

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6479780号  
(P6479780)

(45) 発行日 平成31年3月6日(2019.3.6)

(24) 登録日 平成31年2月15日(2019.2.15)

(51) Int.Cl.	F 1	
<b>GO 1 N 33/566 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/566	
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	
<b>A 6 1 K 31/7088 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/7088	
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00	1 1 1
請求項の数 7 (全 19 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-520450 (P2016-520450)  
 (86) (22) 出願日 平成26年6月17日 (2014. 6. 17)  
 (65) 公表番号 特表2016-532098 (P2016-532098A)  
 (43) 公表日 平成28年10月13日 (2016. 10. 13)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2014/062713  
 (87) 国際公開番号 W02014/202602  
 (87) 国際公開日 平成26年12月24日 (2014. 12. 24)  
 審査請求日 平成29年4月6日 (2017. 4. 6)  
 (31) 優先権主張番号 13172362.9  
 (32) 優先日 平成25年6月17日 (2013. 6. 17)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 500431380  
 ドイツェス クレープスフォルシュングス  
 ツェントルム シュティフトゥング デス  
 エッフエントリッヒェン レヒツ  
 ドイツ国 D-69120 ハイデルベル  
 グ, イム ノイハイマー フェルト 28  
 O  
 (73) 特許権者 514009627  
 ルプレクトーカールズ-ウニベルシタット  
 ハイデルベルク  
 ドイツ連邦共和国 69117 ハイデル  
 ベルク, グラベンガッセ 1  
 (74) 代理人 100088904  
 弁理士 庄司 隆

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 転写因子TSC22D4の阻害剤によるインスリン耐性の治療

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

哺乳動物中のインスリン耐性、メタボリックシンドローム及び/又は糖尿病タイプ1若しくは2の予防及び/又は治療のための、及び/又は、腫瘍疾患との関連におけるインスリン感受性のようなインスリン感受性を改善するための、

モジュレーターを同定する方法であって、以下の工程を含む：

a) TSC22D4をコードする核酸配列又はTSC22D4の遺伝子発現産物を含む生体サンプルを提供すること、

b) 前記サンプルを前記TSC22D4をコードする核酸配列又はTSC22D4の遺伝子発現産物の少なくとも1つの推定上のモジュレーターと接触させること、及び

c) 前記少なくとも1つの推定上のモジュレーターと前記TSC22D4をコードする核酸配列又はTSC22D4の遺伝子発現産物との間の結合を検出すること、及び

d) 前記TSC22D4をコードする核酸配列又はTSC22D4の遺伝子発現産物の前記モジュレーターを同定すること、及び

e) 前記モジュレーターの存在下又は非存在下における少なくとも1つのTSC22D4活性又は発現を評価する工程であって、前記モジュレーター非存在下におけるTSC22D4の測定された活性又は発現と比較された、前記モジュレーター存在下におけるTSC22D4の測定された活性又は発現との間の低下は、前記モジュレーターがインスリン耐性、メタボリックシンドローム及び/又は糖尿病タイプ1若しくは2の予防及び/又は治療において、及び/又は、腫瘍性疾患との関連におけるインスリン感受性のようなインスリン感受性を改善する

ために、使用されることを示し、

前記モジュレーターは、ペプチドライブラリー分子、アプタマー、組み合わせライブラリー分子、細胞抽出物由来分子、小分子薬、細菌代謝産物、ファージディスプレイ分子、その抗体又は断片、タンパク質、タンパク質断片、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、miRNA、siRNA又はshRNA、及びそれらの組み合わせから選択される、方法。

【請求項 2】

前記TSC22D4の活性又は発現が肝臓の（hepatic）活性又は発現である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

インスリン耐性、メタボリックシンドローム及び／又は糖尿病タイプ1若しくは2の予防及び／又は治療における、及び／又は、腫瘍疾患との関連におけるインスリン感受性のようなインスリン感受性を改善するための、前記モジュレーターの効果を解析する工程を更に含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

TSC22D4の活性を評価することは、酵素活性解析、免疫測定、レポーターアッセイ及び／又はウェスタンブロットを含み、及び／又は、TSC22D4の発現を評価することは、ノーザンブロット、マイクロアレイ解析及び／又はRT-PCRを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記哺乳動物由来の生体サンプル中の血糖、炎症性サイトカイン及び／又はレジスチンの循環レベルを解析する工程を更に含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項 6】

疾患の予防又は治療に使用するための、及び／又は、腫瘍疾患との関連におけるインスリン感受性のようなインスリン感受性を改善するための、TSC22D4に特異的なTSC22D4の発現の阻害剤であって、前記阻害剤は、miRNA、siRNA又はshRNA、及びそれらの組み合わせの群から選択され、前記疾患はインスリン耐性、メタボリックシンドローム及び糖尿病タイプ1若しくは2から選択される、阻害剤。

【請求項 7】

糖尿病に関連するインスリン耐性の検出方法であって、そのような疾患を有すると疑われた被験者から得られた生体サンプル中のTSC22D4の発現及び／又は生物活性を測定する工程を含み；

30

ここで健康な被験者からのサンプル中のTSC22D4の測定された活性又は発現と比較された前記サンプル中のTSC22D4の測定された活性又は発現の低下は、糖尿病タイプ2を含む糖尿病に関連するインスリン耐性の存在又はリスクを示す、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、TSC22D4活性又は発現のモジュレーター、特に阻害剤、及び哺乳動物中のインスリン耐性、メタボリックシンドローム及び／又は糖尿病の予防、治療及び／又は制御のための、及び／又はインスリン感受性を改善するためのそれらの使用に関する。本発明は、本発明に従った方法を実施するための材料を含むキットだけでなく、これらのモジュレーターを同定するためのスクリーニング方法、これらの疾患の診断において同定されたモジュレーターの使用に更に関する。

40

【背景技術】

【0002】

ヒトにおいて、過度の脂質貯蔵及び除去の低下の組み合わせは、肥満及びインスリン耐性、心血管合併症、及び脂質異常症を含む関連併存症を引き起こし（Langin D. In and out: adipose tissue lipid turnover in obesity and dyslipidemia. Cell Metab. 2011 Nov 2; 14(5):569-70）、現在世界中で15億人を超える人々に影響を及ぼしている（Finucane MM, et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 19

50

80: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 91 million participants. *Lancet*. 2011 Feb 12; 377(9765):557-67)。実際に、インスリン耐性は、最終的に糖耐性、膵細胞不全、及び最終的にタイプ2糖尿病等の代謝機能不全の発症に結びつく、いわゆるメタボリックシンドロームのコアコンポーネントを表す。

#### 【0003】

インスリン分泌障害（細胞）、肝臓のグルコース産生増加（肝臓）、及び末梢の（筋肉）グルコース利用低下は、タイプ2糖尿病の発症及び進行の原因である従来の初期の異常を構成する。インスリン分泌低下に最終的に結びつく細胞不全は、タイプ2糖尿病の自然経過において、本来考えられたよりはるかに初期に生じることが現在知られている。更に、タイプ2糖尿病の病態生理学についてのより良い理解は、古典的な三徴候（triad）を超える、現在不吉なオクテット（ominous octet）と呼ばれる、他の病因機序を明らかにする。細胞、肝臓及び筋肉に加えて、他の発症機序は、脂肪細胞インスリン耐性（脂肪分解増加）、インクレチンの分泌/感受性低下（胃腸）、グルカゴン分泌増加（細胞）、グルコース再吸収増強（腎臓）、及び神経伝達物質機能障害に起因する中枢神経系インスリン耐性（脳）を含む。現在、タイプ2糖尿病の管理は、血糖（空腹時と食後）及びヘモグロビンA(1c)の低下によるグルコース調節に集中している。しかし、治療の目標は、疾患進行及び最終的な治療失敗を遅らせることであるべきである。治療は、該疾患の既知の病原性障害（pathogenic disturbances）を標的とするべきである（すなわち、細胞機能の悪化の低減及びインスリン感受性の改善）。近年、治療戦略は、タイプ2糖尿病の一因となる異常の多くに影響を及ぼし、並びに疾患進行の鈍化を通して持続性のグルコース調節を提供する、新規の治療オプションの開発に集中してきた。タイプ2糖尿病の最適な管理は、異なる作用機序を備える多数の薬を組み合わせ使用した治療の早期開始を含むべきである（DeFronzo RA. (Current issues in the treatment of type 2 diabetes. Overview of newer agents: where treatment is going. *Am J Med*. 2010 Mar;123(3 Suppl):S38-48)）。

#### 【0004】

特に、肝臓、骨格筋及び脂肪組織を含むインスリン作用に対する、主な代謝器官の非感受性は、本質的に疾患進行及び糖尿病の後期合併症を防ぐための薬理的介入の最終的な必要性の一因となる。したがって、効率的で安全なインスリン増感は、依然として抗糖尿病治療における魅力的な標的及び目標となっている。

#### 【0005】

転写補因子複合体（transcriptional co-factor complexes）は、肝臓及び白色脂肪組織（WAT）を含む、様々な組織中の代謝プログラムの協調における重要なチェックポイントとして同定されてきた（レビューのため、Sommerfeld A, Kronen-Herzig A, Herzig S. Transcriptional co-factors and hepatic energy metabolism. *Mol Cell Endocrinol*. 2011 Jan 30;332(1-2):21-31を参照されたい）。

#### 【0006】

Kester HAらは（Transforming growth factor-beta-stimulated clone-22 is a member of a family of leucine zipper proteins that can homo- and heterodimerize and has transcriptional repressor activity. *J Biol Chem*. 1999 Sep 24;274(39):27439-47において）、TGF- 刺激クローン-22（TSC-22）が進化の過程で高度に保存されたロイジンジッパー含有タンパク質をコードすることを説明している。

#### 【0007】

更に、Jonesらは（Jones, A., et al., Transforming growth factor-beta1 Stimulated Clone-22 D4 is a molecular output of hepatic wasting metabolism. *EMBO Mol Med*. 2013 Feb; 5(2):294-308において）、分子悪液質排出経路（molecular cachexia output pathway）として、転写因子形質転換増殖因子 1-刺激クローン（TSC）22 D4の肝臓レベルは、癌悪液質中で増加したことを説明している。健康な肝臓におけるTSC22D4の高い悪液質レベルの模倣は、肝臓VLDL放出及び脂質生成遺伝子の抑制を引き起こし、正常及び高

10

20

30

40

50

脂肪食事条件の両方の下で全身性VLDLレベルを減少させた。したがって、肝臓TSC22D4活性は、癌悪液質を含む代謝消耗症 (metabolic wasting diseases) を患う被験者における末梢エネルギー欠乏についての分子理論 (molecular rationale) を表すかもしれない。

【0008】

Kulozik, Ph.ら (Hepatic deficiency in transcriptional co-factor TBL1 promotes liver steatosis and hypertriglyceridemia. 2011 Cell Metab. 13: 389-400) は、転写補因子トランスデュースン様 (TBL) 1の肝臓発現障害が一遺伝子及び多重遺伝子の脂肪肝マウスモデルの共通の特徴を表すことを説明している。健康なマウスにおけるTBL1遺伝子発現の肝臓特異的な除去は、正常及び高脂肪食事条件の両方の下で高トリグリセリド血及び脂肪肝を促進した。TBL1発現レベルは、ヒト患者において肝臓脂肪含有率と逆相関することも発見されたので、肝臓TBL1/TBLR1補因子活性の欠乏は、肥満及びメタボリックシンドロームを患う被験者における脂肪肝の分子理論を表すかもしれない。

【0009】

Berriell Diaz, M.ら (Nuclear receptor co-factor RIP140 controls lipid metabolism during wasting in mice. 2008. Hepatology 48: 782-791) は、肝臓のTG貯蔵の動員 (mobilization) を防ぐことによって、肝臓中のRIP140の誘導が飢餓、敗血症、又は癌悪液質における脂肪肝についての分子理論を提供することを説明している。肝臓のRIP140の転写活性の抑制は、それにより、これらの状態の治療における魅力的な補助機構 (adjunct scheme) を提供するかもしれない。

【0010】

Fareseらは (The problem of establishing relationships between hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. Cell Metab. 2012 May 2;15(5):570-3において)、肝臓 (脂肪肝) 中の脂肪の過度の沈着が肝臓のインスリン耐性を頻繁に伴うことを説明している。

【0011】

抗糖尿病及び/又はインスリン増感薬の主要なクラスは、スルホニル尿素、メトホルミン、チアゾリジンジオン、グルコシダーゼ阻害剤、インクレチン模倣体、及びジペプチジルペプチダーゼ4阻害剤を含み、それらの全てが厳しい制限と関連する (レビューのため、Moller, Metabolic disease drug discovery- "hitting the target" is easier said than done. Cell Metab. 2012 Jan 4;15(1):19-24を参照されたい)。

【0012】

タイプ2糖尿病の病因におけるインスリン耐性の重要な役割にもかかわらず、有効で安全なインスリン増感剤は、なお欠如している。実際に、チアゾリジンジオンファミリーの現在の薬は、適度な効能特性を発揮し、例えば、ロシグリタゾンの最近の市場からの撤回に結びついている、体重増加、心不全のリスク増加、膀胱癌の可能性のあるリスク増加、及び心筋梗塞のリスク増加を含む、本質的な副作用を伴う。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

したがって、本発明は、インスリン耐性、メタボリックシンドローム及び/又は糖尿病を予防、治療、及び/又は制御するための新規の標的及び戦略を提供すること及び/又はインスリン感受性を改善することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明の第一の態様によれば、上記の目的は、哺乳動物中のインスリン耐性、メタボリックシンドローム及び/又は糖尿病タイプ1若しくは2の予防、治療及び/又は制御のための、及び/又は、例えば、腫瘍疾患との関連におけるインスリン感受性のようなインスリン感受性を改善するための、モジュレーターを同定する方法により解決され、以下の工程を含む: a) TSC22D4をコードする核酸配列又はTSC22D4の遺伝子発現産物を含む、生体サンプルを提供すること、b) 前記サンプルを前記TSC22D4をコードする核酸配列又はTSC22D

10

20

30

40

50

4遺伝子発現産物の少なくとも1つの推定上のモジュレーターと接触させること、及びc) 前記少なくとも1つの推定上のモジュレーターと前記TSC22D4をコードする核酸配列又はTSC22D4の遺伝子発現産物との間の結合を検出すること、及びd) 前記TSC22D4をコードする核酸配列又はTSC22D4の遺伝子発現産物の前記モジュレーターを同定すること。

【0015】

本発明者らは、転写制御因子形質転換増殖因子 1刺激クローン22 D4 (TSC22D4) が肝臓及び全身のインスリン感受性を制御することを示してきた。したがって、TSC22D4は、インスリンシグナルカスケードにおけるいくつかの重要なノード (nodes) を制御し、それにより肝臓及び全身のインスリン感受性を増強し、糖尿病の高血糖症を正常化する、定義された分子及び器官特異的標的を表す。転写TSC22D4複合体は、糖尿病の状態において、インスリン感受性を改善し、正常なグルコース恒常性に回復するために操作することができる、干渉に基づく戦略 (interference-based strategies) のための新規の分子標的として役立つ。更に、本発明との関連において実施された実験において、TSC22D4の肝臓特異的損失は、耐糖能及びインスリン感受性、及び対抗する (counter-acted) 高インスリン血症を有意に改善した。TSC22D4複合体は、肝臓及び全身のインスリン増感における新規の分子チェックポイントとして同定され、そして (shRNA、siRNA及びmiRNA技術により媒介された) ノックダウン戦略が開発されてきた。肝臓特異的ターゲティングアプローチ (例えばsiRNAに基づいたノックダウン戦略) を用いた肝臓でのTSC22D4の操作は、他の組織中の主要な副作用を回避するであろう。

【0016】

より詳しくは、健康な動物におけるハイスルーブットTSC22D4標的トランスクリプトーム研究と組み合わせたTSC22D4 (NM\_030935) シストローム (cistrome) のChIP-sequence解析は、インスリンシグナル伝達経路の主要なノードがTSC22D4、最も顕著にはリポカリン13、Grb14及びSOCS 2/3により直接的又は間接的に標的化されることを明らかにした。野生型のマウスと同様に初代マウス肝細胞中のTSC22D4の下方調節又は過剰発現は、それぞれ急性インスリン暴露にตอบสนองして、Ser473のAkt/PKBキナーゼ及びSer9のGSK3 のリン酸化により決定される、細胞内インスリンシグナル伝達経路の上方調節又は下方調節をそれぞれもたらす。

【0017】

糖尿病のdb/dbマウスにおけるTSC22D4の肝臓の不活性化は、これらの動物における糖耐性及びインスリン耐性を改善し、血糖をほとんど正常レベルへと正常化した。糖尿病の動物における代謝ステータスの全体的な改善に一致して、炎症性サイトカイン及びレジチンの循環レベルは、肝臓特異的TSC22D4欠損のマウスにおいて顕著により低かった。注目すべきことに、肝臓癌細胞におけるTSC22D4の不活性化は、細胞の成長を増加させず、むしろ増殖を減少させたことから、TSC22D4のインスリン増感機能が、影響を受けた細胞/器官における癌感受性の増加を引き起こさないことを示唆している。

【0018】

前記モジュレーターの存在下又は非存在下においてTSC22D4活性及び/又は発現を評価する工程を更に含む、本発明による方法が好ましく、ここで前記モジュレーターの非存在下におけるTSC22D4の測定された活性又は発現と比較された、前記モジュレーター存在下におけるTSC22D4の測定された活性又は発現との間の低下は、前記モジュレーターが、該工程を含む、哺乳動物中のインスリン耐性、メタボリックシンドローム、糖尿病タイプ1若しくは2の予防、治療及び/又は制御における使用のため、及び/又は、例えば、腫瘍疾患との関連におけるインスリン感受性のようなインスリン感受性を改善するためのものであることを示す。より好ましくは、前記TSC22D4の活性又は発現は、肝臓の活性又は発現であり、すなわち、肝細胞又は組織中の活性及び/又は発現である。

【0019】

前記TSC22D4の活性又は発現が肝臓の活性又は発現である、本発明による方法は、より好ましい。したがって、活性及び/又は発現は、肝細胞又は組織中で試験される。

【0020】

1つの実施態様において、本発明による方法の生体サンプルは、生体外又は生体内で候補化合物と接触させられる。

【0021】

本発明による方法の更に別の態様において、前記方法は、インスリン耐性、メタボリックシンドローム及び/又は糖尿病タイプ1又は2の予防、治療及び/又は制御における、及び/又は、例えば、腫瘍疾患との関連におけるインスリン感受性のようなインスリン感受性を改善するための、前記モジュレーターの効果を解析する工程を更に含む。前記哺乳動物由来の生体サンプル中の血糖、炎症性サイトカイン及び/又はレジスチンの循環レベルを解析する工程を更に含む、本発明による方法が好ましい。したがって、このような試験は、好ましくは前記モジュレーターの存在下又は非存在下において、例えば、インスリン濃度、c-ペプチド濃度、インターロイキン6濃度、レプチン濃度、レジスチン濃度、TNF濃度、グルカゴン濃度及び/又はPYY濃度等の、試験される被験者から得る生体サンプル中のマーカーの解析を含んでもよい。それぞれの解析は、熟練した当業者に既知である。

10

【0022】

前記モジュレーターが好ましくはTSC22D4の発現を標的とし、調整する、ペプチドライブラリー分子、アプタマー、組み合わせライブラリー (combinatory library) 分子、細胞抽出物由来分子、小分子薬、細菌代謝産物、ファージディスプレイ分子、その抗体又は断片、タンパク質、タンパク質断片、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、特にmiRNA、siRNA又はshRNA、及びそれらの組み合わせから選択された候補化合物であって、かつ遺伝子産物の対応する活性を更に変更できる、本発明による方法が好ましい。明確には、「標的とすること (targeting)」は、遺伝子産物、又はそのような産物の機能的部位に直接的又は間接的に結合することを含む (例えば、TSC22D4を結合し、無力化する、したがってその活性を調整する抗体)。

20

【0023】

1つの態様では、生物活性剤は、「RNA干渉 (RNAi)」を利用する。RNAiは、二本鎖RNA (dsRNA) 又はsiRNAによって開始された配列特異的な、転写後遺伝子サイレンシングのプロセスである。RNAiは、ショウジョウバエ、線虫、菌類及び植物等の多くの生物で見られ、抗ウイルス防御、トランスポゾン活性の調整、及び遺伝子発現の制御に関与すると考えられている。RNAiの間に、dsRNA又はsiRNAは、結果的な遺伝子発現の配列特異的抑制とともに標的mRNAの分解を誘導する。本願に使用されるどころ、「低分子干渉RNA」(siRNA) は、TSC22D4の遺伝子に標的化される、ヌクレオチドのRNA二本鎖である。「RNA二本鎖」は、RNA分子の2つの領域間の相補的対合により形成された構造を参照する。siRNAは、siRNAの二本鎖部分のヌクレオチド配列が標的遺伝子のヌクレオチド配列に相補的であるという点で遺伝子に「標的化 (targeted)」される。いくつかの実施態様では、siRNAsの二本鎖の長さは、30ヌクレオチド未満である。いくつかの実施態様では、二本鎖は、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11又は10ヌクレオチドの長さであり得る。いくつかの実施態様では、二本鎖の長さは、19~25ヌクレオチドの長さである。siRNAのRNA二本鎖部分は、ヘアピン構造の一部であってもよい。二本鎖部分に加えて、ヘアピン構造は、二本鎖を形成する2つの配列間に位置したループ部分を含んでもよい。ループは長さにおいて相違し得る。いくつかの実施態様では、ループは5、6、7、8、9、10、11、12又は13ヌクレオチドの長さである。ヘアピン構造は、更に3'及び/又は5'突出部分を含み得る。いくつかの実施態様では、突出は、0、1、2、3、4又は5ヌクレオチドの長さの3'及び/又は5'突出である。siRNAは、核酸配列によってコードされてもよく、核酸配列は、更にプロモーターを含み得る。核酸配列は、更にポリアデニル化シグナルを含み得る。いくつかの実施態様では、ポリアデニル化シグナルは、合成の最小のポリアデニル化シグナルである。

30

40

【0024】

上述のような方法の更なる実施態様では、TSC22D4の活性の評価は、酵素活性解析、免疫測定、又はウェスタンブロット、好ましくは例えばレポーターアッセイのような、転写因子の機能解析のための少なくとも1つの方法を含む。1つの実施態様では、TSC22D4の発

50

現の評価は、ノーザンブロット、マイクロアレイ解析、RNAハイブリダイゼーション、メチル化解析、及び/又はRT-PCRを含む。酵素の活性の評価又は遺伝子の発現の評価は、熟練した当業者に既知である酵素（ここでは転写因子）の活性を評価する全ての方法を含む。

【0025】

したがって、代案として、TSC22D4の酵素又は発現活性は、TSC22D4により制御される酵素の酵素又は発現活性の評価により間接的に評価され得る。したがって、このような試験は、好ましくは前記モジュレーター存在下又は非存在下において、例えば、インスリン濃度、c-ペプチド濃度、インターロイキン6濃度、レプチン濃度、レジスチン濃度、TNF濃度、グルカゴン濃度及び/又はPYY濃度等の、試験される被験者から得る生体サンプル中のマーカーの解析を含んでもよい。それぞれのアッセイは、熟練した当業者に既知である。本発明による更なる方法は、熟練した当業者に既知である、遺伝子発現、又は酵素活性の検出に適した任意の方法だけでなくマイクロアレイ解析である。

10

【0026】

本発明の別の態様は、TSC22D4に特異的であり、本願に記載された通りの本発明による方法により同定されるモジュレーターに更に関するものであって、ここで前記モジュレーターは、ペプチドライブラリー分子、アプタマー、組み合わせライブラリー分子、細胞抽出物由来分子、小分子薬、細菌代謝産物、ファージディスプレイ分子、抗体又はその断片、タンパク質、タンパク質断片、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、特にmiRNA、siRNA又はshRNA、及びそれらの組み合わせの群から選択される。好ましくは、前記モジュレーターは、TSC22D4の発現及び/又は生物活性の阻害剤から選択される。

20

【0027】

1つの実施態様では、TSC22D4の阻害剤は、アンチセンスDNA-オリゴヌクレオチド及び/又はアンチセンスRNA-オリゴヌクレオチド、アンチセンス2'-O-メチルオリゴリボヌクレオチド、ホスホロチオエート結合含有アンチセンスオリゴヌクレオチド、低分子干渉RNA、miRNA、Locked Nucleic Acid LNA（商標）塩基含有アンチセンスオリゴヌクレオチド、モルフォリノアンチセンスオリゴ、PPAR-アゴニスト、antagomir、及びそれらの混合物、及び特にTSC22D4のantagomirから選択される。

【0028】

本発明の更なる別の態様では、モジュレーターは、融合タンパク質の一部であってもよく、例えば、化学療法、ペプチド、小分子薬及び/又は放射性ヌクレオチド等の、前記モジュレーターに接合した、少なくとも1つの抗糖尿病薬を任意に含む担体分子の一部であってもよく、及び/又は少なくとも1つの検出可能な部分を任意に含む診断用薬の一部であってもよい。これは、本発明の診断の関連における、及び/又はより効率的な、好ましくは相乗的な、他の抗糖尿病薬と併用する治療のための特別の利点である。

30

【0029】

本発明の目的は、以下の工程を含む、医薬組成物を生産する方法によっても解決される：a) 任意に、上記の通りの本発明による方法を実施すること、及びb) 同定された前記少なくとも1つのモジュレーター又は本発明によるモジュレーターを少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤と調合すること。医薬組成物の担体及び/又は賦形剤は、他の調合成分と均質の混合物を形成することができ（compatible）、そのレシピエントに有害ではないという意味において「許容され（acceptable）」なければならない。

40

【0030】

本目的は、本発明により生産された、医薬組成物により更に解決される。更なる別の実施態様では、本発明による医薬組成物は、投与のためのものであり、及び/又は経口的に、経直腸的に、経粘膜的に、経皮的に、経腸的に、非経口的に、筋肉内に、髄腔内に、直接脳室内に、静脈内に、腹腔内に、鼻腔内に、眼内に、又は皮下に投与される。

【0031】

本目的は、本発明によるモジュレーター又は疾患の診断における使用のための及び/又は疾患の予防、制御及び/又は治療における使用のための本発明による医薬組成物により

50

更に解決される。本発明による使用のためのモジュレーター又は医薬組成物が好ましく、ここで前記疾患は、インスリン耐性、メタボリックシンドローム及び/又は糖尿病から選択される。より好ましくは、本発明による使用のためのモジュレーター又は医薬組成物は、ペプチドライブラリー分子、アプタマー、組み合わせライブラリー分子、細胞抽出物由来分子、小分子薬、細菌代謝産物、ファージディスプレイ分子、抗体又はその断片、タンパク質、タンパク質断片、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、特にmiRNA、siRNA又はshRNA、及びそれらの組み合わせの群から選択される。1つの実施態様では、TSC22D4の阻害剤は、アンチセンスDNA-オリゴヌクレオチド及び/又はアンチセンスRNA-オリゴヌクレオチド、アンチセンス2'-O-メチルオリゴリボヌクレオチド、ホスホロチオエート結合含有アンチセンスオリゴヌクレオチド、低分子干渉RNA、miRNA、Locked Nucleic Acid LNA (商標)塩基含有アンチセンスオリゴヌクレオチド、モルフォリノアンチセンスオリゴ、PPAR- アゴニスト、antagomir、及びそれらの混合物、及び特にTSC22D4のantagomirから選択される。

10

#### 【0032】

本目的は、インスリン耐性、メタボリックシンドローム及び/又は糖尿病タイプ1又は2から選択された疾患についての、及び/又は、例えば、腫瘍疾患との関連におけるインスリン感受性のような、インスリン感受性の改善についての、存在又はリスクを検出及び任意に診断するための、当該疾患を患っていると疑われる被験者から得た生体サンプル中のTSC22D4の発現及び/又は生物活性を測定する工程をさらに含む、方法により更に解決され；ここで健康な被験者からのサンプル中のTSC22D4の測定された活性又は発現と比較された前記サンプル中のTSC22D4の測定された活性又は発現の低下は、インスリン耐性、メタボリックシンドローム、糖尿病タイプ1又は2から選択された疾患についての、及び/又は、例えば、腫瘍疾患との関連におけるインスリン感受性のようなインスリン感受性の改善についての、存在又はリスクを示す。好ましくは、前記検出は、本発明によるモジュレーターの結合を検出することを含む。前記サンプルが、好ましくは血液、血漿、尿、細胞の、及び例えば、肝臓、胸、前立腺、骨、軟骨、肺、又は脳組織を含む生検等の組織サンプルから選択された生体サンプルである、本発明による方法が好ましい。「生体サンプル (biological sample)」は、任意の生物ソースの検体である。生物ソースは、任意の自然発生の又は遺伝子組換えの生物であり得る。生体サンプルは、遺伝子発現産物、ヌクレオチド酸、タンパク質、又はペプチドの溶液、又は固形物としてのヌクレオチド酸、タンパク質、又はペプチドからと同様に、組織、細胞培養、粗製抽出物、体液から得ることができるが、それに限定されない。

20

30

#### 【0033】

本目的は、必要とする被験者においてインスリン耐性、メタボリックシンドローム及び/又は糖尿病から選択された疾患を治療及び/又は予防するための、有効な量の本発明によるモジュレーター又は本発明による医薬組成物を前記必要とする患者に投与する工程を含む、方法により更に解決される。好ましくは、前記モジュレーターは、ペプチドライブラリー分子、アプタマー、組み合わせライブラリー分子、細胞抽出物由来分子、小分子薬、細菌代謝産物、ファージディスプレイ分子、抗体又はその断片、タンパク質、タンパク質断片、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、特にmiRNA、siRNA又はshRNA、及びそれらの組み合わせの群から選択される。1つの実施態様では、TSC22D4の阻害剤は、アンチセンスDNA-オリゴヌクレオチド及び/又はアンチセンスRNA-オリゴヌクレオチド、アンチセンス2'-O-メチルオリゴリボヌクレオチド、ホスホロチオエート結合含有アンチセンスオリゴヌクレオチド、低分子干渉RNA、miRNA、Locked Nucleic Acid LNA (商標)塩基含有アンチセンスオリゴヌクレオチド、モルフォリノアンチセンスオリゴ、PPAR- アゴニスト、antagomir、及びそれらの混合物、及び特にTSC22D4のantagomirから選択される。

40

#### 【0034】

本目的は、任意にキットの使用のための説明書とともに、診断に適した酵素及びバッファー等の、本発明による方法を実施するための材料を含む、診断又は治療用キットにより更に解決される。TSC22D4ポリペプチドを検出するためのキットは、好ましくはTSC22D4ポ

50

リペプチドに特異的に結合する、抗体及び/又はmiRNAを含む。TSC22D4 mRNAを検出するためのキットは、好ましくはTSC22D4 mRNAと特異的にハイブリダイズする1つ又は複数の核酸(例えば、1つ又は複数のオリゴヌクレオチドプライマー又はプローブ、DNAプローブ、RNAプローブ、又はRNAプローブを生成するためのテンプレート)を含む。本質的に、同じことは、好ましくはTSC22D4ポリペプチド及び/又はmRNAのための薬学的に許容されるモジュレーターを含む、治療用キットにも該当する。

【0035】

TSC22D4機能及び/又は発現の「モジュレーター」は、TSC22D4の機能及び/又は発現を制御又は変更する物質である。当該モジュレーターは、TSC22D4機能及び/又は発現に直接又は間接的に影響してもよい。TSC22D4機能及び/又は発現は、例えば、TSC22D4タンパク質のドメインに結合すること、又はTSC22D4の遺伝子発現を増強又は抑制することにより変更又は制御され得るが、それに限定されない。本発明によるモジュレーターは、制御し、又はTSC22D4により制御される遺伝子の機能及び/又は発現を制御又は変更することにより、TSC22D4の機能及び/又は発現を更に間接的に制御又は変更してもよい。

10

【0036】

本発明による「遺伝子発現産物」は、DNA、cDNA、RNA、若しくはmRNAのような、精製された、組換えの、自然の、人工の又は合成のヌクレオチド配列;又はタンパク質、又はペプチドを含むが、それに限定されない。本発明による「遺伝子発現産物」は、精製された、組換えの、自然の、人工の又は合成の遺伝子発現産物、又はその修飾体を含むが、それに限定されない。本発明による核酸配列は、先行技術において既知であるTSC22D4をコードする任意の核酸配列、又は相補配列、又はその修飾体と同様にストリンジェントな条件の下、そこへハイブリダイズするヌクレオチド配列である。

20

【0037】

「阻害剤」は、触媒された反応において触媒の有効性を減少させることができる物質である(非生物学的触媒又は酵素のいずれか)。本願に参照される阻害剤は、酵素の活性の有効性を減少させることができる;更に、本願に参照される阻害剤は、酵素の発現の有効性を減少させることができる。阻害剤は、DNA、cDNA、RNA、miRNA又はmRNAのような、組み換えの、自然の、人工の又は合成のヌクレオチド配列;又はタンパク質(例えば、抗体等)、又はペプチド、又はその修飾体でもよいが、それに限定されない。阻害剤は、その修飾体と同様に先行技術において既知であるTSC22D4をコードするヌクレオチド配列にストリンジェントな条件の下でハイブリダイズする、任意の核酸配列、又は相補配列、又はヌクレオチド配列であってもよいが、それに制限されない。

30

【0038】

本発明による「細胞」は、原核細胞又は真核細胞であり得る。本発明による「細胞」は、好ましくは肝細胞から選択されるが、それに限定されない。哺乳動物細胞は、好ましくはヒト、ウサギ、マウス又はラットから選択されてもよい。好ましくは、細胞はヒト細胞である。用語「細胞」は、更に動物モデルの細胞を含む。更に、細胞は、組織培養の一部であり得る。

【0039】

本発明との関連における用語「予防」は、疾患を有する患者の状態の悪化、又は健康な及び/若しくは病気の被験者の損傷(injury)又は死に結びつく可能性が最も高いネガティブイベントの発生を回避することを目指す医療介入として理解されるべきである。

40

【0040】

「必要とする被験者(subject in need thereof)」は、苦痛、特に神経因性疼痛を感じる、任意の動物又はヒトであり得るが、それに限定されない。好ましくは、必要とする被験者はヒトである。

【0041】

TSC22D4の肝細胞特異的不活性化は、肝臓と骨格筋中のインスリンシグナル伝達を増強し、一方で肝臓のTSC22D4過剰発現は、インスリン組織応答を鈍くした。その結果、肝臓のTSC22D4抑制は、様々な糖尿病マウスモデルにおける高血糖症、糖耐性、及びインスリ

50

ン耐性をそれぞれ予防したのみならず逆転させた。TSC22D4は、生体内でのクロマチン動員及び遺伝学的レスキュー実験により証明された、小分泌タンパク質リポカリン (LCN) 13の転写制御を部分的に通じて、全身のグルコース恒常性に効果を発揮することが発見された。肝臓のTSC22D4レベルは、インスリン感受性低下及び高血糖症と相関して、ヒト糖尿病患者において上昇したことが発見されたため、本発明は、インスリン耐性、メタボリックシンドロームの治療と同様に、糖尿病タイプ1又は2治療における魅力的なインスリン増感オプションとして、及び/又は、例えば、腫瘍疾患との関連におけるインスリン感受性のようなインスリン感受性を改善するために、TSC22D4の抑制を確立する。

#### 【0042】

以下の図、配列及び実施例は、単に本発明を例証することを目的とするに過ぎず、実施例中に記載された発明の特定の実施態様に本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。本発明の目的のため、本明細書で引用されている全ての参考文献が、その全体の参照として組み込まれている。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0043】

【図1】図1は、初代マウス肝細胞中のTSC22D4のノックダウンがインスリンシグナル伝達を増強することを示す。コントロール又はTSC22D4 shRNAアデノウイルスで処理された初代(1°)マウス肝細胞の全Akt及びホスホ-Akt (Ser473)抗体を使用したウェスタンブロット(細胞シグナル伝達)。初代マウス肝細胞は、PBS又はインスリンのいずれかとともに10分間培養された。TSC22D4のshRNA媒介性ノックダウンは、Akt-リン酸化の増加を引き起こした。

【図2】図2は、肝臓のTSC22D4のノックダウンが野生型マウス中のインスリンシグナル伝達を増強することを示す。注入7日後のコントロール又はTSC22D4 shRNAアデノウイルス注入メスC57Bl/6マウスからの肝抽出物の全Akt及びホスホ-Akt (Ser473)抗体を使用したウェスタンブロット(細胞シグナル伝達)。器官摘出の20分前に、マウスは、PBS又はインスリンのいずれかを腹腔内に注入された。マウスは、注入の4時間前に絶食させた。TSC22D4のshRNA媒介性ノックダウンは、インスリン刺激後にAkt-リン酸化の増加を引き起こした。

【図3】図3は、肝臓のTSC22D4の欠損が野生型のマウスにおけるインスリンシグナル伝達経路の別個のコンポーネントを制御することを示す。図4と同様の絶食及び再栄養状態におけるコントロール又はTSC22D4 shRNAアデノウイルス注入野生型メスC57Bl/6マウスの肝臓中のA) 転写因子形質転換増殖因子 1-刺激クローン22D4 (TSC22D4)、B) リポカリン13 (Lcn13)、C) 増殖因子受容体結合タンパク質14 (Grb14)、D) サイトカインシグナル抑制因子3 (SOCS3)、E) アデニル酸シクラーゼ1 (ADCY1)の定量PCR解析{平均(means) ± 標準誤差(SEM)、n=7}。統計的検定A~E: スチューデントのt検定。

【図4】図4は、TSC22D4の肝細胞特異的不活性化が、野生型の動物において糖耐性、インスリン感受性を改善し、インスリンレベルを低下させることを示す。低脂肪食(LFD)を餌としたC57Bl/6マウスは、TSC22D4の長期及び肝細胞特異的ノックダウンのためのコントロール又はTSC22D4 miRNAアデノ随伴ウイルスを注入された。A) ウィルス注入8週間後マウスは、kg体重あたり1gのグルコースを腹腔内に注入することによるグルコース負荷試験を行う前に4時間絶食させた。B) ウィルス注入9週間後マウスは、kg体重あたり1Uインスリンを腹腔内に注入することによりインスリン耐性試験を行なう4時間前に絶食させた。TSC22D4のノックダウンは、対照動物と比較して、腹腔内(i.p.)インスリン注射に続いて血糖値レベルの著しい低下を引き起こし(p < .001 TWO-WAY ANOVA RM; Holm-Sidak post hoc検定)、インスリン感受性の改善を示唆している。統計的検定A~B、D: TWO-WAY ANOVA RM; Holm-Sidak post hoc検定。統計的検定C: スチューデントのt検定。

【図5】図5は、低脂肪(LFD)及び高脂肪(HFD)の食事条件の下で、インスリン感受性が長期のTSC22D4ノックダウンにおいて改善されることを示す。図6と同一の動物及び対応する高脂肪食を餌としたコホートにおけるインスリン耐性指数(HOMA)。(平均 ± 標準誤差、n=7)

10

20

30

40

50

【図6】図6は、TSC22D4の肝臓ノックダウンが遺伝学的に糖尿病のマウスにおいてインスリン感受性を改善し、正常化することを示す。11週齢のdb/dbマウス（肥満の遺伝学的マウスモデル）は、コントロール又はTSC22D4 shRNAアデノウイルスを注入された。A) ウィルス注入7日後マウスは、kg体重あたり2Uインスリンを腹腔内に注入することによるインスリン耐性試験を行なう4時間前に絶食させた。TSC22D4のノックダウンは、対照動物と比較して、腹腔内インスリン注射に続いて血糖値レベルの著しい低下を引き起こし（ $p = 0.004$  TWO-WAY ANOVA RM; Holm-Sidak post hoc検定）、インスリン感受性の改善を示唆している。B) ウィルス注入13日後マウスは、kg体重あたり1gのグルコースを腹腔内に注入することによるグルコース負荷試験を行なう4時間前に絶食させた。TSC22D4のノックダウンは、対照動物と比較して、腹腔内グルコース注射への代謝反応の改善を引き起こし（ $p < 0.001$ ; TWO-WAY ANOVA RM; Holm-Sidak post hoc検定）、インスリン感受性の改善を示唆している。C) マウスは、絶食（18時間）、再栄養（18時間の絶食に続く6時間の再給餌）、又はランダムな食事状態において、屠殺された。絶食、再栄養、又はランダムな給餌条件の下の血糖レベル（mg/dl）（平均±標準誤差、 $n=4$ ）。D) db/dbマウスの毎日の水分摂取量（グラム）（平均±標準誤差、 $n=12$ ）。統計的検定A~B: TWO-WAY ANOVA RM; Holm-Sidak post hoc検定。統計的検定C~D: スチューデントのt検定。

【図7】図7は、TSC22D4ノックダウンについてdb/dbマウス中の身体構成マーカー（body composition markers）を示す。11週齢のdb/dbマウス（図8と同一の動物）は、コントロール又はTSC22D4 shRNAアデノウイルスを注入された。マウスは、絶食（18時間）、再栄養（18時間の絶食に続く6時間の再給餌）、又はランダムな食事状態において、屠殺された。A) グラム体重（平均±標準誤差、 $n=4$ ）。B) グラム肝臓重量（平均±標準誤差、 $n=4$ ）。C) 血清アラニン-アミノ基転移酵素レベル（ALT; 平均±標準誤差、 $n=4$ ）。D) 肝臓グリコーゲンレベル（グラム肝臓組織あたりのmgグリコーゲン; 平均±標準誤差、 $n=4$ ）。E) 肝臓トリグリセリド（TAG）レベル（グラム肝臓組織あたりのmgトリグリセリド; 平均±標準誤差、 $n=4$ ）。F) 血清トリグリセリドレベル（mL血清あたりのmgトリグリセリド; 平均±標準誤差、 $n=4$ ）。統計的検定A~F: スチューデントのt検定。

【図8】図8は、肝臓のTSC22D4欠乏が糖尿病のdb/dbマウスにおける炎症マーカー発現を改善することを示す。11週齢のdb/dbマウス（図8と同一の動物）は、コントロール又はTSC22D4 shRNAアデノウイルスを注入された。マウスは、絶食（18時間）、再栄養（18時間の絶食に続く6時間の再給餌）、又はランダムな食事状態において、屠殺された。A) pg/mL血清インスリンレベル（平均±標準誤差、 $n=4$ ）。B) pg/mL血清Cペプチドレベル（平均±標準誤差、 $n=4$ ）。C) pg/mL血清インターロイキン6レベル（平均±標準誤差、 $n=4$ ）。D) pg/mL血清レプチンレベル（平均±標準誤差、 $n=4$ ）。E) pg/mL血清レジスチンレベル（平均±標準誤差、 $n=4$ ）。F) pg/mL血清TNF レベル（平均±標準誤差、 $n=4$ ）。統計的検定A~F: スチューデントのt検定。

【図9】図9は、糖尿病の動物におけるTSC22D4の肝臓ノックダウンがインスリン増感遺伝子を上方調節することを示す。ランダム、絶食（18時間）及び再栄養状態（18時間の絶食及びそれに続く6時間の再給餌）におけるコントロール又はTSC22D4 shRNAアデノウイルス注入db/db糖尿病マウス（図8と同一の動物）の肝臓中のA) 転写因子形質転換増殖因子1-刺激クローン22D4（TSC22D4）、B) リポカリン13（Lcn13）、C) 増殖因子受容体結合タンパク質14（Grb14）、D) サイトカインシグナル抑制因子3（SOCS3）、E) アデニル酸シクラーゼ1（ADCY1）の定量PCR解析（平均±標準誤差、 $n=7$ ）。統計的検定A~D: スチューデントのt検定。

【図10】図10は、TSC22D4の欠損が糖尿病の肝臓中のインスリンシグナル伝達を増強することを示す。コントロール又はTSC22D4 shRNAアデノウイルスを注入された、11週齢のdb/dbマウス（図8と同一の動物）からの肝臓抽出物のウェスタンブロット。注入7日後肝臓可溶化液は、全Akt及びホスホ-Akt（Ser473）抗体に対してプロットされた（細胞シグナル伝達）。マウスは、絶食（18時間）又は再栄養（18時間の絶食に続く6時間の再給餌）状態において、屠殺された。TSC22D4のshRNA媒介性ノックダウンは、絶食及び再栄養条件の両方の下のAkt-リン酸化の増加を引き起こした。

10

20

30

40

50

【図11】図11は、TSC22D4の肝細胞特異的不活性化が糖尿病易発性マウスにおける高血糖症を予防することを示す。db/dbマウスは、明白な高血糖症の発病前5週齢（グラフ中の0週を表している）にTSC22D4 miRNAを発現するAAVを注入された。グルコース（mg/dL）は、ウイルス注入時及びウイルス注入後2及び4週間に測定された。グルコース測定前マウスは、4時間絶食させた。（平均±標準誤差、n=7）。

【図12】図12は、TSC22D4がヒトにおいてLCN13内分泌系を介して作用し、インスリン感受性に関連することを示す。(a) 野生型マウスの肝臓中のTSC22D4に対する抗体によるLCN13プロモーター領域（1~3）のクロマチン免疫沈降。qPCRにより決定されたネガティブコントロールIgGと比較したフォールドエンリッチメント（fold enrichment）。領域4は、ネガティブなPCRコントロールを表す（n=2~3）。同様の結果は、異なるTSC22D4抗体の使用により得られた。(b) コントロール又はTSC22D4 shRNAアデノウイルス注入野生型C57Bl/6（左）、db/db（中央）及びNZOマウス（右）の肝臓中LCN13の定量PCR解析（各実験について平均±標準誤差、n=6）。(c) 注入7日後のコントロール（NC shRNA）又はTSC22D4（D4 shRNA）shRNAアデノウイルス注入C57Bl/6マウスからの血清は、LCN13抗体で免疫沈殿され、LCN13抗体で免疫プロットされた。アルブミン抗体は、ローディングコントロールとして使用された。(d) 全Akt（t-Akt）、ホスホ-Akt（p-Akt）（Ser473）、及びVCP抗体を使用した、コントロール（Ctrl）（PBS）又はLCN13（200 nM）処理C2C12筋細胞抽出物からの代表的なウェスタンプロット。それぞれ示されたLCN13（3時間）及び15分間（30 nM）のインスリン（Ins）処理。示された濃度測定解析。\*、インスリンの効果を示す；#、LCN13の効果を示す。(e) 注入1週間後のコントロール（コントロールshRNA）、LCN13（LCN13 shRNA）、TSC22D4（TSC22D4 shRNA）、LCN13を加えたTSC22D4（TSC22D4+LCN13 shRNA）shRNAアデノウイルス注入db/dbマウスにおける糖耐性試験。グルコースは、kg体重あたり1 gグルコースの濃度で腹腔内注射された。\*は、NCとTSC22D4群間の有意性を示す；#は、TSC22D4とTSC22D4+LCN13群間の有意性を示す；\$は、NCとTSC22D4+LCN13群間の有意性を示す。(f) (e)と同一のマウス中のHOMA IR指数。(g) (e)と同一のマウス中の血清グルコースレベル。(h) タイプ2糖尿病の患者（T2D、n=26）又は正常な糖耐性（NGT、n=40）の肝臓中のTSC22D4 mRNA発現の定量PCR解析。(i) (h)と同一の患者におけるTSC22D4 mRNAの肝臓発現及び空腹時血糖値の相関性。(j) (h)と同一の患者における高インスリン正常血糖クランプ法（hyperinsulemic-euglycemic clamp study）の間のTSC22D4 mRNAのヒトの肝臓発現及びグルコース注入速度（GIR）の相関性。a、b、d~h：スチューデントのt-検定、i、j：ピアソン相関係数についての統計的解析、\*：p 0.05；\*\*：p 0.01；\*\*\*：p 0.001。

【図13】図13は、(a) タイプ2糖尿病の患者（n=26）又は正常な糖耐性（n=40）におけるLCN13（Obp2a）のヒト肝臓発現及びTSC22D4 mRNAレベルの相関性を示す。(b) タイプ2糖尿病の患者（T2D、n=26）又は正常な糖耐性（NGT、n=40）の肝臓中のLCN13（Obp2a）mRNA発現の定量PCR解析。(c) (a)と同一の患者における高インスリン正常血糖クランプ法の間のLCN13（Obp2a）mRNAのヒトの肝臓発現及びグルコース注入速度（GIR）の相関性。(d) (a)と同一の患者におけるLCN13（Obp2a）mRNAの肝臓発現及び空腹時血糖値の相関性。a、c、d：ピアソン相関係数、b：スチューデントのt-検定についての統計的解析、\*：p 0.05；\*\*：p 0.01；\*\*\*：p 0.001。

#### 【0044】

配列番号1~4は、本発明の実験において使用されたオリゴヌクレオチドを示す。

#### 【実施例】

#### 【0045】

#### 組換えウイルス

U6プロモーターの制御下でTSC22D4又は非特異的shRNA、又はCMVプロモーターの制御下でTSC22D4 cDNAを発現しているアデノウイルスは、BLOCK-iT Adenoviral RNAi expression system（Invitrogen社、カールスルーエ、ドイツ）を使用してクローニングされた。以前記載した通り、ウイルスは、動物注入の前に塩化セシウム法により精製され、10%グリセロール含有リン酸塩緩衝生理食塩水バッファーに対して透析された（Herzig S, Hedric

10

20

30

40

50

k S, Morantte I, Koo SH, Galimi F, Montminy M. CREB controls hepatic lipid metabolism through nuclear hormone receptor PPAR-gamma. *Nature*. 2003; 426: 190-193. Herzog S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, Rudolph D, Yoon C, Puigserver P, Spiegelman B, et al. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature*. 2001; 413: 179-183)。肝細胞特異的プロモーターの制御下でコントロール又はTSC22D4特異的miRNAをコードするAAVは、以前記載された通りに樹立された (Rose AJ, Frosig C, Kiens B, Wojtaszewski JF, Richter EA. Effect of endurance exercise training on Ca<sup>2+</sup> calmodulin-dependent protein kinase II expression and signaling in skeletal muscle of humans. *J Physiol*. 2007; 583: 785-795)。

【0046】

#### 動物実験

オスの8~12週齢C57Bl/6及び10週齢db/dbマウスは、Charles River Laboratories社 (ブリュッセル、ベルギー) から得られ、通常の無制限の食事で12時間の明暗周期で維持された。インスリン及びグルコース負荷試験の前に、動物は、4時間絶食された。別の方法では、動物は自由に餌を与えられ、水まで自由にアクセスできた。アデノウイルス注入については、組換えウイルスあたり1~2 × 10<sup>9</sup> プラーク形成単位 (pfu) が尾静脈注射により投与された。AAV実験については、5 × 10<sup>11</sup> ウィルスが尾静脈を介して注入された。各実験では、6~12匹の動物が同一の処理を受けて、示された通りに絶食 (18時間の絶食)、ランダムな給餌又は再栄養 (18時間の絶食に続く6時間の再給餌) 条件の下で解析された。肝臓、精巢上体及び腹部脂肪体、及び腓腹筋を含む器官は、特定時間後に採取され、計量され、瞬間凍結され、更なる解析に使用された。全体脂肪量 (Total body fat content) は、Echo MRI body composition analyzer (Echo Medical Systems社、ヒューストン、アメリカ) により決定された。動物取扱い及び実験は、NIHガイドラインに従って行われ、地方自治体により承認された。

【0047】

インスリン耐性試験のために、1Uインスリン/mLの保存溶液は、0.9%塩化ナトリウムを使用して調製された。マウスは、実験前に4時間絶食された。全ての動物の体重が決定され、血糖レベルは、カミソリ刃で尾を切るにより測定された。血液滴 (blood drop) は、血糖計ストリップ (glucometer strip) 上に載せて測定された。1 Uインスリン/kg体重は、C57Bl/6に注入され、1.5Uインスリン/kg体重は、db/dbマウスに腹腔内注射された。血糖レベルは、20、40、60、80及び120分後にモニターされた。

【0048】

グルコース負荷試験のために、20%グルコースの保存溶液は、0.9%塩化ナトリウムを使用して調製された。マウスは、実験の4時間前に絶食された。全ての動物の体重が決定され、血糖レベルは、カミソリ刃で尾を切るにより測定された。血液滴は、血糖計ストリップ上に載せて測定された。グラムあたり5 µLの20%のグルコース溶液は、C57Bl/6及びdb/dbマウスに腹腔内注射された。血糖レベルは、20、40、60、80及び120分後にモニターされた。

【0049】

#### ヒト被験者

本発明者らは、ルーワイバイパス手術 (Roux en Y bypass)、スリーブ状胃切除術、選択的胆嚢摘出術 (elective cholecystectomy) 又は試験開腹のための開腹外科手術 (open abdominal surgery) を受けたことを特徴とする66人の広範囲にわたる白色人種の肥満及び痩身の男性及び女性から得た肝臓組織サンプル中のTSC22D4 mRNA発現を調査した。経口グルコース負荷試験で、本発明者らは、各個人をタイプ2糖尿病 (n=26) 又は正常な糖耐性 (n=40) と同定した。インスリン感受性は、記載の通り、正常血糖高インスリンクランプ法 (euglycemic-hyperinsulinemic clamp method) を使用して評価された。全ての基線血液サンプルは、一晚絶食後の午前8時から10時の間に採取された。全ての研究プロトコルは、ライプツィヒ大学 (363-10-13122010及び017-12-230112) の倫理委員会により承認された。全ての参加者は、研究に参加する前に、書面のインフォームドコンセントを提出

10

20

30

40

50

した。

【 0 0 5 0 】

血液代謝物質

グルコース及びトリグリセリド (TG) の血清レベルは、自動グルコース計測器 (One Touch、Lifescan社、ネッカーゲミュント、ドイツ) 又は商用キット (それぞれ、Sigma社、ミュンヘン、ドイツ; RANDOX社、クラムリン、北アイルランド; WAKO社、ノイス、ドイツ) を使用して決定された。インスリンレベルは、mouse insulin enzyme-linked immunosorbent assay (Mercodia社、ウプサラ、スウェーデン) を使用して決定された。

【 0 0 5 1 】

組織脂質抽出

肝臓の脂質は、以前記載された通りに抽出された (Herzig S, Hedrick S, Morante I, Koo SH, Galimi F, Montminy M. CREB controls hepatic lipid metabolism through nuclear hormone receptor PPAR-gamma. Nature. 2003; 426: 190-193)。

【 0 0 5 2 】

組織化学

肝臓組織は、Tissue Tek optimal cutting temperature compound中で包埋された (Sakura社、トーランス、アメリカ)。5 μmの凍結切片は、記載の通り、ヘマトキシリン及びエオシン又はオイルレッドOで染色された (Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, Mangelsdorf DJ (1998) Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. Cell 93: 693- 704)。

【 0 0 5 3 】

定量Taqman RT-PCR

全RNAは、Qiazol reagent (Qiagen社、ヒルデン、ドイツ) を使用して、ホモジナイズされたマウス肝臓又は細胞溶解物から抽出された。cDNAは、M-MuLV酵素及びオリゴdTプライマー (Fermentas社、ザンクト・レオン＝ロート、ドイツ) を使用した逆転写により調製された。cDNAsは、assay-on-demandキット及びABI PRISM 7700 Sequence detector (Applied Biosystems社、ダルムシュタット、ドイツ) を使用して増幅された。RNA発現データは、TATAボックス結合タンパク質 (TBP) RNAのレベルに標準化された。

【 0 0 5 4 】

ヒトのTSC22D4 mRNA発現は、TaqMan assayを用いた蛍光温度サイクラー (fluorescent temperature cycler) における定量リアルタイムRT-PCRにより測定され、蛍光は、ABI PRISM 7000 sequence detector (Applied Biosystems社、ダルムシュタット、ドイツ) 上で検出された。全RNAは、TRIzol (Life technologies社、グランドアイランド、ニューヨーク州) を使用して単離され、1 μg RNAは、標準試薬 (standard reagents) (Life technologies社、グランドアイランド、ニューヨーク州) で逆転写された。各RT-PCRから、2 μlがメーカーの説明に従い、stratagene社 (ラホヤ、カリフォルニア州) のBrilliant SYBR green QPCR Core reagent kitを用いた26 μl のPCR反応において増幅された。サンプルは、95 °C、10分での最初の変性のためにABI PRISM 7000 sequence detector中で培養され、続いて、各サイクル95 °C 15 秒、60 °C 1分、及び72 °C 1分からなる、40PCRサイクルが行われた。ヒトTSC22D4及びObp2a (LCN13) (それぞれHs00229526\_m1及びHs01062934\_g1により決定された) (Applied Biosystems社、ダルムシュタット、ドイツ) mRNA発現は、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT1) のmRNA発現に対して計算され、HPRT1 (Hs01003267\_m1) (Applied Biosystems社、ダルムシュタット、ドイツ) についてオンデマンドな予混合解析 (premixed assay) により決定された。特異的な転写産物の増幅は、各PCRの終了時の融解曲線プロファイル (蛍光の測定と同時のサンプルの68 °Cまでの冷却及び95 °Cまでの緩やかな加熱) により確認された。PCRの特異性は、増幅産物をアガロースゲル電気泳動に供することにより更に確認された。

【 0 0 5 5 】

タンパク質解析

タンパク質は、細胞溶解バッファー中の凍結器官サンプル又は培養肝細胞から抽出され (Rose AJ, Frosig C, Kiens B, Wojtaszewski JF, Richter EA. Effect of endurance exercise training on Ca<sup>2+</sup> calmodulin-dependent protein kinase II expression and signaling in skeletal muscle of humans. *J Physiol.* 2007; 583: 785-795)、20 µgのタンパク質は、4~12%のSDSポリアクリルアミドゲルにロードされ、ニトロセルロース膜上にプロットされた。ウェスタンプロット解析は、TSC22D4 (Abcam社、ケンブリッジ、イギリス又はシグマ社、ミュンヘン、ドイツ)、AKT、p-AKT、GSK、p-GSK (Cell signaling社、ダンヴァーズ、アメリカ) 又はVCP (Abcam社) に特異的な抗体を使用して、記載の通りに (Herzig et al, 2001) 実施された。

【0056】

プラスミド及びRNA干渉

shRNA実験のために、マウスTSC22D4 (GCCTGGTTGGCATTGACAACACGAATG; 配列番号1) をターゲットとするオリゴヌクレオチドは、アニールされ、pENTR/U6 shRNAベクター (Invitrogen社) にクローニングされた。いかなる哺乳類遺伝子配列にも有意な相同性を有さない非特異的オリゴヌクレオチド (5'-GATCTGATCGACACTGTAATG-3' 配列番号2) は、全ての実験において非サイレンシング (non-silencing) コントロールとして使用された。miRNA実験のために、マウスTSC22D4 (5'-GACAGCGATGACGATAGTGGT-3' 配列番号3) をターゲットとするオリゴヌクレオチド及び非特異的オリゴヌクレオチド (5'-AAATGTACTGCGCGTGGAGAC-3' 配列番号4) は、pdsAAV-LP1ベクターにクローニングされた。

【0057】

細胞培養と一過性導入解析

初代マウス肝細胞は、記載の通りに (Klingmuller U, Bauer A, Bohl S, Nickel PJ, Breitung K, Dooley S, Zellmer S, Kern C, Merfort I, Sparna T, et al. Primary mouse hepatocytes for systems biology approaches: a standardized in vitro system for modelling of signal transduction pathways. *IEE Proc Syst Biol.* 2006; 153: 433-447) 単離され、培養された。簡潔に述べると、オスの8~12週齢のC57Bl/6マウスは、100 mg/kg体重の塩酸ケタミン及び5 mg/kg体重の塩酸キシラジンの腹腔内注射により麻酔をかけられた。腹腔を開いた後に、肝臓は、門脈を介して5分間HANKS I (pH 7.4に調整された1 L蒸留H<sub>2</sub>O、2.5 mM EGTA、0.1%グルコース中、8 g NaCl、0.4 g KCl、3.57 g Hepes、0.06 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O、0.06 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) で37 °Cで灌流され、続いて5~7分間HANKS II (pH 7.4に調整された1 L蒸留H<sub>2</sub>O、0.1%グルコース、3 mg/mLのコラゲナーゼCLSII、5 mM CaCl<sub>2</sub>中、8 g NaCl、0.4 g KCl、3.57 g Hepes、0.06 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O、0.06 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) で、肝臓構造の崩壊が観察されるまで灌流された。肝臓カプセル (liver capsule) は除去され、細胞浮遊液は、100 µmメッシュを通して濾過された。細胞は洗浄され、続いて、細胞の生存率は、トリパンブルー染色により決定された。1,000,000生存細胞/ウェルがコラーゲンIコーティングされた6ウェルプレート上に播種された。24時間後、細胞は、100の感染の多様性 (multiplicity of infection) で組換えアデノウイルスに感染させられた。刺激実験のために、初代肝細胞は、10分間100 nM/6ウェルの濃度でPBS {コントロール溶媒 (control medium) } 又はインスリンで処理された。細胞は、感染48時間後に回収された。

【0058】

肝臓のTSC22D4のシストローム解析

Chipシーケンシング (Chip-Sequencing) 結果のKEGG-Pathway解析は、有意性によりソートされた。インスリンシグナル伝達経路は、有意に制御されると分かった (p=0.00005)。Chipシーケンシングは、Flag-TSC22D4 cDNAアデノウイルスを注入されたオスC57Bl/6マウスからの肝臓抽出物中で注入7日後に行われた。

【0059】

ヒト設定 (human setting) における結果の関連性を試験するために、本発明者らは、正常な糖耐性 (NGT) 又はタイプ2糖尿病 (T2D) の66人の患者のコホートを解析した。TSC22D4 mRNAは、NGT (図12h) と比較して、T2D患者の肝臓中で有意に上昇した。マウスにお

10

20

30

40

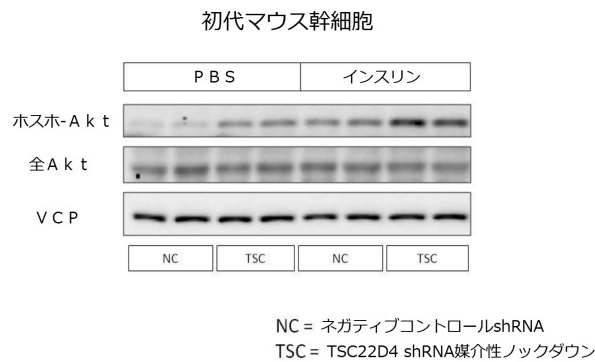
50

けるTSC22D4のインスリン増感及び血糖調節機能と一致して、肝臓のTSC22D4 mRNAレベルは、このヒトコホート全体で空腹時血糖レベル（図12i）及びインスリン感受性と有意に相関し、後者は、高インスリン-正常血糖クランプの間のグルコース注入速度（GIR）により決定された（図12j）。TSC22D4 mRNAレベルは、TG及び炎症性サイトカインレベルの循環と正の相関関係を有し、その結果、動物モデルの結果を更に支持している。重要なことに、患者コホート中のLCN13発現研究は、TSC22D4とLCN13の mRNAレベル間で高度に有意な相関性を明らかにし、非糖尿病の被験者と比較して、糖尿病患者におけるLCN13の全体的な、より低い発現を実証した。更に、肝臓のLCN13 mRNAレベルは、ヒトにおけるGIR及び空腹時血糖レベルと相関し、動物モデルにおけるTSC22D4-LCN13-インスリン増感リンクを全体的に再現している。

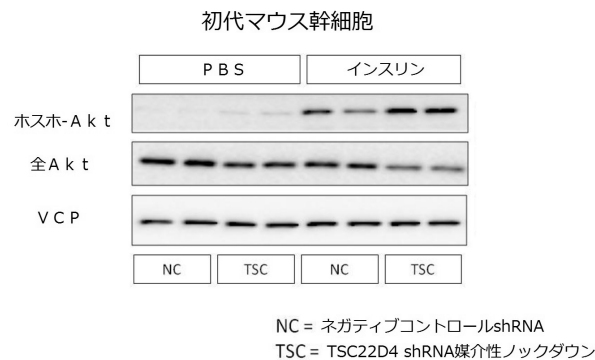
【 0 0 6 0 】

まとめると、データは、全身のグルコース代謝及びインスリン感受性における重要なノードとしてTSC22D4を確立する。LCN13内分泌系のためのその上流制御機能及びその後のインスリン感受性及びグルコース貯蔵の多臓器の増強を考慮すると、TSC22D4抑制が予防的及び治療的タイプ2糖尿病治療及びインスリン増感における魅力的な代替モード（alternative mode）を意味することは、明白である。

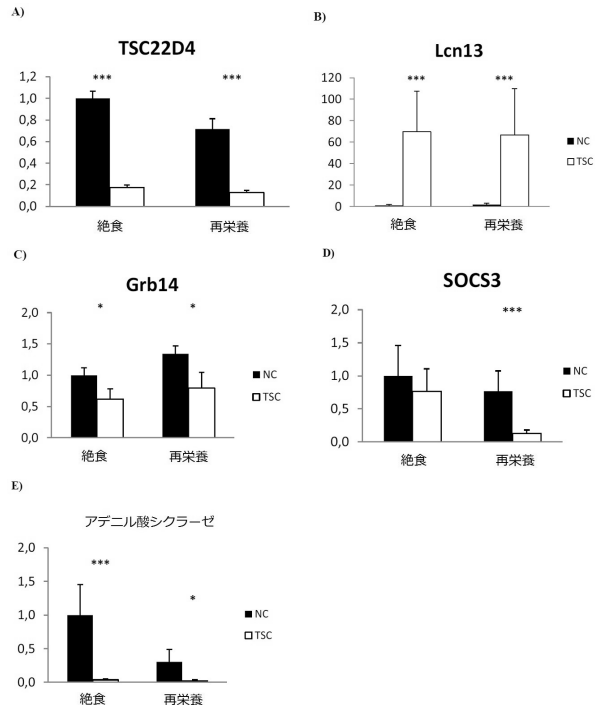
【 図 1 】



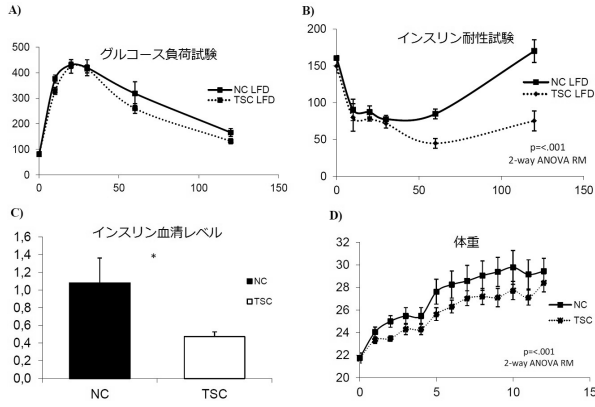
【 図 2 】



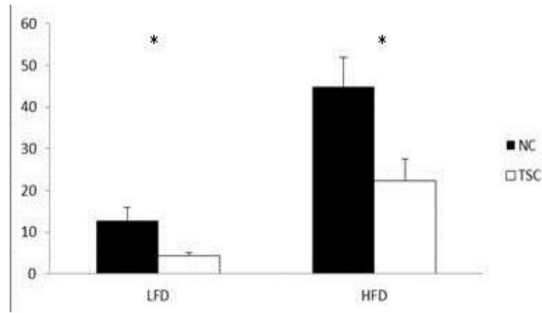
【 図 3 】



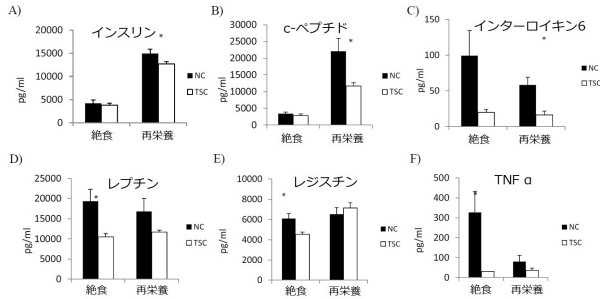
【図4】



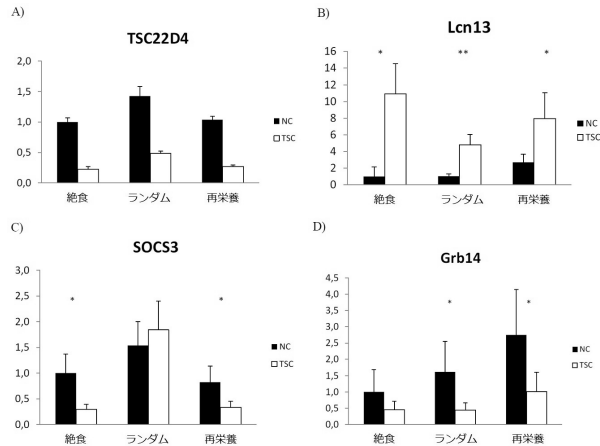
【図5】



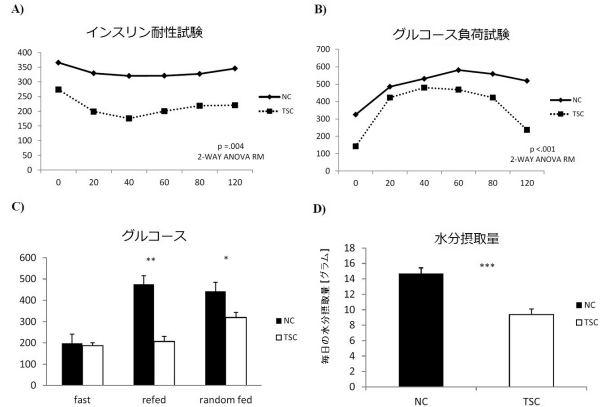
【図8】



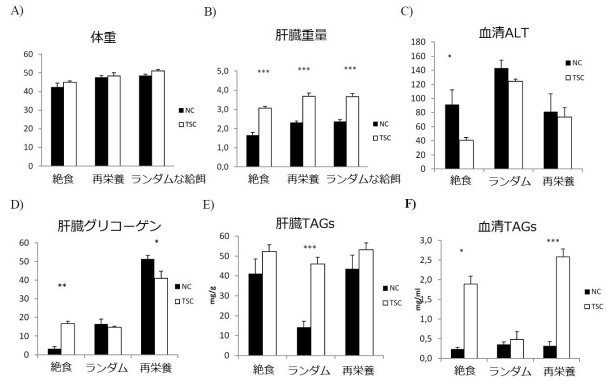
【図9】



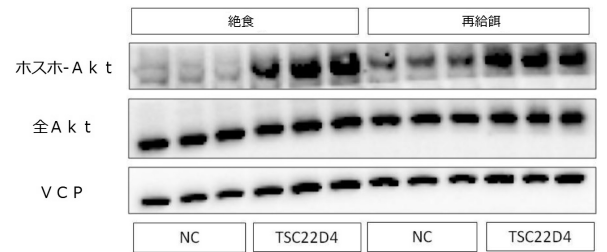
【図6】



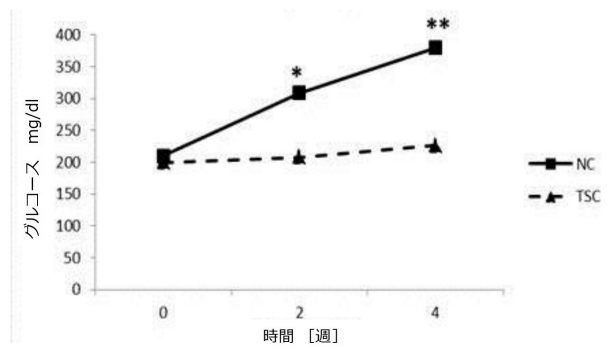
【図7】



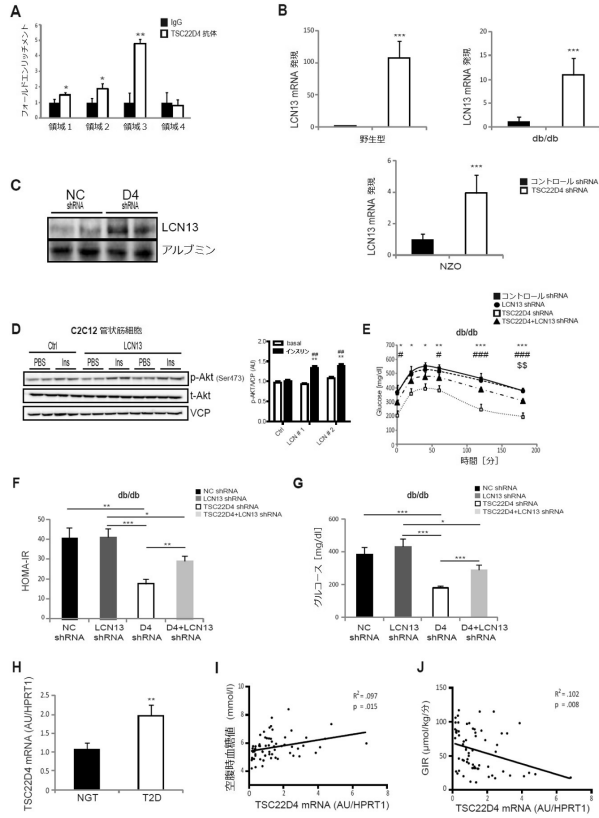
【図10】



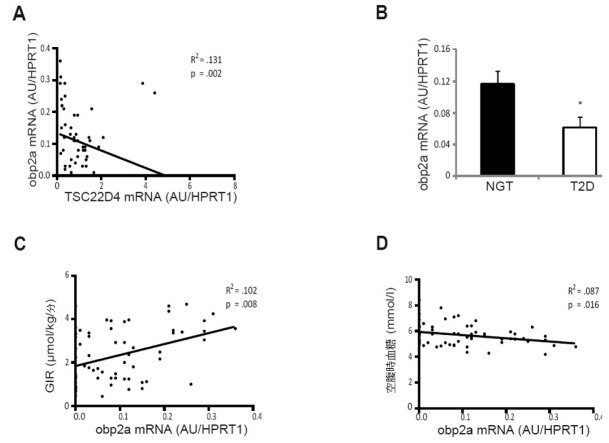
【図11】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 配列表 】

0006479780000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 3/00	(2006.01)	A 6 1 P 3/00	
G 0 1 N 33/15	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
G 0 1 N 33/50	(2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/66	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
C 1 2 Q 1/68	(2018.01)	G 0 1 N 33/66	A
C 1 2 N 15/00	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68	Z N A
C 1 2 Q 1/54	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	
		C 1 2 Q 1/54	

(74)代理人 100124453

弁理士 資延 由利子

(74)代理人 100135208

弁理士 大杉 卓也

(74)代理人 100152319

弁理士 曾我 亜紀

(72)発明者 ベリエル ディアス, マウリシオ

ドイツ, 6 9 2 2 1 ドッセンハイム, ハーゼンハイン 1 6

(72)発明者 ヘルツィヒ, シュテファン

ドイツ, 6 9 2 5 1 ガイスベルク, イン デン クラウテッカーン 5

(72)発明者 フリードリヒ, キリアン

ドイツ, 6 9 1 1 7 ハイデルベルク, ハウプトシュトラッセ 5 5 / 4

(72)発明者 ヨネス, アラン

ドイツ, 6 9 1 1 5 ハイデルベルク, リングシュトラッセ 2 9

審査官 大瀧 真理

(56)参考文献 国際公開第2013/076501(WO, A2)

国際公開第2005/059564(WO, A1)

国際公開第2012/158123(WO, A1)

Allan Jones et al., TSC22D4 is a molecular output of hepatic wasting metabolism, EMBO molecular medicine, 2013年, vol.5, no.2, p.294-308

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 0 0 - 3 3 / 9 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

专利名称(译)	转录因子TSC22D4抑制剂治疗胰岛素抵抗		
公开(公告)号	<a href="#">JP6479780B2</a>	公开(公告)日	2019-03-06
申请号	JP2016520450	申请日	2014-06-17
[标]申请(专利权)人(译)	德意志刮扫描文件夹中顺集团曾托穆什TIFF到ING死亡边缘芬之旅帕滕基乐同性恋帮助直接卡尔的海胆钟乳木果达海德堡		
申请(专利权)人(译)	德意志给扫描文件夹中顺集团曾托时间什鲁斯伯里TIFF到ING死亡边缘芬之旅帕滕基Rehitsu Rupurekuto - Karuzu - Uniberushitatto海德堡		
当前申请(专利权)人(译)	德意志给扫描文件夹中顺集团曾托时间什鲁斯伯里TIFF到ING死亡边缘芬之旅帕滕基Rehitsu Rupurekuto - Karuzu - Uniberushitatto海德堡		
[标]发明人	ベリエルディアスマウリシオ ヘルツイヒシュテファン フリードリヒキリアン ヨネスアラン		
发明人	ベリエル ディアス,マウリシオ ヘルツイヒ,シュテファン フリードリヒ,キリアン ヨネス,アラン		
IPC分类号	G01N33/566 A61K45/00 A61K48/00 A61K31/7088 A61P43/00 A61P35/00 A61P3/10 A61P3/00 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/66 C12Q1/68 C12N15/00 C12Q1/54		
CPC分类号	A61P3/00 G01N33/5008 G01N33/6893 G01N2333/4703 G01N2800/042 C12N15/113 C12N2310/14 C12N2310/141 C12N2310/531 C12N2320/30 C12Q1/6883 C12Q2600/136 C12Q2600/158 G01N33 /6872 G01N2500/04 G01N2500/10		
FI分类号	G01N33/566 A61K45/00 A61K48/00 A61K31/7088 A61P43/00.111 A61P35/00 A61P3/10 A61P3/00 A61P43/00.105 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/66.A C12Q1/68.ZNA C12N15/00 C12Q1/54		
代理人(译)	庄司隆 Shinobe百合子		
优先权	2013172362 2013-06-17 EP		
其他公开文献	JP2016532098A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及TSC22D4活性或表达的调节剂，特别是抑制剂，以及用于预防，治疗和/或控制哺乳动物的胰岛素抗性，代谢综合征和/或糖尿病和/或用于改善胰岛素敏感性的调节剂。他们的用途。本发明进一步涉及试剂盒，其包含用于实施本发明方法的材料，以及用于鉴定这些调节剂的筛选方法，在这些疾病的诊断中鉴定的调节剂的用途。【选择图】无

(45) 発行日 平成31年3月6日 (2019.3.6)

(24) 登録日 平成31年2月15日 (2019.2.15)

(51) Int. Cl.

F I

<b>GO 1 N</b>	<b>33/566</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N	33/566
<b>A 6 1 K</b>	<b>45/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K	45/00
<b>A 6 1 K</b>	<b>48/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K	48/00
<b>A 6 1 K</b>	<b>31/7088</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K	31/7088
<b>A 6 1 P</b>	<b>43/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	43/00

1 1 1

請求項の数 7 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-520450 (P2016-520450)

(86) (22) 出願日 平成26年6月17日 (2014.6.17)

(65) 公表番号 特表2016-532098 (P2016-532098A)

(43) 公表日 平成28年10月13日 (2016.10.13)

(86) 国際出願番号 PCT/EP2014/062713

(87) 国際公開番号 W02014/202602

(87) 国際公開日 平成26年12月24日 (2014.12.24)

審査請求日 平成28年4月6日 (2017.4.6)

(31) 優先権主張番号 13172362.9

(32) 優先日 平成25年6月17日 (2013.6.17)

(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 500431380  
 ドイチェス クレープスフォルシュングス  
 ツェントルム シュティフトゥング デス  
 エッフェントリッヒェン レヒツ  
 ドイツ国 D-69120 ハイデルベル  
 グ、イム ノイハイマー フェルト 28  
 O

(73) 特許権者 514009627  
 ルプレクトーカールズーウニベルシタット  
 ハイデルベルク  
 ドイツ連邦共和国 69117 ハイデル  
 ベルク、グラベンガッセ 1

(74) 代理人 100088904  
 弁理士 庄司 隆

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 転写因子 T S C 2 2 D 4 の阻害剤によるインスリン耐性の治療