

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2009年11月19日(19.11.2009)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2009/139459 A1

- (51) 国際特許分類:  
A61K 45/00 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01) A61P 3/06 (2006.01)  
A61K 48/00 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)  
A61P 3/00 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/059045
- (22) 国際出願日: 2009年5月15日(15.05.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2008-128086 2008年5月15日(15.05.2008) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人 岡山大学(National University Corporation Okayama University) [JP/JP]; 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 Okayama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 四方 賢一 (SHIKATA, Kenichi) [JP/JP]; 〒7008558 岡山県岡山市北区鹿田町二丁目5番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内 Okayama (JP). 榎野 博史 (MAKINO, Hirofumi) [JP/JP]; 〒7008558 岡山県岡山市北区鹿田町二丁目5番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内 Okayama (JP). 佐藤 千景 (SATO, Chikage) [JP/JP]; 〒7008558 岡山県岡山市北区鹿田町二丁目5番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内 Okayama (JP).
- (74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 規則 4.17 に規定する申立て:  
— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則 4.17(v))
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))  
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))



WO 2009/139459 A1

(54) Title: METHOD FOR PREVENTION AND TREATMENT OF METABOLIC SYNDROME THROUGH THE INHIBITION OF PSGL-1

(54) 発明の名称: P S G L - 1 阻害によるメタボリックシンドロームの予防及び治療法

(57) Abstract: Disclosed is a prophylactic and/or therapeutic agent which can exhibit an effect by itself on the prevention and/or treatment of a basic condition of a lifestyle-related disease such as metabolic syndrome and type-2 diabetes. Also disclosed is a method for the screening of the prophylactic and/or therapeutic agent. Specifically disclosed is a prophylactic and/or therapeutic agent for metabolic diseases, which comprises an inhibitor of PSGL-1 as an active ingredient.

(57) 要約: 本発明は、メタボリックシンドロームや2型糖尿病などの生活習慣病における根本的病態の予防及び/又は治療に対して単独で効果をもたらし得る予防及び/又は治療剤やそのスクリーニング方法を提供することをその目的とする。上記課題は、P S G L - 1 に対する阻害物質を有効成分として含有する、代謝性疾患の予防及び/又は治療剤によって解決される。

## 明 細 書

発明の名称：

### PSGL-1 阻害によるメタボリックシンドロームの予防及び治療法

#### 技術分野

[0001] 本発明は、代謝性疾患の予防及び／又は治療剤及びそのスクリーニング方法に関する。より具体的には、本発明は、PSGL-1 に対する阻害物質を含有する、メタボリックシンドローム、2型糖尿病、耐糖能異常、肥満症又は脂質異常症などの代謝性疾患の予防及び／又は治療剤、並びにPSGL-1の機能阻害を指標とする代謝性疾患の予防及び／又は治療剤のスクリーニング方法に関する。

#### 背景技術

[0002] 先進各国において、生活習慣病、特にメタボリックシンドロームの罹患者が近年著しく増加しており、医療における重大な問題となっている。メタボリックシンドロームの患者においては、内臓脂肪型肥満、高血糖、高血圧、高脂血症などの症状が重積しており、これらの症状の重積により、心筋梗塞や脳梗塞などの動脈硬化性疾患を発症する可能性が高くなっている。メタボリックシンドロームの診断基準は世界的に統一されておらず、例えば我が国においては、内臓脂肪型肥満を必須項目とし、更に高血圧、高血糖及び血清脂質異常のうちの2項目以上に該当する場合にメタボリックシンドロームと診断される。

[0003] メタボリックシンドロームの近年の流行は、飽食と運動不足によるところが大きいため、その治療方針として食事療法及び運動療法がこれまで重視されてきた。しかしながら、これらの療法は、患者自身の生活習慣の根本的な改善を強いることが多く、それゆえ実現が困難であることが多い。一方、メタボリックシンドロームの主要な病態である高血圧、高血糖及び血清脂質異常のそれぞれに対する薬物療法も試みられており、例えば、高トリグリセリド／低HDL-コレステロール血症にはフィブラート系又はスタチン系薬剤

；糖代謝異常にはスルホニルウレア系薬剤、速効型インスリン分泌促進薬、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤又はインスリン抵抗性改善剤；高血圧にはアンジオテンシン変換酵素阻害剤又はアドレナリン $\alpha$ 受容体アンタゴニストなどが利用されている。しかしながら、これらの薬物療法は、医療費が高価であることや必ずしも治療効果が確実でないことなどの問題点がある。また、内臓脂肪型肥満に対する薬物療法としては、中枢性の食欲抑制剤による間接的な予防又は治療がなされているのみである。

[0004] メタボリックシンドロームや2型糖尿病をはじめとする生活習慣病の発症において、インスリン抵抗性の重要性が広く認識されている。インスリン抵抗性とは、骨格筋細胞、肝細胞、脂肪細胞などにおいて、インスリン感受性が低下することにより、インスリン分泌は保たれているものの、その作用が低下した状態をいう。インスリン抵抗性が高インスリン血症、次いで耐糖能異常、更には高血圧や脂質代謝異常を惹き起こすと考えられている（非特許文献1）。インスリン抵抗性の発症メカニズムは完全に明らかにされていないが、従来過栄養状態や運動不足によりもたらされる内臓脂肪の蓄積及び増加が重要視されてきた。更に、近年になって、肥満とインスリン抵抗性との間には炎症が介在していることが明らかにされてきており、脂肪細胞の肥大化・壊死とそれを冠状に取り囲むマクロファージの集積が、炎症とインスリン抵抗性をもたらしているという認識が広まっている。

[0005] P S G L - 1 は、白血球と血管内皮細胞との接着に関与する細胞表面の分子であるP-セレクチンのリガンドとしてクローニングされた膜タンパク質である（特許文献1、非特許文献2）。P S G L - 1 は、220 k D a のジスルフィド結合ホモダイマーシアロムチンであり、ほとんどの血液白血球（例えば、好中球、単球、マクロファージ、B細胞のサブセット、及び全てのT細胞）はP S G L - 1 を発現することが知られている。炎症において非常に重要な過程である傷害組織への白血球の遊走及び浸潤には多種多様な細胞接着分子が関与しており、炎症の初期段階に観察されるローリングと呼ばれる現象は、セレクチンとそれらに特異的な糖鎖リガンドとの相互作用（例え

ばP-セレクチンとPSGL-1との相互作用)を介して行われることが分かっていた(非特許文献3及び4)。しかしながら、メタボリックシンドロームや2型糖尿病をはじめとする生活習慣病の発症において、PSGL-1が重要な役割を果たしていることはこれまで知られていなかった。

### 先行技術文献

### 特許文献

[0006] 特許文献1: 特表平08-502886号公報

### 非特許文献

[0007] 非特許文献1: Reaven GM., *Diabetes*; 37(12): 1595-1607 (1988)

非特許文献2: Sako et al., *Cell*; 75(6): 1179-1186 (1993)

非特許文献3: Tedder TF et al., *FASEB J.*; 9(10): 866-73 (1995)

非特許文献4: Yang J et al., *Thromb Haemost.*; 81(1): 1-7 (1999)

### 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0008] 上述した当該技術分野における現状から分かるように、メタボリックシンドロームや2型糖尿病などの生活習慣病に対する有効且つ患者にとって容易な新規の治療及び予防法に対する需要が存在している。特に、それらの生活習慣病の基盤であるインスリン抵抗性、脂肪細胞の炎症、及び肥満に対して、単独で効果をもたらす薬剤に対する期待及び重要性は非常に大きいといえよう。本発明は、メタボリックシンドロームや2型糖尿病などの生活習慣病における根本的病態の予防及び/又は治療に対して単独で効果をもたらし得る予防及び/又は治療剤やそのスクリーニング方法を提供することを目的とする。

## 課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、大きな社会問題にもなっている糖尿病、高脂血症及び高血圧などの生活習慣病の予防及び治療に以前より力を注いできた。そのなかで、集積した生活習慣病の各病態を個別に予防又は治療するのではなく、生活習慣病の根本的病態を単独の治療で予防及び／又は治療し得る薬剤の必要性を痛切に感じ、そのための研究を重点的に行ってきた。その結果、細胞接着関連分子であるPSGL-1を阻害することにより、生活習慣病の根本的病態を予防及び／又は治療し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0010] 即ち、本発明は以下の通りである：

[1] PSGL-1に対する阻害物質を有効成分として含有する、代謝性疾患の予防及び／又は治療剤。

[2] 代謝性疾患が、メタボリックシンドローム、2型糖尿病、耐糖能異常、肥満症又は脂質異常症である、上記[1]記載の剤。

[3] PSGL-1に対する阻害物質が、PSGL-1に対する特異的中和抗体、或いはPSGL-1の発現を特異的に阻害可能なアンチセンス核酸若しくは小分子量干渉RNA、又はこれらを哺乳動物細胞内において発現可能な発現ベクターである、上記[1]記載の剤。

[4] 以下の工程を含む、代謝性疾患を予防又は治療し得る物質のスクリーニング方法：

(I) 被験物質がPSGL-1の機能を阻害するか検定すること、及び

(II) PSGL-1の機能を阻害した被験物質を代謝性疾患を予防又は治療し得る物質として選択すること。

[5] 代謝性疾患が、メタボリックシンドローム、2型糖尿病、耐糖能異常、肥満症又は脂質異常症である、上記[4]記載の方法。

## 発明の効果

[0011] 本発明の剤は、内臓脂肪へのマクロファージの浸潤を抑制し、以って脂肪組織における炎症及びインスリン抵抗性の発症を阻害し得る。従って、本発明の剤を使用することにより、食事療法又は運動療法を行うことなく、メタ

ポリックシンドローム、2型糖尿病、耐糖能異常、肥満症又は脂質異常症などの代謝性疾患に対する予防及び／又は治療効果を得ることが可能である。これらの代謝性疾患を予防及び／又は治療することにより、係る代謝性疾患に起因する動脈硬化性疾患の予防及び／又は進展抑制をすることも可能となる。本発明はまた、これらの代謝性疾患を予防又は治療し得る物質のスクリーニング方法も併せて提供する。

### 図面の簡単な説明

[0012] [図1] 8週齢db/dbマウス及びBL6マウスの体重、内臓脂肪重量及び各種代謝データの測定結果を示す図である（ $n=10$ 、平均±標準エラー、\*： $P<0.0001$ 、\*\*： $P<0.005$ ）。（A）は体重（g）、（B）は精巣周囲脂肪重量（g）、（C）は血清LDL（mg/dl）、（D）は随時血糖（mg/dl）、（E）は随時IRI（ng/ml）、（F）はHbA1c（%）の測定結果を示している。

[図2] 8週齢db/dbマウス及びBL6マウスの内臓脂肪における各種遺伝子発現の定量リアルタイムRT-PCRによる測定結果を示す図である（ $n=10$ 、平均±標準エラー、\*： $P<0.005$ 、\*\*： $P<0.05$ ）。（A）はF4/80、（B）はMCP-1、（C）はPSGL-1、（D）はP-セレクチン、（E）はE-セレクチン、（F）はICAM-1の測定結果を示している。縦軸はインデックス値を示している。

[図3] 19週齢高脂肪食負荷マウス及び低脂肪食負荷マウスの体重、内臓脂肪重量及び各種代謝データの測定結果を示す図である（白丸：低脂肪食負荷マウス（LF； $n=9$ ）、黒三角：高脂肪食負荷マウス（HF； $n=11$ ）、平均±標準エラー、\*： $P<0.0005$ 、\*\*： $P<0.001$ ）。（A）は体重（横軸：週齢数（w）、縦軸：体重（g））、（B）は精巣周囲脂肪重量（g）、（C）は血清LDL（mg/dl）、（D）は空腹時血糖（mg/dl）、（E）は空腹時IRI（ng/ml）、（F）はHbA1c（%）の測定結果を示している。

[図4] 19週齢高脂肪食負荷マウス及び低脂肪食負荷マウスに対するインスリ

ン負荷試験(I T T)及び腹腔内グルコース負荷試験(I P G T T)の結果を示す図である(白丸:低脂肪食負荷マウス(L F ; n = 9)、黒三角:高脂肪食負荷マウス(H F ; n = 11)、平均±標準エラー、\* : P < 0. 005、\*\* : P < 0. 05)。(A)はI P G T T血糖値(m g / d l)、(B)はI P G T T血漿インスリン値(n g / m l)、(C)はI T T血糖値のインスリン負荷前血糖値に対する割合(%)を示している。(A)~(C)において、横軸は負荷開始後の時間(分)を示す。なお、「前」は負荷前であることを意味する。

[図5] 19週齢高脂肪食負荷マウスの内臓脂肪組織における各種遺伝子発現の定量リアルタイムRT-PCRによる測定結果を示す図である(低脂肪食負荷マウス(L F) : n = 9、高脂肪食負荷マウス(H F) : n = 10、平均±標準エラー、\* : P < 0. 001)。(A)はCD68、(B)はMCP-1、(C)はPSGL-1、(D)はP-セレクチン、(E)はE-セレクチン、(F)はICAM-1の測定結果を示している。縦軸はインデックス値を示している。

[図6]高脂肪食負荷後の17週齢BL6マウス及びPSGL-1ノックアウトマウスにおける体重、内臓脂肪重量及び各種代謝データの測定結果を示す図である(高脂肪食負荷BL6マウス(WT-HF) : n = 7、高脂肪食負荷PSGL-1ノックアウトマウス(KO-HF) : n = 8、平均±標準エラー、\* : P < 0. 005、\*\* : P < 0. 05)。(A)は体重(g)、(B)は精巣周囲脂肪重量/体重比(%)、(C)は総コレステロール(m g / d l)、(D)はLDL(m g / d l)、(E)は中性脂肪(m g / d l)、(F)は血清FFA( $\mu$ Eq/l)、(G)は空腹時血糖(m g / d l)、(H)は空腹時IRI(n g / m l)、(I)はHbA1c(%)、(J)は血清レプチン(n g / m l)、(K)は血清アディポネクチン( $\mu$ g / m l)の測定結果を示している。

[図7]高脂肪食負荷後のBL6マウス及びPSGL-1ノックアウトマウスに対するインスリン負荷試験(I T T)及び腹腔内グルコース負荷試験(I P G T T

T)の結果を示す図である(白丸:高脂肪食負荷BL6マウス(WT-HF; n=9)、黒三角:高脂肪食負荷PSGL-1ノックアウトマウス(KO-HF; n=8)、平均±標準エラー、\*:P<0.05)。(A)はIPGTT血糖値(mg/dl)、(B)はIPGTT血漿インスリン値(ng/ml)、(C)はITT血糖値のインスリン負荷前血糖値に対する割合(%)を示している。(A)~(C)において、横軸は負荷開始後の時間(分)を示す。なお、「前」は負荷前であることを意味する。

[図8]高脂肪食負荷後のBL6マウス及びPSGL-1ノックアウトマウスにおける内臓脂肪組織の染色像、及び内臓脂肪細胞の面積を示す図である。(A)は高脂肪食負荷BL6マウス(WT-HF; n=1818細胞)の内臓脂肪のPAS染色像(x200)、(B)は高脂肪食負荷PSGL-1ノックアウトマウス(KO-HF; n=1834細胞)の内臓脂肪のPAS染色像(x200)、(C)は高脂肪食負荷BL6マウス(WT-HF)及びPSGL-1ノックアウトマウス(KO-HF)の内臓脂肪細胞の面積( $\mu\text{m}^2$ ; 平均±標準エラー、\*:P<0.0001)を示している。

[図9]高脂肪食負荷後のBL6マウス及びPSGL-1ノックアウトマウスの内臓脂肪における各種遺伝子発現の定量リアルタイムRT-PCRによる測定結果を示す図である(高脂肪食負荷BL6マウス(WT-HF):n=7、高脂肪食負荷PSGL-1ノックアウトマウス(KO-HF):n=7、平均±標準エラー、\*:P<0.01、\*\*:P<0.05)。(A)はF4/80、(B)はMCP-1、(C)はNOS 2(iNOS)、(D)はレプチンの測定結果を示している。縦軸はインデックス値を示す。

[図10]高脂肪食負荷後のBL6マウス(WT-HF)及びPSGL-1ノックアウトマウス(KO-HF)における肝臓重量および肝臓中性脂肪含量ならびに肝臓のHE染色像を示す図である。(A)の左グラフは両マウスの肝臓重量(単位:g)を示しており、右グラフは両マウスの肝臓中性脂肪含量(単位:mg/g)を示している。(B)は両マウスについてそれぞれ肝臓組織のHE染色像(x200)を示している。



## 発明を実施するための形態

- [0013] 本発明は、PSGL-1に対する阻害物質を有効成分として含有する、代謝性疾患の予防及び／又は治療剤を提供する。
- [0014] 本発明の剤の阻害対象である「PSGL-1」は、O-グリコシル化細胞外シアロムチンを有する公知の接着分子である。PSGL-1としては、上記特許文献1に開示されているヒトPSGL-1、若しくは他の様々な哺乳動物におけるそのオルソログ、例えば、マウスPSGL-1 (Yang J. 他, Blood, May 15; 87 (10) : 4176-86 (1996))、又はそれらの天然のアレル体などを挙げる事ができる。PSGL-1のアミノ酸配列及びcDNA (mRNA) 配列も公知である。ヒトPSGL-1及びマウスPSGL-1のアミノ酸配列及びcDNA配列を、それぞれ配列番号1乃至4に例示する (配列番号1 : ヒトPSGL-1のmRNA配列 (NCBIアクセッション番号 NM\_003006) ; 配列番号2 : 配列番号1のmRNA配列によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列 (NCBIアクセッション番号 NP\_002997) ; 配列番号3 : マウスPSGL-1のmRNA配列 (NCBIアクセッション番号 NM\_009151) ; 配列番号4 : 配列番号3のmRNA配列によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列 (NCBIアクセッション番号 NP\_033177)) 。
- [0015] 本発明の剤における有効成分である、「PSGL-1に対する阻害物質」には、PSGL-1タンパク質の活性を阻害する物質 (以下、PSGL-1活性阻害物質ともいう) とPSGL-1の発現を阻害する物質 (以下、PSGL-1発現阻害物質ともいう) とが含まれる。なお、本明細書において用語「阻害」とは、阻害対象 (例えば、活性又は発現) を完全に或いは部分的に抑制又は減少させることを意味する。
- [0016] PSGL-1の活性とは、セレクチンへの結合活性を意味する。セレクチンとしては、P-セレクチン、E-セレクチン及びL-セレクチンを挙げる事ができるが、PSGL-1はP-セレクチンへの親和性が最も高い。本

発明の剤で用いることのできるPSGL-1活性阻害物質としては、例えば、特異的中和抗体（抗PSGL-1ポリクローナル抗体、抗PSGL-1モノクローナル抗体など）、セレクチン（P-セレクチンなど）との結合を阻害する物質（例えば、フコイダン、スルファチド、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ケラタン硫酸などのグリコサミノグリカンなど）、活性中心に結合する低分子物質などを挙げることができ、特異的中和抗体が好ましく、抗PSGL-1モノクローナル抗体がより好ましい。また、セレクチンに対する特異的中和抗体（抗P-セレクチンポリクローナル抗体、抗P-セレクチンモノクローナル抗体など）、可溶性セレクチンなどもPSGL-1活性阻害物質として用いることができる。PSGL-1活性阻害物質は、後述するスクリーニング方法を用いて、選択、同定又は確認することができる。

[0017] 本発明で用いることのできるPSGL-1発現阻害物質としては、例えば、PSGL-1の発現を特異的に阻害可能なアンチセンス核酸若しくは小分子量干渉RNA（small interfering RNA；siRNA）、PSGL-1 mRNAを特異的に切断可能なリボザイム、これらを哺乳動物細胞内において発現可能な発現ベクターなどを挙げることができる。また、PSGL-1発現阻害物質の例として、インフリキシマブ（レミケード）などの抗TNF $\alpha$ 抗体製剤、エタネルセプト（エンブレル）などの可溶性TNF $\alpha$ 受容体製剤、メソトレキセート（リウマトレックス）、タクロリムス；FK506（プロGRAF）、シクロスポリン；CyA（ネオーラル）、シクロフォスファミド（エンドキサン）、アザチオプリン（イムラン）、ミゾリビン（ブレディニン）、MMF（セルセプト）などの免疫抑制剤などを挙げることができる。PSGL-1発現阻害物質は、後述するスクリーニング方法を用いて、選択、同定又は確認することができる。

[0018] 上記アンチセンス核酸としては、PSGL-1の転写産物（mRNA又は初期転写産物）と特異的にハイブリダイズして、PSGL-1の翻訳を阻害し得る核酸をいう。核酸としては、DNAであっても、RNAであっても、

或いはDNA/RNAキメラであっても良い。

アンチセンス核酸の長さとしては、PSGL-1の転写産物と特異的にハイブリダイズし得る限り特に制限はないが、合成の容易さや抗原性の観点などから、下限としては通常10塩基以上、好ましくは15塩基以上のものが挙げられ、上限としては通常100塩基以下、好ましくは30塩基以下、より好ましくは24塩基以下のものが挙げられる。従って、アンチセンス核酸としては、例えば10塩基以上100塩基以下、好ましくは15塩基以上30塩基以下、より好ましくは15塩基以上24塩基以下のオリゴヌクレオチドが使用され得る。

また、アンチセンス核酸の標的配列についても、アンチセンス核酸がハイブリダイズすることによりPSGL-1の翻訳が阻害される配列であれば特に制限はなく、mRNAの全配列であっても部分配列（通常10塩基以上、好ましくは15塩基以上；且つ通常100塩基以下、好ましくは30塩基以下、より好ましくは24塩基以下）であってもよいし、あるいは初期転写産物のイントロン部分であってもよいが、アンチセンス核酸としてオリゴヌクレオチドを使用する場合は、標的配列はPSGL-1のmRNAの5'末端からコード領域のC末端までに位置することが望ましい。

アンチセンス核酸の具体例としては、例えばヒトPSGL-1の場合、配列番号：1に記載したmRNAの1-1369位までの塩基配列に含まれる、通常10塩基以上、好ましくは15塩基以上、且つ通常100塩基以下、好ましくは30塩基以下、より好ましくは24塩基以下の長さの塩基配列に相補的な配列を持つオリゴヌクレオチドが挙げられ、或いは例えばマウスPSGL-1の場合、配列番号：3に記載したmRNAの1-1412位までの塩基配列に含まれる、通常10塩基以上、好ましくは15塩基以上、且つ通常100塩基以下、好ましくは30塩基以下、より好ましくは24塩基以下の長さの塩基配列に相補的な配列を持つオリゴヌクレオチドが挙げられる。

上記アンチセンス核酸の合成は自体公知の方法で行えば良く、例えば、所

望の塩基配列を持つオリゴヌクレオチドを市販のDNA/RNA自動合成機を用いて合成すれば良い。

[0019] 上記 siRNA は、PSGL-1 の転写産物 (mRNA 又は初期転写産物) のコード領域内の部分配列 (通常 18 塩基以上、好ましくは 21 塩基以上、且つ通常 30 塩基以下、好ましくは 27 塩基以下、より好ましくは 23 塩基以下; 初期転写産物の場合はイントロン部分を含む) に相補的な配列を有する二本鎖オリゴRNA であり、当該転写産物を特異的に認識して切断することにより PSGL-1 の発現を阻害し得るものであれば特に制限されない。siRNA の長さは、通常 21 ~ 23 塩基である。当業者は、配列番号: 1 に記載したヒト PSGL-1 の mRNA 配列又は配列番号: 3 に記載したマウス PSGL-1 の mRNA 配列をもとに、ヒト又はマウスの PSGL-1 の発現を阻害するために使用され得る siRNA のセンス鎖及びアンチセンス鎖の配列を決定することができる。

siRNA の合成は自体公知の方法で行えば良く、例えば、センス鎖及びアンチセンス鎖を DNA/RNA 自動合成機でそれぞれ合成し、それらをアニリングさせることにより合成することができる。

[0020] また、上記発現ベクターとしては、当該技術分野で使用される任意のものを使用することができ、例えば、大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド (例、pSH19, pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが挙げられる。

[0021] 本明細書において、用語「代謝性疾患」とは、様々な栄養素 (例、タンパク質、脂質、糖質、無機塩類、ビタミンなど) の代謝経路において、先天的又は後天的な原因が働いて様々な段階で障害が起こり、その結果、血液中又は特定の臓器で代謝産物が過剰になったり或いは不足したりすることに起因

する疾患又は状態を意味する。代謝性疾患の例としては、メタボリックシンドローム、糖尿病（1型糖尿病、2型糖尿病、妊娠糖尿病など）、耐糖能異常、肥満症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、脂質異常症（高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、低HDL血症、食後高脂血症など）、高血圧症などが挙げられる。

[0022] メタボリックシンドロームの診断基準について、日本では、2005年に日本内科学会など8学会の委員で構成されたメタボリックシンドローム診断基準検討委員会によって制定され、報告された。

この報告によれば、メタボリックシンドロームとは、内臓脂肪蓄積（ウエスト周囲径が男性は85cm以上、女性は90cm以上）を必須項目として、それに加えて脂質代謝異常（高トリグリセリド血症（150mg/dl以上）且つ／又は低HDLコレステロール血症（40mg/dl未満））、高血圧（収縮期血圧が130mmHg以上、且つ／又は拡張期血圧が85mmHg以上）及び高血糖（空腹時血糖が110mg/dl以上）からなる3項目のうちの2項目以上が該当する場合をいう。

[0023] メタボリックシンドロームの診断基準は、欧米では米国高脂血症治療ガイドライン：National Cholesterol Education ProgramのAdult Treatment Panel III（NCEP-ATP III）及びWHOより提唱されている（JAMA 2001；285：2486-97、及びDiabet. Med. 1998；15：539-553を参照）。NCEP-ATP IIIでは肥満（胴囲測定）、高中性脂肪、低HDLコレステロール、高血圧及び高血糖のうち以下の条件に3つ以上該当する場合と定義されている。

- 1) ウエスト（腹囲）が男性で102cm以上、女性で88cm以上；
- 2) 空腹時トリグリセリドが150mg/dl以上；
- 3) HDLコレステロールが男性で40mg/dl未満、女性で50mg/dl未満；
- 4) 血圧が最大血圧で130mmHg以上又は最小血圧で85mmHg以

上；

5) 空腹時血糖値が $110\text{mg}/\text{dl}$ 以上。

一方、WHOの診断基準では、高インスリン血症（非糖尿病患者の上位25%）又は空腹時血糖 $110\text{mg}/\text{dl}$ 以上に加え、内臓肥満、脂質代謝異常、高血圧、マイクロアルブミン尿症のうち以下の条件に2つ以上該当する場合と定義されている。

1) 内臓肥満：ウエスト／ヒップ比 $>0.9$ （男性）、 $>0.85$ （女性）又はBMIが30を上回る；

2) 脂質代謝異常：血漿トリグリセリド $150\text{mg}/\text{dl}$ 以上；

3) 高血圧：最大血圧 $140$ ／最小血圧 $90\text{mmHg}$ 以上又は降圧剤内服中；

4) マイクロアルブミン尿症：尿中アルブミン排泄率 $20\mu\text{g}/\text{min}$ 以上又は尿中アルブミン／クレアチニン比 $30\text{mg}/\text{g}$ 以上。

本発明の剤は、上記した診断基準により決定されるメタボリックシンドロームの予防及び／又は治療剤として使用され得る。

[0024] 糖尿病の判定基準については、1999年に日本糖尿病学会から新たな判定基準が報告されている。

この報告によれば、糖尿病とは、空腹時血糖値（静脈血漿におけるグルコース濃度）が $126\text{mg}/\text{dl}$ 以上、75g経口ブドウ糖負荷試験（75gOGTT）2時間値（静脈血漿におけるグルコース濃度）が $200\text{mg}/\text{dl}$ 以上、随時血糖値（静脈血漿におけるグルコース濃度）が $200\text{mg}/\text{dl}$ 以上のいずれかを示す状態である。また、上記糖尿病に該当せず、かつ、「空腹時血糖値（静脈血漿におけるグルコース濃度）が $110\text{mg}/\text{dl}$ 未満または75g経口ブドウ糖負荷試験（75gOGTT）2時間値（静脈血漿におけるグルコース濃度）が $140\text{mg}/\text{dl}$ 未満を示す状態」（正常型）でない状態を、「境界型」と呼ぶ。

[0025] また、糖尿病の判定基準については、1997年にADA（米国糖尿病学会）から、1998年にWHOから、新たな判定基準が報告されている。

これらの報告によれば、糖尿病とは、空腹時血糖値（静脈血漿におけるグルコース濃度）が $126\text{ mg/dl}$ 以上であり、 $75\text{ g}$ 経口ブドウ糖負荷試験2時間値（静脈血漿におけるグルコース濃度）が $200\text{ mg/dl}$ 以上を示す状態である。

また、上記報告によれば、耐糖能異常とは、空腹時血糖値（静脈血漿におけるグルコース濃度）が $110\text{ mg/dl}$ 以上、 $126\text{ mg/dl}$ 未満であり、かつ、 $75\text{ g}$ 経口ブドウ糖負荷試験2時間値（静脈血漿におけるグルコース濃度）が $140\text{ mg/dl}$ 以上 $200\text{ mg/dl}$ 未満を示す状態である。さらに、ADAの報告によれば、空腹時血糖値（静脈血漿におけるグルコース濃度）が $110\text{ mg/dl}$ 以上 $126\text{ mg/dl}$ 未満の状態をIFG（Impaired Fasting Glucose）と呼ぶ。一方、WHOの報告によれば、 $75\text{ g}$ 経口ブドウ糖負荷試験2時間値（静脈血漿におけるグルコース濃度）が $140\text{ mg/dl}$ 以上、 $200\text{ mg/dl}$ 未満である状態をIGT（Impaired glucose tolerance）と呼ぶ。

本発明の剤は、上記した新たな判定基準により決定される糖尿病、耐糖能異常（IFG、IGT）の予防及び／又は治療剤としても使用され得る。

[0026] 本発明の剤は、そのままあるいは薬理的に許容し得る担体を配合し、経口的または非経口的に投与することができる。薬理的に許容し得る担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質が用いられ、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤；液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤などとして配合される。また必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤などの製剤添加物を用いることもできる。

[0027] 本発明の医薬は、経口投与する場合の剤形としては、例えば、錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤、マイクロカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などが挙げられ、また、非経口投与する場合の剤形としては、例えば、注

射剤、注入剤、点滴剤、坐剤などが挙げられる。また、適当な基剤（例、酪酸の重合体、グリコール酸の重合体、酪酸-グリコール酸の共重合体、酪酸の重合体とグリコール酸の重合体との混合物、ポリグリセロール脂肪酸エステルなど）と組み合わせて徐放性製剤とすることも有効である。

[0028] 本発明の医薬中のPSGL-1に対する阻害物質の含有量は、医薬製剤の形態に応じて相違するが、通常製剤全体に対して2ないし85重量%、好ましくは5ないし70重量%である。

[0029] PSGL-1に対する阻害物質を上記の剤形に製する方法としては、当該分野で一般的に用いられている公知の製造方法を適用することができる。また、上記の剤形に製する場合には、必要に応じて、その剤形に製する際に製剤分野において通常用いられる賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤などの担体、甘味剤、界面活性剤、懸濁化剤、乳化剤などの各種製剤添加物などを適宜、適量含有させて製造することができる。

[0030] 例えば、PSGL-1に対する阻害物質を錠剤に製する場合には、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤などを含有させて製造することができ、丸剤および顆粒剤に製する場合には、賦形剤、結合剤、崩壊剤などを含有させて製造することができる。また、散剤およびカプセル剤に製する場合には賦形剤などを、シロップ剤に製する場合には甘味剤などを、乳剤または懸濁剤に製する場合には懸濁化剤、界面活性剤、乳化剤などを含有させて製造することができる。

[0031] 賦形剤の例としては、乳糖、白糖、ブドウ糖、でんぷん、ショ糖、微結晶セルロース、カンゾウ末、マンニトール、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、硫酸カルシウムなどが挙げられる。

[0032] 結合剤の例としては、5ないし10重量%デンプンのり液、10ないし20重量%アラビアゴム液またはゼラチン液、1ないし5重量%トラガント液、カルボキシメチルセルロース液、アルギン酸ナトリウム液、グリセリンなどが挙げられる。

[0033] 崩壊剤の例としては、でんぷん、炭酸カルシウムなどが挙げられる。



- [0034] 滑沢剤の例としては、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、精製タルクなどが挙げられる。
- [0035] 甘味剤の例としては、ブドウ糖、果糖、転化糖、ソルビトール、キシリトール、グリセリン、単シロップなどが挙げられる。
- [0036] 界面活性剤の例としては、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリソルベート 80、ソルビタンモノ脂肪酸エステル、ステアリン酸ポリオキシシル 40などが挙げられる。
- [0037] 懸濁化剤の例としては、アラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ベントナイトなどが挙げられる。
- [0038] 乳化剤の例としては、アラビアゴム、トラガント、ゼラチン、ポリソルベート 80などが挙げられる。
- [0039] 更に、PSGL-1に対する阻害物質を上記の剤形に製造する場合には、所望により、製剤分野において通常用いられる着色剤、保存剤、芳香剤、矯味剤、安定剤、粘稠剤などを適量添加することができる。
- [0040] PSGL-1に対する阻害物質を含有する本発明の医薬は、安定かつ低毒性で安全に使用することができる。その1日の投与量は患者の状態や体重、PSGL-1に対する阻害物質の種類、投与経路などによって異なるが、当業者はこれらの要素を考慮して適切な量を決定することができる。また、投与は、1日1回の投与であっても、或いは2ないし3回に分けての投与であってもよい。
- [0041] PSGL-1に対する阻害物質を非経口的に投与する場合は、通常、液剤（例、注射剤）の形で投与する。その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形にして、通常体重1kgあたり約0.1mg～約100mgを静脈注射により投与するのが好都合である。注射剤としては、静脈注射剤のほか、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などが含まれ、また持続性製剤としては、イオントフォレシス経皮剤などが含まれる。かかる注射剤は、自体公知の方法、

すなわち、PSGL-1に対する阻害物質を無菌の水性液もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製される。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（例、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート80、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、ゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤（例、安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなど）などと併用してもよい。また、緩衝剤（例、リン酸緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例、ベンジルアルコール、フェノールなど）などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、アンプルに充填される。

[0042] 本発明の剤は、先に例示したような代謝性疾患（例えば、メタボリックシンドローム、2型糖尿病、耐糖能異常、肥満症、脂質異常症（高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、低HDL血症、食後高脂血症など）など）に対して、単独で予防及び／又は治療効果をもたらす得る。しかしながら、PSGL-1に対する阻害物質を上記のような各疾患に適用する際には、それらの疾患に通常使用される薬剤又は治療法と適宜併用することも可能である。PSGL-1に対する阻害物質と他の薬剤を併用する場合、PSGL-1に対する阻害物質と併用薬剤の投与形態は特に限定されず、投与時に、PSGL-1に対する阻害物質と併用薬剤とが組み合わせられていればよい。このような投与形態としては、例えば、（1）PSGL-1に対する阻害物質と併用薬剤とを同時に製剤化して得られる単一の製剤の投与、（2）PSGL-1に対する阻害物質と併用薬剤とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の同一投与経路での同時投与、（3）PSGL-1に対する阻害物質と併用薬剤とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の同一投与経路での時間

差をおいての投与、(4) PSGL-1に対する阻害物質と併用薬剤とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の異なる投与経路での同時投与、(5) PSGL-1に対する阻害物質と併用薬剤とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の異なる投与経路での時間差をおいての投与(例、本発明の剤→併用薬剤の順序での投与、あるいは逆の順序での投与)などが挙げられる。併用薬剤の投与量は、临床上用いられている用量を基準として適宜選択することができる。また、PSGL-1に対する阻害物質と併用薬剤の配合比は、投与対象、投与ルート、対象疾患、症状、組み合わせなどにより適宜選択することができる。例えば、投与対象がヒトである場合、PSGL-1に対する阻害物質1重量部に対し、併用薬剤を0.01乃至100重量部用いればよい。

[0043] 本発明はまた、代謝性疾患を予防又は治療し得る物質のスクリーニング方法を提供する。当該スクリーニング方法は、以下の工程を含む：

(I) 被験物質がPSGL-1の機能(即ち、活性又は発現)を阻害するか検定すること、及び

(II) PSGL-1の機能を阻害した被験物質を代謝性疾患を予防又は治療し得る物質として選択すること。

当該スクリーニング方法において、用語「代謝性疾患」は、その予防及び/又は治療剤の説明において記述したものと同義である。

以下、本発明のスクリーニング方法を詳述する。

[0044] スクリーニング方法に供される被験物質は、いかなる公知化合物及び新規化合物であってもよく、例えば、核酸、糖質、脂質、タンパク質、ペプチド、有機低分子化合物、コンビナトリアルケミストリー技術を用いて作製された化合物ライブラリー、固相合成やファージディスプレイ法により作製されたランダムペプチドライブラリー、あるいは微生物、動植物、海洋生物等由来の天然成分等が挙げられる。被験物質は、標識されていても未標識であってもよく、また、標識体と未標識体を所定の割合で含む混合物も被験物質として使用できる。標識用物質としては、例えば、FITC、FAM等の蛍光

物質、ルミノール、ルシフェリン、ルシゲニン等の発光物質、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{123}\text{I}$ 等の放射性同位体、ビオチン、ストレプトアビジン等の親和性物質などが挙げられる。

[0045] [PSGL-1 活性阻害物質のスクリーニング方法]

PSGL-1の活性を阻害する物質（PSGL-1 活性阻害物質）としては、PSGL-1とセレクチン（例えば、P-セレクチン）との結合を阻害する物質が挙げられる。以下、PSGL-1とセレクチンとの結合を阻害する物質（以下、PSGL-1 結合阻害物質ともいう）のスクリーニング方法について説明する。

PSGL-1 結合阻害物質のスクリーニング方法（以下、スクリーニング方法Aともいう）は、以下の工程（a）、（b）及び（c）を含む：

- （a）被験物質の存在下、セレクチンをPSGL-1に接触させる工程；
- （b）被験物質の存在下におけるセレクチンとPSGL-1との結合能を測定し、該結合能を被験物質の非存在下におけるセレクチンとPSGL-1との結合能と比較する工程；
- （c）上記（b）の比較結果に基づいて、セレクチンとPSGL-1との結合能の低下をもたらす被験物質を代謝性疾患を予防又は治療し得る物質として選択する工程。

[0046] スクリーニング方法Aの工程（a）では、被験物質、セレクチンのいずれもがPSGL-1と接触条件下におかれる。被験物質の存在下でのセレクチンのPSGL-1に対する接触は、被験物質の存在下、セレクチン又はその発現細胞を、PSGL-1又はその発現細胞に接触させることにより行われ得る。また、PSGL-1に対して被験物質、セレクチンを接触させる順番は特に限定されず、いずれかを先にPSGL-1に接触させても、同時に接触させてもよい。

セレクチン及びPSGL-1は自体公知の方法により調製できる。それらは、例えば、セレクチン又はPSGL-1の発現細胞（それぞれ、例えば、血管内皮細胞及び白血球）から単離・精製できる。しかしながら、迅速、容

易かつ大量にそれらのタンパク質を調製し、また、それらのヒトタンパク質を調製するためには、遺伝子組換え技術により組換えタンパク質を調製するのが好ましい。組換えタンパク質は、細胞系、無細胞系のいずれで調製したものでよい。

セレクチン又はPSGL-1発現細胞は、セレクチン又はPSGL-1を発現するものである限り特に限定されず、上述したセレクチン又はPSGL-1の発現細胞、セレクチン又はPSGL-1発現ベクターで形質転換された細胞などであり得る。該細胞は、当業者であれば容易に同定又は調製でき、初代培養細胞、当該初代培養細胞から誘導された細胞株、市販の細胞株、セルバンクより入手可能な細胞株などを使用できる。

[0047] スクリーニング方法Aの工程(b)では、まず、被験物質の存在下、セレクチンとPSGL-1との結合能が測定される。測定される「結合能」としては、セレクチンとPSGL-1との結合を評価できるものである限り特に限定されないが、結合量、結合強度(親和定数、結合速度定数、解離速度定数などのパラメーターを含む)、結合様式(濃度依存的結合を含む)が挙げられる。結合能の測定は、例えば、上述の標識用物質で標識されたセレクチンを利用してフローサイトメトリーなどの自体公知の方法により行われ得る。また、表面プラズモン共鳴を利用した結合能測定法(Biacoreなど)も好適に用いられる。

次いで、被験物質の存在下におけるセレクチンとPSGL-1との結合能が、被験物質の非存在下におけるセレクチンとPSGL-1との結合能と比較される。結合能の比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行われる。被験物質の非存在下におけるセレクチンとPSGL-1との結合能は、被験物質の存在下におけるセレクチンとPSGL-1との結合能の測定に対し、事前に測定した結合能であっても、同時に測定した結合能であってもよいが、実験の精度、再現性の観点から同時に測定した結合能であることが好ましい。

[0048] スクリーニング方法Aの工程(c)では、セレクチンとPSGL-1との

結合能の低下をもたらす被験物質が代謝性疾患を予防又は治療し得る物質として選択される。

[0049] [PSGL-1発現阻害物質のスクリーニング方法]

次に、PSGL-1の発現を阻害する物質（PSGL-1発現阻害物質）のスクリーニング方法（以下、スクリーニング方法Bともいう）について説明する。スクリーニング方法Bは、以下の工程（a）、（b）及び（c）を含む：

（a）被験物質とPSGL-1タンパク質又はそれをコードする遺伝子の発現を測定可能な細胞とを接触させる工程；

（b）被験物質を接触させた細胞における発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞における発現量と比較する工程；

（c）上記（b）の比較結果に基づいて、発現量を低下させた被験物質を代謝性疾患を予防又は治療し得る物質として選択する工程。

[0050] スクリーニング方法Bの工程（a）では、被験物質がPSGL-1タンパク質の発現を測定可能な細胞と接触条件下におかれる。PSGL-1タンパク質の発現を測定可能な細胞に対する被験物質の接触は、培養培地中で行われ得る。

「PSGL-1タンパク質又はそれをコードする遺伝子の発現を測定可能な細胞」とは、PSGL-1遺伝子の産物、例えば、転写産物、翻訳産物（即ち、タンパク質）の発現レベルを直接的又は間接的に評価可能な細胞をいう。PSGL-1遺伝子産物の発現レベルを直接的に評価可能な細胞は、PSGL-1遺伝子を天然で発現可能な細胞であり得、一方、PSGL-1遺伝子の産物の発現レベルを間接的に評価可能な細胞は、PSGL-1遺伝子転写調節領域についてレポーターアッセイを可能とする細胞であり得る。

PSGL-1遺伝子を天然で発現可能な細胞は、PSGL-1遺伝子を潜在的に発現するものである限り特に限定されず、PSGL-1遺伝子を恒常的に発現している細胞、PSGL-1遺伝子を誘導条件下（例えば、薬物の処理）で発現する細胞などであり得る。該細胞は、当業者であれば容易に

同定でき、初代培養細胞、当該初代培養細胞から誘導された細胞株、市販の細胞株、セルバンクより入手可能な細胞株などを使用できる。PSGL-1 遺伝子を天然で発現可能な細胞の例としては、白血球（例えば、好中球、単球、マクロファージ、B細胞のサブセット、及び全てのT細胞）が挙げられる。

PSGL-1 遺伝子転写調節領域についてレポーターアッセイを可能とする細胞は、PSGL-1 遺伝子転写調節領域、当該領域に機能可能に連結されたレポーター遺伝子を含む細胞である。PSGL-1 遺伝子転写調節領域、レポーター遺伝子は、発現ベクター中に挿入されている。

PSGL-1 遺伝子転写調節領域は、PSGL-1 遺伝子の発現を制御し得る領域である限り特に限定されないが、例えば、転写開始点から上流約 2 k b p までの領域、あるいは該領域の塩基配列において 1 以上の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、且つ PSGL-1 遺伝子の転写を制御する能力を有する領域などを挙げる事ができる。

レポーター遺伝子は、検出可能なタンパク質又は酵素をコードする遺伝子であればよく、例えば GFP（緑色蛍光タンパク質）遺伝子、GUS（β-グルクロニダーゼ）遺伝子、LUS（ルシフェラーゼ）遺伝子、CAT（クロラムフェニコルアセチルトランスフェラーゼ）遺伝子などが挙げられる。

PSGL-1 遺伝子転写調節領域、当該領域に機能可能に連結されたレポーター遺伝子が導入される細胞は、PSGL-1 遺伝子転写調節機能を評価できる限り、即ち、該レポーター遺伝子の発現量が定量的に解析可能である限り特に限定されない。しかしながら、PSGL-1 遺伝子に対する生理的な転写調節因子を発現し、PSGL-1 遺伝子の発現調節の評価により適切であると考えられることから、該導入される細胞としては、PSGL-1 遺伝子を天然で発現可能な細胞が好ましい。

被験物質と PSGL-1 遺伝子の発現を測定可能な細胞とが接触される培養培地は、用いられる細胞の種類などに応じて適宜選択されるが、例えば、約 5 ~ 20 % のウシ胎仔血清を含む最少必須培地（MEM）、ダルベッコ改

変最少必須培地（DMEM）、RPMI 1640培地、199培地などである。培養条件もまた、用いられる細胞の種類などに応じて適宜決定されるが、例えば、培地のpHは約6～約8であり、培養温度は通常約30～約40℃であり、培養時間は約12～約72時間である。

[0051] スクリーニング方法Bの工程（b）では、先ず、被験物質を接触させた細胞におけるPSGL-1遺伝子の発現量が測定される。発現量の測定は、用いた細胞の種類などを考慮し、自体公知の方法により行われ得る。

例えば、PSGL-1遺伝子の発現を測定可能な細胞として、PSGL-1遺伝子を天然で発現可能な細胞を用いた場合、発現量は、PSGL-1遺伝子の産物、例えば、転写産物又は翻訳産物を対象として自体公知の方法により測定できる。例えば、転写産物の発現量は、細胞からtotal RNAを調製し、RT-PCR、ノザンブロットング等により測定され得る。また、翻訳産物の発現量は、細胞から抽出液を調製し、免疫学的手法により測定され得る。免疫学的手法としては、放射性同位元素免疫測定法（RIA法）、ELISA法（Methods in Enzymol. 70: 419-439（1980））、蛍光抗体法などが使用できる。

一方、PSGL-1遺伝子の発現を測定可能な細胞として、PSGL-1遺伝子転写調節領域についてレポーターアッセイを可能とする細胞を用いた場合、発現量は、レポーターのシグナル強度に基づき測定され得る。

次いで、被験物質を接触させた細胞におけるPSGL-1遺伝子の発現量が、被験物質を接触させない対照細胞におけるPSGL-1遺伝子の発現量と比較される。発現量の比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行なわれる。被験物質を接触させない対照細胞におけるPSGL-1遺伝子の発現量は、被験物質を接触させた細胞におけるPSGL-1遺伝子の発現量の測定に対し、事前に測定した発現量であっても、同時に測定した発現量であってもよいが、実験の精度、再現性の観点から同時に測定した発現量であることが好ましい。

[0052] スクリーニング方法Bの工程（c）では、PSGL-1遺伝子の発現量を



低下させる被験物質が代謝性疾患を予防又は治療し得る物質として選択される。

[0053] 以下に、試験例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。

## 実施例

[0054] 試験例 1 : 糖尿病モデルマウスの代謝データおよび内臓脂肪におけるマクロファージ、接着分子の発現の検討

### [実験]

8週齢の db/db マウス (c57BL/KsJ-db/db) 及び C57/BL6 マウスの体重、脂肪重量及び各種代謝データを測定した。内臓脂肪組織から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR によって、マクロファージのマーカーである F4/80、炎症のマーカーである MCP-1、接着分子である P-セレクチン、E-セレクチン、ICAM-1 などの遺伝子発現レベルを検討した。更に、DNA マイクロアレイを用いて、内臓脂肪組織における遺伝子発現プロファイルを解析した。

### [結果]

db/db マウスでは対照群に比し、体重、内臓脂肪重量、LDL、随時血糖及び IRI の有意な増加を認め、HbA1c には差は見られなかった (図 1)。DNA マイクロアレイでは、対照群に比し db/db マウスで 2 倍以上の発現増加を認めた遺伝子は 1001 あり、更にクラスター解析を行った結果、L-セレクチンや PSGL-1 をはじめとする 40 の細胞接着分子関連遺伝子の発現増加を認めた (表 1)。また、リアルタイム RT-PCR により、db/db マウスにおいて、F4/80、MCP-1、PSGL-1 及び P-セレクチンの有意な発現増加を認めた (図 2)。

[0055] 表 1 は、db/db マウスと BL6 マウスの内臓脂肪を用いた DNA マイクロアレイの結果を示す。野生型 (BL6 マウス) に比し、db/db マウスで 2 倍以上の発現増加を認めた計 1001 遺伝子を Gene Ontology category に従い分類した。

[0056] [表1]

発現が増加した遺伝子: 1001遺伝子

免疫応答	86	
細胞活性化	27	
生物刺激への応答	103	
ストレス応答	71	
細胞運動	22	
輸送	128	
局在化の確立	128	
器官形成	67	
生合成	65	
細胞接着	40	⇒
生理学的プロセスの正の制御	37	
:		L-セレクチン
		<b>PSGL-1</b>
		インテグリン $\beta_2$
		インテグリン $\alpha_M$
		:

[0057] 試験例 2 : 高脂肪食負荷マウスの代謝データおよび内臓脂肪におけるマクロファージ、接着分子の発現の検討

[実験]

7週齢のC57/BL6マウスに低脂肪食及び高脂肪食を各々12週間負荷し、インスリン負荷試験 (ITT) 及び腹腔内グルコース負荷試験 (IPGTT) を施行した。ITTではインスリン0.7単位/kgを腹腔内投与し、負荷前並びに負荷後30分、60分及び120分の血糖値を測定し、負荷前血糖値との変化率を比較した。IPGTTではブドウ糖1.2g/kgを腹腔内投与し、負荷前並びに負荷後30分、60分及び120分の血糖値及びIRIを測定した。また、試験例1と同様に各種代謝データの測定と内臓脂肪組織における遺伝子発現をリアルタイムRT-PCRとDNAマイクロアレイとを用いて検討した。

[結果]

高脂肪食負荷マウスでは低脂肪食負荷群に比し、体重、内臓脂肪重量、LDL、空腹時血糖、空腹時IRI及びHbA1cの有意な増加を認めた (図3)。またITTとIPGTTにて、高脂肪食群で耐糖能異常及びインスリン抵抗性を認めた (図4)。DNAマイクロアレイの結果では、対照群に比し高脂肪食群で2倍以上の発現増加を認めた遺伝子を566認め、クラスタ

一解析にて、PSGL-1を含む37の細胞接着分子関連遺伝子の発現増加を認めた(表2)。リアルタイムRT-PCRでは、db/dbマウスにおいてCD68、MCP-1、PSGL-1及びP-セレクチンの有意な発現増加を認めた(図5)。

[0058] 表2は、高脂肪食負荷マウスと低脂肪食負荷マウスの内臓脂肪を用いたDNAマイクロアレイの結果を示す。低脂肪食負荷マウスに比し高脂肪食負荷マウスで2倍以上の発現を認めた遺伝子をGene Ontology categoryに従い分類した。

[0059] [表2]

**発現増加した遺伝子 :566 遺伝子**

免疫応答	55	
細胞増殖	50	
細胞活性化	18	
生物刺激への応答	63	
<b>細胞接着</b>	<u>37</u>	⇒ <b>PSGL-1</b>
器官形成	48	⇒ インテグリンβ <sub>2</sub>
細胞運動	17	⇒ インテグリンα <sub>M</sub>
ストレス応答	43	:
生理学的プロセスの正の制御	17	
輸送		
:	67	

[0060] 試験例3 : PSGL-1ノックアウトマウスの解析

[実験]

7週齢のPSGL-1ノックアウトマウス及びC57/BL6マウスに高脂肪食を10週間負荷し、試験例2と同様にITT及びIPGTTを施行し、各種代謝データを測定した。また内臓脂肪からRNAを抽出し、リアルタイムRT-PCRによって炎症関連遺伝子の遺伝子発現レベルを検討した。更に、内臓脂肪組織のPAS染色を行い、内臓脂肪細胞の面積を測定した。更に、肝臓重量および肝臓中性脂肪含量の測定を行い、また、肝臓組織のHE染色を行って肝臓組織の変化を検討した。

[結果]

高脂肪食負荷PSGL-1ノックアウトマウスとC57/BL6マウスとでは、体重、脂肪重量、空腹時血糖及びHbA1cに差は見られなかったが、T-Chol、LDL、TG、FFA、空腹時IRI及び血清レプチン濃度はPSGL-1ノックアウトマウスにおいて有意な低下を認めた(図6)。ITTではPSGL-1ノックアウトマウスで有意に耐糖能の改善を認め、IPGTTでも血糖値に差は見られなかったが、PSGL-1ノックアウトマウスで有意にIRIの低下を認めた(図7)。また、内臓脂肪組織のPAS染色にて脂肪細胞の面積の測定を行い、C57/BL6マウスに比しPSGL-1ノックアウトマウスにて脂肪細胞面積の減少を認めた(図8)。リアルタイムRT-PCRにて、PSGL-1ノックアウトマウスでF4/80、MCP-1、NOS2及びレプチンの有意なmRNAの発現低下を認めた(図9)。PSGLノックアウトマウスでは肝臓重量の有意な減少が見られ、肝臓中性脂肪含量についても減少する傾向がみられた(図10(A))。また、HE染色像において、肝細胞障害(ブルーニング変化)がPSGL-1ノックアウトマウスで明らかに抑制されていた(図10(B))。

[0061] [結論]

PSGL-1は、白血球及び血管内皮細胞上に発現し、P-、E-及びL-セレクチンをリガンドとして機能し、炎症巣への白血球浸潤を誘導する分子である。今回の結果から、PSGL-1を阻害することにより、肥満マウスの内臓脂肪組織へのマクロファージの浸潤が減少し、内臓脂肪における炎症が抑制されてインスリン抵抗性が改善することが示された。PSGL-1を阻害することにより、メタボリックシンドロームの予防、及び肥満者におけるインスリン抵抗性の改善と糖尿病発症抑制が可能になる。

### 産業上の利用可能性

[0062] 本発明の剤は、内臓脂肪へのマクロファージの浸潤を抑制し、以って脂肪組織における炎症及びインスリン抵抗性の発症を阻害し得る。従って、本発明の剤を使用することにより、食事療法又は運動療法を行うことなく、メタボリックシンドローム、2型糖尿病、耐糖能異常、肥満症又は脂質異常症な

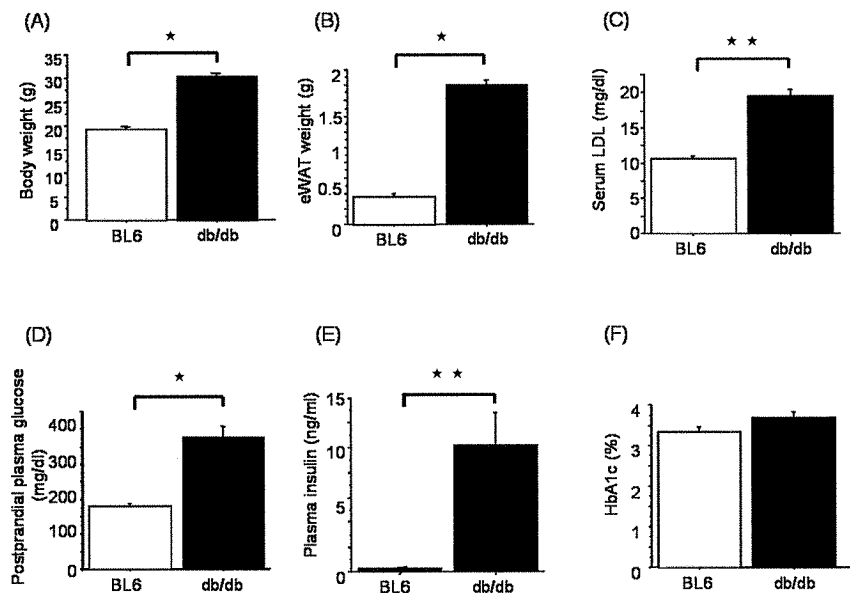
どの代謝性疾患に対する予防及び／又は治療効果を得ることが可能である。これらの代謝性疾患を予防及び／又は治療することにより、係る代謝性疾患に起因する動脈硬化性疾患の予防及び／又は進展抑制をすることも可能となる。本発明はまた、これらの代謝性疾患を予防又は治療し得る物質のスクリーニング方法も併せて提供する。

[0063] 本発明は日本で出願された特願2008-128086（出願日：2008年5月15日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

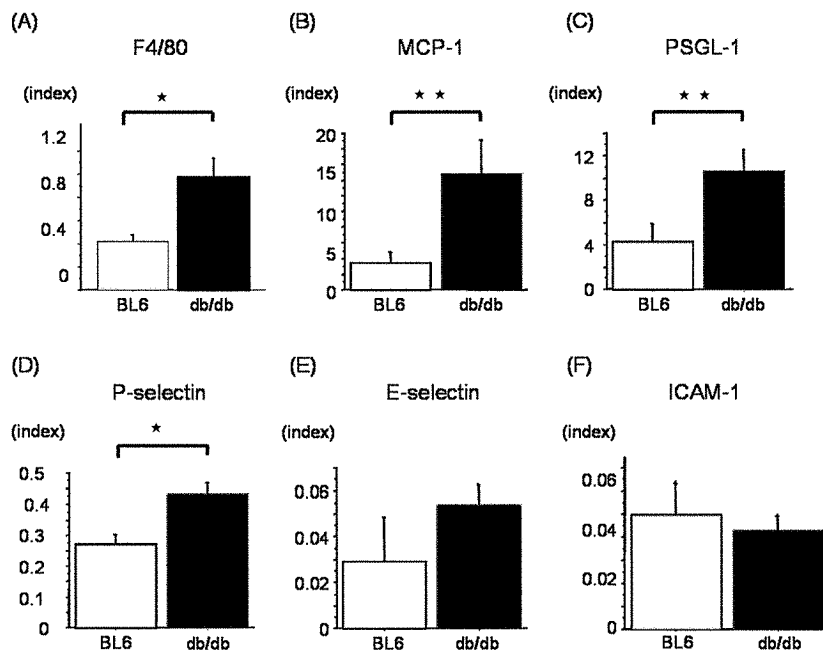
## 請求の範囲

- [請求項1] P S G L - 1 に対する阻害物質を有効成分として含有する、代謝性疾患の予防及び／又は治療剤。
- [請求項2] 代謝性疾患が、メタボリックシンドローム、2型糖尿病、耐糖能異常、肥満症又は脂質異常症である、請求項1記載の剤。
- [請求項3] P S G L - 1 に対する阻害物質が、P S G L - 1 に対する特異的中和抗体、或いはP S G L - 1 の発現を特異的に阻害可能なアンチセンス核酸若しくは小分子量干渉RNA、又はこれらを哺乳動物細胞内において発現可能な発現ベクターである、請求項1記載の剤。
- [請求項4] 以下の工程を含む、代謝性疾患を予防又は治療し得る物質のスクリーニング方法：  
( I ) 被験物質がP S G L - 1 の機能を阻害するか検定すること、及び  
( I I ) P S G L - 1 の機能を阻害した被験物質を代謝性疾患を予防又は治療し得る物質として選択すること。
- [請求項5] 代謝性疾患が、メタボリックシンドローム、2型糖尿病、耐糖能異常、肥満症又は脂質異常症である、請求項4記載の方法。

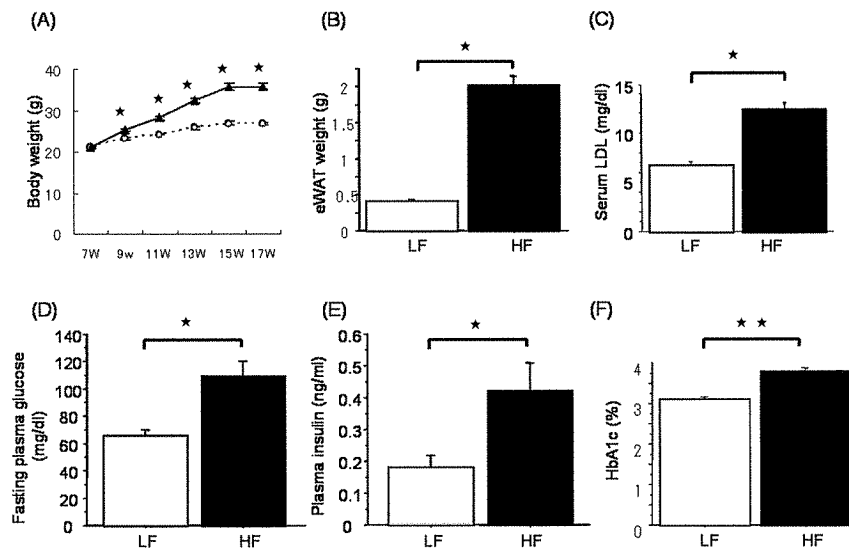
[Fig 1]



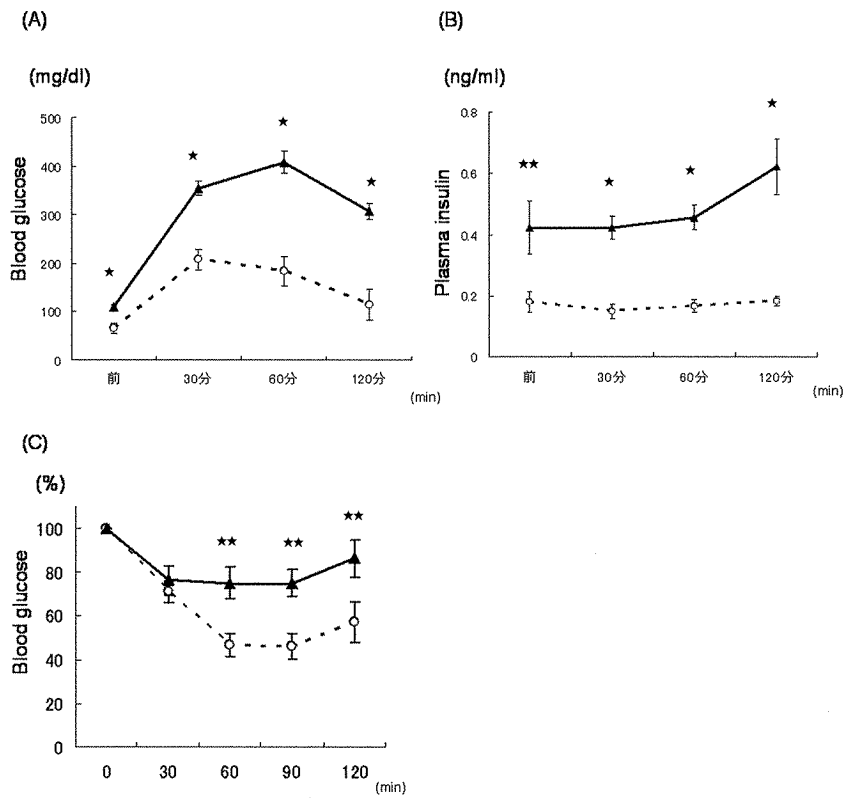
[Fig 2]



[ 3 ]

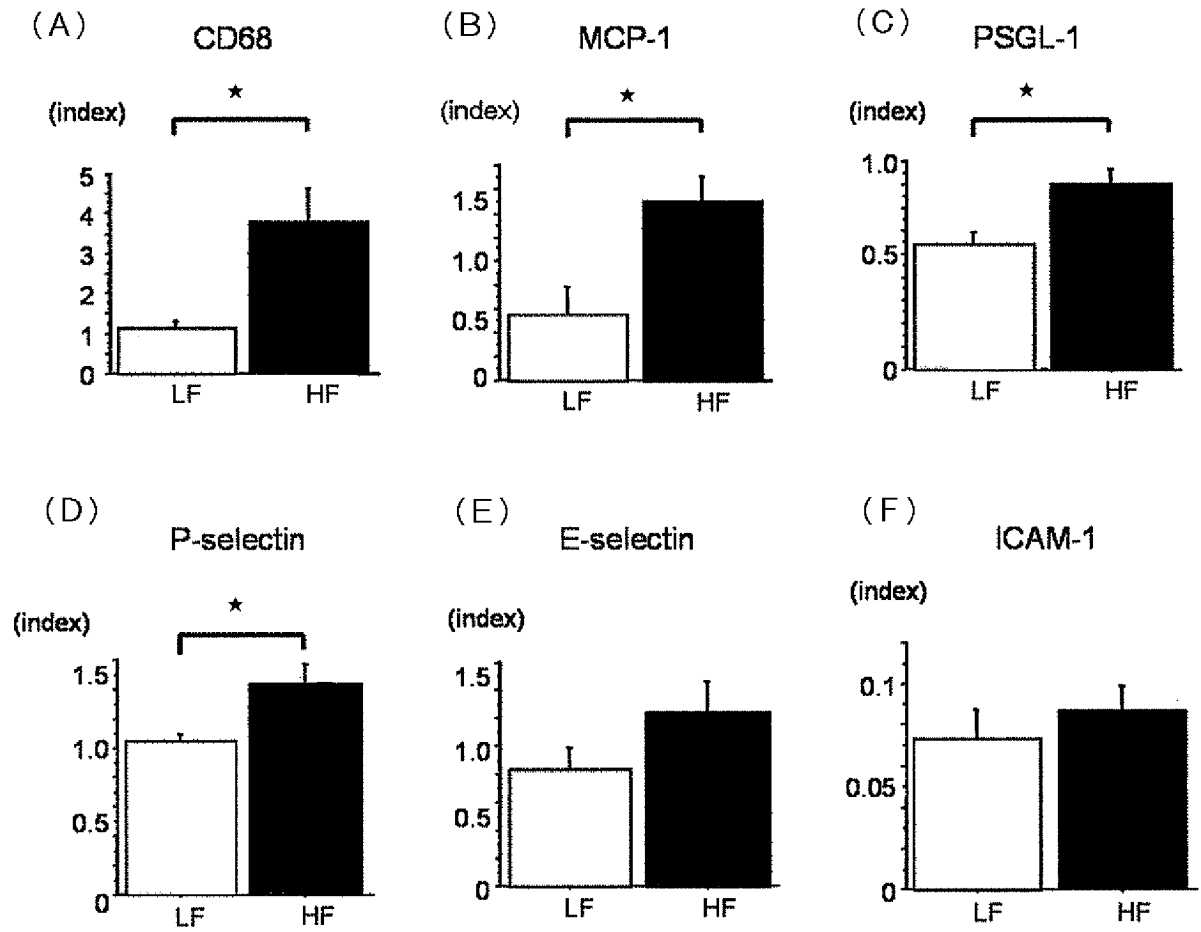


[ 4 ]

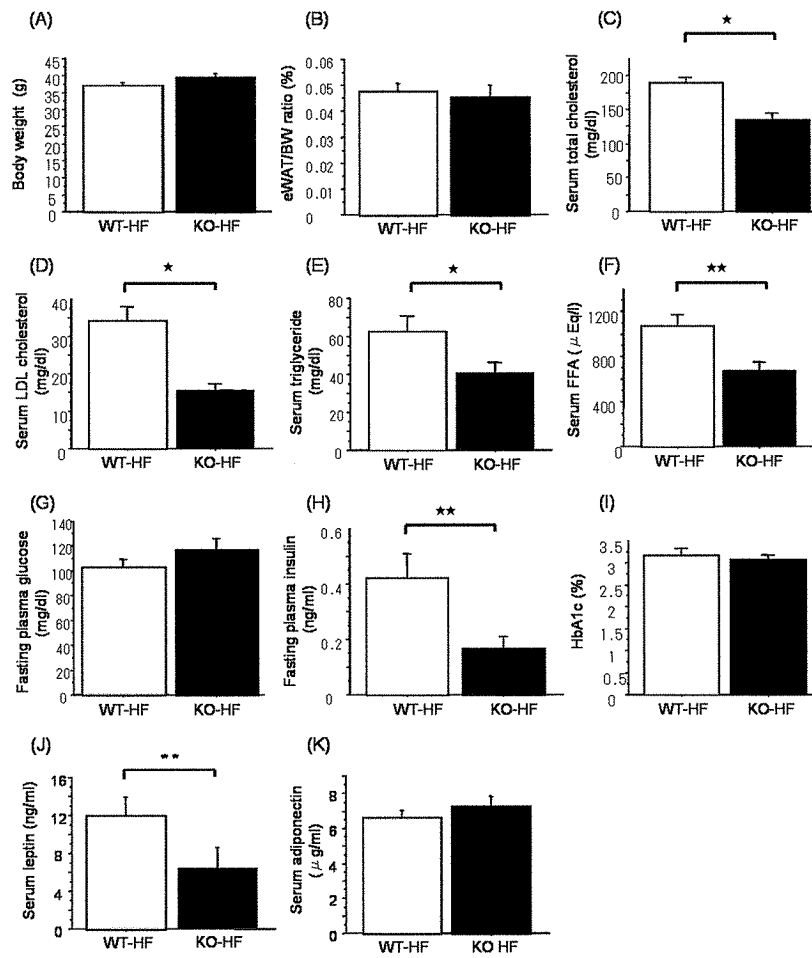




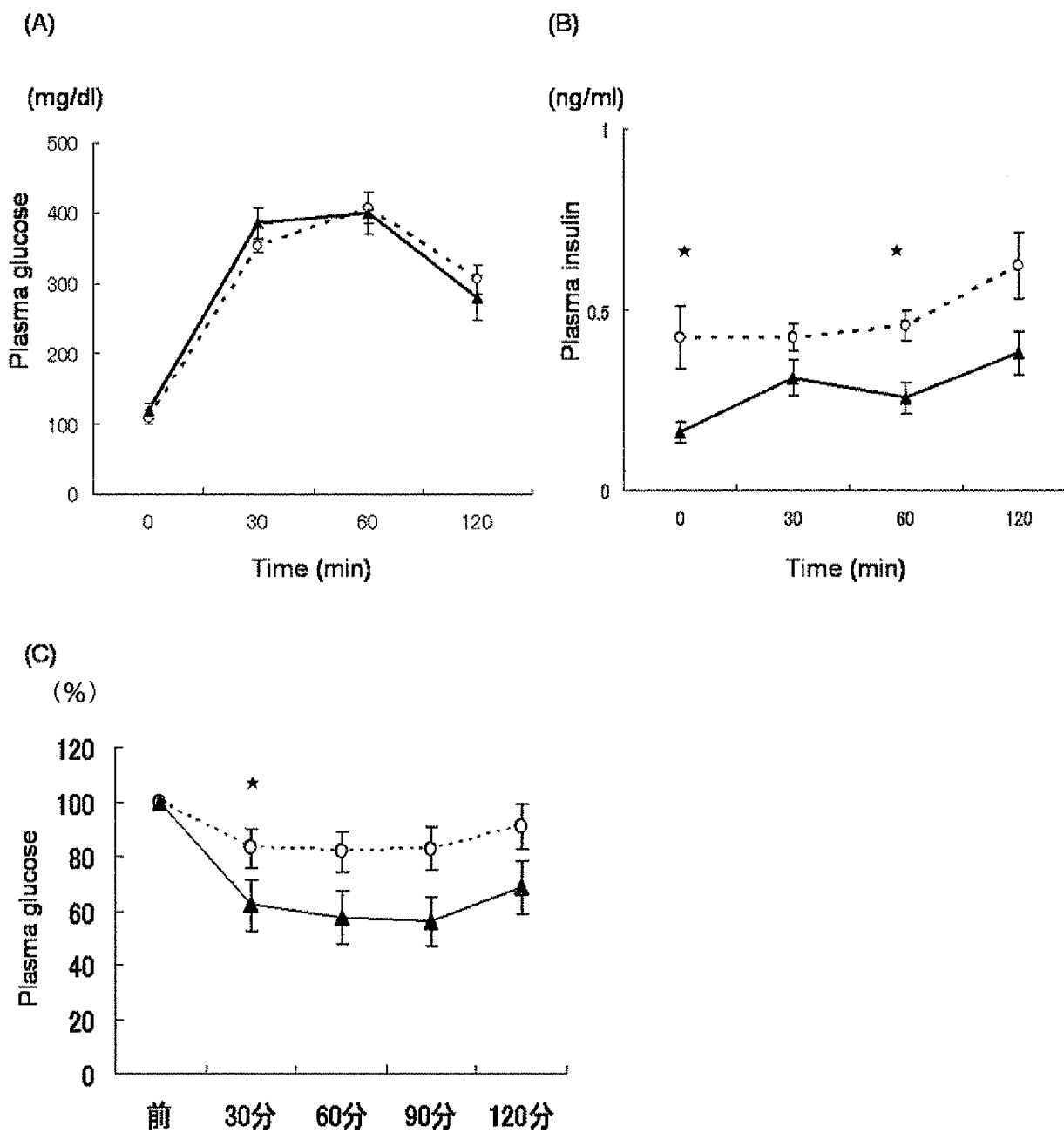
[圖5]



[6]

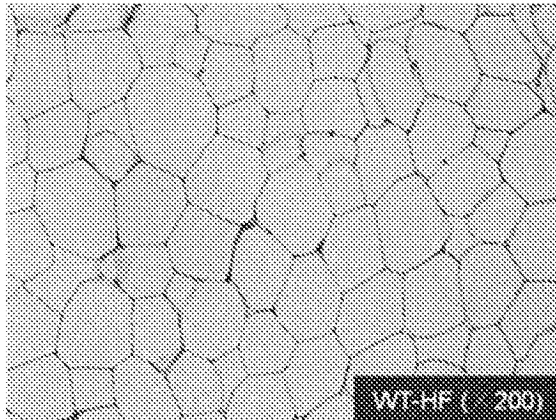


[図7]

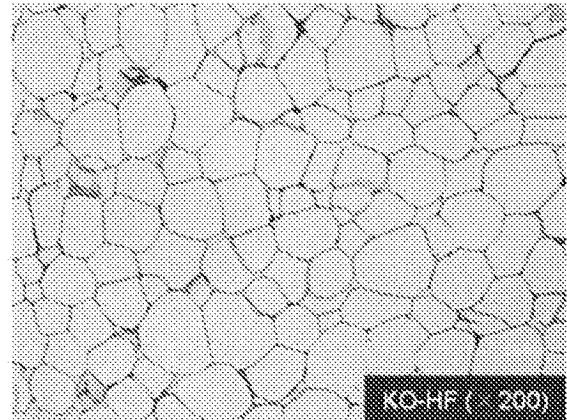


[图8]

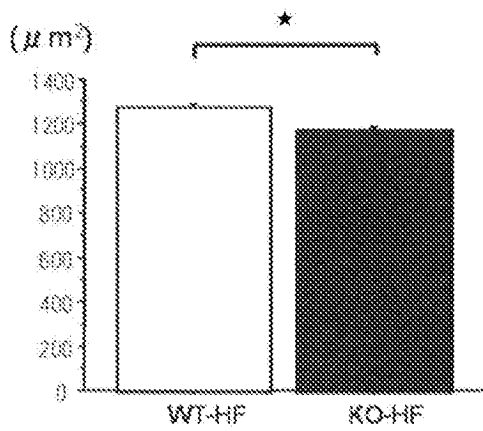
(A)



(B)



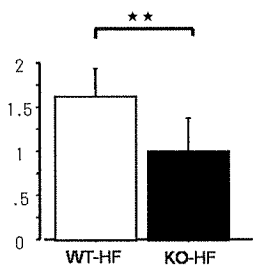
(C)



[图9]

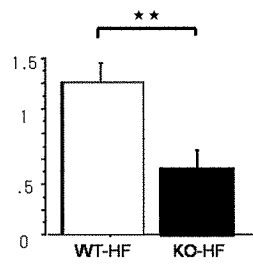
(A)

F4/80



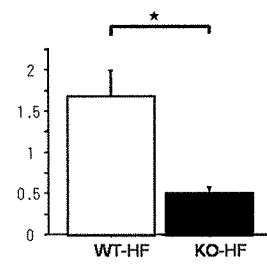
(B)

MCP-1



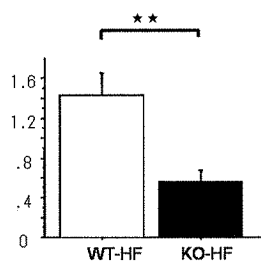
(C)

NOS 2 (iNOS)

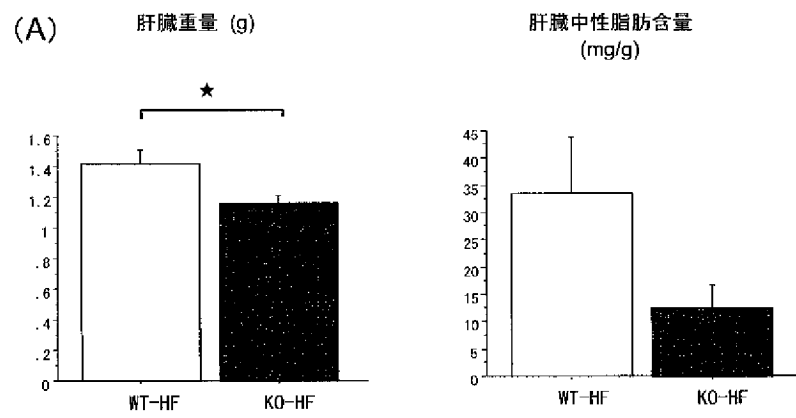


(D)

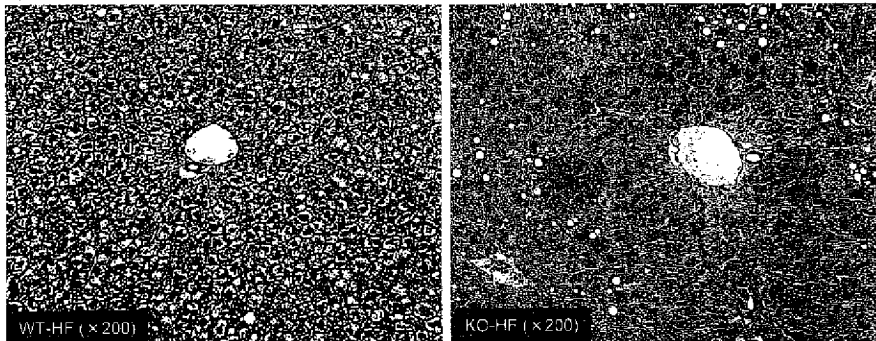
leptin



[図10]



(B) 肝臓HE染色



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2009/059045

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 A61K45/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P3/00(2006.01)i, A61P3/04(2006.01)i, A61P3/06(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i  
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**  
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 A61K45/00, A61K39/395, A61K48/00, A61P3/00, A61P3/04, A61P3/06, A61P3/10, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
 Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009  
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 PubMed

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 1994/010309 A1 (GENETICS INSTITUTE, INC.), 11 May, 1994 (11.05.94), Description, page 18, line 19 to page 19, line 9; page 23, line 1 to page 24, line 36; examples 4, 7; Claims 1 to 5, 12 to 20 & JP 08-502886 A & US 5827817 A & EP 0666914 A1 & DE 69333346 T & AU 5538894 A & CA 2147623 A & AT 256182 T & DK 666914 T & PT 666914 E	1-5

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  
 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 03 June, 2009 (03.06.09)	Date of mailing of the international search report 07 July, 2009 (07.07.09)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/059045

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/027831 A2 (BGENOMICS CORP.), 31 March, 2005 (31.03.05), Description, page 13, line 15 to page 16, line 13; page 20, line 19 to page 25, line 14; examples 1, 11; Claim 1 & JP 2007-533618 A            & US 2003/0049252 A1 & EP 1663290 A2            & DE 60229394 D & CA 2428822 A            & NO 20061306 A & BR 200414402 A            & NZ 531199 A & CN 1473052 A            & AT 411045 T & DK 1411982 T            & ES 2316569 T & KR 10-2006-0088104 A   & SG 146670 A	1-5
X	JP 2006-522158 A (Alnylam Pharmaceuticals, Inc.), 28 September, 2006 (28.09.06), Claim 1; Par. Nos. [0761] to [0762] & US 2005/0119214 A1        & EP 1605978 A2 & WO 2004/080406 A2        & CA 2518475 A	1-3
X	HARAKAWA, N. et al, P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-independent leukocyte rolling in high endothelial venules of peripheral lymph nodes, Int Immunol, 2007, Vol.19, No.3, p.321-9 See page 322, left column, line 54-right column, line 10	4-5
A	WO 2004/108920 A1 (Astellas Pharma Inc.), 16 December, 2004 (16.12.04), Claims; Par. Nos. [0012] to [0013], [0019] to [0022], [0042] to [0043] & US 2006/0156423 A1        & EP 1593740 A1 & CA 2518627 A	4-5
X	Chikage SATO et al., "PSGL-1 Knockout Mouse dewa Ko Shiboshoku Fuka Go no Naizo Shibo no Ensho to Insulin Teikosei ga Yokusei sareru", The Journal of the Japan Diabetic Society, Vol.51 special extra issue, Japan Diabetes Society, 25 April, 2008 (25.04.08), page S-109	1-5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/059045

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

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

The inventions of claims 1-5 are not novel, as disclosed in the three documents shown below. Therefore, these inventions have no special technical feature.

WO 1994/010309 A1 (GENETICS INSTITUTE, INC.), 11 May, 1994 (11.05.94)  
 WO 2005/027831 A2 (ABGENOMICS CORPORATION), 31 March, 2005 (31.03.05)  
 The Journal of the Japan Diabetic Society, Vol.51 special extra issue,  
 Japan Diabetes Society, 25 April, 2008 (25.04.08), page S-109

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

**Remark on Protest**  
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.



## 第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. c の続き)

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

- a. タイプ  配列表  
 配列表に関連するテーブル
- b. フォーマット  紙形式  
 電子形式
- c. 提出時期  出願時の国際出願に含まれていたもの  
 この国際出願と共に電子形式により提出されたもの  
 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの

2.  さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求項 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2.  請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求項1～5に係る発明は、以下の3つの文献に記載のとおり、新規性が認められないから、特別な技術的特徴を有しない。

<記>

- ・ WO 1994/010309 A1 (GENETICS INSTITUTE, INC.) 1994.05.11
- ・ WO 2005/027831 A2 (ABGENOMICS CORPORATION) 2005.03.31
- ・ 糖尿病, 第51巻臨時増刊号, 社団法人日本糖尿病学会, 2008年4月25日, 第S-109頁

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K45/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P3/00(2006.01)i, A61P3/04(2006.01)i, A61P3/06(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K45/00, A61K39/395, A61K48/00, A61P3/00, A61P3/04, A61P3/06, A61P3/10, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2009年
日本国実用新案登録公報	1996-2009年
日本国登録実用新案公報	1994-2009年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 1994/010309 A1 (GENETICS INSTITUTE, INC.) 1994.05.11, 明細書第18頁19行~第19頁9行、第23頁1行~第24頁36行、実施例4、7、請求項1-5、12-20 & JP 08-502886 A & US 5827817 A & EP 0666914 A1 & DE 69333346 T & AU 5538894 A & CA 2147623 A & AT 256182 T & DK 666914 T & PT 666914 E	1-5

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.06.2009

国際調査報告の発送日

07.07.2009

国際調査機関の名称及びあて先  
 日本国特許庁 (ISA/J P)  
 郵便番号100-8915  
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

佐々木 秀次

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4C

4496

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2005/027831 A2 (BGENOMICS CORPORATION) 2005.03.31, 明細書 第13頁15行～第16頁13行、第20頁19行～第25頁14行、実施 例1、11, 請求項1 & JP 2007-533618 A & US 2003/0049252 A1 & EP 1663290 A2 & DE 60229394 D & CA 2428822 A & NO 20061306 A & BR 200414402 A & NZ 531199 A & CN 1473052 A & AT 411045 T & DK 1411982 T & ES 2316569 T & KR 10-2006-0088104 A & SG 146670 A	1 - 5
X	JP 2006-522158 A (アルナイラム ファーマシューティカルズ イ ンコーポレイテッド) 2006.09.28, 請求項1, 段落【0761】 - 【0762】 & US 2005/0119214 A1 & EP 1605978 A2 & WO 2004/080406 A2 & CA 2518475 A	1 - 3
X	HARAKAWA, N. et al, P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-independent leukocyte rolling in high endothelial venules of peripheral lymph nodes, Int Immunol, 2007, Vol.19, No.3, p.321-9 See page 322, left column, line 54-right column, line 10	4 - 5
A	WO 2004/108920 A1 (アステラス製薬株式会社) 2004.12.16, 【特許 請求の範囲】, 段落【0012】 - 【0013】、【0019】 - 【0022】、【0042】 - 【0043】 & US 2006/0156423 A1 & EP 1593740 A1 & CA 2518627 A	4 - 5
X	佐藤千景 et al, PSGL-1 ノックアウトマウスでは高脂肪食負荷後の 内臓脂肪の炎症とインスリン抵抗性が抑制される, 糖尿病, 第51巻 臨時増刊号, 社団法人日本糖尿病学会, 2008年4月25日, 第S-109 頁	1 - 5