

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5299900号  
(P5299900)

(45) 発行日 平成25年9月25日(2013.9.25)

(24) 登録日 平成25年6月28日(2013.6.28)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/68</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A
<b>G O 1 N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 Z N A D
<b>A 6 1 K</b>	<b>38/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02
<b>A 6 1 K</b>	<b>39/395</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 D
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 11 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2008-526853 (P2008-526853)
(86) (22) 出願日	平成19年7月27日 (2007.7.27)
(86) 国際出願番号	PCT/JP2007/065221
(87) 国際公開番号	W02008/013324
(87) 国際公開日	平成20年1月31日 (2008.1.31)
審査請求日	平成22年7月20日 (2010.7.20)
(31) 優先権主張番号	特願2006-206747 (P2006-206747)
(32) 優先日	平成18年7月28日 (2006.7.28)
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)

(73) 特許権者	504160781 国立大学法人金沢大学 石川県金沢市角間町ヌ7番地
(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫
(72) 発明者	金子 周一 石川県金沢市角間町ヌ7番地 国立大学法人金沢大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖尿病関連肝臓由来分泌タンパク質の2型糖尿病または血管障害の診断または治療への利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

セレノプロテインPを測定することを含む、2型糖尿病の検出方法。

【請求項2】

セレノプロテインPを測定することを含む、2型糖尿病に罹患するリスクを評価する方法。

【請求項3】

セレノプロテインPを測定することを含む、被験体のインスリン抵抗性または血糖コントロールを評価する方法。

【請求項4】

セレノプロテインPを測定することを含む、2型糖尿病患者におけるインスリン抵抗性を評価する方法。

【請求項5】

セレノプロテインPを測定することを含む、耐糖能正常者における2型糖尿病発症のリスクを評価する方法。

【請求項6】

セレノプロテインPからなる、2型糖尿病検出用マーカー。

【請求項7】

セレノプロテインPからなる、2型糖尿病の罹患リスク評価用マーカー。

【請求項8】

10

20

セレノプロテインPからなる、インスリン抵抗性または血糖コントロール評価用マーカー。

【請求項 9】

セレノプロテインPの、2型糖尿病検出用マーカーとしての使用。

【請求項 10】

セレノプロテインPの、2型糖尿病の罹患リスク評価用マーカーとしての使用。

【請求項 11】

セレノプロテインPの、インスリン抵抗性または血糖コントロール評価用マーカーとしての使用。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、セレノプロテインPの2型糖尿病または血管障害の診断、治療への利用に関する。

【背景技術】

【0002】

世界規模で増加し続ける2型糖尿病は、網膜・腎・神経の合併症や虚血性心疾患などの動脈硬化性疾患を促進することで人類のQOLと生命を脅かしており、その新たな治療法の開発は急務である。肝臓は糖・脂質代謝の主役を担うだけでなく、血管新生因子をはじめとする各種生理活性物質の生体内最大の産生臓器であることから、2型糖尿病の病態を形作る未知の分泌蛋白を多数産生している可能性がある。2型糖尿病では、インスリンによる肝臓からの糖放出抑制作用は減弱しており、この現象はインスリン抵抗性と呼ばれる(非特許文献1および2を参照)。インスリン抵抗性は肝臓からの糖放出亢進による高血糖と、脂質の産生亢進による高脂血症をもたらし、ともに動脈硬化性疾患を促進する。さらに肝臓は動脈硬化のリスクにつながる血管新生因子をはじめとする各種生理活性物質の生体内最大の産生臓器である。

20

【非特許文献1】Michael MD, et al., Mol. Cell 6: 87-97, 2000

【非特許文献2】Saltiel AR, et al., Nature 414: 799-806, 2001

30

【発明の開示】

【0003】

本発明は、糖尿病関連肝臓由来分泌タンパク質であるセレノプロテインP (Selenoprotein P) を利用して2型糖尿病や心筋梗塞、脳梗塞、閉塞性動脈硬化症などの動脈硬化性疾患等の血管障害を検出する方法および2型糖尿病や動脈硬化性疾患等の血管障害に罹患するリスクを評価する方法、ならびにセレノプロテインPからなる糖尿病や動脈硬化性疾患等の血管障害を検出するためのマーカーおよび2型糖尿病や動脈硬化性疾患等の血管障害に罹患するリスクを評価するためのマーカーの提供を目的とする。

さらに、本発明はセレノプロテインPを用いた2型糖尿病や動脈硬化性疾患等の血管障害を予防または治療する医薬のスクリーニング方法、セレノプロテインPを有効成分として含む血管障害の予防または治療薬の提供を目的とする。

40

本発明者らは、100例を超える糖尿病・代謝症候群患者の肝生検サンプルを前向きに蓄積し、DNAチップおよびSAGE法を用いて60万遺伝子を超える肝発現遺伝子を包括的に解析してきた。これらの肝発現遺伝子情報から、血糖コントロール、BMI、インスリン抵抗性等の患者の臨床指標と肝遺伝子発現が相関する62種の分泌蛋白群を同定した(御簾・篁・金子ら、糖尿病の病態と関連して発現変動する遺伝子群、日本国特許出願2005-125689号)。

本発明者らは、糖尿病関連肝臓由来分泌タンパク質についてさらに鋭意検討を行った。

本発明者らは、2型糖尿病患者の肝臓での包括的遺伝子発現プロファイルから、インスリン抵抗性と糖負荷後2時間血糖値に肝遺伝子発現が相関する分泌タンパクとしてセレノ

50

プロテイン P を同定し、その機能解析を行った。その結果、マウスへのセレノプロテイン P 投与が全身でのインスリン抵抗性を誘導し糖負荷後の高血糖を惹起することを見出し、その機序として、肝細胞でのインスリンシグナルを減弱させ肝細胞からの糖放出を増加させることを明らかにした。加えて、マウス胎仔器官培養を用いた検討から、セレノプロテイン P は血管内皮細胞の増殖を抑制し、血管壁細胞の増殖を強力に誘導することを明らかにした。以上の結果から、2 型糖尿病患者あるいはインスリン抵抗性を有する肥満患者においては、肝臓からのセレノプロテイン P 分泌が亢進し、その結果全身でのインスリン抵抗性および食後高血糖が誘導され、さらには血管内皮細胞の増殖低下が生じることで、血管障害を進行させている可能性が示唆された(図 1)。

本発明者らは、セレノプロテイン P 遺伝子の発現が 2 型糖尿病の病態と関連していることから、セレノプロテイン P の発現を指標に 2 型糖尿病の診断を行うことができることを見出した。また、セレノプロテイン P がインスリンの作用に大きく影響することから、セレノプロテイン P の発現を制御することにより 2 型糖尿病の病態を制御し得ることを見出した。さらに、セレノプロテイン P が血管細胞の発生および増殖に影響を及ぼすことから、血管障害の治療に用い得ることを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

[ 1 ] セレノプロテイン P を測定することを含む、2 型糖尿病または血管障害の検出方法。

[ 2 ] セレノプロテイン P を測定することを含む、2 型糖尿病または血管障害に罹患するリスクを評価する方法。

[ 3 ] 血管障害が動脈硬化性疾患である [ 1 ] または [ 2 ] の方法。

[ 4 ] セレノプロテイン P を測定することを含む、被験体のインスリン抵抗性または血糖コントロールを評価する方法。

[ 5 ] セレノプロテイン P を測定することを含む、2 型糖尿病患者におけるインスリン抵抗性を評価する方法。

[ 6 ] セレノプロテイン P を測定することを含む、耐糖能正常者における 2 型糖尿病発症のリスクを評価する方法。

[ 7 ] セレノプロテイン P からなる、2 型糖尿病または血管障害検出用マーカー。

[ 8 ] セレノプロテイン P からなる、2 型糖尿病または血管障害の罹患リスク評価用マーカー。

[ 9 ] 血管障害が動脈硬化性疾患である [ 7 ] または [ 8 ] のマーカー。

[ 10 ] セレノプロテイン P からなる、インスリン抵抗性または血糖コントロール評価用マーカー。

[ 11 ] セレノプロテイン P の、2 型糖尿病または血管障害検出用マーカーとしての使用。

[ 12 ] セレノプロテイン P の、2 型糖尿病または血管障害の罹患リスク評価用マーカーとしての使用。

[ 13 ] 血管障害が動脈硬化性疾患である [ 11 ] または [ 12 ] の使用。

[ 14 ] セレノプロテイン P の、インスリン抵抗性または血糖コントロール評価用マーカーとしての使用。

[ 15 ] 2 型糖尿病または血管障害の予防または治療薬をスクリーニングする方法であって、候補化合物のセレノプロテイン P の発現または作用を抑制する能力を指標に、予防または治療薬として選択することを含むスクリーニング方法。

[ 16 ] 血管障害が動脈硬化性疾患である [ 15 ] のスクリーニング方法。

[ 17 ] セレノプロテイン P またはセレノプロテイン P をコードする核酸を有効成分として含む血管内皮細胞の増殖または血管壁細胞の増殖低下に関連する疾患の予防または治療剤。

[ 18 ] 血管内皮細胞の増殖または血管壁細胞の増殖低下に関連する疾患が糖尿病性網膜症、動脈硬化性疾患または癌である [ 17 ] の予防または治療剤。

[ 19 ] 抗セレノプロテイン P 抗体を有効成分として含む 2 型糖尿病または血管障害の

10

20

30

40

50

予防または治療剤。

[ 2 0 ] セレノプロテイン P をコードする遺伝子の発現を抑制する 2 本鎖 R N A を有効成分として含む 2 型糖尿病または血管障害の予防または治療剤。

[ 2 1 ] 2 本鎖 R N A が、配列番号 1 に示すセレノプロテイン P をコードする塩基配列の連続する 1 5 ~ 5 0 塩基からなる塩基配列と相同な配列からなるセンス R N A および該センス R N A に相補的な配列からなるアンチセンス R N A からなる 2 本鎖 R N A である、[ 2 0 ] の 2 型糖尿病または血管障害の予防または治療剤。

[ 2 2 ] センス R N A が配列番号 3 で示される塩基配列からなる、[ 2 1 ] の 2 型糖尿病または血管障害の予防または治療剤。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2 0 0 6 - 2 0 6 7 4 7 号の明細書および / または図面に記載される内容を包含する。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 4 】

図 1 は、セレノプロテイン P とインスリン抵抗性および動脈硬化との関係を示す図である。

図 2 は、高血糖および高セレノプロテイン血症に伴う悪循環を示す図である。

図 3 は、ヒト肝臓でのセレノプロテイン P 遺伝子発現と M C R の相関を示す図である。

図 4 は、ヒト肝臓でのセレノプロテイン P 遺伝子発現と糖負荷後 2 時間血糖値の相関を示す図である。

図 5 は、インスリン投与が肝細胞におけるセレノプロテイン P 遺伝子発現に与える影響を示す図である。

図 6 は、グルコース投与が肝細胞におけるセレノプロテイン P 遺伝子発現に与える影響を示す図である。

図 7 A は、肝細胞からの糖放出に及ぼすセレノプロテイン P の影響を示す図である。

図 7 B は、肝細胞からの糖放出に及ぼすセレノプロテイン P の影響を示す図である ( その 2 ) 。

図 8 は、肝細胞におけるインスリン投与による A k t のリン酸化に及ぼすセレノプロテイン P の影響を示す図である。図 8 A は S D S - P A G E の結果を示す写真であり、図 8 B はそれぞれの条件での発効強度を示すグラフである。

図 9 は、セレノプロテイン P が仔胎マウス血管新生に与える影響を示す写真である。図 9 A は陰性対照、図 9 B はセレノプロテイン P を 5  $\mu$  g / m L 投与した場合、図 9 C はセレノプロテイン P を 2 5  $\mu$  g / m L 投与した場合の結果を示す。

図 1 0 は、セレノプロテイン P 投与マウスに対する糖負荷試験の結果を示す図である。

図 1 1 は、セレノプロテイン P 投与マウスに対するインスリン負荷試験の結果を示す図である。

図 1 2 は、2 型糖尿病患者における血清セレノプロテイン P 濃度と B M I / Q U I C K I の相関を示す図である。図 1 2 A は B M I との相関、図 1 2 B は Q U I C K I との相関を示す。

図 1 3 は、2 型糖尿病患者における肥満の有無による血清セレノプロテイン濃度の比較の結果を示す図である。

図 1 4 は、耐糖能正常者における血清セレノプロテイン P 濃度と体重・H O M A - I R の相関を示す図である。図 1 4 A は体重との相関、図 1 4 B は H O M A - I R との相関を示す。

図 1 5 は、セレノプロテイン P s i R N A を注入した K K A y マウスにおける肝セレノプロテイン P 遺伝子発現 s i R N A をマウスに急速投与し、7 日後に肝臓から R N A を抽出した結果を示す図である。遺伝子発現量は R e a l t i m e P C R 法によって測定した。\* p < 0 . 0 5 である。

図 1 6 は、セレノプロテイン P に対する s i R N A を注入した K K A y マウスにおける血中 S e P タンパク発現を示す写真である。s i R N A をマウスに急速投与し、7 日後に採血を施行した。セレノプロテイン P タンパク発現は W e s t e r n b l o t t i n g 法

10

20

30

40

50

によって評価した。

図17は、セレノプロテインPに対するsiRNAを注入したKKAYマウスにおける空腹時血糖値を示す図である。

図18は、肝でのセレノプロテインPをノックダウンしたKKAYマウスにおける糖負荷試験の結果を示す図である。siRNAをマウスに急速投与し、2~7日後に糖負荷試験を施行した(n=6-8 per group)。\*p<0.05、\*\*p<0.01である。

図19は、肝でのセレノプロテインPをノックダウンしたKKAYマウスにおけるインスリン負荷試験の結果を示す図である。siRNAをマウスに急速投与し、2~7日後にインスリン負荷試験を施行した(n=6-8 per group)。\*p<0.05である。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0005】

セレノプロテインP(Selenoprotein P, SeP)は、セレノシステインを10残基含むタンパク質である。セレノプロテインPは、過酸化水素や過酸化脂質を還元して無毒化し、また細胞内の酸化還元を制御するグルタチオンペルオキシダーゼ様活性を有する酵素として作用する。

配列番号1に、セレノプロテインPをコードするDNAの塩基配列を、配列番号2にセレノプロテインPのアミノ酸配列を示す。

本発明において用いるセレノプロテインPは、上記配列情報に基づいて、化学合成することができ、また遺伝子組換え技術を利用して組換えタンパク質として得ることができる。

20

また、セレノプロテインは、ヒト血清中に含まれており、Saito Y. et al., J Biol Chem 274:2866-2871, 1999の記載の方法に従って、ヒト血清より単離・精製することができる。

本発明に用いるセレノプロテインPは、配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1個または数個のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなるタンパク質であって、上記のグルタチオンペルオキシダーゼ様活性を有するタンパク質をも含む。ここで、1または数個とは1~9個、好ましくは1~5個、さらに好ましくは1もしくは2個である。また、10残基のセレノシステインのいずれかが欠失したものは除外される。さらに、本発明においては、セレノプロテインPの断片を用いることもできる。

30

セレノプロテインPを2型糖尿病等の検出等のマーカーとして用いる場合、セレノプロテインPの断片は、限定されず、セレノプロテインPの任意の断片をマーカーとして用いることができる。好ましくは、セレノプロテインPのアミノ酸配列の連続した一部配列であって、アミノ酸が10個以上、好ましくは15個以上、さらに好ましくは20個以上からなる一部配列からなる断片ペプチドである。

一方、セレノプロテインPを医薬として用いる場合の断片は、上記のグルタチオンペルオキシダーゼ様活性を有する断片ペプチドである。このようなセレノプロテインPの断片として、セレノプロテインPのC末端側断片を挙げることができ、例えば、配列番号2に示されるアミノ酸配列の260番目のアミノ酸から362番目までのアミノ酸を含む配列からなる断片が挙げられる。また、これらの断片のアミノ酸配列において、1個または数個のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなる断片ペプチドであって、上記のグルタチオンペルオキシダーゼ様活性を有するペプチドをも含む。

40

血中セレノプロテインP濃度は、全身のインスリン抵抗性や血管障害進展へのリスクを反映している。セレノプロテインPを2型糖尿病や血管障害等の疾患の検出用マーカーとして用いることができる。血管障害は、心筋梗塞、脳梗塞、閉塞性動脈硬化症等の動脈硬化性疾患を含む。また、血中セレノプロテインPを測定することにより被験体の2型糖尿病または血管障害に罹患するリスクを評価することができる。さらに、インスリン抵抗性または血糖コントロールを評価することができる。さらに、2型糖尿病患者においては新規インスリン抵抗性評価マーカーに、耐糖能正常患者においては2型糖尿病発症の予知マ

50

ーカーになりうる。すなわち、2型糖尿病患者において、セレノプロテインPが高値である場合、インスリン感受性が減弱していると評価することができる。また、耐糖能正常者において、セレノプロテインPが高値である場合、2型糖尿病を発症するリスクが高いと評価・判定することができる。また、セレノプロテインP値は、肥満と相関しており、肥満の合併症の判定基準ともなり得る。すなわち、セレノプロテインPが高値である場合、肥満症または肥満の合併症に罹患していると判定することができる。さらに、セレノプロテインPが高値である場合、肥満によりインスリン抵抗性が高まっていると評価・判定することもできる。

セレノプロテインPをマーカーとして用いる場合、被験体の血液等の試料中のセレノプロテインPを検出すればよい。検体試料としては、全血、血清または血漿等を用いることができる。

10

検出は、セレノプロテインPを直接検出してもよいし、セレノプロテインPのmRNAを検出して、セレノプロテインPの発現を検出してもよい。セレノプロテインPを直接検出する方法として、セレノプロテインPを特異的に認識し結合する抗セレノプロテインP抗体を用いる免疫測定法により行うことができる。抗セレノプロテインP抗体は、公知の方法により作製することができる。免疫測定法としては、抗セレノプロテインP抗体を固相化した担体を用いる方法やウエスタンブロットティング等が挙げられる。固相化担体を用いる方法として、例えば、固相化マイクロタイタープレートを用いるELISA、固相化粒子を用いる凝集法等が挙げられるが、これらには限定されず、公知の免疫学的測定法を採用して、血中セレノプロテインPを検出することができる。

20

セレノプロテインPのmRNAは、ノーザンブロットティング、RT-PCR法、DNAチップ(DNAマイクロアレイ)を利用した方法等により検出することができる。これらの方法も公知の方法で行うことができる。

さらに、セレノプロテインPは2型糖尿病等の疾患に罹患している被験体の肝臓において、発現が亢進しているため、肝臓におけるセレノプロテインPの発現を検出してもよい。

被験体から採取した検体試料中のセレノプロテインPを測定し、またはセレノプロテインPの発現を測定することにより、被験体が2型糖尿病や血管障害に罹患しているか否かを検出・診断することができる。また被験体が2型糖尿病や血管障害に罹患するリスクを評価することができる。さらに、被験体が糖・脂質代謝異常、糖尿病性合併症に罹患しているかどうかの判定や罹患するリスクを評価することもできる。

30

被験体から採取した検体試料中のセレノプロテインPを測定し、セレノプロテインP濃度が正常人の検体試料中のセレノプロテインP濃度より高い場合に、あるいは被験体のセレノプロテインPの発現が亢進している場合に、被験体が2型糖尿病や血管障害に罹患していると診断することができる。あるいは被験体の2型糖尿病や血管障害に罹患するリスクが高いと評価することができる。

さらに、セレノプロテインPを測定し、またはセレノプロテインPの発現を測定することにより、被験体の2型糖尿病の病態を判断することができる。例えば、被験体のインスリン抵抗性や血糖コントロールを評価することができる。ここで、インスリン抵抗性の評価とは、被験体がインスリン抵抗性となっているかどうかの判定およびインスリン抵抗性となるリスクの評価をいう。また、血糖コントロールの評価とは、被験体の血糖コントロールの良悪の評価または被験体の血糖コントロールが悪化するリスクの評価をいう。

40

例えば、被験体から採取した検体試料中のセレノプロテインPを測定し、セレノプロテインP濃度が正常人の検体試料中のセレノプロテインP濃度より高い場合に、あるいは被験体のセレノプロテインPの発現が亢進している場合に、被験体がインスリン抵抗性であると評価し、または血糖コントロールが悪化していると評価することができる。あるいは、被験体がインスリン抵抗性となるリスクが高く、または血糖コントロールが悪化するリスクが高いと評価することができる。正常人における検体試料中のセレノプロテインP濃度またはセレノプロテインPの発現程度はあらかじめ測定しておき、統計的解析により、血中セレノプロテインPの異常値や異常発現のカットオフ値を設定することが可能である

50

。すなわち、本発明は上記のリスクを評価するための検査方法および上記のリスクを評価するための検査用試薬をも包含する。また、セレノプロテインPは、上記のリスクを評価するための検査用マーカーとして用いることができる。

本発明は、さらにセレノプロテインPの発現を指標にして、2型糖尿病や血管障害を予防または治療する医薬のスクリーニングを行う方法を包含する。セレノプロテインPは、2型糖尿病および動脈硬化病変の治療標的となり得る。特に、糖尿病患者においては、高血糖、肝からのセレノプロテインP分泌亢進、全身のインスリン抵抗性悪化、さらなる高血糖という悪循環が生じている可能性があり(図2)、血中セレノプロテインP濃度を適正レベルまで低下させることで、糖毒性に伴うこれらの病態を劇的に改善させうる可能性がある。該医薬は、体内でのセレノプロテインPの発現を抑制し、セレノプロテインPの分泌を抑制し、またはセレノプロテインPの作用を阻害する医薬である。該医薬は、インスリン抵抗性を減弱させ、また血糖コントロールを改善し得る。これらの医薬は、セレノプロテイン分泌抑制薬またはセレノプロテイン作用減弱薬であり、血中セレノプロテインP濃度を適切なレベルに低下させることができる。

10

該医薬は例えば、セレノプロテインPのプロモーターに結合し、セレノプロテインPの発現、分泌を抑制し得る化合物である。また、該医薬は、セレノプロテインPの受容体に結合し、セレノプロテインPが受容体に結合するのを阻害し、セレノプロテインPの作用を阻害し得る化合物である。

このような化合物は例えば、動物細胞等にセレノプロテインPをコードするDNAおよびセレノプロテインPのプロモーターを導入し、セレノプロテインP発現系を構築し、該動物細胞と候補化合物を接触させ、すなわち候補化合物の存在下で動物細胞を培養し、該細胞におけるセレノプロテインPの発現を指標にスクリーニングすることができる。候補化合物により、セレノプロテインPの発現が低下した場合、該候補化合物を2型糖尿病や血管障害の予防、治療用医薬として選択することができる。

20

また、セレノプロテインP、セレノプロテインP受容体および候補化合物を共存させ、セレノプロテインPとセレノプロテインPの受容体との結合を候補化合物が阻害し、セレノプロテインPの作用を抑制するか否かを指標にして、2型糖尿病や血管障害の予防、治療用医薬として用い得る化合物を選択することができる。

本発明は、さらにセレノプロテインPまたはセレノプロテインPの断片ペプチドであってグルタチオンペルオキシダーゼ様活性を有するペプチドを有効成分として含む医薬組成物、ならびにセレノプロテインPをコードする核酸またはそれらの断片ヌクレオチドであって、グルタチオンペルオキシダーゼ様活性を有するペプチドをコードする断片ヌクレオチドを有効成分として含む医薬組成物を包含する。セレノプロテインPは、血管内皮細胞の増殖を抑制し、血管壁細胞の増殖を誘導し得るので、血管内皮細胞の増殖または血管壁細胞の増殖低下に関連した疾患の予防または治療に用いることができる。該医薬組成物は血管系細胞に直接作用し、上記疾患の予防、治療薬として用いることができる。

30

本発明は、さらにセレノプロテインPのアゴニストまたはセレノプロテインPのアンタゴニストを有効成分として含む医薬組成物を包含する。ここで、セレノプロテインPのアゴニストとは、セレノプロテインPの受容体に結合し、細胞に生理活性作用を発現させる物質をいい、セレノプロテインPのアンタゴニストとは、セレノプロテインPの受容体に結合するが、生体に対する作用を発現せず、セレノプロテインPの作用を阻害する物質をいう。セレノプロテインPのアゴニストまたはアンタゴニストは、血管内皮細胞の増殖または血管壁細胞の増殖低下に関連した疾患の予防または治療に用いることができる。血管内皮細胞の増殖または血管壁細胞の増殖低下に関連した疾患として、例えば糖尿病性網膜症、心筋梗塞、脳梗塞、閉塞性動脈硬化症等の動脈硬化性疾患等が挙げられる。また、セレノプロテインPは血管新生を抑制することができ、セレノプロテインPまたはセレノプロテインPのアゴニストもしくはアンタゴニストは、癌の予防または治療に用いることもできる。

40

セレノプロテインPタンパク質または断片ペプチドを医薬として用いる場合、被験体に

50

タンパク質または断片ペプチドを投与すればよい。また、セレノプロテインPをコードする核酸またはそれらの断片ヌクレオチドを医薬として用いる場合、公知の遺伝子治療の手法により、核酸またはヌクレオチドを体内に投与すればよい。遺伝子を被験体へ導入する方法として、ウイルスベクターを用いる方法および非ウイルスベクターを用いる方法があり、種々の方法が公知である（別冊実験医学、遺伝子治療の基礎技術、羊土社、1996；別冊実験医学、遺伝子導入&発現解析実験法、羊土社、1997；日本遺伝子治療学会編、遺伝子治療開発研究ハンドブック、エヌ・ティー・エス、1999）。

さらに、本発明はセレノプロテインPを標的とし、セレノプロテインPの活性を抑制するか、またはセレノプロテインPの発現を抑制し得る医薬をも包含する。これらの医薬は、2型糖尿病または血管障害の予防または治療薬として用いることができる。

このような医薬として用い得る化合物として、セレノプロテインPの作用を中和し得る抗セレノプロテインP抗体が挙げられる。セレノプロテインPの作用を中和し得る抗セレノプロテインP抗体、すなわち、セレノプロテインPに対するアンタゴニスティック抗体は、公知の抗体作成方法により作製することができる。これらの抗体は好ましくはヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト化（Humanized）抗体である。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来の定常領域とからなる。ヒト化抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域と、ヒト抗体由来のフレームワーク領域およびC領域とからなる。ヒト化抗体はヒト体内における抗原性が低下されているため、本発明の治療剤の有効成分として有用である。ヒト化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体ともいい、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域（CDR；complementarity determining region）をヒト抗体の相補性決定領域へ移植することにより得ることができる。ヒト抗体遺伝子座を導入し、ヒト由来抗体を産生する能力を有するトランスジェニック動物に抗原を投与することにより得ることができるヒト抗体も含む。このようなトランスジェニック動物としてマウスが挙げられ、ヒト抗体を産生し得るマウスの作出方法は、例えば、国際公開第WO02/43478号パンフレットに記載されている。本発明の抗セレノプロテインP抗体は、抗セレノプロテインP抗体の一部（部分断片）であって、抗体の抗原への作用を有する抗体の断片も含み、具体的にはF(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv、ジスルフィド結合Fv、一本鎖Fv（scFv）、及びこれらの重合体等が挙げられる。

セレノプロテインPを標的とし、セレノプロテインPの活性を抑制するか、またはセレノプロテインPの発現を抑制し得る医薬として使用し得る化合物は、セレノプロテインPの受容体に結合するが、野生型のセレノプロテインPの作用は有さず、野生型のセレノプロテインPが受容体に結合することを阻害するドミナントネガティブ突然変異体をも包含する。

さらに、セレノプロテインPを標的とし、セレノプロテインPの活性を抑制し、またはセレノプロテインPの発現を抑制し得る医薬として使用し得る化合物は、体内においてセレノプロテインPの発現を抑制し得る化合物を含む。このような化合物として、例えばRNAi（RNA干渉）により特定の配列を有する標的mRNAを切断し、そのmRNAに対応する遺伝子の発現を抑制し得る化合物が挙げられる。RNAiにおいては、特定の標的mRNAと実質的に同一な配列を有するセンス鎖と該センス鎖に相補的なアンチセンス鎖からなるsiRNA（short interfering RNA）がガイドRNAとしてターゲット配列を認識し、ターゲットmRNAを切断することにより、遺伝子の発現が抑制される。siRNAは細胞内または生体内でダイサー（Dicer）によりプロセッシングを受けて2重鎖RNA（dsRNA）より形成される。該化合物として、例えばRNAi作用を有する2本鎖RNAが挙げられる。2本鎖RNAは、標的遺伝子のmRNA配列と相同な配列からなるセンスRNAおよびこれと相補的な配列からなるアンチセンスRNAとからなる。また、センス鎖またはアンチセンス鎖の3'末端にオーバーハングを有していてもよく、該オーバーハングの塩基の種類、数は限定されず、例えば、1～

10

20

30

40

50



5、好ましくは1～3、さらに好ましくは1もしくは2塩基からなる配列が挙げられ、例えば、UUやTTが挙げられる。本発明において、オーバーハングとは、shRNAの一方の鎖の末端に付加された塩基であって、もう一方の鎖の対応する位置に相補的に結合し得る塩基が存在しない塩基をいう。オーバーハングはDNAを構成する塩基であってもよい。2本鎖部分は、RNA干渉により発現を抑制しようとする標的遺伝子の配列中の標的配列にハイブリダイズし得る配列を有するRNA鎖（センス鎖）および該配列に相補的なRNA鎖（アンチセンス鎖）が相補的に結合した構造を有する。また、2本鎖RNAは、センス鎖とアンチセンス鎖がループ配列を介して連結しているステムループ構造を有しているショートヘアピンRNA（shRNA）であってもよい。本発明の2本鎖RNAの標的遺伝子であるセレノプロテインPをコードする遺伝子の特定の標的配列は、配列番号1  
10に示すDNAの塩基配列に対応するRNA中の配列であり、該配列情報に基づいて適宜設定できる。その塩基数は、限定されず、15～500塩基の範囲で選択される。好ましくは15～50、15～45、15～40、15～35もしくは15～30塩基、さらに好ましくは20～35塩基、さらに好ましくは19～30塩基、特に好ましくは19～29塩基もしくは28塩基である。

さらに、体内においてセレノプロテインPの発現を抑制し得る化合物として、アンチセンス核酸が挙げられる。アンチセンス核酸は、目的の標的遺伝子に相補的でありハイブリダイズする配列を持つDNAまたはRNAであり、その標的遺伝子の発現を抑制し得る。本発明のセレノプロテインPの発現を抑制するアンチセンス核酸は、配列番号1に示すセレノプロテインPをコードするDNAの塩基配列または該DNA配列に対応するRNA配列の一部に相補的な核酸である。該核酸は、長さが10から400ヌクレオチドであり、好ましくは長さが250以下のヌクレオチド、さらに好ましくは長さが100以下のヌクレオチド、さらに好ましくは長さが50以下のヌクレオチド、特に好ましくは長さが12  
20～28の間のヌクレオチドである。

本発明の2本鎖RNAまたはアンチセンス核酸の導入方法としては、Hydrodynamic法、カルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法等が挙げられる。

本発明は上記の化合物を有効成分として含む2型糖尿病または血管障害の治療または予防のための医薬組成物を包含する。  
30

本発明の医薬組成物は、セレノプロテインPタンパク質もしくはその断片ペプチドまたはセレノプロテインPをコードする核酸またはそれらの断片ヌクレオチドを含むベクターならびに薬理的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤を含む。

本発明の医薬組成物は、種々の形態で投与することができ、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与、あるいは注射剤、点滴剤、座薬、スプレー剤、点眼剤、経鼻投与剤、貼付剤などによる非経口投与を挙げることができる。

本発明の医薬組成物は、局所投与することも可能であり、例えば肝臓組織部位に注射により投与することによりその効果を発揮し得る。

本発明の医薬組成物は、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤、賦形剤を含む。たとえば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、ステアリン酸マグネシウムなどが使用される。注射用の水性液としては、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが使用され、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール、プロピレングリコールなどのポリアルコール、非イオン界面活性剤などと併用してもよい。油性液としては、ゴマ油、大豆油などが使用され、溶解補助剤としては安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。  
40

その投与量は、症状、年齢、体重などによって異なるが、タンパク質またはペプチドの場合、経口投与では、1日約0.001mg～100mgであり、1回または数回に分けて投与すればよい。また、非経口投与では、1回あたり、0.001mg～100mgを皮下注射、筋肉注射、または静脈注射によって投与すればよい。また、被験体内で翻訳させる発現ベクター等に挿入されたセレノプロテインPをコードする核酸またはそれらの断  
50

片ヌクレオチドは、数日または数週間または数ヶ月おきに1回あたり、0.001mg~100mgを皮下注射、筋肉注射、または静脈注射によって投与すればよい。RNAiの作用を有する2本鎖RNAまたはアンチセンス核酸の場合、肝臓の細胞当たり少なくとも1コピーの2本鎖RNAまたはアンチセンス核酸が導入されるように投与してもよい。本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

一連の実施例において、材料、試薬および動物は以下のものを用いた。

ラットヘパトーマ由来H4IIEC細胞は、American Type Culture collection (ATCC)より購入した。ヒト由来セレノプロテインPは高橋和彦教授(北海道薬科大学, 日本)から供与を受けた(Saito Y. et al., J Biol Chem 274:2866-2871, 1999)。セレノプロテインP濃度はウシ血清アルブミンをスタンダードとしてブラッドフォード法を用いて測定した。ヒト組み換えインスリンはSigma Chemicalsから購入した。抗Akt抗体と抗セリン(473)リン酸化Akt抗体はCell Signaling technologyから購入した。抗CD31モノクローナル抗体はPharmingen、HRP結合Anti-Human Smooth Muscle Actin抗体はDAKO Cytomationから購入した。

雌C57BL/6Jマウスは三共ラボサービス(日本)より8週齢の時点で購入し、標準的な光(12時間の光/闇)および温度の環境で維持した。これらのマウスは1グループあたり5匹のケージで飼育し、水と食料をad libitumで提供し、約10週齢で実験に使用した。

#### 【実施例1】

##### 【0006】

セレノプロテインP遺伝子発現と糖尿病の病態

ヒト肝臓におけるセレノプロテインP遺伝子発現とインスリン抵抗性の関連

主に骨格筋におけるインスリン抵抗性を、人工膵臓を用いた正常血糖下高インスリンクランプ法を用いて、glucose metabolic clearance rate (MCR)として定量化した。MCRは骨格筋へのインスリン依存性糖取り込みを反映し、MCRが低いほどインスリン抵抗性は強い。結果を図3に示す。図3に示すように、DNAチップを用いて定量したヒト肝臓でのセレノプロテインP遺伝子発現量は、インスリン抵抗性指標であるMCRと負に相関した。すなわち、ヒト肝でのセレノプロテインP遺伝子発現がインスリン抵抗性に関連して亢進することが判明した。

同様に、ヒト肝臓におけるセレノプロテインP遺伝子発現と高血糖の関連を調べた。結果を図4に示す。図4に示すように、ヒト肝臓でのセレノプロテインP遺伝子発現量は、糖負荷後2時間血糖値と正の相関を示した。すなわち、ヒト肝でのセレノプロテインP遺伝子発現が糖負荷後高血糖に関連して亢進することが判明した。

#### 【実施例2】

##### 【0007】

細胞レベルでの発現制御・機能解析

(1) インスリン投与が肝細胞におけるセレノプロテインP遺伝子発現に与える影響

ヒト肝臓におけるセレノプロテインP遺伝子発現がインスリン抵抗性や高血糖で亢進することがわかったので、インスリンおよびグルコースがセレノプロテインP遺伝子発現に及ぼす作用を試験管内で検討した。

肝細胞(H4IIEC)を6穴プレート上でDulbecco's Modified Eagle培地(DMEM, Gibco BRL)、20%ウマ血清(Gibco BRL)、5%FBSにて80%コンフルエント状態まで培養した。PBSにて一回細胞を洗った後、血清なしのDMEM培地で6時間培養しstarvationをおこなった。その後、インスリンを培地に添加し6時間インキュベートし、Quick gene system(FUJIFILM)を用いてTotal RNAを回収した。1サンプルにつき100ngのRNAをHigh-capacity cDNA Archive

10

20

30

40

50

Kit (Applied Biosystems)にてcDNAに変換し、ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)を用いてセレノプロテインP遺伝子発現の変化をReal-time PCR法にて観察した。セレノプロテインPのプライマーとTaqManプローブはApplied Biosystems所有のものを使用した(Assays-on-Demand gene expression product)。normalizationのためのコントロール遺伝子として、16s rRNAを用いた。PCR条件は50・2分を1サイクル、95・10分を1サイクル、その後95・15秒と60・1分を40サイクルとした。浸透圧の影響を除外するため、グルコースと等濃度のマンニトールをコントロールに用いた。

10

結果を図5に示す。図5に示すように、インスリンは用量依存性に肝セレノプロテインP遺伝子発現を低下させることが明らかとなった。

(2) グルコース投与が肝細胞におけるセレノプロテインP遺伝子発現に与える影響

肝細胞(H4IIEC)を6穴プレート上でDMEM培地、20%ウマ血清、5%FBSにて80%コンフルエント状態まで培養した。PBSにて一回細胞を洗った後、糖新生バッファー(glucose-free DMEM、3.7g/L sodium bicarbonate)、0.4%FBSで6時間培養しstarvationをおこなった。その後、グルコースを培地に添加し6時間インキュベートし、Quick gene system(FUJIFILM)を用いてTotal RNAを回収した。浸透圧の影響を除外するため、グルコースと等濃度のマンニトールをコントロールに用いた。1サンプルにつき100ngのRNAをHigh-capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems)にてcDNAに変換し、ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)を用いてセレノプロテインP遺伝子発現の変化をReal-time PCR法にて観察した。セレノプロテインPのプライマーとTaqManプローブはApplied Biosystems所有のものを使用した(Assays-on-Demand gene expression product)。normalizationのためのコントロール遺伝子として、16s rRNAを用いた。PCR条件は50・2分を1サイクル、95・10分を1サイクル、その後95・15秒と60・1分を40サイクルとした。

20

30

結果を図6に示す。図6に示すように、グルコースはコントロールであるマンニトールに比較して有意に肝セレノプロテインP遺伝子発現を亢進させた。

(3) 肝細胞におけるインスリン作用におよぼすセレノプロテインPの影響

次に、セレノプロテインPの機能を解析した。

インスリンは肝からの糖新生を抑制することで血糖を制御する。そこで、まず、セレノプロテインPが肝におけるインスリン作用に及ぼす効果を評価した。

糖新生系を有するラットhepatome由来培養肝細胞であるH4IIEC細胞を、6穴プレート上でDMEM培地、20%ウマ血清、5%FBSにて80%コンフルエント状態まで培養した。PBSにて二回細胞を洗った後、糖新生バッファー(glucose-free DMEM, sodium bicarbonate 3.7g/L, sodium pyruvate 5mM, sodium lactate 50mM, cAMP 1mM, dexamethasone 250nM)とセレノプロテインPまたは対照ならびにインスリンと共に24時間培養した。培養液を回収し、上清中に遊離したグルコースの濃度をGlucose Oxidation kit (Sigma)にて測定した(Fukuhara A. et al., Science 307:426-430, 2005)。培養液回収後、細胞をRIPAバッファーにて回収し、タンパク濃度をLowry法にて測定した。グルコース濃度をタンパク濃度で除した値を、肝細胞からのグルコース放出として計算した。

40

結果を図7AおよびBに示す。図7AおよびBに示すように、インスリンは用量依存性に肝細胞からの糖新生を抑制した。10μg/mLのセレノプロテインP存在下では、イ

50

ンスリンによる肝糖新生抑制作用を減弱させた。このことは、セレノプロテインPは肝におけるインスリン作用を減弱させることを示している。

#### (4) 肝細胞内インスリンシグナルに対するセレノプロテインPの影響

セレノプロテインPが、肝臓におけるインスリン作用を減弱することがわかったので、次に、肝細胞内インスリンシグナルへの影響を検討した。

肝細胞(H4IIEC)を6穴プレート上でDMEM培地、20%ウマ血清、5%FBSにて80%コンフルエント状態まで培養した。PBSにて一回細胞を洗った後、無血清DMEM培地とともに、セレノプロテインP 0、1、5、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  存在下で6時間培養した。その後、ヒトインスリン(1  $\text{ng}/\text{mL}$ )で37  $^{\circ}\text{C}$  15分間処置し、300  $\mu\text{L}/\text{dish}$ のCell lysis buffer(Tris 20  $\text{mM}$ , EDTA 5  $\text{mM}$ ,  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  10  $\text{mM}$ , NaF 100  $\text{mM}$ , NP-40 1%, Protease inhibitor cocktail(Sigma Chemicals),  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  2  $\text{mM}$ )を用いて細胞を回収した。超音波破碎装置(BIORUPTOR COSMO BIO)を用いて細胞を破碎した後、15000 rpmで10分間遠心分離し上清を新しいチューブへ回収した。等量のタンパクを4~20% SDS-PAGEにて分離し、polyvinylidene difluoride membranes(PVDMs)の上へBio-Rad Transblot装置を用いて転写した。メンブレンをブロッキングバッファー(Tris 50  $\text{mM}$ , NaCl 150  $\text{mM}$ , 0.1% Tween 20, 5% non-fat milk)で室温1時間ブロッキングし、その後それぞれの一次抗体で室温1時間もしくは4~16時間プローブした。メンブレンをバッファー(Tris 50  $\text{mM}$ , NaCl 150  $\text{mM}$ , 0.1% Tween 20)で洗浄した後、horseradish peroxidase結合二次抗体とインキュベートし、enhanced chemiluminescence reagent(ECL plus Amersham)を用いて化学発光反応を評価した。

結果を図8に示す。図8に示すように、セレノプロテインPは用量依存性にAktのセリンリン酸化を阻害した。ヒト正常血中セレノプロテインP濃度は5.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ と報告されていることから(Takahashi et al., Journal of Health Science 47, Pages 346-352, 2001)、セレノプロテインPはヒト正常血中濃度に極めて近い濃度で、肝におけるインスリン作用を抑制しうることが判明した。

#### (5) セレノプロテインPが仔胎マウス血管新生に与える影響

長期間にわたる糖尿病の持続は網膜、腎臓、神経の細小血管障害、および虚血性心疾患や脳梗塞といった動脈硬化性疾患を引き起こす。そこで、これらの血管合併症の病態に及ぼすセレノプロテインPの作用をまず試験管内の血管系細胞を用いて検討した。実験には、マウス胎仔器官培養系(Takakura et al., Cell 102:199-20, 2000)を用いた。

ストローマ細胞株であるOP9(Nakano T. et al., Science 265:1098-1101, 1994)をalpha-modified minimum essential media( $\alpha$ -MEM Gibco BRL)、20% Fetal-calf serum(FCS; JRH Bioscience)にて培養した。妊娠8.5日目のマウスから胎仔を摘出し、血管系幹細胞の起源のひとつとされるパラ大動脈臓側中胚葉(PAS)領域を臍腸管動脈(omphalomesenteric artery)を含むように取り出し、10%FCS、 $10^{-5}\text{M}$  2-メルカプトエタノール(2-ME; Gibco BRL)、RPMI 1640(Gibco BRL)の中のOP9細胞上で14日間培養した(Takakura T. et al., Cell 102:199-209, 2000)。培養7日目からセレノプロテインPを5、25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ で投与し、血管系細胞の発生を検討した。血管内皮細胞をCD31抗体(MEC13.3 rat anti mouse monoclonal antibody; Pharmingen, San Diego, CA)を用いて青色に、血管壁細胞をalpha-SMA抗体(Anti-Human Smooth Muscle A

ctin/HRP Dako Cytomation)を用いて茶色に免疫染色した。

結果を図9に示す。図9に示すように、セレノプロテインPは血管内皮細胞の発生・増殖を有意に抑制し、一方で血管壁細胞の発生・増殖を強力に誘導した。

#### 【実施例3】

##### 【0008】

個体レベルでの機能解析

(1) セレノプロテインP投与がマウス耐糖能に与える影響

セレノプロテインPが試験管内で、肝細胞におけるインスリン作用を障害することがわかったので、次に個体レベルでの作用を検討した。

1グループにつき5匹の10週齢雌C57BL/6Jマウスに対し、セレノプロテインP 1 $\mu$ g/g BWもしくはベヒクル(vehicle)を午前7時と午後7時の二回腹腔内投与した。マウスは一回目の注射後から絶食とした。二回目の注射の2時間後、1.5mg/g BWのグルコースを腹腔内投与し、血糖値を0から120分において測定した。血糖値はFreeStyle(キッセイ 日本)を用いて測定した。

10

結果を図10に示す。図10に示すように、コントロールマウスと比較して、セレノプロテインP投与マウスでは、糖負荷後15、30分後の血糖が有意に高値を示した。すなわち、個体レベルで、セレノプロテインPが糖負荷後高血糖を誘導しうるということが明らかとなった。

(2) セレノプロテインP投与がマウスのインスリン感受性に与える影響

セレノプロテインPがマウスに糖負荷後高血糖をもたらした機序を探るため、本タンパクがマウスのインスリン感受性に与える影響を検討した。

20

1グループにつき5匹の10週齢雌C57BL/6Jマウスに対し、セレノプロテインP 1 $\mu$ g/g BWもしくはベヒクル(vehicle)を午前7時と午後7時の二回腹腔内投与した。マウスは二回目の注射の2時間前から絶食とした。合計4時間の絶食の後、0.5mU/g BWのヒトインスリン(Humalin R(登録商標)、Lilly Japan)を腹腔内投与し、血糖値を0から120分において測定した。血糖値はFreeStyle(キッセイ、日本)を用いて測定した。

結果を図11に示す。図11に示すように、コントロールマウスと比較して、セレノプロテインP投与マウスでは、糖負荷後15、30分後の血糖低下率が有意に高値であった。したがって、セレノプロテインPはマウスにインスリン抵抗性を誘導することにより、糖負荷後高血糖をもたらすことが明らかとなった。

30

#### 【実施例4】

##### 【0009】

ヒト血中セレノプロテインP濃度測定

金沢大学医学部附属病院代謝内科に通院または入院した2型糖尿病患者16人(年齢 $59 \pm 14$ 歳, BMI  $25.2 \pm 4.6$  kg/m<sup>2</sup>, 空腹時血糖  $184 \pm 50$  mg/dL, HbA1c  $10.4 \pm 3.2$ %)、耐糖能正常者8人(年齢  $42 \pm 15$ 歳, BMI  $23.2 \pm 3.5$  kg/m<sup>2</sup>, 空腹時血糖  $93 \pm 9$  mg/dL)を対象とした。空腹状態にて採血を施行し、採取した血清のセレノプロテインP濃度を2種のセレノプロテインPモノクローナル抗体によるサンドイッチELISA法を用いて測定した(Saito Y et al., J Health Sci 2001; 47: 346; Akira Andoh et al., Nutrition 21(2005) 574-579)。抗体は北海道薬科大学高橋和彦教授より供与を受けた。耐糖能正常患者のインスリン抵抗性を、下記のごとくhomeostasis model for insulin resistance(HOMA-IR)を算出することによって評価した(Matthews DR et al., Diabetologia 28: 412-419, 1985)。2型糖尿病患者のインスリン抵抗性は、下記のごとくquantitative insulin sensitivity check index(QUICKI)を算出することによって評価した(Arie Katz et al., J Clin Endocrinol Metab 85: 2402-2410)。

40

50

$HOMA - IR = \text{空腹時血糖値} (mg/dL) \times \text{空腹時の血中インスリン濃度} (\mu U/ml) / 405$

$QUICKI = 1 / [\log \text{空腹時の血中インスリン濃度} (\mu U/ml) + \log \text{空腹時血糖値} (mg/dL)]$

(1) ヒト血清におけるセレノプロテインP濃度測定

(i) 2型糖尿病患者における血清セレノプロテインP濃度

2型糖尿病患者16人において血清セレノプロテインP濃度を測定した結果、その平均濃度は  $5.28 \pm 1.3 \mu g/ml$  であった。患者のセレノプロテインP値はBMIと正に、QUICKIと負に相関した(図12A及びB)。

(ii) 2型糖尿病患者における肥満の有無による血清セレノプロテインP濃度の比較

2型糖尿病患者における血清セレノプロテインP濃度を、肥満の有無にて比較検討した。BMI25以上を肥満、25未満を非肥満群としたところ、血清セレノプロテインP値は肥満群で  $5.9 \pm 1.1 \mu g/ml$ 、非肥満群で  $4.4 \mu g/ml$  であり、肥満群にて有意に高値であった ( $p = 0.029$ ) (図13)。

(iii) 耐糖能正常者における血清セレノプロテインP濃度と体重・HOMA-IRの相関

耐糖能正常者8人において血清セレノプロテインP濃度を測定した結果、その平均濃度は  $6.1 \pm 0.8 \mu g/ml$  であった。耐糖能正常者のセレノプロテインP値も糖尿病患者のそれと同様に、体重およびHOMA-IRと正に相関する傾向を示した(図14AおよびB)。

以上の結果から、血清セレノプロテインP値は肥満・インスリン抵抗性を強く反映する臨床マーカーであることが判明した。さらに、血清セレノプロテインP値と肥満・インスリン抵抗性との相関が2型糖尿病患者と耐糖能正常者の両者において認められた。細胞および動物実験の結果からセレノプロテインPがインスリン抵抗性原因ホルモンのひとつであると考えられることより、ヒト血清セレノプロテインP値測定は2型糖尿病患者においては新規インスリン抵抗性評価マーカーに、耐糖能正常患者においては2型糖尿病発症の予知マーカーになりうる。

【実施例5】

【0010】

肝臓由来セレノプロテインPをターゲットとした2型糖尿病に対する新規遺伝子治療

これまでの投与実験の結果から、セレノプロテインPが2型糖尿病におけるインスリン抵抗性・高血糖の原因ホルモンのひとつであることが明らかとなった。そこで、short interference RNA (siRNA) を用いた肝臓におけるセレノプロテインP産生の抑制が2型糖尿病に対する新たな治療になりうるかを検討した。

自然発症肥満2型糖尿病モデル動物であるKKAYマウス(7~8週令、体重31~33g)に対し、hydrodynamic法を用いてセレノプロテインPに特異的なsiRNAを遺伝子導入した。方法は、Zender, L. et al. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 7797-802 (2003) および McCaffrey, A. P. et al. Nature 418, 38-9 (2002) に記載の方法に従った。動物導入用のsiRNAはAmbionから購入した(Silencer(登録商標) In Vivo Ready Pre-designed siRNA)。セレノプロテインPをノックダウンするsiRNAは以下の配列のごとく合成した: Mice Sepp1: 5' - GGUGUCAGAACACAUCGCA tt - 3' (sense) (ttを除いた配列を配列番号3に示す)。ネガティブコントロールのsiRNAはAmbionより購入した。ネガティブコントロールのsiRNAはマウス、ラットおよびヒトにおけるいずれの既知遺伝子に対しても有意な相同性を有さない。ペントバルビツールによってマウスに全身麻酔をほどこした後、2nmolのsiRNAを3.0mLのPBSに溶解し、尾静脈を介して約15~20秒間で投与した。siRNA投与2~7日後に12時間の絶食後糖負荷試験およびインスリン負荷試験をおこなった。0.3mg/g body weightのグルコースもしくは4U/kg body wei

10

20

30

40

50

g h t のインスリンを腹腔内投与し、15、30、60および120分後に血糖値を測定した。

セレノプロテインP 遺伝子特異的な s i R N A を経尾静脈から急速投与した結果、肝でのセレノプロテインP 遺伝子発現は約80%に減弱した(図15)。血中セレノプロテインP 濃度も同様に有意に低下した(図16)。肝でのセレノプロテインP 遺伝子をノックダウンしたK K A y マウスでは空腹時血糖値には変動を認めなかったが(図17)、糖負荷試験にて耐糖能異常の改善を(図18)、インスリン負荷試験にてインスリン抵抗性の改善を認めた(図19)。

h y d r o d y n a m i c 法を用いた遺伝子導入によって、肝臓におけるセレノプロテインP 産生の抑制が全身のインスリン抵抗性を改善し、2型糖尿病における負荷後高血糖を軽減させることが明らかとなった。以上の結果から、肝臓由来セレノプロテインP は2型糖尿病の重要な治療標的であることが証明された。さらに肝臓由来セレノプロテインP は、動脈硬化症、メタボリックシンドロームに代表されるその他のインスリン抵抗性関連疾患に対しても治療標的となりうる可能性があることが示された。

【産業上の利用可能性】

【0011】

セレノプロテインP がインスリン抵抗性および血管内皮障害の原因ホルモンのひとつであり、セレノプロテインP 濃度の測定は、全身のインスリン抵抗性または血管障害進展へのリスクを反映する新たな臨床マーカーとして有用である。セレノプロテインP をマーカーとして、2型糖尿病や動脈硬化性疾患等の疾患の病態を判定することが可能である。

また、セレノプロテインP は、血管系細胞にも直接作用を有することから、これらのセレノプロテインP を含む医薬、あるいはセレノプロテインP 抑制療法は、血管障害に対する画期的な治療法となり得る。

さらに、セレノプロテインP は、2型糖尿病および動脈硬化病変の治療標的となり得る。特に、糖尿病患者においては、高血糖、肝からのセレノプロテインP 分泌亢進、全身のインスリン抵抗性悪化、さらなる高血糖という悪循環が生じている可能性があり、血中セレノプロテインP 濃度を適正レベルまで低下させることで、糖毒性にともなうこれらの病態を劇的に改善させ得る。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

[配列表]

10

20

30

## SEQUENCE LISTING

<110> National University Corporation Kanazawa University

<120> Use of a liver-derived secreted protein associated with diabetes for diagnosing or treating type 2 diabetes or angiopathy

<130> PH-3197-PCT

10

<150> JP 2006-206747

<151> 2006-01-23

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2038

20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gcaggcccgt tggaaagtgt tgtgacaacc ccagcaatgt ggagaagcct ggggcttgcc 60
ctggetctct gtctcctccc atcgggagga acagagagcc aggaccaaag ctcttatgt 120
aagcaacccc cagcctggag cataagagat caagatcaa tgctaaactc caatggttca 180
gtgactgtgg ttgetcttct tcaagccagc tgatacctgt gcatcatoga ggcatactaa 240
ttagaagacc tgcgagtaaa actgaagaaa gaaggatatt ctaatatctc ttatatgttt 300
gttaatcatt aaggaatctc ttctcgatta aaatacacac atcttaagaa taaggtttca 360
gagcatattc ctgtttatca acaagaagaa aaccaaacag atgtctggac ttttttaaat 420
ggaagcaaag atgacttctc catatatgat agatgtggcc gtcttgata tcactttggt 480
ttgccttttt cttcctaac ttcccatat gtagaagaag ccattaagat tgettactgt 540
gaaaagaaat gtggaaactg ctctctcacg actctcaaag atgaagactt ttgtaaacgt 600
gtatctttgg ctactgtgga taaaacagtt gaaactccat cgcctcatta ccatcatgag 660
catcatcaca atcatggaca tcagcactt ggcagcagt agctttcaga gaatcagcaa 720
ccaggagcac caaatgetcc tactcatcct gctcctccag gccttcatca ccaccataag 780
cacaagggtc agcataggca gggtcacca gagaaccgag atatgccagc aagtgaagat 840
ttacaagatt tacaaaagaa gctctgtcga aagagatgta taaatcaatt actctgtaa 900
ttgccacag attcagagtt ggctectagg agctgatgct gccattgtcg acatctgata 960
tttgaaaaaa caggtctctc aatcacctga cagtgtaaag aaaacctccc atctttatgt 1020
agctgacagg gacttcgggc agaggagaac ataactgaat cttgtcagt acgtttgct 1080
ccagctgctt gacaaataag tcagcagctt ataccacag aagccagtgc cagttgacgc 1140
tgaaagaatc aggcacaaaa gtgagaatga ctttcaaact aatatttaa aataggacat 1200

```

30

40



actccccaat ttagtctaga cacaattca tttccagcat tttataaac taccaaatta 1260  
gtgaaccaa aatagaaatt agatttgtc aaacatggag aaatctactg aattggett 1320  
cagatittaa attttatgct atagaaatat tgactcaaac catatTTTTT atgatggagc 1380  
aactgaaagg tgattgcagc ttttggttaa tatgtctttt ttttctttt tccagtgttc 1440  
tatttgcttt aatgagaata gaaacgtaaa ctatgaccta ggggttttct gttggataat 1500  
tagcagttta gaatggagga agaacaacaa agacatgctt tccatTTTTT cctttactta 1560  
tctctcaaaa caatattact ttgtcttttc aatcttctac ttttaactaa taaaataagt 1620  
ggattttgta ttttaagatc cagaaatact taacacgtga atattttgct aaaaaagcat 1680  
atataactat tttaaatata catttatctt ttgtatatct aagactcctc ctgattttta 1740  
ctatcacaca tgaataaagg cctttgtatc tttctttctc taatgttgta tcatactctt 1800  
ctaaaacttg agtggctgtc ttaaaagata taaggggaaa gataatattg tctgtctcta 1860  
tattgcttag taagtatttc catagtcaat gatggtttaa taggtaaacc aaaccctata 1920  
aacctgacct cctttatggt taatactatt aagcaagaat gcagtacaga attggataca 1980  
gtacggattt gtccaaataa attcaataaa aaccttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa 2038

10

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 381

20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; 59, 300, 318, 330, 345, 352, 367, 369, 376, 378

&lt;223&gt; Xaa represents selenocysteine

&lt;400&gt; 2

30

Met Trp Arg Ser Leu Gly Leu Ala Leu Ala Leu Cys Leu Leu Pro Ser

1

5

10

15

Gly Gly Thr Glu Ser Gln Asp Gln Ser Ser Leu Cys Lys Gln Pro Pro

20

25

30

Ala Trp Ser Ile Arg Asp Gln Asp Pro Met Leu Asn Ser Asn Gly Ser

35

40

45

Val Thr Val Val Ala Leu Leu Gln Ala Ser Xaa Tyr Leu Cys Ile Ile

50

55

60

40

Glu Ala Ser Lys Leu Glu Asp Leu Arg Val Lys Leu Lys Lys Glu Gly

65

70

75

80

Tyr Ser Asn Ile Ser Tyr Ile Val Val Asn His Gln Gly Ile Ser Ser  
85 90 95

Arg Leu Lys Tyr Thr His Leu Lys Asn Lys Val Ser Glu His Ile Pro  
100 105 110

Val Tyr Gln Gln Glu Glu Asn Gln Thr Asp Val Trp Thr Leu Leu Asn  
115 120 125

10

Gly Ser Lys Asp Asp Phe Leu Ile Tyr Asp Arg Cys Gly Arg Leu Val  
130 135 140

Tyr His Leu Gly Leu Pro Phe Ser Phe Leu Thr Phe Pro Tyr Val Glu  
145 150 155 160

Glu Ala Ile Lys Ile Ala Tyr Cys Glu Lys Lys Cys Gly Asn Cys Ser  
165 170 175

20

Leu Thr Thr Leu Lys Asp Glu Asp Phe Cys Lys Arg Val Ser Leu Ala  
180 185 190

Thr Val Asp Lys Thr Val Glu Thr Pro Ser Pro His Tyr His His Glu  
195 200 205

His His His Asn His Gly His Gln His Leu Gly Ser Ser Glu Leu Ser  
210 215 220

30

Glu Asn Gln Gln Pro Gly Ala Pro Asn Ala Pro Thr His Pro Ala Pro  
225 230 235 240

Pro Gly Leu His His His His Lys His Lys Gly Gln His Arg Gln Gly  
245 250 255

His Pro Glu Asn Arg Asp Met Pro Ala Ser Glu Asp Leu Gln Asp Leu  
260 265 270

Gln Lys Lys Leu Cys Arg Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys  
275 280 285

40

Leu Pro Thr Asp Ser Glu Leu Ala Pro Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys  
290 295 300

Arg His Leu Ile Phe Glu Lys Thr Gly Ser Ala Ile Thr Xaa Gln Cys  
 305                                  310                                  315                                  320

Lys Glu Asn Leu Pro Ser Leu Cys Ser Xaa Gln Gly Leu Arg Ala Glu  
                                         325                                  330                                  335

Glu Asn Ile Thr Glu Ser Cys Gln Xaa Arg Leu Pro Pro Ala Ala Xaa  
                                         340                                  345                                  350

10

Gln Ile Ser Gln Gln Leu Ile Pro Thr Glu Ala Ser Ala Ser Xaa Arg  
                                         355                                  360                                  365

Xaa Lys Asn Gln Ala Lys Lys Xaa Glu Xaa Pro Ser Asn  
                                         370                                  375                                  380

<210> 3

20

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 3

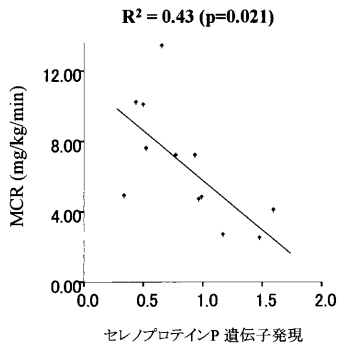
ggugucagaa cacaucgca

19

30

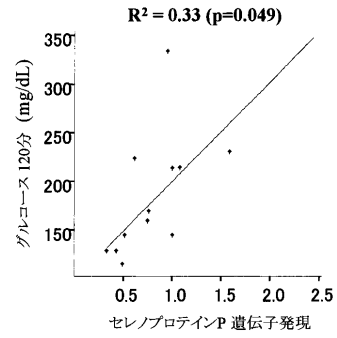
【 図 3 】

図 3



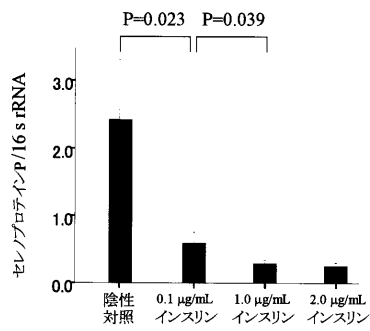
【 図 4 】

図 4



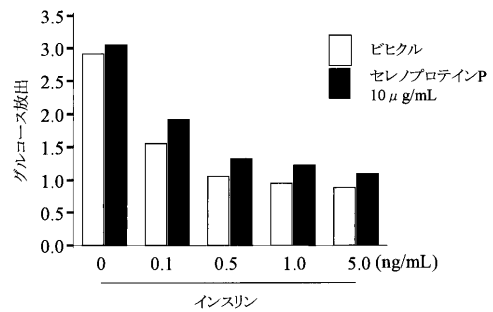
【 図 5 】

図 5



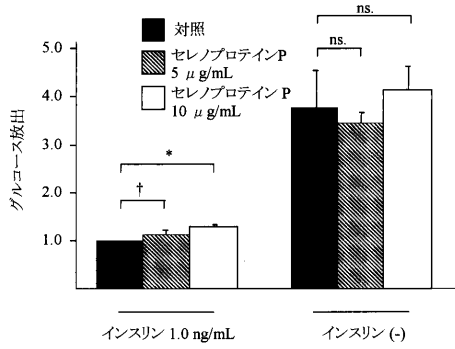
【 図 7 A 】

図 7 A



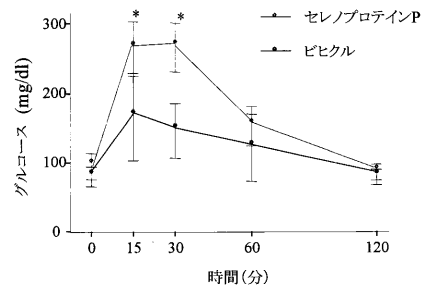
【 図 7 B 】

図 7 B



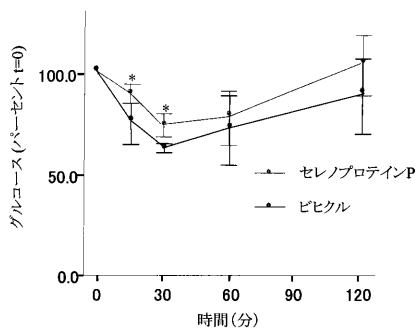
【 図 1 0 】

図 1 0



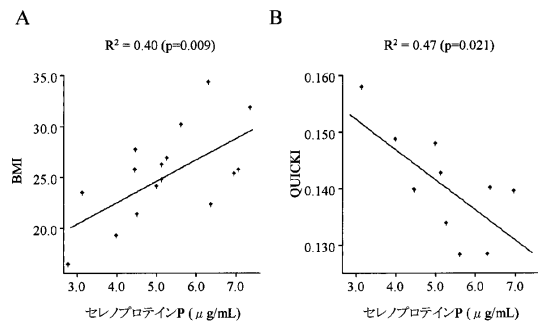
【 図 1 1 】

図 1 1



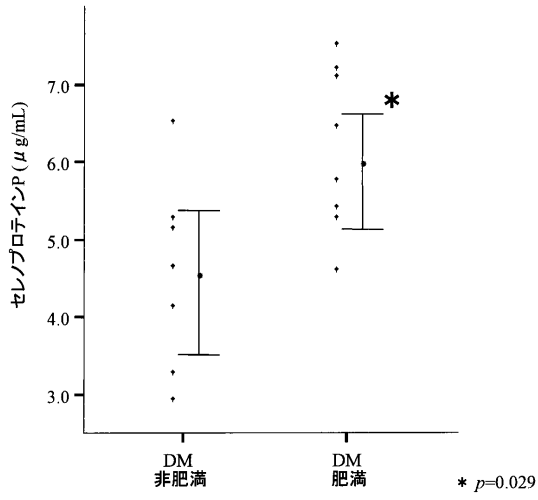
【 図 1 2 】

図 1 2



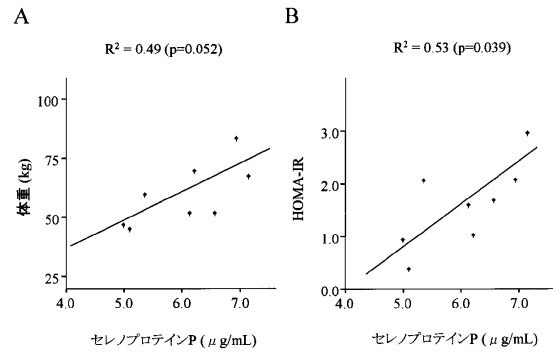
【 図 1 3 】

図 1 3



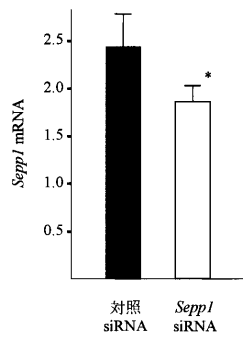
【 図 1 4 】

図 1 4



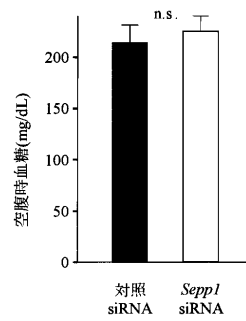
【 図 1 5 】

図 1 5



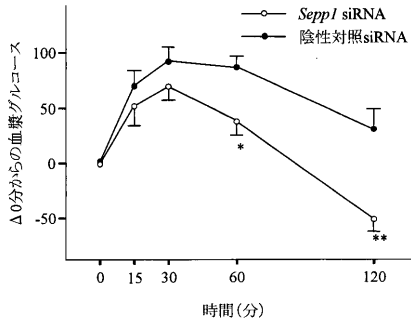
【 図 1 7 】

図 1 7



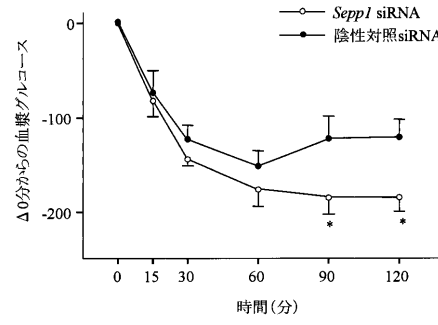
【 図 1 8 】

図 1 8



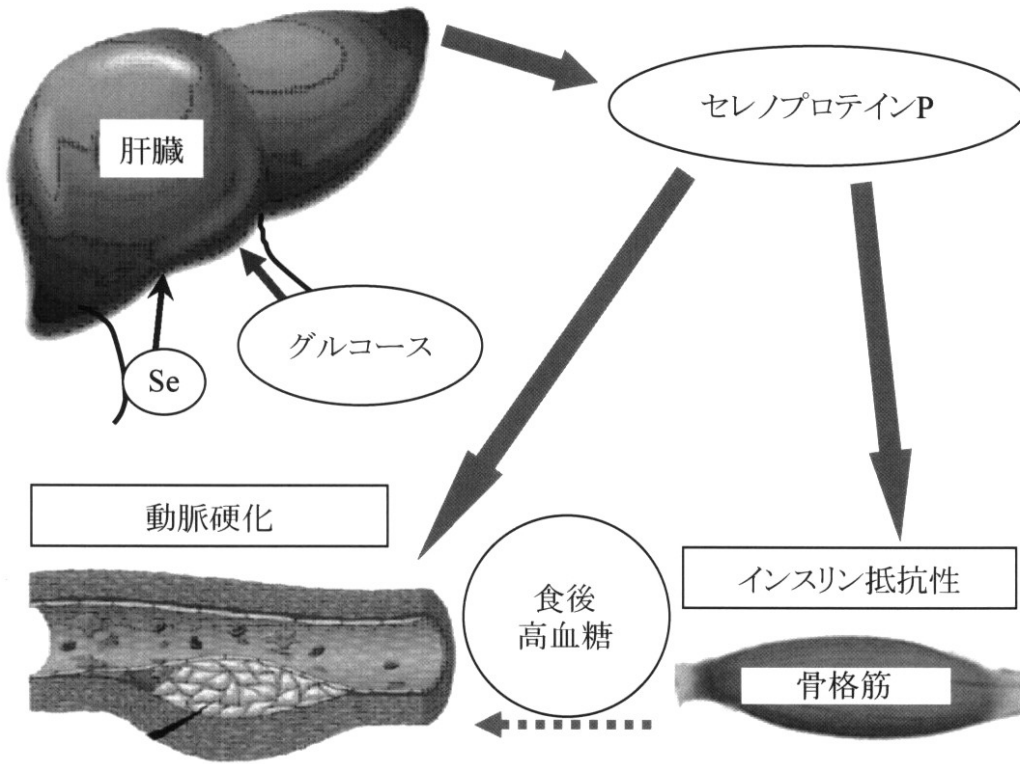
【 図 1 9 】

図 1 9



【図1】

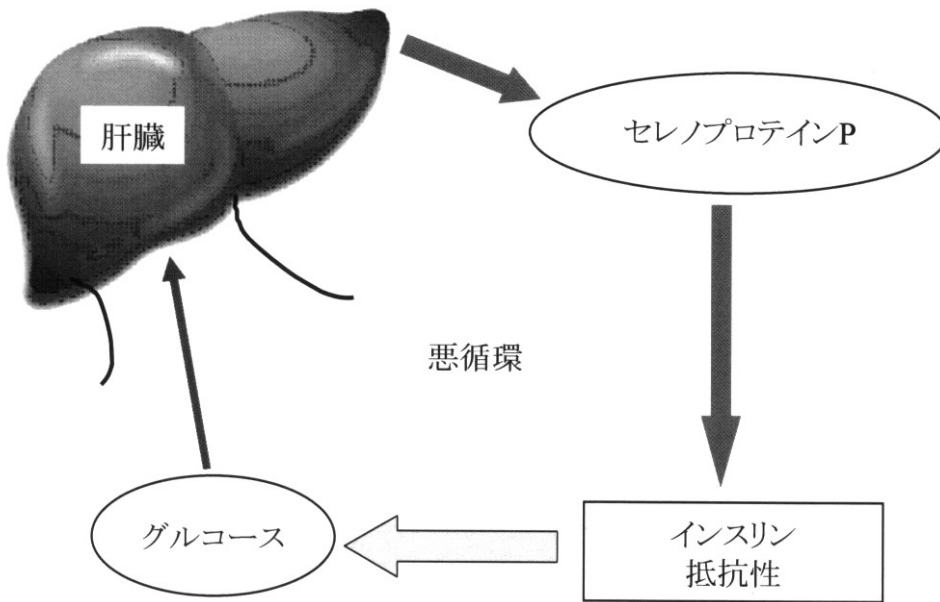
図1





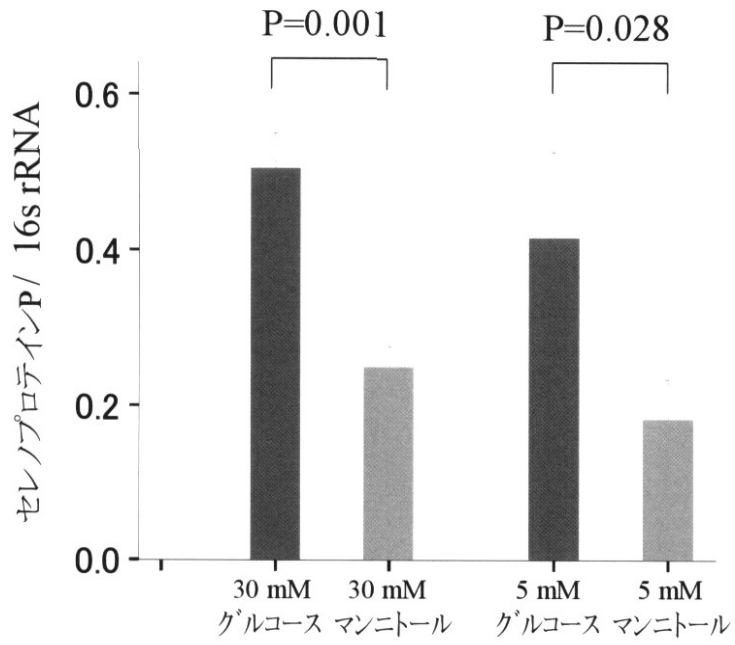
【図2】

図2



【 図 6 】

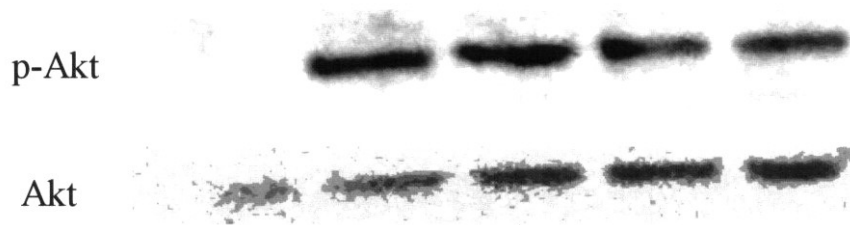
図 6



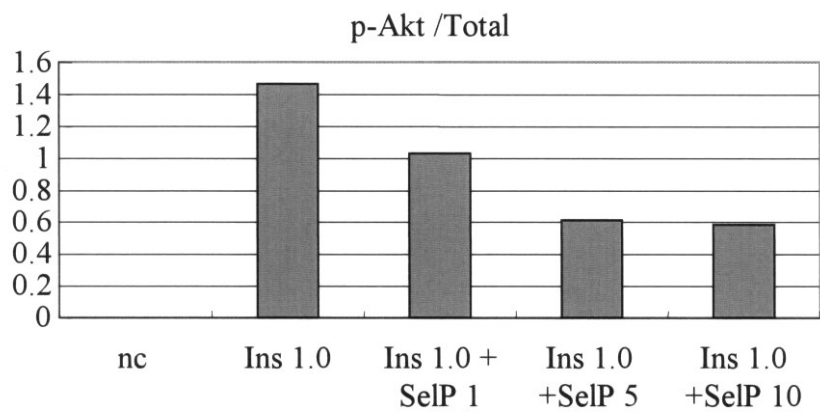
【 図 8 】

図 8

A



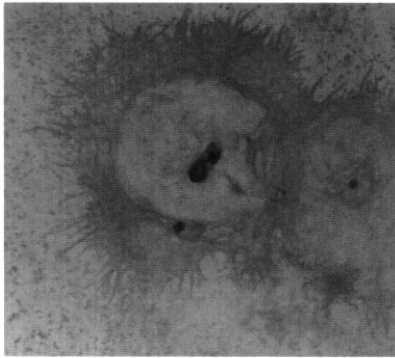
B



【図9】

図9

A



陰性対照

B



セレノプロテインP 5  $\mu$  g/mL

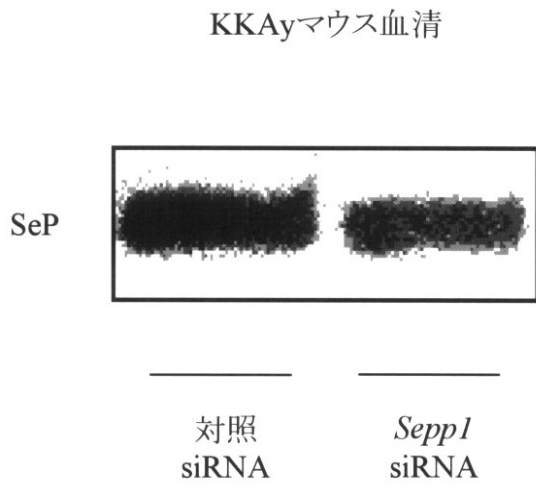
C



セレノプロテインP 25  $\mu$  g/mL

【図16】

図 16



## フロントページの続き

- (72)発明者 篁 俊成  
石川県金沢市角間町又7番地 国立大学法人金沢大学内
- (72)発明者 御簾 博文  
石川県金沢市角間町又7番地 国立大学法人金沢大学内
- (72)発明者 高倉 伸幸  
石川県金沢市角間町又7番地 国立大学法人金沢大学内

審査官 三木 隆

- (56)参考文献 HARA S., Effects of Selenium Deficiency on Expression of Selenoproteins in Bovine Arterial Endothelial Cells, Biol. Pharm. Bull., Vol.24, No.7, 2001, Page.754-759
- MCCLUNG J.P., Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.101, No.24, 2004, Page.8852-8857
- KARLSON Hakan K.R., Relationship between serum amyloid A level and Tanis/SeIS mRNA expression in skeletal muscle and adipose tissue from healthy and type 2 diabetic subjects, Diabetes, Vol.53, No.6, 2004, Page.1424-1428

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 Q 1 / 6 8  
 A 6 1 K 3 1 / 7 1 3  
 A 6 1 K 3 8 / 0 0  
 A 6 1 K 3 9 / 3 9 5  
 A 6 1 K 4 8 / 0 0  
 A 6 1 P 3 / 1 0  
 A 6 1 P 9 / 1 0  
 A 6 1 P 9 / 1 4  
 A 6 1 P 2 7 / 0 0  
 A 6 1 P 3 5 / 0 0  
 A 6 1 P 4 3 / 0 0  
 G 0 1 N 3 3 / 1 5  
 G 0 1 N 3 3 / 5 0  
 G 0 1 N 3 3 / 5 3  
 C 1 2 N 1 5 / 0 9  
 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 )