS05 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02		
优先权	1020150091189 2015-06-26 KR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

包含与TM4SF19特异性结合的物质的用于诊断肥胖的组合物和试剂盒，以及使用该组合物和诊断肥胖的方法，可以用于有效地诊断肥胖和治疗抑制TM4SF19的肥胖。通过筛选使用的候选物质的方法，可以有效地选择能够治疗肥胖症的候选物质。

