

(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2008-546380

(P2008-546380A)

(43) 公表日 平成20年12月25日(2008.12.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 46 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2008-516328 (P2008-516328)
 (86) (22) 出願日 平成18年6月15日 (2006.6.15)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年2月18日 (2008.2.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2006/063256
 (87) 国際公開番号 W02006/134154
 (87) 国際公開日 平成18年12月21日 (2006.12.21)
 (31) 優先権主張番号 05291298.7
 (32) 優先日 平成17年6月17日 (2005.6.17)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 500470482
 サントル ナショナル ドゥ ラ ルシェ
 ルシュ シアンティフィック (セーエヌエ
 ールエス)
 CENTRE NATIONAL DE
 LA RECHERCHE SCIENT
 IFIQUE (CNRS)
 フランス共和国, エフー75016 パリ
 , リュ ミシェル-アンジュ, 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肥満と2型糖尿病のリスクに関連するENPP1 (PC-1) 遺伝子のハプロタイプおよびその応用

(57) 【要約】

本発明は、被験者のDNAまたはRNAサンプルにおける三つの特定のSNPを含むハプロタイプの存在および/または血清ENPP1タンパク質濃度の上昇の判定によって、肥満または肥満関連病理の発症に対する被験者のリスク増加を判定する方法を対象とする。本発明はキットにも、および前記ENPP1遺伝子ハプロタイプを含む単離された核酸配列、ベクターまたは組換え細胞にも関するものである。本発明はさらに、肥満または肥満関連病理の治療または予防のための化合物を選択する方法、および患者の肥満または肥満関連病理のリスクを減らす医薬品の有効性を判定する方法も含んでいる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ゲノム DNA または RNA を含む被験者の生体サンプルから、被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが増加しているかを判定する方法であって、

a) タンパク質 ENPP1 をコードする少なくとも一つの対立遺伝子または RNA 配列において、前記配列またはその断片が、三つの次の SNP、

- ・ K121Q、
- ・ IVS20 delT-11、および
- ・ 3' UTR ドメイン配列内に位置する SNP

を有するハプロタイプを含んでいるかを判定する過程と、

b) 前記ハプロタイプの存在は被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが高いことを示すので、前記配列またはその断片が前記ハプロタイプを含んでいるかを観察することによって前記被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが高いか否かを観察する過程

とから成る方法。

【請求項 2】

肥満関連病理が 2 型糖尿病、高血圧、高コレステロール血症および高脂質血症から成る群から選択されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

肥満関連病理が 2 型糖尿病であることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

3' UTR ドメイン内に位置する前記 SNP が、A > G + 1044 TGA、A > C + 1092 TGA、および C > T + 1157 TGA から成る SNP 群から選択されることを特徴とする、請求項 1 から 3 のいずれか一つに記載の方法。

【請求項 5】

3' UTR ドメイン内に位置する前記 SNP が、A > G + 1044 TGA および A > C + 1092 TGA から成る SNP 群から選択されることを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

3' UTR ドメイン内に位置する前記 SNP が A > G + 1044 TGA であることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

請求項 1 から 6 のいずれか一つに記載の方法の過程 a) と b) から成ることを特徴とする、被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが増加しているかを判定する方法であって、

過程 a) で、被験者が前記三つの SNP を含む前記ハプロタイプについて同型接合であるか否かが判定され、

過程 b) で、同型接合は被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが高いことを示すので、前記被験者が前記ハプロタイプについて同型接合であるかを観察することによって被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが高いか否かを観察する方法。

【請求項 8】

前記三つの対立遺伝子がリスクであるハプロタイプの有無を判別する過程 a) が、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって前記ハプロタイプ SNP を含む可能性のあるゲノム DNA 配列もしくは RNA 配列、またはその断片を増幅する過程を含む方法によって実施されることを特徴とする、請求項 1 から 7 のいずれか一つに記載の方法。

【請求項 9】

PCR 過程が、次のプライマーセット、

a) 「K121Q」SNP に対して、5' - TCATACTCAGGAAGACAGCAAA - 3' (フォワードプライマー SEQ ID No. 2) と 5' - CAATAGC

10

20

30

40

50

C A T G A C T C C T A A - 3 ' (リバースプライマー SEQ ID No . 3) 、
 b) I V S 2 0 d e l T - 1 1 の S N P に対して、5 ' - A G C A T T T T T A C A
 C T T T A G T T - 3 ' (フォワードプライマー SEQ ID No . 4) と 5 ' - A
 T A A T G T A T G G T A G G A T T T - 3 ' (リバースプライマー SEQ ID N
 o . 5) 、 および

c) A > G + 1 0 4 4 T G A の S N P に対して、5 ' - A T A T T C C T A T C C T G
 C T C A C T - 3 ' (フォワードプライマー SEQ ID No . 6) と 5 ' - T G C
 A G C T G G C C C T T A G G C C G - 3 ' (リバースプライマー SEQ ID No
 . 7)

を用いて、ゲノムDNA、mRNA、もしくは逆転写過程の結果得られたcDNA、また
 はその断片から実施されることを特徴とする、請求項7に記載の方法。

10

【請求項10】

前記ハプロタイプの存在がRNA配列またはその断片において判別されるときに、前記
 生体サンプルが肝臓、脂肪細胞または膵臓ベータ細胞のサンプルであることを特徴とする
 、請求項1から9のいずれか一つに記載の方法。

【請求項11】

被験者の血漿または血清サンプルから、前記被験者が肥満または肥満関連病理を発症す
 るリスクが増加しているかを判定する方法であって、

a) 血清または血漿のENPP1タンパク質濃度を測定する過程と、

b) 有意に高い濃度の存在は被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが高い
 ことを示すので、前記濃度が通常レベルより有意に高いかを観察することによって前記被
 験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが高いか否かを観察する過程
 とから成ることを特徴とする方法。

20

【請求項12】

血清または血漿のENPP1タンパク質の有意に高い濃度が、正常な血清または血漿の
 濃度より少なくとも10%高い、好適には15%以上高い濃度に対応することを特徴とす
 る、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記血清または血漿のENPP1タンパク質濃度が、ENPP1タンパク質を特異的に
 認識することができる抗体を用いて測定されることを特徴とする、請求項11または12
 に記載の方法。

30

【請求項14】

ENPP1タンパク質と前記抗体の間で特定の免疫複合体の形成を可能にする条件下で
 前記抗体を試験対象の血清または血漿と接触させ、形成された免疫複合体を定量するこ
 とを特徴とする、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

請求項11から14のいずれか一つに記載の方法を含み、さらに請求項1および4から
 6に定義された三つのSNPを含むハプロタイプの存在の判定を含むことを特徴とする、
 被験者の血漿または血清サンプルから前記被験者が肥満または肥満関連病理を発症する
 リスクが増加しているかを判定する方法。

40

【請求項16】

肥満関連病理が2型糖尿病、高血圧、高コレステロール血症および高脂質血症から成る
 群から選択されることを特徴とする、請求項11から15のいずれか一つに記載の方法。

【請求項17】

肥満関連病理が2型糖尿病であることを特徴とする、請求項11から16のいずれか一
 つに記載の方法。

【請求項18】

被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが増加しているかを判定するた
 めのキットであって、タンパク質ENPP1をコードし、三つの次のSNP、

・K121Q、

50

・ I V S 2 0 d e l T - 1 1、および

・ 3 ' U T R ドメイン配列内に位置する S N P

を有するハプロタイプを含む可能性のあるゲノム DNA または R N A の断片を増幅することのできる、少なくとも一つのプライマー対またはセットのプライマー対から成ることを特徴とするキット。

【請求項 1 9】

前記少なくとも一つのプライマー対またはセットのプライマー対が、タンパク質 E N P P 1 をコードし、三つの次の S N P、

・ K 1 2 1 Q、

・ I V S 2 0 d e l T - 1 1、ならびに

A > G + 1 0 4 4 T G A、A > C + 1 0 9 2 T G A、および C > T + 1 1 5 7 T G A から成る S N P 群から選択された 3 ' U T R ドメイン内に位置する S N P

を有するハプロタイプを含む可能性のあるゲノム DNA または R N A の断片を増幅することが可能であることを特徴とする、請求項 1 8 に記載のキット。

【請求項 2 0】

前記少なくとも一つのプライマー対またはセットのプライマー対が、タンパク質 E N P P 1 をコードし、三つの次の S N P、

・ K 1 2 1 Q、

・ I V S 2 0 d e l T - 1 1、および

・ 3 ' U T R ドメイン内に位置する、A > G + 1 0 4 4 T G A または A > C + 1 0 9 2 T G A の S N P

を有するハプロタイプを含む可能性のあるゲノム DNA または R N A の断片を増幅することが可能であることを特徴とする、請求項 1 9 に記載のキット。

【請求項 2 1】

前記少なくとも一つのプライマー対またはセットのプライマー対が、タンパク質 E N P P 1 をコードし、三つの次の S N P、

・ K 1 2 1 Q、

・ I V S 2 0 d e l T - 1 1、および

・ 3 ' U T R ドメイン内に位置する A > G + 1 0 4 4 T G A

を有するハプロタイプを含む可能性のあるゲノム DNA または R N A の断片を増幅することが可能であることを特徴とする、請求項 2 0 に記載のキット。

【請求項 2 2】

前記少なくとも一つのプライマー対が、

a) 「K 1 2 1 Q」 S N P に対して、5 ' - T C A T A C T C A G G A A G A C A G C A A - 3 ' (フォワードプライマー SEQ ID No. 2) と 5 ' - C A A T A G C C A T G A C T C C T A A - 3 ' (リバースプライマー SEQ ID No. 3)、

b) I V S 2 0 d e l T - 1 1 の S N P に対して、5 ' - A G C A T T T T T A C A C T T T A G T T - 3 ' (フォワードプライマー SEQ ID No. 4) と 5 ' - A T A A T G T A T G G T A G G A T T T - 3 ' (リバースプライマー SEQ ID No. 5)、および

c) A > G + 1 0 4 4 T G A の S N P に対して、5 ' - A T A T T C C T A T C C T G C T C A C T - 3 ' (フォワードプライマー SEQ ID No. 6) と 5 ' - T G C A G C T G G C C C T T A G G C C G - 3 ' (リバースプライマー SEQ ID No. 7)

であることを特徴とする請求項 1 8 から 2 1 のいずれか一つに記載のキット。

【請求項 2 3】

請求項 1 および 4 から 6 に定義された三つの S N P から成るハプロタイプの存在を少なくとも含んでいることを特徴とする、哺乳類、好適にはヒトの、E N P P 1 タンパク質をコードする遺伝子のゲノム DNA 配列または R N A 配列の単離された変異核酸配列またはその相補的配列。

10

20

30

40

50

【請求項 24】

請求項 23 に記載の核酸配列を含んでいるクローニングベクターおよび / または発現ベクター。

【請求項 25】

請求項 24 に記載のベクターによって形質転換された宿主細胞。

【請求項 26】

請求項 25 に記載の形質転換細胞を含有するか、または請求項 1 および 4 から 6 に定義された三つの SNP を含む少なくともハプロタイプを有する機能的な組換え ENPP1 遺伝子を含んでいる細胞を含有することを特徴とする、ヒト以外のトランスジェニック哺乳類。

10

【請求項 27】

肥満または肥満関連病理の治療または予防のための化学化合物または生化学化合物をスクリーニングするための、請求項 25 に記載の細胞または請求項 26 に記載のトランスジェニック哺乳類の使用法。

【請求項 28】

肥満または肥満関連病理の治療または予防のための化学化合物または生化学化合物を選択するための方法であって、

a) 請求項 25 に記載の細胞または請求項 26 に記載のトランスジェニック哺乳類を試験対象の前記化学化合物または生化学化合物と接触させる過程と、

b) ENPP1 遺伝子の発現産物が前記細胞または前記哺乳類において減少したか否かを観察する過程

20

とから成ることを特徴とする方法。

【請求項 29】

請求項 28 に記載の肥満または肥満関連病理の治療または予防のための化学化合物または生化学化合物を選択するための方法において、

・過程 a) において、試験対象の前記化学化合物または生化学化合物を請求項 26 に記載のトランスジェニック哺乳類または ENPP1 タンパク質を過剰発現するトランスジェニック哺乳類に投与し、さらに

・過程 b) において、血清または血漿の ENPP1 タンパク質濃度が基準と比較して減少したかを観察し、

30

前記濃度の減少が認められたときに前記化学化合物または生化学化合物を選択することを特徴とする方法。

【請求項 30】

患者における肥満または肥満関連病理のリスクを減らすための医薬品の有効性を判定する方法であって、

(a) 前記患者への前記医薬品の投与の前後に前記患者から血清または血漿サンプルを採取する過程と、

(b) 前記治療後の血清または血漿の ENPP1 タンパク質濃度の低下は肥満または肥満関連病理のリスクを低下する治療の指標であるため、前記採取したサンプルにおける血清または血漿の ENPP1 タンパク質濃度を測定する過程

40

とから成る方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は被験者の DNA もしくは RNA サンプルにおける三つの特定の SNP を含むハプロタイプの存在および / または血清 ENPP1 タンパク質濃度の上昇の判定によって、肥満または肥満関連病理の発症に対する被験者のリスクの増加を判定する方法を対象とする。本発明はキットにも、また、前記 ENPP1 遺伝子のハプロタイプを含む単離された核酸配列、ベクターまたは組換え細胞にも関するものである。本発明はさらに、肥満または肥満関連病理の治療または予防のための化合物の選択方法、および患者の肥満または肥

50

満関連病理のリスクを減らす医薬品の有効性を判定する方法も含んでいる。

【背景技術】

【0002】

肥満は深刻な疾患である。肉体的健康を損なうことに加えて、肥満は自尊心に影響を与えるので精神的健康にも大きな打撃を与えることがあり、それが最終的には人が他者と社会的に交流する能力を損なわせることがある。不幸なことに、肥満は十分理解されているとは言えず、肥満に対する社会的固定観念と推測はこの疾患の心理的影響を深刻化させる傾向にあるだけである。個人と社会に対する肥満の影響が大きいため、肥満治療の方法を発見するために多くの努力がなされたが、肥満の長期治療および/または予防に対してはほとんど成果が得られていない。

10

【0003】

肥満は体重障害の中で最も一般的なものであり、西欧諸国において最も重要な栄養障害であり、中年層では30%から50%に蔓延していると推定されている。除脂肪体重に対する体脂肪の過剰と定義される肥満は、他の疾患の一因にもなっている。例えば、この障害は冠動脈疾患、高血圧、脳卒中、糖尿病、高脂血症、および一部のガンなどの発症率も増加させる。肥満は単なる生活習慣の問題、すなわち自発的な過食の結果ではない。むしろ、肥満者と健常者の間に見られる身体組成の差は、代謝および神経/代謝相互作用の両方における差の結果である。これらの差は、ある程度、遺伝子発現の差、および/または遺伝子産物レベルもしくは遺伝子活性レベルの差に起因すると思われる。肥満の疫学研究はこの障害が遺伝する特性を呈することを強く示している。

20

【非特許文献1】Meyre, D. et al. A genome-wide scan for childhood obesity-associated traits in French families shows significant linkage on chromosome 6q22.31-q23.2. Diabetes 53, 803-11 (2004).

【非特許文献2】Atwood, L.D. et al. Genomewide Linkage Analysis of Body Mass Index across 28 Years of the Framingham Heart Study. Am. J. Hum. Genet. 71, 1044-50 (2002).

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

したがって、要するに、大きな、世界的な健康問題を引き起こしている肥満は、複雑で、高度に遺伝される形質である。かかる障害の重篤性、蔓延および潜在的不均一性に鑑み、とくに、この病理または肥満関連病理の発症のリスクを予見し、および/またはより標的を絞った薬剤を開発することができるように、肥満の制御に関与する遺伝子を識別することが強く必要とされている。それが本発明の目的である。

【課題を解決するための手段】

【0005】

以前の研究は、小児肥満の遺伝子座を、2.4 Mbの2型糖尿病・肥満に連鎖した領域を含む、染色体6q16.3-q24.2上に識別しており(ロッドスコア=4.06)¹、前記遺伝子座は、この領域における連鎖を報告している八つの公開されたゲノムスキャン全てに共通である¹⁻⁸。

40

【0006】

本発明者は、3147人のフランス系白人の被験者と6000人を超える欧州人の被験者において、580 kbのENPP1領域における遺伝子型・表現型の関連研究とENPP1のmRNAの発現研究を実施した。

【0007】

ENPP1遺伝子は、エクト型ヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼ(ENPP)ファミリーのメンバーであるエクト型ヌクレオチドピロホスファターゼ/

50

ホスホジエステラーゼ 1 (ENPP1) をコードする。コードされたタンパク質はジスルフィド結合で連結した二つの同一のサブユニットからなる II 型膜貫通糖タンパク質である。このタンパク質は広い特異性を有し、ヌクレオチドや糖ヌクレオチドのホスホジエステル結合、およびヌクレオチドや糖ヌクレオチドのピロリン酸結合を含む、多種多様な基質を切断する。このタンパク質はヌクレオシド 5' 三リン酸をその対応する一リン酸塩に加水分解する機能を有し得、またジアデノシンポリリン酸を加水分解し得る。この遺伝子の突然変異は、とくに、「突発性」乳児動脈石灰化 (GLU893TER、ARG774CYS、または LEU579PHE)、脊椎の後縦靭帯骨化症 (OPLL) (IVS20AS、1-BP DEL、T、-11) およびインスリン抵抗性 (LYS121GLN、「K121Q」突然変異) に関連づけられてきた。

10

【0008】

発明者は、この ENPP1 遺伝子の変異体、特に三つの対立遺伝子がリスクであるハプロタイプ (K121Q、IVS20 delT-11、および 3' UTR ドメイン配列内に位置する SNP (特に A>G+1044TGA、QdelTG)) と、小児肥満および病的肥満の大人との間に最も強い関連があることを実証した。発明者は、リスクハプロタイプの少なくとも一つの対立遺伝子の存在が、高い ENPP1 発現をさらに示唆する、小児における可溶性 ENPP1 タンパク質の血清レベルの増加と関連づけられることも実証した。くわえて、肥満に関連する A>G+1044TGA の SNP を含む長い ENPP1 の mRNA アイソフォームの発現が、グルコース恒常性に主として重要な三つの組織、すなわち、膵島細胞、脂肪細胞および肝臓に特異的であることが見出された。これらの所見は、肥満と 2 型糖尿病 (T2D) の両方の発症において ENPP1 のいくつかの変異体がインスリン抵抗性の成立に主要な役割を果たすことを初めて実証するものであり、蔓延している両疾患に共通する分子機構を提案するものである。

20

【0009】

発明者は、肥満および/または肥満関連病理を発症するリスクを診断することならびに治療処置のための分子を識別することに用いることができるスクリーニングアッセイも提供している。

【0010】

したがって、第一の態様において、本発明は、ゲノム DNA または RNA を含む被験者の生体サンプルから、前記被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが増加しているかを判定する方法であって、

30

a) タンパク質 ENPP1 をコードする少なくとも一つの対立遺伝子または RNA 配列において、前記核酸配列またはその断片が、表 3 に示された SNP で変異対立遺伝子の頻度が 5% を超える SNP から成る SNP 群から選択された、少なくとも一つの SNP を含んでいるかを判定する過程と、

b) 前記 SNP の存在は被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが高いことを示すので、前記配列またはその断片が前記少なくとも一つの SNP を含んでいるかを観察することによって、前記被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが高いか否かを観察する過程

40

とから成る方法を対象とする。

【0011】

好ましい実施態様において、本発明は、ゲノム DNA または RNA を含む被験者の生体サンプルから、前記被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが増加しているかを判定する方法であって、

a) タンパク質 ENPP1 をコードする少なくとも一つの対立遺伝子または RNA 配列において、前記核酸配列またはその断片が、IVS2 delG+8、K121Q、IVS8 T>G+27、IVS20 delT-11、A>G+1044TGA、および T>G+5954TGA から成る SNP 群から選択された少なくとも一つの SNP を含んでいるかを判定する過程と、

b) 前記 SNP の存在は被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが高いこと

50

を示すので、前記配列またはその断片が前記少なくとも一つのSNPを含んでいるかを観察することによって、前記被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが高いか否かを観察する過程

とから成る方法を含んでいる。

【0012】

第二の態様において、本発明はゲノムDNAまたはRNAを含む被験者の生体サンプルから、前記被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが増加しているかを判定する方法であって、

a) タンパク質ENPP1をコードする少なくとも一つの対立遺伝子またはRNA配列において、前記核酸配列またはその断片が、次の三つのSNP、

- ・ K121Q (rs1044498)、
- ・ IVS20 delT-11、および
- ・ 3'UTRドメイン配列内に位置するSNP

を有するハプロタイプを含んでいるかを判定する過程と、

b) 前記ハプロタイプの存在は被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが高いことを示すので、前記配列またはその断片が前記ハプロタイプを含んでいるかを観察することによって、前記被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが高いか否かを観察する過程

とから成る方法を対象とする。

【0013】

本明細書において、例えば「rs1044498」という表現の中の「rs」という用語は、データベースSNPにおけるSNPの名称に対応する。

【0014】

SNP「K121Q (rs1044498)」は、ENPP1変異体「K121Q」に対応するSNPであるrs1044498を示すものである(121は寄託番号(A.N.)NP_006199を有するENPP1アミノ酸配列(SEQ ID No. 14)におけるアミノ酸の位置であり、寄託番号AAH59375を有するENPP1アミノ酸配列においては173位に対応する。寄託番号BC059375はA.N.AAH59375で表される配列を有するヒトENPP1タンパク質をコードするmRNAのヌクレオチド配列に対応する)。

【0015】

SNP「IVS20 delT-11」は下に示したようにENPP1のエクソン21の前の-11位に対応する。

```

A a a a a t t a g c c a g g g c g t g g t g g g t c a c a c c t g t a a t c c c a
g c a c t t t g a g g g g g c t g c a g c g g a t g g a t c a c c t g a g g t c
a g g a g c t c a a g a c c a g c c t t g c c a a c a t g g t g a a a c c c c a
t c t c t a c c a a a a a c a c a a a a t t a g c c a g g c g t g g t g g c a
g a t g c c t g t a g t c c c a g c t a c t c g g g a a g c t g a g g c a g g a
g a a t c g c t t g a a c c t g g g g g c a g a g t t g c g g t g a g c c g a
g a t t g c g c c g c t g c c c t c t a g t c t g g g t g a c a g a g t g a g a
c t c c a t c t t a a a a a a t a a t a a t a a t a a a t a a a t a a a t a a
a t a a a t a a a t a t t t a a a a t t g t g t a g a t a a a a t c a t t c t a
a a c a t t a t t t c a t a t t a g c a t a g c a g a a t c t g a a a a t a t t
t g c a t a a a t a t g a c a a t t a a t a t c t t t a a t a t t g t a a a g c
a t t t t t a c a c t t t a g t t a g a a a a a a g a t g a a t a t a c t a g
t a g g a a a a t a g g g a a g g a c a t g a g c t g a c a g c t a g a g c t t
c a t a a t t t t a t g a t g t a g t t c a c c t t t a a a t a t t a a t a a a
g c a A t t t t c t t c t c t g t g c c t g a t a t c t g a g a g t t c t t c t
c a t t t t ( d e l T ) c g t t c t t c a g G A C A G T T T C T C T A C G G A A
G A C T T C T C C A A C T G T C T G T A C C A G G A C T T T A G A A T T C C T C

```

10

20

30

40

50

T T A G T C C T G T C C A T A A A T G T T C A T T T T A T A A A A A T A A C A C
 C A A A G T G A G T T A C G G G T T C C T C T C C C C A C C A C g t a a g t t t
 t t t c c t c t c c t g a c c t t c c c t t t t c t c c t t t t t g t t t t c t
 t t c t t g t t t a t a a a t c c t a c c a t a c a t t a t a g g g t a a t (S
 E Q I D N o : 1)

【0016】

「ハプロタイプ」という用語は個体またはサンプル内に存在する対立遺伝子の組合せを意味する。本発明において、ハプロタイプは、所与の個体に見出される、表現型に関連すると考えられる多型対立遺伝子の組合せを特に指している。

【0017】

本書における「多型」という用語は、異なるゲノムまたは個体の中で二つ以上の代替的なゲノム配列または対立遺伝子が生じることを意味する。「多型性」は特定のゲノム配列の二つ以上の変異体が個体群の中に見出される状況を意味する。「多型部位」は変異が生じている遺伝子座である。「一塩基多型」(SNP)は一塩基対の変化である。典型的には、一塩基多型は多型部位における一つのヌクレオチドの別のヌクレオチドによる置換である。単一のヌクレオチドの欠失または単一のヌクレオチドの挿入も、一塩基多型を生じさせる。

【0018】

変異核酸は、特に人間において自然に存在する、とりわけヌクレオチドの欠失、置換および/または付加に対応する、全ての代替的な核酸配列を意味するものと理解される。本願の場合、変異核酸配列はとりわけ、肥満または肥満関連病理を発症するリスクの増加に部分的に関連する。

【0019】

本書で交換可能に使用される用語「オリゴヌクレオチド」、「核酸」および「ポリヌクレオチド」には、一本鎖または二本鎖のいずれかの、二つ以上のヌクレオチドからなるRNA配列、DNA配列またはRNA/DNAハイブリッド配列が含まれる。

【0020】

本書で用いられる用語「核酸」および「核酸分子」は、DNA分子(例えばcDNAまたはゲノムDNA)およびRNA分子(例えばmRNA)、ならびにヌクレオチド類似体を用いて生成したDNAまたはRNAの類似体を含むものとする。核酸分子は一本鎖でも二本鎖でもよいが、好適には二本鎖DNAである。本明細書を通して、「ヌクレオチド配列」という表現は、ポリヌクレオチドまたは核酸を区別なく指すために用いられることがある。より正確には、「ヌクレオチド配列」は核酸物質自体を包含し、したがって、特定のDNA分子またはRNA分子を生化学的に特徴づける配列情報(すなわち四つの塩基の文字から選択された文字の連続)に限定されない。また、本書において、用語「核酸」、「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」は交換可能に使用される。

【0021】

好ましい実施態様において、前記肥満関連病理は、2型糖尿病、心臓疾患、冠動脈疾患、心筋梗塞、高血圧、および脂質に関連する代謝異常、例えば高コレステロール血症、高脂質血症などから成る群から選択される。

【0022】

より好ましい実施態様において、前記肥満関連病理は2型糖尿病(T2D)である。

【0023】

3'UTRドメイン配列内に位置する前記SNPに関して、好適にはこのSNPは、A>G+1044TGA(rs7754561)、A>C+1092TGA(rs7754586)、C>T+1157TGA(rs7754859)、G>T+1101TGA、T>C+1137TGA、C>T+1157TGA、G>T+1236TGA、T>C+1348TGA、G>A+1350TGA、A>G+1539TGAおよびT>C+1670TGAから成るSNP群から選択される。より好適には、SNPはA>G+1044TGA、A>C+1092TGAおよびC>T+1157TGAから成る群から選択され

10

20

30

40

50

、3' UTRドメイン内に位置するSNPであるA>G+1044TGAが最も好適である。

【0024】

同様に好適なのは、本発明による上述の方法の過程a)とb)から成ることを特徴とする、被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが増加しているかを判定する方法であって、

過程a)で、被験者が前記三つのSNPを含む前記ハプロタイプについて同型接合であるか否かが判定され、

過程b)で、同型接合は被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが高いことを示すので、前記被験者が前記ハプロタイプについて同型接合であるかを観察することによって被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが高いか否かを観察する方法である。

10

【0025】

天然の遺伝子と比較して遺伝子内の変異を検出することを可能にする方法は、もちろん、きわめて数多くある。それらの方法は本質的に二つの大きな部類に分けることができる。第一のタイプの方法は、変異の存在が、代替的配列を対応する正常な配列と比較することによって検出されるものであり、第二のタイプは、変異の存在が間接的に、例えば、変異の存在によるミスマッチの存在によって検出されるものである。

【0026】

対立遺伝子の変異性の判別方法の中で、本発明によるヌクレオチド配列のプライマー対を用いた、本発明による、三つの対立遺伝子がリスクであるハプロタイプから成る標的配列のいわゆるPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)あるいはPCR様増幅のための少なくとも一つの段階を含む方法が好適である。増幅産物を適切な制限酵素で処理してから、標的生成物の検出またはアッセイを実施してもよい。

20

【0027】

PCR様増幅は、核酸配列の直接的または間接的な複製を用いるか、あるいは標識系が増幅されている、全ての方法を意味するものと理解され、これらの技術はもちろん既知であり、一般的に、ポリメラーゼによるDNA増幅を含む。元のサンプルがRNAであるとき、あらかじめ逆転写を実施することが望ましい。現在この増幅を可能にする方法は数多くあり、例えば、いわゆるNASBA「核酸配列に基づく増幅(Nucleic Acid Sequence Based Amplification)」、TAS「転写に基づく増幅システム(Transcription based Amplification System)」、LCR「リガーゼ連鎖反応(Ligase Chain Reaction)」、「エンドラン増幅(Endo Run Amplification)」(ERA)、「サイクリングプローブ反応(Cycling Probe Reaction)」(CPR)、およびSDA「鎖置換増幅(Strand Displacement Amplification)」などの方法が当業者には周知である。

30

【0028】

したがって、本発明に従って被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが(高度に)増加しているかを判定する方法において、前記三つの対立遺伝子がリスクであるハプロタイプの有無を判別する過程a)が、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって前記ハプロタイプSNPを含む可能性のあるゲノムDNA配列もしくはRNA配列、好適にはDNA配列、またはその断片を増幅する過程を含む方法によって実施されることを特徴とする方法も、本発明の一部を形成する。

40

【0029】

三つの対立遺伝子がリスクであるハプロタイプの有無を判別する過程a)が、増幅PCR過程を含む方法によって実施されることを特徴とする前記方法において、使用されるプライマーは、ENPP1遺伝子のヌクレオチド配列から推定され、K121Q、IVS20 delT-11、および3' UTRドメイン配列(配列SEQ ID No. 15を有する、最初の1170bpの3' UTRドメインの野生型配列(TGAコドンを含む)

50

）内に位置するSNPという三つのSNPを含む、あるいはそれらから成る前記ハプロタイプの存在を検出することを可能にする、全てのプライマーとすることができる。

【0030】

「プライマー」という用語は、標的ヌクレオチド配列に対して相補的で、標的ヌクレオチド配列とハイブリダイズさせるために用いられる特定のオリゴヌクレオチド配列を意味する。プライマーはDNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼまたは逆転写酵素によって触媒されるヌクレオチド重合の開始点の役割を果たす。

【0031】

本発明の方法に使用できるプライマーは、当該分野で既知の任意の方法のために、開示された配列から設計することができる。プライマーの好ましいセットは、標的配列と同一の隣接範囲の3'末端がプライマーの3'末端に存在するように構成される。このような構造は、プライマーの3'末端が選択された核酸配列とハイブリダイズすることを可能にする。

10

【0032】

対立遺伝子特異的プライマーは、多型が隣接範囲の3'末端に存在し、隣接範囲がプライマーの3'末端に存在するように設計される。かかる対立遺伝子特異的プライマーは、多型で見られる二つの対立遺伝子のうちの一つを含む核酸サンプルと共に使用される限りにおいて、増幅または配列決定反応を選択的に引き起こす傾向がある。

【0033】

好ましい実施態様において、本発明に従った、被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが（高度に）増加しているかを判定する前記方法は、PCR過程が次のプライマーセット、

20

a) 「K121Q」SNPに対して、5'-TCATACTCAGGAAGACAGCAAA-3'（フォワードプライマー SEQ ID No. 2）と5'-CAATAGCCATGACTCCTAA-3'（リバースプライマー SEQ ID No. 3）、

b) IVS20 delT-11のSNPに対して、5'-AGCATTTTACACTTTAGTT-3'（フォワードプライマー SEQ ID No. 4）と5'-ATAATGTATGGTAGGATTT-3'（リバースプライマー SEQ ID No. 5）、および

c) A>G+1044TGAのSNPに対して、5'-ATATTCCTATCCTGCTCACT-3'（フォワードプライマー SEQ ID No. 6）と5'-TGCAAGCTGGCCCTTAGGCCG-3'（リバースプライマー SEQ ID No. 7）

30

を用いて、ゲノムDNA、mRNA、もしくは逆転写過程の結果得られたcDNA、またはその断片から実施されることを特徴とする。

【0034】

特定の実施態様において、本発明に従った、被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが（高度に）増加しているかを判定する前記方法は、PCR過程が次の二つのプライマーセット、

a) -5'-CTTTCCCCAATCACTACAGCATTTGTCA-3'（フォワードプライマー エクソン7、SEQ ID No. 8）と

-5'-TTTCAGACCATCCATCAGCATACCAAC-3'（リバースプライマー エクソン12、SEQ ID No. 9）、

および3'UTRのSNPについて

b) -5'-GTCCTGTGTTTGA CTTTGA TTTATGA-3'（フォワードプライマー エクソン23、SEQ ID No. 10）と

-5'-CCCTTAGGCCGTTGAAGAATGGTCA-3'（リバースプライマー 3'UTR、SEQ ID No. 11）

を用いて、ゲノムDNA、mRNA、もしくは逆転写過程の結果得られたcDNA、またはその断片から実施されることを特徴とする。

50

【 0 0 3 5 】

また、さらに別の好ましい実施態様において、本発明に従った、被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが（高度に）増加しているかを判定する前記方法は、前記ハプロタイプの存在がRNA配列またはその断片において判別されるときに、前記生体サンプルが肝臓、脂肪細胞または膵臓ベータ細胞のサンプルであることを特徴とする。

【 0 0 3 6 】

本発明のさらに別の実施態様は、被験者の血漿または血清サンプルから、前記被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが増加しているかを判定する方法であって、

a) 血清または血漿のENPP1タンパク質濃度を測定する過程と、

b) 有意に高い前記濃度の存在は被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが高いことを示すので、前記濃度が通常レベルより有意に高いかを観察することによって前記被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが高いか否かを観察する過程とから成る方法に関するものである。

10

【 0 0 3 7 】

好ましい実施態様において、血清または血漿のENPP1タンパク質の有意に高い濃度は正常な血清または血漿の濃度より少なくとも10%高い、好適には15%以上高い濃度に対応する。

【 0 0 3 8 】

本発明はさらに、本発明に従った、被験者の血漿または血清サンプルから前記被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが増加しているかを判定する方法であって、前記血清または血漿のENPP1タンパク質濃度が、ENPP1タンパク質またはその特定のエピトープ断片を特異的に認識することができる抗体を用いて測定されることを特徴とする方法にも関するものである。

20

【 0 0 3 9 】

好ましい実施態様において、前記方法は、ENPP1タンパク質と前記抗体の間で特定の免疫複合体の形成を可能にする条件下で前記抗体を試験対象の血清または血漿と接触させ、形成された免疫複合体を定量することを特徴とする。

【 0 0 4 0 】

他の態様には、被験者の血漿または血清サンプルから、およびENPP1遺伝子の三つの対立遺伝子がリスクであるハプロタイプを含んでいる可能性のあるゲノムDNA配列もしくはRNA配列またはその断片を含む生体サンプルから、前記被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが増加しているかを判定する方法であって、血清または血漿のENPP1タンパク質濃度を測定すること、そして前記血清または血漿のENPP1タンパク質濃度が正常レベルより有意に高いか否か、および前記DNA配列またはRNA配列が三つの対立遺伝子がリスクであるハプロタイプを有するか否かを観察することから成る方法も含まれる。

30

【 0 0 4 1 】

被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが（高度に）増加しているかを判定するこれらの方法のための好ましい実施態様において、肥満関連病理は2型糖尿病、高血圧、高コレステロール血症および高脂質血症から成る群から選択され、とりわけ2型糖尿病である。

40

【 0 0 4 2 】

別の態様において、本発明は、被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが増加しているかを判定するためのキットであって、ENPP1領域の次の三つのSNP、

・ K 1 2 1 Q、

・ I V S 2 0 d e l T - 1 1、および

・ 3 ' U T R ドメイン配列内に位置するSNP

におけるヌクレオチドの同一性を判定することによって被験者の遺伝子型を決定するための一つ以上のプライマーもしくはプライマーのセットまたはプローブから成り、必要な試薬と指示の一部または全てを随意に備えたキットも含まれている。

50

【0043】

前記キットのプライマーまたはプローブは随意に固体担体に取り付けられるか、ポリヌクレオチドのアレイまたはアドレス可能アレイの一部とすることができる。このキットは、シーケンシングアッセイ法、マイクロシーケンシングアッセイ法、ハイブリダイゼーションアッセイ法、対立遺伝子特異的増幅法、またはポリメラーゼ連鎖反応および/もしくはリガーゼ連鎖反応に基づくミスマッチ検出アッセイを始めとするがそれらに限定されない既知のいずれかの方法による、ENPP1領域位置のこれら三つのSNPにおけるヌクレオチドの同一性の判定で利用することができる。

【0044】

好ましい実施態様において、被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが増加しているかを判定するための前記キットは、タンパク質ENPP1をコードし、三つの次のSNP、

- ・K121Q、
- ・IVS20 delT-11、および
- ・3'UTRドメイン配列内に位置するSNP

を有するハプロタイプを含む可能性のあるゲノムDNAまたはRNAの断片を増幅することのできる、少なくとも一つのプライマー対またはセットのプライマー対から成ることを特徴とする。

【0045】

前記キットのためのより好ましい実施態様において、3'UTRドメイン内に位置するSNPは、A>G+1044TGA、A>C+1092TGA、G>T+1101TGA、T>C+1137TGA、C>T+1157TGA、G>T+1236TGA、T>C+1348TGA、G>A+1350TGA、A>G+1539TGA、およびT>C+1670TGAから成るSNP群から選択される。前記キットにさらにより好ましいのは、3'UTRドメイン内に位置するSNPが、A>G+1044TGA、A>C+1092TGA、およびC>T+1157TGAから成るSNP群から選択されることであり、なかでもA>G+1044TGAとA>C+1092TGAからなるSNP群が好ましく、A>G+1044TGAが最も好ましい。

【0046】

特定の実施態様において、本発明は、本発明に従った、被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが増加しているかを判定するためのキットであって、前記少なくともセットのプライマー対が、

a) 「K121Q」SNPに対して、5'-TCATACTCAGGAAGACAGCAA-3' (フォワードプライマー SEQ ID No. 2) と5'-CAATAGCCATGACTCCTAA-3' (リバースプライマー SEQ ID No. 3)、

b) IVS20 delT-11のSNPに対して、5'-AGCATTTTTTACA CTTTAGTT-3' (フォワードプライマー SEQ ID No. 4) と5'-ATAATGTATGGTAGGATTT-3' (リバースプライマー SEQ ID No. 5)、および

c) A>G+1044TGAのSNPに対して、5'-ATATTCTATCCTGCTCACT-3' (フォワードプライマー SEQ ID No. 6) と5'-TGCAAGCTGGCCCTTAGGCCG-3' (リバースプライマー SEQ ID No. 7)

であることを特徴とするキットを含んでいる。

【0047】

別の特定の実施態様において、本発明は、本発明に従った、被験者が肥満または肥満関連病理を発症するリスクが増加しているかを判定するためのキットであって、前記少なくともセットのプライマー対が、

a) -5'-CTTTC C C C A A T C A C T A C A G C A T T G T C A -3' (フォワードプライマー エクソン7、SEQ ID No. 8) と

10

20

30

40

50

- 5' - TTTTCAGACCCATCCATCAGCATACCAAC - 3' (リバープライマー エクソン12 SEQ ID No. 9)、および3' UTRのSNPについて

b) - 5' - GTCCTGTGTTTGACTTTGATTATGA - 3' (フォワードプライマー エクソン23 SEQ ID No. 10)と

- 5' - CCCTTAGGCCCGTTGAAGAATGGTCA - 3' (リバープライマー 3' UTR SEQ ID No. 11)

であることを特徴とするキットを含んでいる。

【0048】

別の態様において、本発明は、哺乳類、好適にはヒトの、ENPP1タンパク質をコードする遺伝子のゲノムDNA配列またはRNA配列の単離された変異核酸配列、あるいは単離された核酸分子、またはその相補的配列を対象とするものであり、前記単離された変異核酸配列が、先に定義された三つのSNPであるK121Q、IVS20 delT-11、ならびに、A>G+1044TGA、A>C+1092TGA、G>T+1101TGA、T>C+1137TGA、C>T+1157TGA、G>T+1236TGA、T>C+1348TGA、G>A+1350TGA、A>G+1539TGAおよびT>C+1670TGAから成るSNP群から選択されたSNPの一つのような3' UTRドメイン配列内に位置するSNPを含むハプロタイプを含んでいることを特徴とする。A>G+1044TGAまたはA>C+1092TGAのSNPが3' UTRドメイン配列内に位置するSNPとしてより好ましく、A>G+1044TGAのSNPが最も好ましい

10

20

【0049】

「単離された」核酸配列または核酸分子は、核酸の天然源内に存在する他の核酸配列または核酸分子から分離されたものである。好適には「単離された」核酸には、核酸が由来する被験者のゲノムDNA内の核酸に自然に隣接している配列(すなわち、核酸の5'末端および3'末端に位置する配列)がない。例えば、様々な実施態様において、本発明の単離された変異核酸配列は、核酸が由来する細胞のゲノムDNA内の核酸分子に自然に隣接している約5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、0.5kbまたは0.1kb未満のヌクレオチド配列を含むことができる。さらに、cDNA分子のような「単離された」核酸分子は、組換え技術によって生成されたときに他の細胞の物質または培養培地をほとんど含まないか、あるいは化学合成したときに化学前駆物質またはその他の化学物質をほとんど含まないものであり得る。本発明の核酸分子は標準的な分子生物学技術と本書に提供した配列情報を用いて単離することができる。先に定義した三つのSNPであるK121Q、IVS20 delT-11、および3' UTR内に位置するSNPを含むハプロタイプを含むENPP1変異核酸配列の全部または一部を用いて、本発明の単離された核酸分子は標準的なハイブリダイゼーション技術およびクローニング技術を用いて単離することができる(例えば、Sambrook, J., Frittsch, E.F., and Maniatis, T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual., 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989に記載)。

30

40

【0050】

本発明のもう一つの態様は、本発明のENPP1の単離された変異核酸配列をコードする核酸を有するベクター、好適には発現ベクターに関するものである。

【0051】

本書で用いられる「ベクター」という用語は、自身が結合している別の核酸を運ぶことができる核酸分子を意味する。ベクターの一つのタイプは「プラスミド」であり、これは環状の二本鎖DNAループを意味し、その中に追加のDNA断片をライゲーションすることができる。別のタイプのベクターはウイルスベクターであり、これにおいて追加のDN

50

A断片をウイルスのゲノム内にライゲーションすることができる。いくつかのベクターはそれが導入される宿主細胞内で自己複製が可能である（例えば、細菌由来の複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム型の哺乳類ベクター）。その他のベクター（例えば非エピソーム型の哺乳類ベクター）は宿主細胞に導入されると宿主細胞のゲノム内に組み込まれ、それによって宿主のゲノムと共に複製される。さらに、いくつかのベクターはそれらが作用可能に連結している遺伝子の発現を指示することができる。かかるベクターは本書において「発現ベクター」と称する。一般的に、組換えDNA技術において有益な発現ベクターはしばしばプラスミドの形態である。本明細書において、「プラスミド」と「ベクター」は、プラスミドが最も一般的に用いられるベクターの形であるため交換可能に使用できる。しかしながら、本発明は、同等の役割を果たすウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）などの、発現ベクターの他の形も含むものとする。

10

20

30

40

50

【0052】

本発明の組換え発現ベクターは宿主細胞内での核酸の発現に適した形で、本発明のENPP1タンパク質をコードする遺伝子の単離された変異核酸配列を含むことができるが、それは、組換え発現ベクターが、発現される核酸配列に作用可能に連結している、発現に使用される宿主細胞に基づいて選択された一つ以上の調節配列を含んでいることを意味する。組換え発現ベクターにおいて、「作用可能に連結した」とは、関心のあるヌクレオチド配列が（例えば、インビトロでの転写/翻訳システム内、またはベクターが宿主細胞内に導入される時は宿主細胞内で）ヌクレオチド配列の発現を可能にするように調節配列に連結していることを意味するものとする。用語「調節配列」はプロモーター、エンハンサーおよびその他の発現調節エレメント（例えばポリアデニル化シグナル）を含むものとする。酵母発現ベクターまたはパキウウイルス発現ベクターなどの本発明の発現ベクターは、タンパク質またはペプチドを生成するために、原核細胞または真核細胞である宿主細胞内に導入することができる。別の実施態様において、本発明の発現ベクターは哺乳類細胞または特定の細胞タイプにおいて選択的に核酸の発現を指示することができる（例えば、核酸の発現のために組織特異的な調節エレメントが用いられる）。

【0053】

本発明の別の態様は、本発明の組換え発現ベクターが導入された宿主細胞に関するものである。用語「宿主細胞」と「組換え宿主細胞」は本書では交換自在に用いられる。かかる用語は特定の被験者の細胞だけでなく、かかる細胞の後代または潜在的な後代も意味するものとする。突然変異または環境の影響によって後続の世代で特定の変化が発生することがあるので、かかる後代は、実際には、親細胞と同一でないこともあるが、それでも本書に使用される用語の範囲に含まれるものとする。

【0054】

宿主細胞は任意の原核細胞または真核細胞とすることができる。例えば、本発明の単離されたENPP1変異核酸配列は、大腸菌などの細菌細胞、昆虫細胞、酵母細胞または哺乳類細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）またはCOS細胞またはヒトの細胞）内で発現させることができる。その他の適切な宿主細胞は当業者には周知であり、アフリカツメガエル卵母細胞が含まれる。

【0055】

ベクターDNAは、通常の形質転換またはトランスフェクション技術を介して原核細胞または真核細胞内に導入することができる。本書に使用される用語「形質転換」または「トランスフェクション」は外来核酸（例えばDNA）を宿主細胞内に導入するための当技術分野で知られている様々な技術を意味するものとし、リン酸カルシウム共沈または塩化カルシウム共沈、DEAE-デキストランを用いたトランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションが含まれる。宿主細胞の形質転換またはトランスフェクションに適した方法は、Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring

ng Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) およびその他の実験マニュアルに見出すことができる。

【0056】

哺乳類細胞の安定したトランスフェクションについては、使用する発現ベクターまたはトランスフェクション技術に応じて、ごく一部の細胞だけが外来DNAをそのゲノム内に組み込むことが知られている。これらの組み込み体を識別し選択するために、選択可能なマーカー（例えば抗生物質に対する耐性）をコードする遺伝子が一般的に、関心のある遺伝子と共に宿主細胞内に導入される。好ましい選択可能なマーカーには医薬品に対する耐性を付与するものが含まれる。

10

【0057】

本発明の宿主細胞は、ヒト以外のトランスジェニック動物の生産にも使用できる。例えば、一つの実施態様において、本発明の宿主細胞は、その中に本発明による単離されたENPP1変異核酸配列が導入される受精卵母細胞または胚性幹細胞である。これによって、かかる宿主細胞を、ゲノム内に本発明の外因性のENPP1変異核酸配列が導入されたヒト以外のトランスジェニック動物、または本発明のハプロタイプの変異体を挿入するために内因性のENPP1核酸配列が改変された相同組換え動物の作成に用いることができる。かかる動物は、ENPP1ポリペプチドまたはその断片の機能および/または活性を研究するために、またENPP1のモジュレーターを識別および/または評価するために有益である。本書で用いられる「トランスジェニック動物」は、その一つ以上の細胞が導入遺伝子を含むヒト以外の動物、好適には哺乳類、より好適にはラットやマウスなどの齧歯類である。トランスジェニック動物のその他の例には、ヒト以外の霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などが含まれる。導入遺伝子はトランスジェニック動物が発生する元となる細胞のゲノム内に組み込まれる外因性DNAであり、該外因性DNAが成熟動物のゲノム内に残存することで、トランスジェニック動物の一つ以上の細胞タイプまたは細胞組織におけるコードされた遺伝子産物の発現を指示する。本書で用いられる「相同組換え動物」は、動物の発生に先立って、内因性ENPP1遺伝子が、内因性遺伝子と、動物の細胞内、例えば動物の胚細胞内に導入された外因性DNA分子との間の相同組換えによって改変された、ヒト以外の動物、好適には哺乳類、より好適にはマウスである。

20

30

【0058】

本発明のトランスジェニック動物は、例えばマイクロインジェクションまたはレトロウイルス感染によって本発明のENPP1変異核酸を受精卵母細胞の雄性前核内に導入し、卵母細胞を擬妊娠した雌の代理母動物内で発生させることにより作成することができる。あるいは、マウスまたはラットのENPP1遺伝子の変異体などの、本発明によるヒトENPP1遺伝子の変異体のヒト以外の相同体を導入遺伝子として用いることができる。胚操作およびマイクロインジェクションを介してトランスジェニック動物、特にマウスなどの動物を作成する方法は当技術分野において一般的となっており、多く報告されている。

【0059】

相同組換えを介してゲノム内に所望の核酸が導入された動物を作成するために、本発明のハプロタイプの少なくとも三つの突然変異が導入され、それによって改変されたENPP1遺伝子の少なくとも一部を有するベクターが準備される。

40

【0060】

したがって、本発明は、本発明による形質転換細胞を含むか、先に定義した三つのSNP（K121Q、IVS20 delT-11、および3'UTRドメイン配列内に位置するSNP）を含むハプロタイプを少なくとも含む機能的な組換えENPP1遺伝子を有する細胞を含む、ヒトを除くトランスジェニック哺乳類に関するものである。

【0061】

別の態様において、本発明は肥満または肥満関連病理の治療または予防のための化学化合物または生化学化合物をスクリーニングするための、本発明による細胞またはトラン

50

スジェニック哺乳類の使用を含んでいる。

【0062】

好ましい実施態様において、肥満または肥満関連病理の治療または予防のための化学化合物または生化学化合物を選択するための前記方法は、

a) 本発明による形質転換細胞またはトランスジェニック哺乳類を試験対象の前記化学化合物または生化学化合物と接触させる過程と、

b) ENPP1 遺伝子の発現産物が前記細胞または前記哺乳類において減少したか否かを観察する過程

とから成ることを特徴とする。

【0063】

より好適な実施態様において、本発明による肥満または肥満関連病理の治療または予防のための化学化合物または生化学化合物を選択するための前記方法は、

・過程 a) において、試験対象の前記化学化合物または生化学化合物を本発明によるトランスジェニック哺乳類または ENPP1 タンパク質を過剰発現するトランスジェニック哺乳類に投与し、

・過程 b) において、血清または血漿の ENPP1 タンパク質濃度が基準と比較して減少したかを観察し、

前記濃度の減少が認められたときに前記化学化合物または生化学化合物を選択することを特徴とする。

【0064】

別の態様において、本発明は患者における肥満または肥満関連病理のリスクを減らすための医薬品の有効性を判定する方法であって、

(a) 前記患者への前記医薬品の投与の前後に前記患者から血清または血漿サンプルを採取する過程と、

(b) 前記治療後の血清または血漿の ENPP1 タンパク質濃度の低下は肥満または肥満関連病理のリスクを低下させる治療の指標であるため、前記採取したサンプルにおける血清または血漿の ENPP1 タンパク質濃度を測定する過程

とから成る方法も対象とする。

【0065】

実施例

本発明の方法のいくつかを下記の実施例において説明するが、それらは例示のために提供されるものであり、いっさい制限するものではない。本書に規定した本発明には、本発明の趣旨と範囲を逸脱することなく数多くのその他の変更と変型を行うことが可能である。

【0066】

図面の簡単な説明

図1. 421人の肥満児と298人の対照個体における、ENPP1 遺伝子を含む580 kb 領域内の53のSNP間のペアワイズLD。高いLDおよび低いLD(デルタ)の領域はそれぞれ赤と青の影で示されている。グラフは物理地図の縮尺のものである。

図2. ARG1、CRSP3、ENPP3、ENPP1 およびCTGF 遺伝子を含む580 kb 領域内の53のSNPの対立遺伝子の関連。青い円は421人の肥満児と298人の対照個体の間の対立遺伝子分布の比較についての $-\log_{10}(p \text{ 値})$ に対応する。赤い円は62の「6q-evidence」家族の肥満児と298人の対照個体の間の対立遺伝子分布の比較についての $-\log_{10}(p \text{ 値})$ に対応する。この図は物理地図位置に従った縮尺ではない。実際には、SNPは関連の試験結果を容易に視覚表示できるように等距離になっている。

図3. 279人の小児におけるENPP1 タンパク質の血清レベルとBMIのZスコアとの間の相関。

図4. リスクハプロタイプの存在に照らした、89人の痩せた小児のENPP1の血清レベル。

10

20

30

40

50

図5Aおよび5B. ヒトの組織におけるPC-1/ENPP1のmRNAの発現。 -
 アクチンとENPP1を検出するためにPCRを実施した。レーン1:心臓、2:脳、3:
 胎盤、4:肺、5:肝臓、6:骨格筋、7:腎臓、8:膵臓(MTCパネル)、9:ヒ
 ト細胞、10:皮下脂肪細胞、および11:大網脂肪細胞。五つのENPP1アイソ
 フォームがデータベース(<http://www.ncbi.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=human&1=ENPP1>)
 に記載されていることを考慮して、少なくとも3つの転写産物に共通のエクソン7と1
 2の間のコード領域を増幅するプライマーを最初に設計し、普遍的に発現されることを見
 出した(図5A)。つぎに、より大きな3'UTR(肥満に関連するSNPであるA>G
 +1044TGAを含む、TGAの下流の1170の塩基)に特徴を有する長いmRNA
 アイソフォームに特異的なプライマーを設計し、膵臓とベータ細胞、皮下脂肪細胞および
 大網脂肪細胞および肝臓に特異的な発現を見出した(図5B)。

【実施例1】

【0067】

方法

a) 被験者

それぞれのサンプルについて、表現型の特徴と実施した研究のタイプを表1にまとめた

【0068】

【表1】

表1. 研究に用いられたフランス人とオーストリア人サンプルの明細。
 性別比: 女性/男性

個体群	数	年齢(歳)	BMI(kg/m ²)	性別比	研究種別
肥満児	N=529	10.4±3.9	28.2±6.4	281/248	関連、6q連鎖、TDT、 表現型、血清
肥満児の両親	N=464	40.7±5.8	31.4±7.7	232/232	表現型
病的肥満	N=696	45.8±12.0	47.4±7.4	520/176	関連
中程度肥満	N=717	49.1±14.7	34.6±4.0	401/316	関連
肥満成人	N=325	35.6±12.1	32.3±9.1	134/191	TDT
フランス人T2D	N=752	59.3±11.3	28.1±4.3	379/373	関連
オーストリア人T2D	N=503	56.7±10.2	30.4±6.3	208/295	関連
痩せた小児	N=198	14.6±2.2	18.3±2.2	99/99	関連、血清
対照1	N=556	55±6.0	22±1.8	254/302	関連
対照2	N=649	50.9±12.7	22.9±2.3	394/255	関連
オーストリア人対照	N=758	52.2±5.8	26.8±4.0	293/465	関連

【0069】

529人の血縁関係のない肥満児を研究した。リールのCNRS-パスツール研究所ユ
 ニットとジャンヌ・ドゥ・フランドル病院で、少なくとも一人の肥満児を有する336の
 家系を収集した。106人の追加の肥満児はトゥールーズの小児病院で集められ、87人
 はパリのトゥルソー病院で集められた。BMIがRolland-Cacheray¹
²の表に報告された年齢と性別についてのBMI(フランスの一般的個体群)の97分位

数より大きい子供たちは、欧州小児肥満グループ (European Childhood Obesity Groupe, ECOG)^{4 2} の勧告に従って肥満と診断した。696人の血縁関係のない病的肥満 (BMI 40 kg/m^2) および717人の血縁関係のない中程度肥満 (BMIが $30 \sim 40 \text{ kg/m}^2$) の成人患者の組を使用した。TDTには、成人肥満を有する87の家系 (BMIが 40 kg/m^2 を超える一人の発端者、BMIが 27 kg/m^2 を超える少なくとも一人の兄弟姉妹、および少なくとも一人の親) も使用した。これらの個体はパリのオテル・ディウ病院の栄養科とリールのCNRS - パスツール研究所ユニットで収集した。752人のT2D被験者はコルベイユ=エソンのシュド・フランシアン病院またはリールのCNRS - パスツール研究所ユニットで収集した。耐糖能異常および2型糖尿病の状態はWHOの1999年の基準に従って定義した。556人の対照被験者の第一の組はSUVIMAX個体群から得られた^{4 3}。649人の対照個体の第二の組はリールのCNRS - パスツール研究所ユニットと「フルルベ=ラヴァンチ市保健所」研究^{4 4} を通じて収集した。1261人の血縁関係のないオーストリア人被験者の組は前述の個体群の無作為な小集団である^{4 5}。年齢を適合させていない対照の使用を正当化し、SNPとハプロタイプの頻度に対する年齢コホートの影響がないことを確認するために、「フルルベ=ラヴァンチ市保健所」研究^{4 4} から得た198人の対照小児においてK121Q、IVS20 delT-11およびA>G+1044TGAの多型の遺伝子型を決定して、対照成人と比較してQ対立遺伝子 (13.8%) およびリスクハプロタイプ (7.8%) の頻度がきわめて一致していることを見出した。458組の対照トリオ (両親と一人の痩せた子供) は「フルルベ=ラヴァンチ市保健所」のコホートに由来する。書面によるインフォームド・コンセントを参加の前に全ての被験者から得た。遺伝学的研究はパリのオテル・ディウとリールのCHRUの倫理委員会によって承認された。BMIのZスコアはColeの方法に従って得られた^{4 6}。経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT) の際、被験者は12時間の一晚の断食の後に、1) 被験者の体重が 50 kg 未満のときは 1 g グルコース / kg を、2) 被験者の体重が 50 kg を超えるときは 75 g のグルコースを与えられた。血漿のグルコースとインスリンの濃度を測定するために0分、30分、60分、90分および120分に血液サンプルを採取した。血漿インスリンの定量的測定は二抗体ラジオイムノアッセイを用いて実施した。血清グルコース濃度はグルコースオキシダーゼ法を用いて測定した。インスリン分泌指数はSeltzerらに従って計算した^{4 7}。

【0070】

b) 連鎖解析

306人の個体を含む68の核家族において、最初のゲノムワイドな研究¹ の連鎖区間をカバーする五つの多型マーカー (D6S1720、D6S434、D6S287、D6S1656、D6S292) を遺伝子型決定に用いた。2点解析および多点解析をGeneHunterソフトウェア^{4 9} により実行されるMLS試験^{4 8} を用いて実施した。

【0071】

c) 突然変異のスクリーニング

染色体6q16 - q24遺伝子座での連鎖が見られる家族の中から無作為に選択された48人の血縁関係のない肥満児と、フランス人の家系から選択された24人の血縁関係のない肥満ではない正常血糖の対照被験者とにおいて、DHLPC (Transgenomic, San Jose, Calif., USA) を用いて25のエクソンとUTR (上流5' UTRと下流3' UTR) をスクリーニングした。変異体のプロフィールは、自動ABI Prism 3700 DNAシーケンサーとBig Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems、フォスターシティ、カリフォルニア、USA) を組み合わせて用いて配列決定した。

【0072】

d) 遺伝子型決定

マイクロサテライトマーカーの遺伝子型決定を自動DNA配列決定機 (ABI 377

10

20

30

40

50

、PEABI)で蛍光に基づいた半自動の技術を用いて実施した。プライマーはMWGBiotechによって合成されたものである。SNPはLightCycler(登録商標)、LightTyper(登録商標)(Roche Diagnostics、パーゼル、スイス)で、TaqMan(登録商標)(Applied Biosystems、フォスターシティ、カリフォルニア、USA)で、あるいは直接の配列決定によって遺伝子型決定した。LightCycler(登録商標)とLightTyper(登録商標)のためのプローブはドイツのTIB Molbiol(登録商標) Syntheselaborによって合成されたものである。580kbの領域をカバーするために、白人において対立遺伝子頻度が>10%のSNPを、Applied Biosystem SNP Viewer IIソフトウェアを用いて選択した。SNPの遺伝子型決定のミスを防ぐために、さらなる検証のためDNAサンプルの10%を体系的に再び遺伝子型決定した。全てのSNPについて一致率は100%であった。

10

【0073】

e) 統計分析

症例と対照の間の対立遺伝子頻度の比較を²検定を用いて実施し、p値はプログラムCLUMP⁵⁰を用いて経験的に計算した。ハプロタイプの頻度はUNPHASEDソフトウェア(<http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/personal/frank/>)⁵¹によって決定し、群間で比較した。質的形質または量的形質の変異に対するハプロタイプの影響はUNPHASEDソフトウェアのサブプログラムcophaseおよびqt-phaseを用いて評価した⁵¹。関連の独立性はソフトウェアTHESIAS³²で試験した。THESIASはEMアルゴリズムも実行し、線形フレームワークにおけるハプロタイプの影響のモデルの尤度試験を可能にする。このプログラムを使用して、肥満の状態に対するそれぞれのSNPの影響がK121Q単独の影響から独立しているかを試験した。ハプロタイプ分析は、これらのSNPが部分的にLDがあるので、多重ロジスティック回帰よりも好ましい。SNPとハプロタイプに対するTDT分析はUNPHASEDソフトウェア⁵¹で実行されるTDT法によって実施した。リスクハプロタイプの三つのSNPの間のLDが低いので、個体群の層別化に対して強固な、真のTDTを得るために、明白なハプロタイプのみを使用した。連鎖に対するリスクハプロタイプの影響を評価するために、Genotype IBD Sharing Test(GIST)手順²³を使用した。これは家族のNPLスコアと家族内のリスクハプロタイプ頻度の指数との間の相関を試験するものである。

20

30

【0074】

f) 連鎖不均衡分析

24の識別されたENPP1のSNPの間、および580kbのENPP1領域における53のSNPの間のLD(連鎖不均衡)を調査した。ペアワイズのデルタ(SNPの間の相関係数)を遺伝子型から推定し、結果をGOLDプログラム(<http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/GOLD/>)によって視覚化した。

【0075】

g) ENPP1のmRNAの発現

MTCパネル(BD Biosciences Contech)、皮下脂肪細胞および大網脂肪細胞(提供:G Fruhbek, University of Navarra、パンプロナ、スペイン)およびFACSで精製した膵臓ベータ細胞(提供:Human Pancreatic Cell Core Facility, University Hospital、リール、フランス⁵²)から得たヒトcDNAをmRNA発現の分析に使用した。ベータ細胞の純度は免疫化学(98%インスリン陽性細胞)とPCR(外分泌細胞に特徴的な、キモトリプシンプライマーによる増幅の不存在)によって確認した。PCRは、10mMのTris-HCl、1.5mMのMgCl₂、50mMのKCl、10mMの各dNTP、2.5UのTaqポリメラーゼ(Promega)、フォワードプライマーとリバースプライマーの両方を30mM、および3μlの一本鎖

40

50

cDNAを含む、25 μ lの混合溶液内で実施した。ENPP1のためのフォワードプライマーは(SEQ ID No. 8) 5' - CTTTCCCAATCACTACAGCATTGTCA - 3' (エクソン7)であり、リバースプライマーは(SEQ ID No. 9) 5' - TTTCAGACCATCCATCAGCATACCAAC 3' (エクソン12)であった。またベータアクチンについて、フォワードプライマー(SEQ ID No. 12: 5' - CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC 3')およびリバースプライマー(SEQ ID No. 13: 5' - ATCTGGCACCCACACCTTCTACAATGAGCTGCG - 3')が使用された。より大きな3' UTR (TGA終止コドンの下流の1170の塩基)を特徴とするENPP1アイソフォームは、SEQ ID No. 10の5' - GTCCTGTGTTTGACTTTGATTATGA 3' (エクソン23)とSEQ ID No. 11の5' - CCCTTAGGCCGTTGAAGAATGGTCA 3' (3' UTR)を用いて増幅した。混合物を95 で2分間加熱して、95 で30秒、68 で2分、72 で2分、ついで72 で10分の45サイクルの増幅にかけた。PCR産物は2% (w/v) アガロースゲル上で分離し、エチジウムブロマイドとUV透過照明によって視覚化した。

10

【0076】

h) ENPP1タンパク質の血清のアッセイ

ENPP1の血清レベルをRutshらが記載しているELISAを用いて測定した²⁴。

20

【実施例2】

【0077】

染色体6q16.3 - q24.2上の位置的候補遺伝子の探索

【0078】

62の「6q-evidence」家族(マイクロサテライトマーカーD6S434とd6S1704が隣接する2-LODドロップの区間において、個別の家系のGene HunterのZスコアが>1.0であることによって規定される)の表現型の特徴を、発明者が以前に公表した小児肥満についてのゲノムスキャンに全て由来する、残りの35の家族と最初に比較した¹。

【0079】

【表 2】

表 2. 「6q evidence」家族の表現型の特徴

形質	「6q evidence」家族の肥満児	他の家族の肥満児	T検定またはカイニ乗検定のp値
年齢	11.52±3.15 (N=138)	11.54±3.41 (N=70)	0.95
性別 (男性/女性)	63/75 (N=138)	40/30 (N=70)	0.11
ZBMI	4.20±0.11 (N=138)	3.74±0.11 (N=70)	0.004
AUGC	773.04±17.32 (N=95)	709.71±17.30 (N=50)	0.07
Ins Ind	25.44±3.01 (N=71)	41.33±7.67 (N=30)	0.02
% IG/T2D	3.1% (N=131)	0% (N=69)	0.18
形質	「6q evidence」家族の両親	他の家族の両親	カイニ乗検定のp値
% T2D	13.8 % (N=123)	3.2 % (N=62)	0.018

ZBMI : BMIのZスコア。

AUGC : 2時間の経口ブドウ糖負荷試験の間の血糖曲線下の面積。

Ins Ind : インスリン分泌指数 ($\text{mU} \cdot \text{mmol}^{-1}$)。

% IG/T2D : グルコース不耐性または2型糖尿病を示す肥満児の百分率。

% T2D : 2型糖尿病を示す親の百分率。

【0080】

表 2 に示したごとく、「6q - evidence」の肥満児は、有意に高いBMIのZスコア (フランス人の基準個体群と比較したボディマス指数の偏差^{1 2}) を有する。性別、年齢およびBMIのパラメーターの調整の後、グルコース投与後の彼らの血中グルコースレベルは高く、第一相のインスリン分泌を評価する彼らのインスリン分泌指数は他の家族の子供たちより有意に低い。くわえて、「6q - evidence」肥満児の3.1%は、グルコース不耐性または糖尿病のいずれかである。対照的に、他の家族の肥満児は誰もグルコース不耐性ではない。さらに前の世代も調査したところ、他の家族における親の3.2%と比較して、6qが連鎖した親の13.8%が2型糖尿病(T2D)を有することが分かった ($p = 0.02$)。これらのデータから、染色体6q上の肥満感受性遺伝子がグルコース恒常性にも関与しているのではないかと結論した。

【0081】

小児肥満についての発明者のゲノムスキャン¹に基づくと、6q16.3 - q24.2の連鎖ピークについての2 - LODドロップの区間は41.4 Mbにわたり、166の参照された遺伝子を含んでいる。肥満感受性遺伝子の調査をより制限された染色体領域に絞るために、全て成人について実施された、7件の公開された報告による、肥満²、インスリン分泌^{3、4}またはT2D^{5 - 8}のいずれかの、染色体6q16.1 - q27での連鎖のピークを分析した。ゲノムスキャンの全てで、マーカーD6S1656とD6S270の間の領域にわたる2.4 Mbの区間が共通であると識別された。この区間内に位置する22の遺伝子の中で、最良の生理学的な候補はエクト型ヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼENPP1 (形質細胞の糖タンパク質 - 1、PC - 1としても知られている) (OMIM参照番号173335)であった。ENPP1はインスリン誘導性のインスリン受容体の立体構造の変化を直接阻害し、それによってその活性化と下流のシグナル伝達に作用すると思料される^{9、13}。この点に関して、インスリンのシグナル伝達をより効果的に阻害するとされる¹¹機能的ミスセンス変異(K121Q)が、様々

な民族集団においてインスリン抵抗性またはT2Dと関連づけられた¹⁴⁻¹⁸。

【0082】

発明者の最初のゲノムスキャンにおいて小児肥満と連鎖していた、ENPP1遺伝子のイントロン1内のマイクロサテライトマーカ-D6S1656を、BMI>95分位数(性別と年齢について補正)である少なくとも二人の同胞を有する68家族の第二の追試の組において分析したところ、連鎖のわずかな存在(MLS=0.83、p=0.04)が観察された。対照的に、追試の組ではこの領域の4つの他のマイクロサテライトマーカに肥満との連鎖は見出されなかった(データは示されていない)。D6S1656の対立遺伝子10も、最初のおよび追試の組の両方において、罹患した小児に対して有意な非伝達を示した(44の伝達対69の非伝達、p=0.02、データは示されていない)。これらの結果は部分的に連鎖不均衡(LD)である機能的多型が近傍に位置している可能性があることを示唆している。

10

【実施例3】

【0083】

ENPP1遺伝子内の配列の変異とENPP1のSNPによる肥満との関連

【0084】

ENPP1は25のエクソンを有し、83.2Kbにわたっている。遺伝子内の配列の変異の特徴を明らかにするために、全てのコード領域、ならびに1.3KbのATG開始コドンの上流とTGA終止コドンの下流の配列決定を「6q-evidence」家族の48人の肥満児および24人の肥満でない成人で実施した。8つの一塩基多型(SNP)が上流配列内に、6つがイントロン/エクソンジャンクション内に識別され、4つはミスセンス変異で、3つは同義変異であり、また20が下流配列内に識別された(表3参照)。

20

【0085】

【表 3】

表 3. ENPP1 遺伝子の 5' および 3' 近位領域、エクソンならびに境界内の多型

SNP	種別	変異対立遺伝子頻度 (%)
1	C>T -1125 ATG	0.7
2	T>C -931 ATG	0.7
3 (rs1800949)	C>T -768 ATG	20.7
4	G>C -406 ATG	0.7
5	C>T -359 ATG	1.4
6	G>T -190 ATG	7.7
7 (rs12212106)	C>G -187 ATG	20.4
8	C>T -165 ATG	4.5
9	IVS2 delG +8	6.8
10 (rs1044498)	K121Q	16.9
11	IVS5 T>G -20	2.8
12	IVS7 T>G -28	0.7
13 (rs9493113)	IVS8 T>G +27	8.3
14	IVS9 G>C +24	2.1
15 (rs9483347)	K387K	0.7
16	IVS20 delT -11	25.3
17 (rs7750837)	S650S	0.7
18	R722C	1.5
19 (rs1805138)	T727N	0.7
20 (rs8192683)	R834T	0.7
21 (rs1804025)	A835A	3.6
22 (rs1044548)	G>A +112 TGA	7.6
23 (rs11964389)	G>C +121 TGA	3.5
24 (rs1044558)	C>T +164 TGA	7.6
25	G>A +395 TGA	7.8
26 (rs1044582)	T>A +457 TGA	7.8
27	InsAA DelT +700 TGA	7.7
28 (rs12212882)	A>G +735 TGA	4.2
29	A>T +772 TGA	8.4
30	C>T +777 TGA	7.7
31	Ins 13bp +828 TGA	4.2
32 (rs7754561)	A>G +1044 TGA	26.1
33 (rs7754586)	A>C +1092 TGA	21.6
34 (rs11154647)	G>T +1101 TGA	5.9
35 (rs11154648)	T>C +1137 TGA	6
36 (rs7754859)	C>T +1157 TGA	27.6
37 (rs11154649)	G>T +1236 TGA	6
38 (rs9483349)	T>C +1348 TGA	3.6
39 (rs9493120)	G>A +1350 TGA	7.1
40 (rs9493121)	A>G +1539 TGA	7.1
41 (rs9493122)	T>C +1670 TGA	4.3

10

20

30

40

【 0 0 8 6 】

これらの 41 の多型の中で、24 は公的なデータベース内に存在し、変異体のうちの 2

50

2は5%より高いマイナー対立遺伝子頻度(MAF)を有していた。19の頻度が低い多型について、それらの伝達を家系内で検査した。罹患していない同胞内に希な対立遺伝子が存在するとき、変異体はそれ以上調査しなかった(n=14)。残りの五つの希なSNPは症例対照分析において、肥満との有意の関連を示さなかった(データは示されていない)。22のもっとも共通のSNPと、さらに他の二つ、すなわち、mRNAの安定性に影響する¹⁹ものとして先に記載したSNP23(3.5%)および13bpのインサート(SNP31、Ins13bp+828TGA、保有率4.2%)におけるペアワイズLDを、サンプル組全体においてタイプ決定される10の「ハプロタイプ・タギング」SNPからなる組を選択するために使用した。

【0087】

機能性SNPの識別の確率をさらに向上させるために、長さが100bpを超え、トラフグ(*Fugu rubripes*)、ラットおよびヒトのゲノムを通じて高い相同性(>70%)を示しており、またENPP1遺伝子の198Kbのイントロン領域ならびに5'および3'遺伝子間領域内に存在する、25の断片を識別した。これらの断片は配列決定され、さらに11のMAF>5%のSNPが識別された。これらのSNPは421人の肥満児と298の対照個体からなる試験組の遺伝子型決定に最初に使用された。小児肥満との関連の傾向(p<0.1)を示したENPP1の3'領域内の一つのSNP(T>G+5954TGA)を、サンプル組全体において分析されるSNPの組に加えた。

【0088】

結局のところ、529人の血縁関係のない肥満児、696人の血縁関係のない病的肥満の成人、および1205人の痩せた正常血糖の成人で構成される2430人の個体において11のSNPが遺伝子型決定された。痩せた大人は、肥満に対して長期の耐性を示したので、症例の両方の組に対する対照として使用した。表4に見るごとく、重篤な肥満と6つのSNP、すなわちIVS2 delG+8、K121Q、IVS8 T>G+27、IVS20 delT-11、A>G+1044TGA、およびT>G+5954TGAとの間に関連が認められた(表4参照、0.00008<p<0.03、1.21<OR<1.37)。個体間の肥満の状態の10⁵の並べ替えで評価した全体的なp値は0.001であった。蓄積したデータの分析により、K121QのSNPの、重篤な肥満との最大の関連が識別された(OR=1.37、95%信頼区間[1.17-1.61]、p=0.00008)。劣性モデルにおけるオッズ比は3.29[1.83-5.93](p=0.00003)に増加し、付加的なモデルから有意の逸脱を示した(p=0.02)。

【0089】

この関連をさらに試験するために、184の多重家族をこのSNPについて遺伝子型決定した。この組は小児肥満についてゲノムスキャンした97の家族と成人の重篤な肥満を有する87の核家族から成り、血清レプチンレベルの染色体6q24に対する連鎖が示されている²⁰。伝達不均衡テスト(TDT)を用いると、121Q対立遺伝子は肥満の子に有意に過剰伝達されており(伝達:76、非伝達:48、p=0.01)、症例対照研究の結果を裏付けている。

【0090】

これらの関連に対するENPP1の特異性を確認するために、580kbにわたる、ARG1、CRSP3、ENPP3、ENPP1およびCTGF遺伝子を含む染色体6q領域内の合計53のSNPを、先に使用した421人の肥満児と298人の対照個体からなる最初の組においてタイプ決定した(平均密度:1SNP/10.9kb)。GOLDソフトウェアを用いて、三つの別個の連鎖不均衡(LD)な領域を見出した。第一のものはARG1、CRSP3およびENPP3遺伝子を、第二のものはENPP1遺伝子だけを、第三のものはCTGF遺伝子と176Kbの非コード領域とを含んでいた(図1)。肥満児と対照の間の、また62人の「6q-evidence」肥満児と対照の間の、53のSNPの対立遺伝子分布の比較により、八つのSNPが小児肥満と「6q-evidence」小児肥満の両方に関連していることが明らかになった(p<0.05)。八つの

10

20

30

40

50

SNPのうちの一つ(K121Q、Celera dbSNP hcV1207989、C>T+164 TGA、Celera dbSNP hcV1207974、A>G+1044 TGA、G>T+1101 TGA、C>T+1157 TGA)はENPP1内にマッピングされた(図2)。第八の関連SNPは遺伝子間領域、CTGFの69 kbの3'領域内に位置し、トラフグ、齧歯類およびヒトのゲノムを通じて高い相同性を示す、既知の転写因子結合部位がない断片内には位置していなかった。これらのデータは小児肥満との観察された関連がENPP1のSNPによるものであるという仮説を裏付けている。

【0091】

【表 4】

表 4. 遺伝子型および ENPP1 遺伝子の SNP の対立遺伝子と肥満との間の正の関連 ($p < 0.05$)

症例組 1 = BMI が 97 分位数の肥満閾値を超える 529 人のフランス系白人小児。
 対照組 1 = 556 人の非肥満かつ血糖正常フランス系白人成人。
 症例組 2 = BMI ≥ 40 の 696 人のフランス系白人成人。
 対照組 2 = 649 人の非肥満かつ血糖正常フランス系白人成人。

10

コホート	遺伝子型	n (頻度)			対立遺伝子 頻度 OR (p 値)	共優性 OR (p 値)	優性 OR (p 値)	劣性 OR (p 値)	HW (p 値)
		CC	CT	TT					
C>T-768ATG									
組 1	肥満児	310 (0.65)	145 (0.30)	23 (0.05)	0.91 (0.42)	0.91 (0.44)	0.93 (0.58)	0.77 (0.37)	0.25
	対照 1	312 (0.63)	152 (0.31)	30 (0.06)					
組 2	病的肥満	385 (0.60)	225 (0.35)	30 (0.05)	1.05 (0.59)	1.05 (0.59)	1.07 (0.58)	1.08 (0.77)	0.82
	対照 2	375 (0.62)	206 (0.34)	27 (0.04)					
組 1 + 2	肥満	695 (0.62)	370 (0.33)	53 (0.05)	0.99 (0.92)	0.98 (0.92)	1.01 (0.93)	0.92 (0.67)	0.66
	対照 1 + 2	687 (0.62)	358 (0.33)	57 (0.05)					
G>T-190ATG									
組 1	肥満児	436 (0.88)	59 (0.12)	1 (0.00)	1.26 (0.24)	1.25 (0.24)	1.28 (0.22)	1.05 (0.97)	1
	対照 1	456 (0.90)	48 (0.10)	1 (0.00)					
組 2	病的肥満	589 (0.90)	63 (0.10)	3 (0.00)	0.77 (0.12)	0.79 (0.13)	0.75 (0.11)	0.88 (0.87)	0.41
	対照 2	518 (0.87)	74 (0.12)	3 (0.01)					
組 1 + 2	肥満	1025 (0.89)	122 (0.11)	4 (0.00)	0.95 (0.71)	0.95 (0.71)	0.95 (0.70)	0.95 (0.94)	0.78
	対照 1 + 2	974 (0.89)	122 (0.11)	4 (0.00)					
IVS2delG+8									
組 1	肥満児	378 (0.88)	48 (0.11)	2 (0.01)	1.34 (0.14)	1.54 (0.14)	1.31 (0.20)	6.55 (0.11)	0.66
	対照 1	495 (0.91)	50 (0.09)	0 (0.00)					
組 2	病的肥満	610 (0.89)	74 (0.11)	3 (0.00)	1.32 (0.12)	1.34 (0.12)	1.31 (0.15)	2.71 (0.37)	0.49
	対照 2	551 (0.91)	52 (0.09)	1 (0.00)					
組 1 + 2	肥満	988 (0.89)	122 (0.11)	5 (0.00)	1.33 (0.03)	1.39 (0.03)	1.30 (0.05)	5.29 (0.09)	0.58
	対照 1 + 2	1046 (0.91)	102 (0.09)	1 (0.00)					
K121Q									
組 1	肥満児	351 (0.67)	153 (0.29)	22 (0.04)	1.45 (0.001)	1.56 (0.001)	1.41 (0.01)	3.63 (0.001)	0.31
	対照 1	405 (0.74)	136 (0.25)	7 (0.01)					
組 2	病的肥満	479 (0.70)	176 (0.26)	25 (0.04)	1.31 (0.01)	1.41 (0.01)	1.26 (0.07)	3.05 (0.004)	0.09
	対照 2	467 (0.75)	148 (0.24)	8 (0.01)					

20

30

40

【表5】

(表4のつづき)

組1+2	肥満	830 (0.69)	329 (0.27)	47 (0.04)	1.37 (0.00008)	1.48 (0.00009)	1.32 (0.002)	3.29 (0.00003)	0.06	
	対照1+2	872 (0.75)	284 (0.24)	15 (0.01)					0.16	
		IVS8T>G+27	TT	TG	GG					
組1	肥満児	377(0.78)	105 (0.22)	2 (0.00)	1.35 (0.04)	1.40 (0.03)	1.39 (0.04)	2.26 (0.49)	0.07	
	対照1	427 (0.83)	86 (0.17)	1 (0.00)					0.16	10
組2	病的肥満	539 (0.81)	118 (0.18)	9 (0.01)	1.26 (0.09)	1.32 (0.09)	1.23 (0.15)	2.83 (0.10)	0.39	
	対照2	508 (0.84)	94 (0.16)	3 (0.00)					0.79	
組1+2	肥満	916 (0.80)	223 (0.19)	11 (0.01)	1.30 (0.009)	1.35 (0.009)	1.30 (0.01)	2.81 (0.06)	0.64	
	対照1+2	935 (0.84)	180 (0.16)	4 (0.00)					0.17	
		IVS20delT-11	T/T	T/delT	delT/delT					
組1	肥満児	293 (0.56)	190 (0.36)	43(0.08)	1.10 (0.32)	1.20 (0.31)	0.99 (0.92)	1.96 (0.01)	0.14	
	対照1	307 (0.55)	224 (0.40)	23 (0.05)					0.03	
組2	病的肥満	382 (0.55)	255 (0.37)	57 (0.08)	1.31 (0.002)	1.32 (0.003)	1.31 (0.01)	1.85 (0.007)	0.12	20
	対照2	396 (0.62)	214 (0.33)	32 (0.05)					0.64	
組1+2	肥満	675 (0.55)	445 (0.37)	100 (0.08)	1.21 (0.004)	1.26 (0.004)	1.15 (0.09)	1.89 (0.0002)	0.03	
	対照1+2	703 (0.59)	438 (0.36)	55 (0.05)					0.22	
		G>C+121TGA	GG	GC	CC					
組1	肥満児	443 (0.96)	17 (0.04)	1 (0.00)	0.86 (0.63)	0.87 (0.64)	0.85 (0.63)	0.89 (0.94)	0.17	
	対照1	398 (0.95)	18 (0.04)	1 (0.01)	0.82				0.21	
組2	病的肥満	601 (0.94)	35 (0.06)	2 (0.00)	1.62 (0.09)	1.88 (0.09)	1.55 (0.13)	3.98 (0.21)	0.11	
	対照2	478 (0.96)	19 (0.04)	0 (0.00)					1	30
組1+2	肥満	1044 (0.95)	52 (0.05)	3 (0.00)	1.24 (0.30)	1.26 (0.31)	1.21 (0.37)	2.52 (0.41)	0.05	
	対照1+2	876 (0.96)	37 (0.04)	1 (0.00)					0.34	
		C>T+164TGA	CC	CT	TT					
組1	肥満児	436(0.89)	55 (0.11)	1 (0.00)	0.99 (0.97)	0.99 (0.97)	0.99 (0.96)	1.10 (0.95)	1	
	対照1	478 (0.89)	61 (0.11)	1 (0.00)					1	
組2	病的肥満	607 (0.87)	83 (0.12)	6 (0.01)	1.40 (0.04)	1.49 (0.05)	1.35 (0.09)	5.54 (0.07)	0.12	
	対照2	561 (0.90)	60 (0.10)	1 (0.00)					1	
組1+2	肥満	1043 (0.88)	138 (0.12)	7 (0.00)	1.20 (0.14)	1.25 (0.14)	1.17 (0.22)	3.49 (0.1)	0.32	
	対照1+2	1039 (0.90)	121 (0.10)	2 (0.00)					0.77	40
		Ins+828TGA	-/-	-/Ins	Ins/Ins					
組1	肥満児	454 (0.90)	50 (0.10)	2 (0.00)	1.17 (0.45)	1.15 (0.45)	1.19 (0.42)	1.00 (1)	0.64	
	対照1	456 (0.91)	42 (0.09)	2 (0.00)					0.28	
組2	病的肥満	586 (0.90)	65 (0.10)	2 (0.00)	0.87 (0.40)	0.87 (0.40)	0.86 (0.39)	0.93 (0.94)	0.7	
	対照2	547 (0.88)	71 (0.12)	2 (0.00)					1	
組1+2	肥満	1040 (0.90)	115 (0.10)	4 (0.00)	0.98 (0.89)	0.98 (0.89)	0.98 (0.88)	0.96 (0.96)	0.56	

【表 6】

(表 4 のつづき)

対照 1 + 2		1003 (0.90)	113 (0.10)	4 (0.00)					0.56
A>G+1044TGA		AA	AG	GG					
組 1	肥満児	260 (0.49)	213 (0.40)	56 (0.11)	1.09 (0.38)	1.14 (0.38)	0.99 (0.94)	1.52 (0.06)	0.22
	対照 1	269 (0.49)	243 (0.44)	38 (0.07)					0.1
組 2	病的肥満	328 (0.50)	257 (0.39)	77 (0.11)	1.36 (0.0004)	1.36 (0.0006)	1.36 (0.006)	1.97 (0.0008)	0.02
	対照 2	369 (0.57)	233 (0.36)	44 (0.07)					0.40
組 1 + 2	肥満	588 (0.49)	470 (0.40)	133 (0.11)	1.22 (0.002)	1.26 (0.002)	1.17 (0.05)	1.76 (0.0002)	0.01
	対照 1 + 2	638 (0.53)	476 (0.40)	82 (0.07)					0.66
T>G+5954 TGA		TT	TG	GG					
組 1	肥満児	366 (0.77)	100 (0.21)	10 (0.02)	1.43 (0.01)	1.47 (0.02)	1.41 (0.03)	2.9 (0.06)	0.30
	対照 1	426 (0.82)	87 (0.17)	4 (0.01)					1
組 2	病的肥満	532 (0.79)	126 (0.19)	11 (0.02)	1.24 (0.09)	1.26 (0.10)	1.23 (0.14)	1.85 (0.22)	0.24
	対照 2	536 (0.83)	106 (0.16)	6 (0.01)					0.81
組 1 + 2	肥満	898 (0.78)	226 (0.20)	21 (0.02)	1.32 (0.004)	1.34 (0.005)	1.30 (0.01)	2.25 (0.03)	0.15
	対照 1 + 2	962 (0.83)	193 (0.16)	10 (0.01)					0.86

10

20

【実施例 4】

【0092】

重篤な肥満と強く関連している三つの対立遺伝子がリスクであるハプロタイプの解析

【0093】

K 1 2 1 Q 多型と 6 つの他の肥満関連 SNP との間の、二つの SNP の分析を用いて、これらの SNP が肥満リスクに対して独立した影響を有するかを評価した。尤度比試験は I V S 2 0 d e l T - 1 1 と G + 1 0 4 4 T G A の SNP だけが K 1 2 1 Q の影響を有意に変化させることを示した (それぞれ $p = 0.03$ と $p = 0.04$)。指摘に値するのは、これら二つの SNP について、最も適合したモデルもやはり劣性のものであったということである。このことは、遺伝子型決定のエラーが再配列決定によって除外されているので、これらの SNP についてのハーディ・ワインベルグ平衡 (HWE) でわずかに見られた偏差の原因となっている (データは示されていない)。このような偏差は、遺伝モデルが厳密には付加的でないときに、罹患した「極端な」個体で予想される²¹。

30

【0094】

肥満リスクに対する三つの SNP の組合せの潜在的な累積的影響を評価するために、2430 人のフランス系白人の被験者の組の全体から得た K 1 2 1 Q、I V S 2 0 d e l T - 1 1 および A > G + 1 0 4 4 T G A の SNP のデータを用いてハプロタイプ分析を実施した。八つのハプロタイプが予測され、その中の五つは MAF > 5% である。表 5 に示したごとく、三つの対立遺伝子が野生型であるハプロタイプ (K 1 2 1 Q / I V S 2 0 d e l T - 1 1 / A > G + 1 0 4 4 T G A、K T A) は、対照よりも肥満被験者において頻度が低かった (64.0% 対 60.3%、 $p = 0.002$)。対照的に、三つの対立遺伝子がリスクであるハプロタイプ (K 1 2 1 Q / I V S 2 0 d e l T - 1 1 / A > G + 1 0 4 4 T G A、Q d e l T G) は重篤な肥満と強く関連していた (11.2% 対 7.5%、OR = 1.58、 $p = 0.00001$ 、 10^5 のシミュレーションについての経験的な p 値 < 0.0001)。興味深いことに、リスクハプロタイプの影響は病的肥満の成人と小児肥満の両方において同程度であった (それぞれ、10.8% 対 7.9%、OR = 1

40

50

. 50、 $p = 0.006$ 、および11.7%対7.1%、 $OR = 1.69$ 、 $p = 0.006$)。この関連は184の家族のTDT分析でも裏付けられた(カイ二乗検定 = 5.68、 $p = 0.01$ 、表5)。

【0095】

【表7】

表5. 1225人の病的肥満/肥満児と1205人の対照被験者のハプロタイプ分析

三つの多型(K121Q、IVS20 delT-11、A>G+1044TGA)を含むハプロタイプが示されている。TDTは小児肥満を有する97の家系と成人肥満を有する87の家系においてそれぞれのハプロタイプについて実施した。

ハプロタイプ			症例/対照試験				184の肥満家系におけるTDT	
K121Q	IVS20 delT-11	A>G+1044TGA	非肥満	肥満	カイ二乗	p値	カイ二乗	p値
K	T	A	64.0	60.3	8.99	0.003	2.7	0.1
		G	7.0	7.6	0.51	0.47	0.09	0.75
	DelT	A	3.5	2.7	1.26	0.26	0	1
		G	11.7	11.9	0.18	0.67	0.73	0.39
Q	T	A	5.5	4.8	0.15	0.70	2.30	0.13
		G	0.6	0.6	0.19	0.66	0	1
	DelT	A	0.2	0.9	5.23	0.02	0.20	0.65
		G	7.5	11.2	18.78	0.00001	5.68	0.01

【0096】

458組のフランス系白人の対照トリオ(両親と1人の痩せた子供)のTDT分析は、リスクハプロタイプの伝達過剰を示さず(カイ二乗検定 = 0.53、 $p = 0.46$ 、データは示されていない)、また罹患していない子供におけるリスクハプロタイプの伝達率の歪みを排除した²²。最後に、肥満の重篤度が低い(BMIが30~40kg/m²)717人の成人被験者からなる追加の組においてハプロタイプの影響を評価し、先に使用した649人の肥満でない正常血糖の対照被験者と比較した。ここでも、リスクハプロタイプは肥満と関連していた(10.3%対7.9%、 $OR = 1.37$ 、 $p = 0.02$)。

【0097】

ゲノムスキャンで観察された小児肥満との連鎖に対するENPP1のリスクハプロタイプの影響を試験するためにいくつかの手法を使用した。まず、「6q-evidence」家族の個体におけるリスクハプロタイプ(16.2%対7.1%、 $OR = 2.37$ 、 $p = 0.004$)の頻度が他の家族(12.2%対7.1%、 $OR = 1.65$ 、 $p = 0.16$)と比較して高いことを検出した。肥満に関連するリスクハプロタイプを共有する罹患同胞対(合計135のうち15)は、別個に分析すると、最初の最大連鎖の位置(マーカーD6S287)において、3.49の最大多点MLS LODスコアを示した。逆に、これら15の罹患同胞対を除いた後、多点MLS LODスコアは、マーカーD6S287において4.06から1.6に減少し、2.63の新たな最大MLS LODスコアが、マーカーD6S301において、元の連鎖ピークに対して16Mb動原体側に出現した。これらの変異の有意性を評価するために、Genotype IBD Sharing Test (GIST)を使用した²³。この試験は、劣性モデルで有意になった($p = 0.03$)ハプロタイプの影響の可能性が、付加的なモデルにおいてもある程度見られ

ることを示唆している ($p = 0.07$) が、それはハプロタイプの二つのコピーを共有している三つの罹患同胞対のみに基づいている。結局のところ、これらのデータが示唆しているのは、染色体 6 q 上の小児肥満との観察された連鎖に対する、ENPP1 の肥満リスクハプロタイプのある程度の寄与であるが、GIST の結果はそれが比較的わずかであることを実証している。

【0098】

これらのデータによれば、少なくとも三つの ENPP1 の SNP が肥満との関連に関連している。Q121 変異体は野生型のものより効果的にインスリンのシグナル伝達¹¹を阻害すると思われるが、リスクハプロタイプの機能的作用は未知である。

【実施例 5】

【0099】

K121Q、IVS20delT-11 および G+1044TGA 対立遺伝子に関連した ENPP1 レベルの高度に有意な増加

【0100】

ENPP1 タンパク質はタンパク質分解性の切断部位を有し、細胞の表面で切断され、循環内に存在することが知られている²⁴。したがって、このタンパク質の血清レベルはその組織発現の優れた評価に当たる²⁴。広い体重範囲を含む 279 人の小児で測定した血清 ENPP1 タンパク質レベルは、BMI の Z スコアと正の相関を示した (ピアソンの相関係数 = 0.1、 $p = 0.05$ 、図 3)。交絡因子である BMI を固定するために、つぎに 89 人の痩せた小児を選定し (平均 BMI、 $18.4 \pm 2.5 \text{ kg/m}^2$ 、平均年齢、 13.3 ± 2.6 歳、 $n = 50/39$ 女子/男子)、そして ENPP1 レベルに対する三つの SNP の影響を分析した。Q121、IVS20delT-11 および G+1044TGA 対立遺伝子の少なくとも一つのコピーの存在が ENPP1 レベルの高度に有意な増加と関連づけられ (28.6 ng/ml 対 24.1 ng/ml 、 $p = 0.008$) (図 4)、このことは、肥満に関連するハプロタイプがインスリン結合を阻害するだけでなく、ENPP1 の発現レベルを向上させることを示唆している。

【0101】

発明者はつぎに、データが入手可能な 474 人の肥満児において、肥満に関連する表現型の変異に対するリスクハプロタイプの寄与を評価した。肥満に関連するリスクハプロタイプを有する肥満児は、空腹時血糖の 0.17 mmol/l の上昇 ($p = 0.002$) を示し、グルコース不耐性/T2D の高い有病率 ($OR = 3.43$ 、 $p = 0.02$) を伴っていた。リスクハプロタイプを有する親は T2D を発症するリスクの増加が 2.35 倍であった ($p = 0.005$)。さらに、肥満の親の小集団ではそのリスクはより高かった ($OR = 3.26$ 、 $p = 0.0005$) が、リスクハプロタイプを有する肥満でない親では T2D リスクの増加は認められなかった ($OR = 0.86$ 、 $p = 0.9$)。ENPP1 の SNP と T2D との関連を確認するために、その疾患の家族歴をもつ 752 人の血縁関係のない T2D のフランス系白人の被験者の追加の重複していないコホートを、先に使用した 556 人の中年の肥満でない正常血糖の被験者 (平均年齢: 55 ± 6 歳) と比較した。T2D 群に有意に過剰なリスクハプロタイプが識別され (10.7% 対 7.1% 、 $OR = 1.44$ 、 $p = 0.005$)、フランス系白人のグルコース恒常性に対する ENPP1 の SNP の影響の可能性がさらに裏付けられた。つぎにこの所見は、503 人の T2D 被験者と 758 人の肥満でない正常血糖の被験者から成る、1261 人の血縁関係のないオーストリア人被験者を用いて反復された (9.8% 対 6.3% 、 $OR = 1.68$ 、 $p = 0.001$)。フランス人コホートとオーストリア人コホートとの間に対立遺伝子頻度と影響の大きさに潜在的な差があるので、固定効果モデルにおいて、Mantel-Haenszel 調整オッズ比を用いて、プールしたコホートにおける T2D のリスクを評価した。欧州人系の 2569 の個体のプールしたデータにより、T2D とのリスクハプロタイプの関連が強化された (10.4% 対 6.6% 、組合せ $OR = 1.56$ 、 $p = 0.00002$)。要約すると、これらの所見は、肥満と T2D の両方が、とくに肥満被験者において、ENPP1 の遺伝的変異性と、またとくに三つの対立遺伝子がリスクである一つのハプロ

10

20

30

40

50

タイプと関連していることを示している。これは、最近報告された小児肥満と十代および成年初期におけるT2Dの高いリスクとの間の連鎖^{2,5}に遺伝学的証拠を提供して、この有害な関連についての最初の共通の分子機構を提供するものである。

【0102】

つぎにENPP1転写産物の組織分布を検査した。脳、筋肉、肝臓、脂肪細胞（皮下および大網）ならびに精製膵島ベータ細胞を含む広範囲のヒト組織のcDNAに対してRT-PCRを実施した。五つのENPP1アイソフォームが既知であることを考慮して（<http://www.ncbi.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=human&1=ENPP1>）、少なくとも3つの転写産物に共通なエクソン7と12の間の領域を増幅するためのプライマーを設計し、普遍的な発現を見出した（図5参照）。つぎに、TGA終止コドンの下流の1170塩基を有するより大きな3'UTRを特徴とし、肥満に関連するSNPであるA>G+1044TAGを含む長いmRNAアイソフォームに特異的なプライマーを設計した。長い形態のものは、膵臓細胞、脂肪細胞および肝臓という、グルコース恒常性にとっての三つの鍵となる組織にだけ発現したことが分かった（補足の図1参照）。

10

【0103】

本研究は、小児と成人の両方の病的な肥満およびあまり重篤でない肥満の発症におけるENPP1遺伝子変異体の変異体の主たる役割の最初の証拠を、そして肥満が同時に存在することによって増大するかも知れないT2Dとの関連の強い証拠を提供する。代謝疾患の枠内における全ENPP1遺伝子座のこの広範な分析は、この作用が主として、全ての研究された個体群において個別のSNPよりも有力な予測因子であった、新規に報告された三つの対立遺伝子がリスクであるハプロタイプの結果であることを明らかにした。

20

【0104】

発明者が観察した6q上での小児肥満との連鎖に対する、肥満に関連するENPP1のリスクハプロタイプの予想される寄与を、最近報告されたGenotype IBD Sharing Test (GIST)手順^{2,3}を始めとするいくつかの方法で評価した。GIST試験において、ハプロタイプに固有の指数とNPLスコアとの間の有意な相関と共に、リスクハプロタイプの有意に高い頻度が「6q-evidence」家族の罹患した個体に認められた。この点に関して、Jenkinsonらは、メキシコ系アメリカ人に観察された、空腹時インスリンレベルへの連鎖に対するENPP1のSNPの寄与を裏付ける予備データを最近報告した³。発明者も、ENPP1のSNPとT2Dとの関連の証拠を発見したので、この遺伝子は他の個体群で見出されたT2Dやそれに関連する形質との連鎖ピークにも寄与しているかも知れない^{3,8}。しかしながら、フランス系白人の個体群における重篤な肥満との三つの対立遺伝子を有するハプロタイプの強い関連（OR = 1.58、p = 0.00001）と、6q連鎖シグナルへのその寄与の証拠にもかかわらず、TDTによって測定したところ、罹患した子に対するこのハプロタイプの伝達の過剰は中程度のものであることが分かった（p = 0.01）。これは、リスクハプロタイプは連鎖に必要であり、それゆえ「連鎖した」個体において高い頻度を示すが、そのことを完全に説明するには充分ではないということを示唆している。このことは6q連鎖領域における他の寄与配列を示唆している。

30

40

【0105】

ENPP1遺伝子座の非コード領域内のさらなるSNPが、観察された連鎖の一端を担うことが考えられる。例えば、トラフグ、ラットおよびヒトのゲノムを通じて高度に保存された領域内に含まれるSNPであるT>G+5954TGAは、重篤な肥満との関連を示した。Genomatix（<http://www.genomatix.de/>）を用いて、この多型がインスリンプロモーター因子IPF1^{2,7}によって認識される配列（aaaaaatctT(>G)ATgacaccta）の一部であることを見出した。TからGへの置換は結合IPF1の喪失を予測し、このことは、このSNPが機能性であるかも知れないことを示唆している。あるいは、二つ以上の遺伝子が6q上での肥満とT2Dとの連鎖を説明するかも知れない。このような状況はクローン病について16番染色

50

体ですでに報告されている²⁸、²⁹。この点に関して、ENPP1の肥満に関連するリスクハプロタイプの保有者が排除されたときの連鎖ピークの16Mb動原体側への変位は、もう一つの肥満候補遺伝子であるSingle-minded 1 (SIM1)の位置と一致する³⁰、³¹。

【0106】

肥満に関連する三つのSNPの推定される機能性を、THE SIASソフトウェア³²を用いて、ハプロタイプの影響の尤度比試験を含む統計的手段で主として評価した。これらのSNPの中で、ENPP1のK121Qのエクソン4のミスセンス変異は、シチリア島、スカンジナビアおよびインド¹⁴ - ¹⁷の比較的小さなサイズのサンプルにおけるインスリン抵抗性、ならびにドミニカ人のT2D¹⁸と既に関連づけられていたが、大規模な研究で確認されたことはなかった。本研究は全てが欧州系の合計6147人を被験者とし、T2Dについての調査結果を裏付け、それらを拡張して肥満を包含するものである。他の二つの強く肥満に関連するSNPはエクソン21境界 (IVS20delT-11)と3'UTR (A>G+1044TGA)内に位置する。興味深いことに、後者は、T2Dの病態生理に大きな役割を果たすと考えられる三つの高度にインスリン応答性のヒト組織 (膵島細胞、脂肪細胞および肝臓)内で特異的に発現するアイソフォームに属している。肝臓内でENPP1遺伝子を過剰発現するアデノウイルス発現構築物を導入されたマウスは、インスリン抵抗性とグルコース不耐性を示し、肝臓におけるENPP1作用の重要性を浮き彫りにした¹⁰。非酵素的機構によってインスリン受容体を直接阻害するためにエクソン121Qのアミノ酸置換が提案されたが¹¹、他の非コードSNPも、遺伝子発現、タンパク質生成またはスプライシングを変化させることによって効果を有するかも知れず、ともにインスリンシグナル伝達に対するタンパク質の推定される有害作用を増強する。この仮説は、ENPP1の肥満リスクハプロタイプを有する小児における血清タンパク質レベルの増大によって、また脂肪過多症によるENPP1レベルの上昇によっても裏付けられる。この作用がハプロタイプ固有のものであるか、あるいは遺伝相と無関係であるかについては、より大きな家族コホートで確認する必要がある。

10

20

【0107】

我々の研究が明らかにしたところでは、ENPP1のmRNAはインスリンに応答する細胞タイプ内に存在し、高いタンパク質発現は、インスリンが効果的な食欲抑制作用を有する脳³³、あるいは骨格筋における、インスリン受容体の不活性化の作用をある程度模倣する可能性があり、この不活性化は脂肪量の増加につながる³⁴、³⁵。加えて、肝臓³⁶または細胞³⁷のインスリン受容体をノックアウトしたマウスはグルコース不耐性である。逆に、Umらは、S6K1欠損マウスにおいて、年齢および食餌に誘発される肥満に対する防護がインスリン感受性の増強と関連していることを最近実証した³⁸。最近の研究によれば、ENPP1のリスクハプロタイプを有する肥満児はT2Dの強い家族歴を有し、グルコース負荷に対して不耐性であることがより多い。このことは、肝臓、筋肉および脂肪組織 (そして可能性としては脳と膵島細胞)における、遺伝した増加したENPP1発現によって付与された過剰なインスリン抵抗性が、きわめて強い西洋化した肥満環境という脈絡において、栄養分配を変化させ、過剰な脂肪の蓄積に寄与するかも知れないということを示唆する。この点に関して、Barrosらは、ENPP1のQ121対立遺伝子が英国の一般的な個体群におけるBMIの増加と関連があることを最近示した³⁹。ここに紹介したデータは、「前糖尿病」状態と見ることができると小児肥満に対する原発性のインスリン抵抗性の因果作用の見解を裏付けている²⁵。この仮説に従って、インスリン抵抗性に誘発される空腹時高インスリン血症が各種の民族集団の子供たちにおけるその後の肥満発症の強力な予測因子になることが証明された⁴⁰、⁴¹。

30

40

【0108】

結論として、この研究は、ENPP1遺伝子の変異体と、染色体6qに連鎖した小児の多遺伝子性の肥満との間の遺伝的関連、また成人肥満やT2Dとの間の遺伝的関連を強力に裏付けるものである。発明者のデータはインスリン抵抗性と肥満との間の生理学的関連についての分子レベルの根拠に対する洞察を提供し、それ故にこれらの疾患の予防と治療

50

に新しい見通しを開くものである。

【0109】

参考文献

1. Meyre, D. et al. A genome-wide scan for childhood obesity-associated traits in French families shows significant linkage on chromosome 6q22.31-q23.2. *Diabetes* 53, 803-11 (2004).
2. Atwood, L.D. et al. Genomewide Linkage Analysis of Body Mass Index across 28 Years of the Framingham Heart Study. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 1044-50 (2002). 10
3. Duggirala, R. et al. A major locus for fasting insulin concentrations and insulin resistance on chromosome 6q with strong pleiotropic effects on obesity-related phenotypes in nondiabetic Mexican Americans. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 1149-64 (2001).
4. Abney, M., Ober, C. & McPeck, M.S. Quantitative-trait homozygosity and association mapping and empirical genomewide significance in large, complex pedigrees: fasting serum-insulin level in the Hutterites. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 920-34 (2002). 20
5. Gelder Ehm, M. G. et al. Genomewide search for type 2 diabetes susceptibility genes in four American populations. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 1871-81 (2000). 30
6. Ghosh, S. et al. The Finland-United States investigation of non-insulin-dependent diabetes mellitus genetics (FUSION) study. I. An autosomal genome scan for genes that predispose to type 2 diabetes. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 1174-85 (2000).
7. Demenais, F. et al. A meta-analysis of four European genome screens (GIFT Consortium) shows evidence for a novel region on chromosome 17p11.2-q22 linked to type 2 diabetes. *Hum Mol Genet* 12, 1865-73 (2003). 40
8. Xiang, K. et al. Genome-Wide Search for Type 2 Diabetes/Impaired Glucose Homeostasis Susceptibility Genes in the Chinese: Significant Linkage to Chromosome 6q21-q23 and Chromosome 1q21-q24. *Diabetes* 53, 228-34 (2004).
9. Maddux, B. A. et al. Membrane glycoprotein 100 is a type 2 diabetes susceptibility gene. *Am. J. Hum. Genet.* 74, 1031-40 (2004). 50

- otein PC-1 and insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 373, 448-51 (1995).
10. Dong, H. et al. Increased Hepatic Levels of the Insulin Receptor Inhibitor, PC-1/NPPL1, Induce Insulin Resistance and Glucose Intolerance. *Diabetes* 54, 367-72 (2005).
11. Costanzo, B.V. et al. The Q allele variant (GLN121) of membrane glycoprotein PC-1 interacts with the insulin receptor and inhibits insulin signaling more effectively than the common K allele variant (LYS121). *Diabetes* 50, 831-6 (2001). 10
12. Rolland-Cacherer, M.F. et al. Body Mass Index variations: centiles from birth to 87 years. *Eur J Clin Nutr* 45, 13-21 (1991).
13. Maddux, B. A. & Goldfine, I.D. Membrane glycoprotein PC-1 inhibition of insulin receptor function occurs via direct interaction with the receptor alpha-subunit. *Diabetes* 49, 13-19 (2000). 20
14. Pizzuti, A. et al. A polymorphism (K121Q) of the human glycoprotein PC-1 gene coding region is strongly associated with insulin resistance. *Diabetes* 48, 1881-4 (1999).
15. Gu, H.F. et al. Association between the human glycoprotein PC-1 gene and elevated glucose and insulin levels in a paired-sibling analysis. *Diabetes* 49, 1601-3 (2000). 30
16. Kubaszek, A., Pihlajamaki, J., Karhapa, P., Vauhkonen, I. & Laakso, M. The K121Q polymorphism of the PC-1 gene is associated with insulin resistance but not with dyslipidemia. *Diabetes Care* 26, 464-7 (2003).
17. Abate, N. et al. Genetic polymorphism PC-1 K121Q and ethnic susceptibility to insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 5927-34 (2003). 40
18. Hamaguchi, K. et al. The PC-1 Q121 allele is exceptionally prevalent in the Dominican Republic and is associated with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 1359-64 (2004).
19. Frittitta, L. et al. A cluster of three single nucleotide polymorphisms in t 50

- he 3' - untranslated region of human glycoprotein PC-1 gene stabilizes PC-1 mRNA and is associated with increased PC-1 protein content and insulin resistance-related abnormalities. *Diabetes* 50, 1952-5 (2001).
20. Hager, J. et al. A genome-wide scan for human obesity genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 10. *Nat Genet* 20, 304-8 (1998). 10
21. Deng, H. W., Chen, W.M. & Recker, R. R. QTL fine mapping by measuring and testing for Hardy-Weinberg and linkage disequilibrium at a series of linked marker loci in extreme samples of populations. *Am J Hum Genet* 66, 1027-45 (2000).
22. Eaves, I.A. et al. Transmission ratio distortion at the INS-IGF2 VNTR. *Nat Genet* 22, 324-5 (1999).
23. Li, C., Scott, L.J. & Boehnke, M. Assessing whether an allele can account in part for a linkage signal: the Genotype-IBD Sharing Test (GIST). *Am J Hum Genet* 74, 418-31 (2004). 20
24. Rutsch, F. et al. PC-1 nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in idiopathic infantile arterial calcification. *Am J Pathol* 158, 543-54 (2001).
25. Weill, J., Vanderbecken, S. & Froguel, P. Understanding the rising incidence of type 2 diabetes in adolescence. *Arch Dis Child* 89, 502-4 (2004). 30
26. Jenkinson, C.P. et al. Comprehensive analysis of snps in ENPP1: association with diabetes. ASHG abstract (2004).
27. Ohlsson, H., Karlsson, K. & Edlund, T. IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *Embo J* 12, 4251-9 (1993). 40
28. Hugot, J.P. et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 599-603 (2001).
29. Hampe, J. et al. Evidence for a NOD2-independent susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 321-6 (2002).
30. Holder, J.L., Jr., Butte, N.F. & Zin 50

- n, A.R. Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene. *Hum Mol Genet* 9, 101-8. (2000).
31. Michaud, J.L. et al. Sim1 haploinsufficiency causes hyperphagia, obesity and reduction of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Hum Mol Genet* 10, 1465-73 (2001).
32. Tregouet, D.A., Escolano, S., Tiret, L., Mallet, A. & Golmard, J.L. A new algorithm for haplotype-based association analysis: the Stochastic-EM algorithm. *Ann Hum Genet* 68, 165-77 (2004). 10
33. Schwartz, M. W. Progress in the search for neuronal mechanisms coupling type 2 diabetes to obesity. *J Clin Invest* 108, 963-4 (2001).
34. Bruning, J.C. et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289, 2122-5 (2000). 20
35. Kim, J. K. et al. Redistribution of substrates to adipose tissue promotes obesity in mice with selective insulin resistance in muscle. *J Clin Invest* 105, 1791-7 (2000).
36. Michael, M.D. et al. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell* 6, 87-97 (2000). 30
37. Kulkarni, R.N. et al. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* 96, 329-39 (1999).
38. Um, S.H. et al. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431, 200-205 (2004). 40
39. Barroso, I. et al. Candidate Gene Association Study in Type 2 Diabetes Indicates a Role for Genes Involved in beta-Cell Function as Well as Insulin Action. *PLoS Biol* 1, E20 (2003).
40. Odeleye, O.E., de Courten, M., Pettitt, D.J. & Ravussin, E. Fasting hyperinsulinemia is a predictor of increased body weight gain and obesity in Pima Indian 50

- children. *Diabetes* 46, 1341-5 (1997).
41. Johnson, M.S., Figueroa-Colon, R., Huang, T.T., Dwyer, J.H. & Goran, M.I. Longitudinal changes in body fat in African American and Caucasian children: influence of fasting insulin and insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 3182-7 (2001).
42. Poskitt, E.M. Defining childhood obesity: the relative body mass index (BMI). European Childhood Obesity group. *Acta Paediatr* 84, 961-3 (1995). 10
43. Hercberg, S. et al. A primary prevention trial using nutritional doses of antioxidant vitamins and minerals in cardiovascular diseases and cancers in a general population: the SU.VI.MAX study - design, methods, and participant characteristics. *Supplementation en Vitamines et Mineraux Antioxydants. Control Clin Trials* 19, 336-51 (1998). 20
44. Lafay, L. et al. Determinants and nature of dietary underreporting in a free-living population: the Fleurbaix Laventie Ville Sante (FLVS) Study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 21, 567-73 (1997).
45. Oberkofler, H. et al. Complex haplotypes of the PGC-1 alpha gene are associated with carbohydrate metabolism and type 2 diabetes. *Diabetes* 53, 1385-93 (2004). 30
46. Cole, T.J. The LMS method for constructing normalized growth standards. *Eur J Clin Nutr* 44, 45-60 (1990).
47. Seltzer, H.S., Allen, E.W., Herron, A.L., Jr. & Brennan, M.T. Insulin secretion in response to glycemic stimulus: relation of delayed initial release to carbohydrate intolerance in mild diabetes mellitus. *J Clin Invest* 46, 323-35 (1967). 40
48. Risch, N. Linkage strategies for genetically complex traits. I. Multilocus models. *Am J Hum Genet* 46, 222-228 (1990).
49. Kruglyak, L. & Lander, E.S. Complete multipoint sib-pair analysis of qualitative and quantitative traits. *Am J Hum Genet* 57, 439-54 (1995).
50. Sham, P.C. & Curtis, D. Monte Carlo 50

tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Ann Hum Genet* 59 (Pt 1), 97-105 (1995).

51. Dudbridge, F., Koelman, B.P., Todd, J.A. & Clayton, D.G. Unbiased application of the transmission/disequilibrium test to multilocus haplotypes. *Am J Hum Genet* 66, 2009-12 (2000).

52. Lukowiak, B. et al. Identification and purification of functional human beta-cells by a new specific zinc-fluorescent probe. *J Histochem Cytochem* 49, 519-28 (2001).

10

【図面の簡単な説明】

【0110】

【図1】421人の肥満児と298人の対照個体における、ENPP1遺伝子を含む580kb領域内の53のSNP間のペアワイズLDを示す図。

【図2】ARG1、CRSP3、ENPP3、ENPP1およびCTGF遺伝子を含む580kb領域内の53のSNPの対立遺伝子の関連を示すグラフ。

【図3】279人の小児におけるENPP1タンパク質の血清レベルとBMIのZスコアとの間の相関を示すグラフ。

20

【図4】リスクハプロタイプの存在に照らした、89人の痩せた小児のENPP1の血清レベルを示すグラフ。

【図5】ヒトの組織におけるPC-1/ENPP1のmRNAの発現を示す図。

【図1】

【図2】

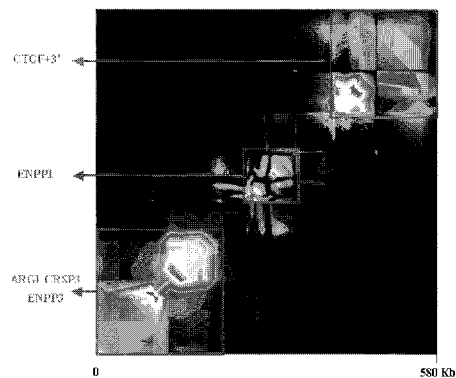


FIGURE 1

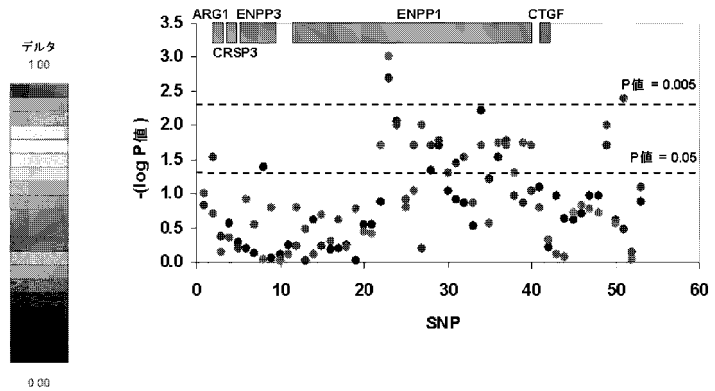


FIGURE 2

【 図 3 】

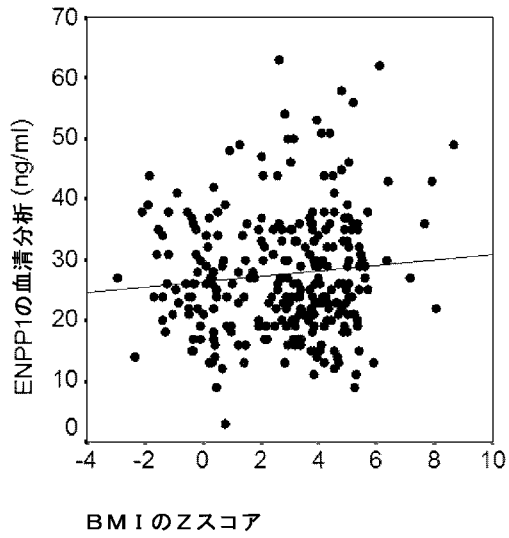


FIGURE 3

【 図 4 】

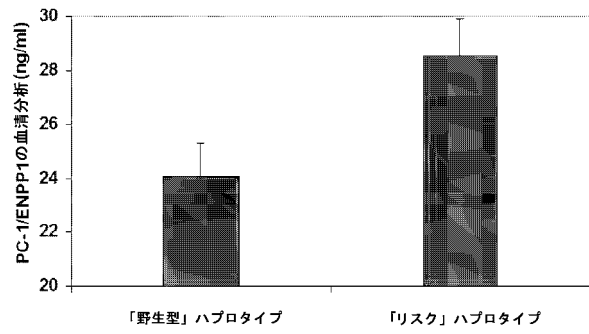


FIGURE 4

【 図 5 】

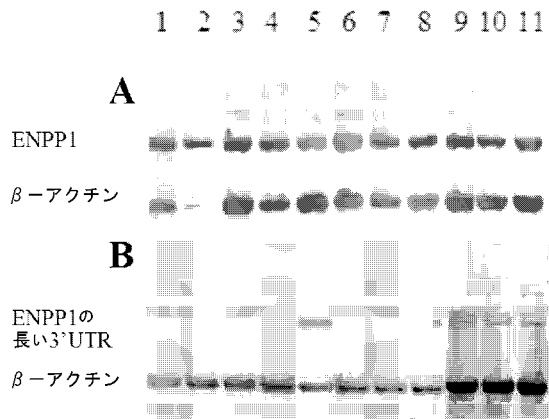


FIGURE 5A - FIGURE 5B

【配列表】

2008546380000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/063256

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. 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) 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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 465 185 B1 (GOLDFINE IRA ET AL) 15 October 2002 (2002-10-15) column 3, line 51 - column 4, line 10; column 6, line 44 - column 7, line 42; column 9, lines 49-64; column 10, lines 52-67; column 11, line 53 - column 12, line 64; example 2; column 18, lines 7-15	11-14, 18-21,30
A	FRITTITTA LUCIA ET AL: "The Q121 PC-1 variant and obesity have additive and independent effects in causing insulin resistance" JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, vol. 86, no. 12, December 2001 (2001-12), pages 5888-5891, XP002354157 ISSN: 0021-972X page 5891, for last paragraph	1-30
	-/-	
<input checked="" 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 document 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		Date of mailing of the international search report
24 November 2006		05/12/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hennard, Christophe

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/063256

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HAMAGUCHI KAZUYUKI ET AL: "The PC-1 Q121 allele is exceptionally prevalent in the Dominican Republic and is associated with type 2 diabetes." JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY & METABOLISM, vol. 89, no. 3, March 2004 (2004-03), pages 1359-1364, XP002354158 ISSN: 0021-972X page 1360, "Genotyping"; page 1361, last full paragraph	1-30
A	GODING J W ET AL: "Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR BASIS OF DISEASE, AMSTERDAM, NL, vol. 1638, no. 1, 20 May 2003 (2003-05-20), pages 1-19, XP004426713 ISSN: 0925-4439 page 11, paragraph 3.4	1-30
A	STEFANOVIC VLADISAV ET AL: "Plasma cell membrane glycoprotein 1 (PC-1): a marker of insulin resistance in obesity, uremia and diabetes mellitus." CLINICAL LABORATORY. 2004, vol. 50, no. 5-6, 2004, pages 271-278, XP009057018 ISSN: 1433-6510 page 273, both column	1-30
A	FRITTITTA LUCIA ET AL: "A cluster of three single nucleotide polymorphisms in the 3'-untranslated region of human glycoprotein PC-1 gene stabilizes PC-1 mRNA and is associated with increased PC-1 protein content and insulin resistance-related abnormalities" DIABETES, vol. 50, no. 8, August 2001 (2001-08), pages 1952-1955, XP002354159 ISSN: 0012-1797 cited in the application page 1954, "Research design and methods"	1-30

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/063256

G(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>MEYRE DAVID ET AL: "Variants of ENPP1 are associated with childhood and adult obesity and increase the risk of glucose intolerance and type 2 diabetes" NATURE GENETICS, vol. 37, no. 8, August 2005 (2005-08), pages 863-867, XP002354160 ISSN: 1061-4036 whole document</p> <p>-----</p>	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2006/063256

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6465185	B1	15-10-2002	NONE

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
A 0 1 K	67/027 (2006.01)	A 0 1 K 67/027	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z

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

(71) 出願人 507411970

ユニヴェルシテ ドゥ ドロワ エ ドゥ ラ サンテ ドゥ リール 2
UNIVERSITE DE DROIT ET DE LA SANTE DE LILLE
2
フランス共和国, エフ - 5 9 8 0 0 リール, リュ ボール ドュエ, 4 2

(74) 代理人 100080447

弁理士 太田 恵一

(72) 発明者 フロゲル, フィリップ

フランス共和国, エフ - 9 3 1 7 0 バニョレ, アヴニユ ドゥ ラ ドュイ, 1 0 4

(72) 発明者 メール, ダヴィッド

フランス共和国, エフ - 5 9 1 6 4 マルパン, リュ バルピュス, 1 4

(72) 発明者 ディナ, クリスティアン

フランス共和国, エフ - 7 5 0 0 9 パリ, リュ ソルニエ, 1 6

(72) 発明者 ブタン, フィリップ

フランス共和国, エフ - 5 9 2 0 0 トウルコワン, ボワ ダシエル, 1 3 3

F ターム(参考) 2G045 AA40 CB01 CB17 DA36

4B024 AA11 CA01 CA09 CA11 CA20 DA01 DA02 DA05 DA11 HA11

4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55

QR59 QR62 QS25 QS32 QX01

4B065 AA90X AB01 BA01 CA46

专利名称(译)	ENPP1 (PC-1) 基因的单倍型及其在肥胖和2型糖尿病风险中的应用		
公开(公告)号	JP2008546380A	公开(公告)日	2008-12-25
申请号	JP2008516328	申请日	2006-06-15
[标]申请(专利权)人(译)	法国国家科学研究中心 里尔法律与医疗卫生第二大学		
申请(专利权)人(译)	中心法国国家科学青色 (NTT节省耶鲁大学上课) Université电德抽屉等德拉桑特里尔2		
[标]发明人	フロゲルフィリップ メールダヴィッド ディナクリスティアン ブタンフィリップ		
发明人	フロゲル,フィリップ メール,ダヴィッド ディナ,クリスティアン ブタン,フィリップ		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A01K67/027 G01N33/53 G01N33/15 G01N33/50		
CPC分类号	G01N33/573 A01K2217/05 A01K2227/105 A01K2267/0362 C12N9/14 C12Q1/6883 C12Q2600/156 C12Q2600/158 C12Q2600/172 G01N33/6893 G01N2500/00 G01N2800/042 G01N2800/044 G01N2800 /52		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A A01K67/027 G01N33/53. D G01N33/15.Z G01N33/50.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/DA36 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024 /CA11 4B024/CA20 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063 /QR35 4B063/QR55 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QX01 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA46		
代理人(译)	太田圭一		
优先权	2005291298 2005-06-17 EP		
其他公开文献	JP5297799B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及通过确定受试者的DNA或RNA样品中包含三个特定SNP的单倍型的存在和/或确定血清ENPP1蛋白浓度的增加来确定受试者发生肥胖或肥胖相关病理的风险增加的方法。兴趣。本发明还涉及试剂盒以及包含所述ENPP1基因单倍型的分离的核酸序列，载体或重组细胞。本发明还包括选择用于治疗或预防肥胖或肥胖相关病理的化合物的方法和确定药物降低患者肥胖或肥胖相关病理风险的有效性的方法。

(5) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A	4 B O 2 4
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 B O 6 3
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 B O 6 5
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		
			審査請求	未請求	予備審査請求	未請求
					(全 46 頁)	最終頁
(21) 出願番号	特願2008-516328 (P2008-516328)		(71) 出願人	500470482		
(86) (22) 出願日	平成18年6月15日 (2006.6.15)			サントル ナショナル ドゥ ラ		
(85) 翻訳文提出日	平成20年2月18日 (2008.2.18)			ルシュ シアンティフィック (セーユ		
(86) 国際出願番号	PCT/EP2006/063256			ールエス)		
(87) 国際公開番号	W02006/134154			CENTRE NATIONAL I		
(87) 国際公開日	平成18年12月21日 (2006.12.21)			LA RECHERCHE SCIE		
(31) 優先権主張番号	05291298.7			IFIQUE (CNRS)		
(32) 優先日	平成17年6月17日 (2005.6.17)			フランス共和国, エフー75016		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)			, リュ ミシエール-アンジュ, 3		