

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4147220号
(P4147220)

(45) 発行日 平成20年9月10日(2008.9.10)

(24) 登録日 平成20年6月27日(2008.6.27)

(51) Int. Cl. F I
A 6 1 K 38/00 (2006.01) A 6 1 K 37/02
A 6 1 K 48/00 (2006.01) A 6 1 K 48/00
A 6 1 P 9/10 (2006.01) A 6 1 P 9/10 1 O 1

請求項の数 3 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2004-506843 (P2004-506843)	(73) 特許権者	503360115
(86) (22) 出願日	平成15年5月26日 (2003. 5. 26)		独立行政法人科学技術振興機構
(86) 国際出願番号	PCT/JP2003/006518		埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(87) 国際公開番号	W02003/099319	(74) 代理人	110000084
(87) 国際公開日	平成15年12月4日 (2003. 12. 4)		特許業務法人アルガ特許事務所
審査請求日	平成16年10月27日 (2004. 10. 27)	(74) 代理人	100068700
(31) 優先権主張番号	特願2002-151220 (P2002-151220)		弁理士 有賀 三幸
(32) 優先日	平成14年5月24日 (2002. 5. 24)	(74) 代理人	100077562
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 高野 登志雄
		(74) 代理人	100096736
			弁理士 中嶋 俊夫
		(74) 代理人	100117156
			弁理士 村田 正樹
		(74) 代理人	100111028
			弁理士 山本 博人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 動脈硬化症予防治療薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ァディポネクチンのC末端側球状領域又はその遺伝子を有効成分とする動脈硬化症予防治療薬。

【請求項 2】

さらに薬学的に許容される担体を含むものである請求項 1 記載の動脈硬化症予防治療薬。

【請求項 3】

ァディポネクチンのC末端側球状領域又はその遺伝子を有効成分とするスカベンジャー受容体 A 発現低下剤。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、動脈硬化症予防治療薬に関する。

背景技術

動脈硬化は、動脈が弾力を失ってもろくなった状態をいい、当該動脈硬化は脳出血、脳梗塞、心筋梗塞、腎硬化症などの成人病の原因として重要である。動脈硬化の原因として高脂血症、血液中の細菌、ウイルス、過酸化脂質、活性酸素等が知られているが、未だ完全には解明されていない。いずれにしても動脈硬化の始まりは、動脈の内膜・内皮細胞の障害による肥厚であり、当該動脈内膜の肥厚を抑制する薬物の探索が希求されている。

従って、本発明の目的は、動脈硬化の予防治療に有効な医薬を提供することにある。

発明の開示

そこで本発明者は、インスリン抵抗性改善作用を有することが知られているアディポネクチンの薬理作用について研究してきたところ、アディポネクチン遺伝子を欠損したマウスでは動脈の内膜が顕著に肥厚しており、また粥状動脈硬化症発症モデルである a p o E 欠損マウスにアディポネクチン、特にアディポネクチンの C 末端球状領域を過剰発現させると動脈硬化の発症が抑制されることから、アディポネクチン、その C 末端側球状領域又はその遺伝子が動脈硬化予防又は治療薬として有用であることを見出した。また、アディポネクチンの過剰発現は、血中の遊離脂肪酸、中性脂肪、総コレステロールなどに顕著な影響を与えず、スカベンジャー受容体 A の発現を低下させていることから、アディポネクチンの動脈硬化防止作用は、スカベンジャー受容体 A の発現を低下させて、マクロファージへの脂質の蓄積を抑制することによるものであることを見出し、本発明を完成するに至った。

10

すなわち、本発明はアディポネクチンの C 末端側球状領域、アディポネクチン又はそれらの遺伝子を有効成分とする動脈硬化症予防治療薬を提供するものである。

また、本発明は、アディポネクチンの C 末端球状領域、アディポネクチン又はそれらの遺伝子を有効成分とするスカベンジャー受容体 A 発現低下剤を提供するものである。

さらに本発明は、アディポネクチンの C 末端側球状領域、アディポネクチン又はそれらの遺伝子の、動脈硬化症予防治療薬製造のための使用を提供するものである。

さらに、本発明が、アディポネクチンの C 末端側球状領域、アディポネクチン又はそれらの遺伝子の、スカベンジャー受容体 A 発現低下剤製造のための使用を提供するものである。

20

さらに本発明は、アディポネクチンの C 末端側球状領域、アディポネクチン又はそれらの遺伝子の有効量を投与することを特徴とする動脈硬化症の処置方法を提供するものである。

さらに本発明は、アディポネクチンの C 末端側球状領域、アディポネクチン又はそれらの遺伝子の有効量を投与することを特徴とする患者のスカベンジャー受容体 A 発現低下方法を提供するものである。

発明を実施するための最良の形態

本発明に用いられるアディポネクチンは、既にクローニングされており [Maeda, K et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 221, 286-296 (1996)、Nakano, Y. et al, J. Biochem. (Tokyo) 120, 802-812 (1996)]、既知の手段により入手できる。配列番号 1 及び 2 にヒトアディポネクチンの塩基酸配列及びアンミ酸配列を示す。アディポネクチンは、N 末端側のコラーゲン様配列 (c A d) と C 末端側の球状領域 (g A d ; 配列番号 1 中、アミノ酸番号 114 ~ 239 又は 111 ~ 242) から構成されているが、C 末端側の球状領域 (g A d) は、完全長アディポネクチンよりも強力な動脈硬化予防治療作用を有し、特に好ましい。また配列番号 3 及び 4 にマウスアディポネクチンの塩基酸配列及びアミノ酸配列を示す。マウスアディポネクチンの N 末端側のコラーゲン様配列 (c A d) は 45 ~ 109 (アミノ酸番号) であり、C 末端側の球状領域 (g A d) は 110 ~ 247 (アミノ酸番号) である。また、本発明においては、配列番号 1 ~ 4 に示すアミノ酸配列及び g A d 領域を示すアミノ酸配列を有する蛋白質だけでなく、これらのアミノ酸配列の一又は複数のアミノ酸が置換、欠失又は付加したアミノ酸配列を有する蛋白質であってもアディポネクチンとしての作用を有するものであれば用いることができる。当該変異蛋白質としては、配列番号 1 ~ 4 のアミノ酸配列又は g A d 領域を示すアミノ酸配列と 80% 以上、特に 90% 以上の相同性を有するものが挙げられる。

30

本発明で用いられる遺伝子としては、配列番号 1 及び 3 に示されるアディポネクチンをコードする遺伝子及び g A d をコードする遺伝子が挙げられる。また、これらの遺伝子とストリンジентな条件でハイブリダイズし得る塩基配列を有する遺伝子も用いることができる。

40

アディポネクチン又はその一部のポリペプチド (g A d を含む) は、それが存在する細胞

50

から分離することもできるが、アディポネクチンをコードする遺伝子がすでにクローニングされているので、DNA組み換え技術、すなわち、当該遺伝子を用いて調製した発現ベクターを利用し、形質転換した細胞を用いて調製してもよい。

後記実施例に示すように、アディポネクチンを欠損させたマウスでは、血中の中性脂肪が高いが、コレステロールは野生型と差がない。また、アディポネクチンを欠損させたマウスは動脈硬化のモデルにおいて野生型に比べて2倍の内膜肥厚を示した。これに対し、粥状動脈硬化を自然に発症するモデルである apoE 欠損マウスに gAd を過剰発現させると、動脈硬化単面積が有意に低下し、動脈硬化発症が抑制される。ところが、apoE 欠損マウスに gAd を過剰発現させても、体重、血糖値、血中の遊離脂肪酸、中性脂肪、総コレステロールなどの一般の動脈硬化リスクファクターに顕著な影響を与えない。これに

10

対し、apoE 欠損マウスに gAd を過剰発現させると動脈壁のスカベンジャー受容体 A の発現が低下していた。ここで、スカベンジャー受容体 A は、マクロファージが変性 LDL を貪食する際、細胞表面で変性 LDL を結合する受容体であり、動脈硬化発症の重要な受容体として知られている。

従って、アディポネクチン、gAd 又はこれらの遺伝子は、スカベンジャー受容体 A 発現低下剤として、また動脈硬化症予防治療薬として有用である。また、gAd 又はその遺伝子はアディポネクチンよりも強力なスカベンジャー受容体発現低下作用及び動脈硬化予防治療作用を有し、特に有用である。

本発明の医薬をヒトを含む哺乳類に投与するには、前記有効成分に薬学的に許容される担体を加えて、種々の投与形態の医薬組成物とすることができる。かかる投与形態としては注射用製剤が好ましい。また薬学的に許容される担体としては、蒸留水、溶解補助剤、安定化剤、乳化剤、緩衝剤等が挙げられる。また、これら医薬の投与量は、疾患、性別、体重等により変化するが、アディポネクチン又は gAd 量として $0.1 \mu\text{g} \sim 10 \text{mg} / \text{日}$ 程度であろう。

20

実施例

次に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明は何らこれに限定されるものではない。

A. 方法

(1) ノックアウトマウスの作成

アディポネクチン cDNA をプロンプを用いて 129/Sv マウスゲノミックライブラリーをスクリーニングし、アディポネクチン遺伝子を含むクローンを複数クローニングした。翻訳開始点直下から翻訳終止点までを neo 耐性遺伝子で置換したターゲティングベクターを構築し、このターゲティングベクターを ES 細胞にトランスフェクションした。サザンブロットングによりスクリーニングを行い、5 クローンの相同組換え体を確認した。顕微注入法にてキメラマウスを作成し、BI/6 との交配により F1、さらに F2 を作成した。

30

すなわち、アディポネクチン遺伝子の欠損マウスは、図 1 に示すような相同組換えによって作成した。マウスアディポネクチン遺伝子を欠損のため、アディポネクチンをコードしているエクソン 2 と 3 を neo 耐性遺伝子に置き換えたターゲティングベクターを作成した。独立した 5 つの相同組換えを起こしたクローンがサザンブロットによって確認された(図 2)。129/Sv をバックグランドにもつ ES 細胞よりキメラマウスを作成し、ヘテロ欠損マウス作成のため BI/6 と交配した。その遺伝子型をサザンブロットにて確認した(図 3)。

40

(2) インスリン負荷試験

負荷試験中のみ絶食をかけ、腹腔内にマウス体重 1 g あたり 0.7mU のヒトインスリンを投与した。採血は尾静脈から行い血糖値はグルテストエース(登録商標、三和化学研究所製)にて測定した。

(3) グルコース負荷試験

試験開始前に少なくとも 16 時間以上絶食をかけた後、マウス体重 1 g あたり 1.5mg のグルコースを経口投与した。採血は眼底静脈より行い血糖値はグルテストエース(登録

50

商標、三和化学研究所製)にて測定、インスリンはラットインスリンRIAキット(アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製)を用いて測定した。

(4) 血中脂質レベルの測定

血中の遊離脂肪酸、中性脂肪、総コレステロールは16時間の絶食の後、それぞれNEFA C-test, TGL-type, Tchol E-type(ワコー社製)を用いて測定した。

(5) 血中レプチン、アディポネクチンの測定

血中のレプチン、アディポネクチンの測定は16時間の絶食の後、それぞれQuintikine M kit(R&D社製)、アディポネクチンRIAキット(LINCO社製)を用いて測定した。

10

(6) カフによる血管内膜肥厚モデルの作製

大腿動脈に2.0mmのポリエチレンチューブ(PE-50)を留置し、2週間後に血管をホルマリンにて圧固定後、対側のカフを巻いていない対照血管とともに摘出した。摘出した血管に対して10mmの厚さで連続輪状切片を作製しそのうち10切片をHE染色し、血管内径、内膜の厚さ、中膜の厚さ、内膜中膜比を測定した。

(7) gAd過発現マウスの作製

Diabetes 48, 1822-1829(1999)に従い、ヒトSAPプロモータとマウスgAd cDNAを有する融合遺伝子を作製した。精製Hind III-Xho IフラグメントをC57BL6マウス(日本クレア製)の受精卵の前核にマイクロインジェクションした。トランスジェニックマウスがgAdを過発現していることは、gAdのBgl II/Hinc IIサイトに対してgAd cDNAプローブを使ったテールDNAのサザンブロッティングにより確認した。

20

(8) gAdを過剰発現するapoE欠損マウスの作製

gAdを過剰発現するapoE欠損マウスを交配し、gAd過剰発現apoEヘテロ欠損マウスを得、さらにapoE欠損マウスと交配することにより、gAdを過剰発現するapoE欠損マウスを作製した。

(9) 血糖値、脂質レベルの測定

血糖値、血中の遊離脂肪酸、中性脂肪、総コレステロールは、飽食時にそれぞれグルテストエース(登録商標、三和化学研究所製)、NEFA C-test、TGL-type、Tchol E-type(ワコー社製)を用いて測定した。

30

(10) 動脈硬化巣の大きさの評価

4ヶ月齢のgAd過剰発現apoE欠損マウスとコントロールのapoE欠損マウスから大動脈弓及び下行大動脈を摘出してホルマリン固定後、Sudan IVにて染色し、動脈硬化巣の大きさを評価した。

(11) コレステロールエステル蓄積量、スカベンジャー受容体A発現量、マクロファージの集積の評価

大動脈弁輪部の凍結連続輪状切片を作製し、そのうちの10切片をOil Red O染色及び抗スカベンジャー受容体A抗体、マクロファージ特異的マーカーである抗Mac3抗体で免疫染色し、それぞれコレステロールエステル蓄積量、スカベンジャー受容体A発現量、マクロファージの集積の評価を行った。

40

B. 結果

(1) マウスアディポネクチン遺伝子欠損マウス

白色脂肪組織のノーザンブロットではヘテロ欠損型マウスではアディポネクチンの発現が約60%減少し、ホモ欠損マウスではその発現が完全に消失していることが確認された(図4)。実際血中のアディポネクチン濃度を測定するとヘテロ欠損型マウスではその血中レベルが約60%低下しホモ欠損マウスでは検出限界以下であった(図5)。なお血中レプチン濃度には差が認められなかった(図6)。

(2) マウスアディポネクチン遺伝子欠損マウスのインスリン抵抗性

6週の野生型(wild-type)、ヘテロ欠損型(adipo+/-)、ホモ欠損型(adipo-/-)マウスの3群において体重差は認められなかった(図7)。6

50

週の野生型とヘテロ型欠損マウスに対してインスリン感受性を調べる目的でインスリン負荷試験を行ったところ、外来性のインスリンに対する血糖値の降下の程度はヘテロ欠損型で有意に低く、ヘテロ欠損型マウスがインスリン抵抗性を有していることが明らかとなった(図8)。

次にグルコース負荷試験を行ったが、血糖値、インスリン値において野生型とヘテロ欠損型マウスにおいて差は認められなかった(図9)。しかし10週間の高脂肪食を負荷したヘテロ欠損マウスでは野生型に比し体重は同じであったにもかかわらず糖負荷前後の血糖値が有意に上昇していた(図10)。

次にはホモ欠損マウスの解析を行った。

6週の野生型とホモ欠損型マウスに対してインスリン負荷試験を行ったところ、外来性のインスリンに対する血糖値の降下の程度は野生型やヘテロ欠損型より有意に低く、インスリン抵抗性が野生型やヘテロ欠損型マウスに比し高いことが明らかとなった(図11)。次にグルコース負荷試験を行ったところ空腹時、負荷後ともに血糖値が野生型に比し高く、このことからホモ欠損型マウスはインスリン抵抗性に加え軽度の耐糖能障害も有していることが明らかとなった(図12)。糖負荷前後のインスリン値は投与前と投与30分後では違いはなかったが15分値ではホモ欠損型マウスでは低い傾向にあった(図12)。

(3) アディポネクチンホモ欠損型マウスでの血中中性脂肪

アディポネクチンの脂質代謝に対する影響を調べるために野生型、ヘテロ欠損型、ホモ欠損型マウスの血中遊離脂肪酸(FFA)、中性脂肪(TG)、総コレステロール値(TC)を測定した(図13, 14)。ヘテロ欠損型では3項目全てにおいて野生型との違いは認められなかった(図13)が、ホモ欠損型では血中の中性脂肪値が野生型に比し有意に高値であった(図14)。

(4) マウスアディポネクチンヘテロ欠損型マウスのカフ損傷モデルにおける内膜肥厚
アディポネクチンの動脈硬化に対する影響を見るためにカフ損傷に対する内膜肥厚の程度を野生型とヘテロ型欠損マウスにおいて比較した。両群においてカフ損傷後の血管の内径に差は認められなかった(図15)。しかしカフ損傷2週間後においてヘテロ欠損型では野生型に比し内膜肥厚の程度が約1.8倍高かった(図16)。しかし中膜の厚さに差は認められなかった(図17)。野生型とヘテロ欠損型マウスにおいて内膜中膜比をとってみるとヘテロ欠損型では野生型に比し約2倍であった(図18)。

(5) gAdを過剰発現するapoE欠損マウスにおける動脈硬化発症の抑制

動脈硬化を自然に発症するモデルであるapoE欠損マウスにgAdを過剰発現させ、その動脈硬化発症が抑制されるかどうかを検討した。その結果を図19及び図20に示す。図19中aはapoE欠損マウスの大動脈のSudan IV染色結果であり、図19中bはgAd過剰発現apoE欠損マウスの大動脈のSudan IV染色結果である。aとbの対比から明らかなようにgAd過剰発現apoE欠損マウスでは動脈硬化巣が明確に減少している。また、動脈硬化巣の面積を対比したのが図20である。図20からもgAdを過剰発現させると、Sudan IVで染色される動脈硬化巣面積が大動脈弓(b)、下行大動脈(c)、両者を足して(a)比較検討した何れの場合でも、有意に低下しており、動脈硬化発症の抑制が認められた。

(6) gAdの過剰発現が普通食下のapoE欠損マウスの動脈硬化リスクファクターに与える影響

普通食下におけるgAd過剰発現apoE欠損マウスの体重、血糖値、血中遊離脂肪酸、中性脂肪及び総コレステロール値の測定結果を表1に示す。

10

20

30

40

表1

	マウス		
	apoE ^{-/-}	gAd Tg apoE ^{-/-}	有意差
体重(g)	29.8±1.2	29.9±1.5	なし
血漿中グルコース濃度(mg/dl)	145±4	152±8	なし
血清総コレステロール(mg/dl)	541±49	509±32	なし
血清トリグリセライド濃度(mg/dl)	127±52	104±24	なし
血清遊離脂肪酸濃度(mEq/L)	0.53±0.08	0.57±0.04	なし

平均±s. e. (n=5)

表1から明らかなように、普通食下の apoE 欠損マウスに gAd を過剰発現させても、体重、血糖値、血中の遊離脂肪酸、中性脂肪、総コレステロールなどの動脈硬化リスクファクターに顕著な影響を与えなかった。このことより、gAd は、血管壁やマクロファージに直接作用して、抗動脈硬化作用を発現している可能性が示唆された。

(7) gAd の動脈硬化発症抑制の作用機序

gAd の血管壁やマクロファージに対する直接作用のメカニズムを明らかにする目的で、大動脈弁輪部の凍結連続輪状切片を用いて、Oil Red O 染色及び抗スカベンジャー受容体 A 抗体、マクロファージ特異的マーカーである抗 Mac3 抗体で免疫染色を施行した。その結果、図 21 に示すように gAd の過剰発現はマクロファージの集積には大きな影響を与えなかったが、スカベンジャー受容体 A の発現を低下させて、マクロファージへの脂質の蓄積を抑制し、動脈硬化発症を低減させることが判明した。

産業上の利用可能性

本発明によれば、動脈壁のスカベンジャー受容体 A の発現を低下させて、マクロファージへの脂質の蓄積を抑制することにより、動脈硬化の発症及び進展を防止することにより、動脈硬化の実体像である血管内膜の肥厚を直接抑制できる動脈硬化症予防治療剤が提供できる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan science and Technology Corporation

<120> Preventing and Ameliorating Medicine for Atherosclerosis 10

<130> JST0011

<140>

<141>

<150> JP2002-151220 20

<151> 2002-05-24

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1 30

<210> 1

<211> 735

<212> DNA

<213> Homosapiens

<220> 40

<221> CDS

<222> (1).. (735)

<400> 1

atg ctg ttg ctg gga gct gtt cta ctg cta tta gct ctg ccc ggt cat 48

Met Leu Leu Leu Gly Ala Val Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Gly His

1 5 10 15

gac cag gaa acc acg act caa ggg ccc gga gtc ctg ctt ccc ctg ccc 96 10

Asp Gln Glu Thr Thr Thr Gln Gly Pro Gly Val Leu Leu Pro Leu Pro

20 25 30

aag ggg gcc tgc aca ggt tgg atg gcg ggc atc cca ggg cat ccg ggc 144

Lys Gly Ala Cys Thr Gly Trp Met Ala Gly Ile Pro Gly His Pro Gly

35 40 45 20

cat aat ggg gcc cca ggc cgt gat ggc aga gat ggc acc cct ggt gag 192

His Asn Gly Ala Pro Gly Arg Asp Gly Arg Asp Gly Thr Pro Gly Glu

50 55 60

aag ggt gag aaa gga gat cca ggt ctt att ggt cct aag gga gac atc 240 30

Lys Gly Glu Lys Gly Asp Pro Gly Leu Ile Gly Pro Lys Gly Asp Ile

65 70 75 80

ggt gaa acc gga gta ccc ggg gct gaa ggt ccc cga ggc ttt ccg gga 288

Gly Glu Thr Gly Val Pro Gly Ala Glu Gly Pro Arg Gly Phe Pro Gly 40

85 90 95

atc caa ggc agg aaa gga gaa cct gga gaa ggt gcc tat gta tac cgc 336

Ile Gln Gly Arg Lys Gly Glu Pro Gly Glu Gly Ala Tyr Val Tyr Arg
100 105 110

tca gca ttc agt gtg gga ttg gag act tac gtt act atc ccc aac atg 384

Ser Ala Phe Ser Val Gly Leu Glu Thr Tyr Val Thr Ile Pro Asn Met
115 120 125 10

ccc att cgc ttt acc aag atc ttc tac aat cag caa aac cac tat gat 432

Pro Ile Arg Phe Thr Lys Ile Phe Tyr Asn Gln Gln Asn His Tyr Asp
130 135 140

ggc tcc act ggt aaa ttc cac tgc aac att cct ggg ctg tac tac ttt 480 20

Gly Ser Thr Gly Lys Phe His Cys Asn Ile Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe
145 150 155 160

gcc tac cac atc aca gtc tat atg aag gat gtg aag gtc agc ctc ttc 528

Ala Tyr His Ile Thr Val Tyr Met Lys Asp Val Lys Val Ser Leu Phe
165 170 175 30

aag aag gac aag gct atg ctc ttc acc tat gat cag tac cag gaa aat 576

Lys Lys Asp Lys Ala Met Leu Phe Thr Tyr Asp Gln Tyr Gln Glu Asn
180 185 190 40

aat gtg gac cag gcc tcc ggc tct gtg ctc ctg cat ctg gag gtg ggc 624

Asn Val Asp Gln Ala Ser Gly Ser Val Leu Leu His Leu Glu Val Gly
195 200 205

gac caa gtc tgg ctc cag gtg tat ggg gaa gga gag cgt aat gga ctc 672

Asp Gln Val Trp Leu Gln Val Tyr Gly Glu Gly Glu Arg Asn Gly Leu

210 215 220

tat gct gat aat gac aat gac tcc acc ttc aca ggc ttt ctt ctc tac 720

Tyr Ala Asp Asn Asp Asn Asp Ser Thr Phe Thr Gly Phe Leu Leu Tyr

10

225 230 235 240

cat gac acc aac tga 735

His Asp Thr Asn

245

20

<210> 2

<211> 244

<212> PRT

<213> Homosapiens

30

<400> 2

Met Leu Leu Leu Gly Ala Val Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Gly His

1 5 10 15

Asp Gln Glu Thr Thr Thr Gln Gly Pro Gly Val Leu Leu Pro Leu Pro

20 25 30

40

Lys Gly Ala Cys Thr Gly Trp Met Ala Gly Ile Pro Gly His Pro Gly

35 40 45

His Asn Gly Ala Pro Gly Arg Asp Gly Arg Asp Gly Thr Pro Gly Glu
 50 55 60
 Lys Gly Glu Lys Gly Asp Pro Gly Leu Ile Gly Pro Lys Gly Asp Ile
 65 70 75 80
 Gly Glu Thr Gly Val Pro Gly Ala Glu Gly Pro Arg Gly Phe Pro Gly
 85 90 95 10
 Ile Gln Gly Arg Lys Gly Glu Pro Gly Glu Gly Ala Tyr Val Tyr Arg
 100 105 110
 Ser Ala Phe Ser Val Gly Leu Glu Thr Tyr Val Thr Ile Pro Asn Met
 115 120 125
 Pro Ile Arg Phe Thr Lys Ile Phe Tyr Asn Gln Gln Asn His Tyr Asp
 130 135 140 20
 Gly Ser Thr Gly Lys Phe His Cys Asn Ile Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe
 145 150 155 160
 Ala Tyr His Ile Thr Val Tyr Met Lys Asp Val Lys Val Ser Leu Phe
 165 170 175
 Lys Lys Asp Lys Ala Met Leu Phe Thr Tyr Asp Gln Tyr Gln Glu Asn
 180 185 190 30
 Asn Val Asp Gln Ala Ser Gly Ser Val Leu Leu His Leu Glu Val Gly
 195 200 205
 Asp Gln Val Trp Leu Gln Val Tyr Gly Glu Gly Glu Arg Asn Gly Leu
 210 215 220
 Tyr Ala Asp Asn Asp Asn Asp Ser Thr Phe Thr Gly Phe Leu Leu Tyr
 225 230 235 240 40
 His Asp Thr Asn

<210> 3

<211> 1276

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

10

<221> CDS

<222> (46)..(789)

<400> 3

ctctaaagat tgtcagtgga tctgacgaca ccaaaagggc tcagg atg cta ctg ttg 57

Met Leu Leu Leu

20

1

caa gct ctc ctg ttc ctc tta atc ctg ccc agt cat gcc gaa gat gac 105

Gln Ala Leu Leu Phe Leu Leu Ile Leu Pro Ser His Ala Glu Asp Asp

5

10

15

20

30

gtt act aca act gaa gag cta gct cct gct ttg gtc cct cca ccc aag 153

Val Thr Thr Thr Glu Glu Leu Ala Pro Ala Leu Val Pro Pro Pro Lys

25

30

35

gga act tgt gca ggt tgg atg gca ggc atc cca gga cat cct ggc cac 201

40

Gly Thr Cys Ala Gly Trp Met Ala Gly Ile Pro Gly His Pro Gly His

40

45

50

aat ggc aca cca ggc cgt gat ggc aga gat ggc act cct gga gag aag	249	
Asn Gly Thr Pro Gly Arg Asp Gly Arg Asp Gly Thr Pro Gly Glu Lys		
55 60 65		
gga gag aaa gga gat gca ggt ctt ctt ggt cct aag ggt gag aca gga	297	
Gly Glu Lys Gly Asp Ala Gly Leu Leu Gly Pro Lys Gly Glu Thr Gly		10
70 75 80		
gat gtt gga atg aca gga gct gaa ggg cca cgg ggc ttc ccc gga acc	345	
Asp Val Gly Met Thr Gly Ala Glu Gly Pro Arg Gly Phe Pro Gly Thr		
85 90 95 100		20
cct ggc agg aaa gga gag cct gga gaa gcc gct tat atg tat cgc tca	393	
Pro Gly Arg Lys Gly Glu Pro Gly Glu Ala Ala Tyr Met Tyr Arg Ser		
105 110 115		
gcg ttc agt gtg ggg ctg gag acc cgc gtc act gtt ccc aat gta ccc	441	
Ala Phe Ser Val Gly Leu Glu Thr Arg Val Thr Val Pro Asn Val Pro		30
120 125 130		
att cgc ttt act aag atc ttc tac aac caa cag aat cat tat gac ggc	489	
Ile Arg Phe Thr Lys Ile Phe Tyr Asn Gln Gln Asn His Tyr Asp Gly		
135 140 145		40
agc act ggc aag ttc tac tgc aac att ccg gga etc tac tac ttc tet	537	
Ser Thr Gly Lys Phe Tyr Cys Asn Ile Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Ser		

150	155	160		
tac cac atc acg gtg tac atg aaa gat gtg aag gtg agc ctc ttc aag			585	
Tyr His Ile Thr Val Tyr Met Lys Asp Val Lys Val Ser Leu Phe Lys				
165	170	175	180	
aag gac aag gcc gtt ctc ttc acc tac gac cag tat cag gaa aag aat			633	10
Lys Asp Lys Ala Val Leu Phe Thr Tyr Asp Gln Tyr Gln Glu Lys Asn				
	185	190	195	
gtg gac cag gcc tct ggc tct gtg ctc ctc cat ctg gag gtg gga gac			681	
Val Asp Gln Ala Ser Gly Ser Val Leu Leu His Leu Glu Val Gly Asp				20
	200	205	210	
caa gtc tgg ctc cag gtg tat ggg gat ggg gac cac aat gga ctc tat			729	
Gln Val Trp Leu Gln Val Tyr Gly Asp Gly Asp His Asn Gly Leu Tyr				
	215	220	225	30
gca gat aac gtc aac gac tct aca ttt act ggc ttt ctt ctc tac cat			777	
Ala Asp Asn Val Asn Asp Ser Thr Phe Thr Gly Phe Leu Leu Tyr His				
	230	235	240	
gat acc aac tga ctgcaactac ccatagccca tacaccagga gaatcatgga			829	40
Asp Thr Asn				
245				

acagtcgaca cactttcagc ttagittgag agattgattt tattgcttag tttgagagtc 889

ctgagtatta tccacacgtg tactcacttg ttcattaaac gactttataa aaaataattt 949

gtgttcctag tccagaaaaa aaggcactcc ctggtctcca cgactcttac atggtagcaa 1009

10

taacagaatg aaaatcacat ttggtatggg ggcttcacaa tattegcatg actgtctgga 1069

agtagaccat gctatitttc tgctcactgt acacaaatat tgttcacata aacctataa 1129

tgtaaataatg aaatacagtg attactcttc tcacaggctg agtgtatgaa tgtctaaaga 1189

20

cccataagta ttaaagtggg agggataaat tggaaaaaaaa aaaaaaaaaa aagaaaaact 1249

ttagagcaca ctggggcgccg ttactag 1276

30

<210> 4

<211> 247

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

40

Met Leu Leu Leu Gln Ala Leu Leu Phe Leu Leu Ile Leu Pro Ser His

1

5

10

15

Ala Glu Asp Asp Val Thr Thr Thr Glu Glu Leu Ala Pro Ala Leu Val

20	25	30	
Pro	Pro	Pro	Lys Gly Thr Cys Ala Gly Trp Met Ala Gly Ile Pro Gly
35	40	45	
His	Pro	Gly	His Asn Gly Thr Pro Gly Arg Asp Gly Arg Asp Gly Thr
50	55	60	
Pro	Gly	Glu	Lys Gly Glu Lys Gly Asp Ala Gly Leu Leu Gly Pro Lys
65	70	75	10
Gly	Glu	Thr	Gly Asp Val Gly Met Thr Gly Ala Glu Gly Pro Arg Gly
	85	90	95
Phe	Pro	Gly	Thr Pro Gly Arg Lys Gly Glu Pro Gly Glu Ala Ala Tyr
	100	105	110
Met	Tyr	Arg	Ser Ala Phe Ser Val Gly Leu Glu Thr Arg Val Thr Val
	115	120	125
Pro	Asn	Val	Pro Ile Arg Phe Thr Lys Ile Phe Tyr Asn Gln Gln Asn
130	135	140	
His	Tyr	Asp	Gly Ser Thr Gly Lys Phe Tyr Cys Asn Ile Pro Gly Leu
145	150	155	160
Tyr	Tyr	Phe	Ser Tyr His Ile Thr Val Tyr Met Lys Asp Val Lys Val
	165	170	175
Ser	Leu	Phe	Lys Lys Asp Lys Ala Val Leu Phe Thr Tyr Asp Gln Tyr
	180	185	190
Gln	Glu	Lys	Asn Val Asp Gln Ala Ser Gly Ser Val Leu Leu His Leu
195	200	205	40
Glu	Val	Gly	Asp Gln Val Trp Leu Gln Val Tyr Gly Asp Gly Asp His
210	215	220	
Asn	Gly	Leu	Tyr Ala Asp Asn Val Asn Asp Ser Thr Phe Thr Gly Phe

225

230

235

240

Leu Leu Tyr His Asp Thr Asn

245

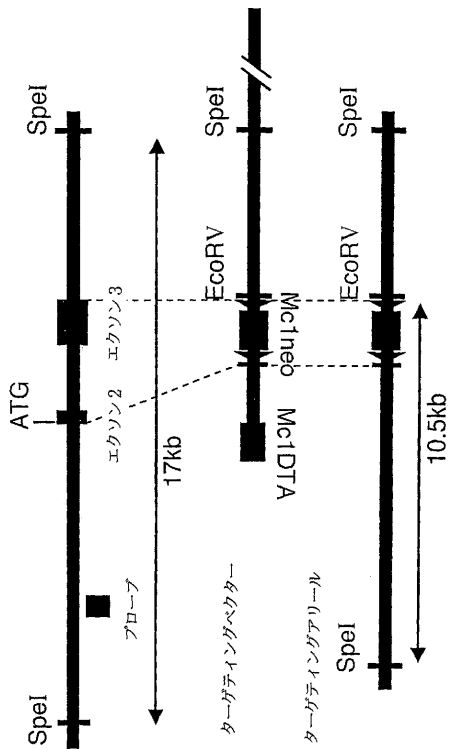
【図面の簡単な説明】

- 図1は、アディポネクチン遺伝子欠損についてのジーンターゲットの模式図を示す。上：マウスアディポネクチン遺伝子の制限酵素地図、中：アディポネクチン遺伝子ターゲットベクター、下：予想されるターゲットアレル。 10
- 図2は、Spe IとEoRVによって消化されたES細胞由来のDNAのサザンブロット結果を示す。17kbのバンドは野生型アレルを、10.5kbのバンドは変異アレルを示す。
- 図3は、Spe IとEoRVによって消化された野生型(wild-type)、ヘテロ欠損型(adipo +/-)、ホモ欠損型(adipo -/-)マウス由来のDNAのサザンブロット結果を示す。17kbのバンドは野生型アレルを、10.5kbのバンドは変異アレルを示す。
- 図4は、野生型(wild-type)、ヘテロ欠損型(adipo +/-)、ホモ欠損型(adipo -/-)マウスの白色脂肪組織のノーザンブロット結果を示す。
- 図5は、野生型(wild-type)、ヘテロ欠損型(adipo +/-)、ホモ欠損型(adipo -/-)マウスの血中アディポネクチン濃度を示す。* * P < 0.01。 20
- 図6は、野生型(wild-type)、ヘテロ欠損型(adipo +/-)、ホモ欠損型(adipo -/-)マウスの血中レプチン濃度を示す。
- 図7は、野生型(wild-type)、ヘテロ欠損型(adipo +/-)、ホモ欠損型(adipo -/-)マウスの6週における体重を示す。
- 図8は、野生型(wild-type)、ヘテロ欠損型(adipo +/-)マウスの6週におけるインスリン負荷試験結果を示す。* P < 0.05。
- 図9は、野生型(wild-type)、ヘテロ欠損型(adipo +/-)マウスの6週におけるグルコース負荷試験結果を示す。* P < 0.05。 30
- 図10は、野生型(wild-type)、ヘテロ欠損型(adipo +/-)マウスの高脂肪食負荷10週におけるグリコース負荷試験結果を示す。* P < 0.05、* * P < 0.01。
- 図11は、野生型(wild-type)、ホモ欠損型(adipo -/-)マウスの6週におけるインスリン負荷試験結果を示す。* P < 0.05、* * P < 0.01。
- 図12は、野生型(wild-type)、ヘテロ欠損型(adipo +/-)マウスの6週におけるグルコース負荷試験結果を示す。* P < 0.05、* * P < 0.01。
- 図13は、野生型(wild-type)、ヘテロ欠損型(adipo +/-)マウスの血中遊離脂肪酸(FFA)、中性脂肪(TG)、総コレステロール値(TC)を示す。
- 図14は、野生型(wild-type)、ホモ欠損型(adipo -/-)マウスの血中遊離脂肪酸(FFA)、中性脂肪(TG)、総コレステロール値(TC)を示す。 40
- 図15は、野生型(wild-type)、ヘテロ欠損型(adipo +/-)マウスのカフ損傷2週間後における血管の内径を示す。
- 図16は、野生型(wild-type)、ヘテロ欠損型(adipo +/-)マウスのカフ損傷2週間後における内膜肥厚の程度を示す。
- 図17は、野生型(wild-type)、ヘテロ欠損型(adipo +/-)マウスのカフ損傷2週間後における中膜肥厚の程度を示す。
- 図18は、野生型(wild-type)、ヘテロ欠損型(adipo +/-)マウスのカフ損傷2週間後における内膜中膜比を示す。
- 図19は、apoE欠損マウス(apoE -/- : a)及びgAd過剰発現apoE欠損 50

マウス (gAdTg apoE - / - : b) における動脈硬化巣を示す図である。
 図 20 は、apoE 欠損マウス (apoE - / -) 及び gAd 過剰発現 apoE 欠損マウス (gAdTg apoE - / -) における動脈硬化巣の面積〔大動脈弓 (b) 及び下行大動脈 (c) 及びそれらの合計 (a)〕を示す図である。
 図 21 は、apoE 欠損マウス (apoE - / -) 及び gAd 過剰発現 apoE 欠損マウス (gAdTg apoE - / -) における動脈に対する Oil Red O 染色、抗 Mac3 抗体との反応、抗スカベンジャー受容体 A 抗体との反応を示す図である。

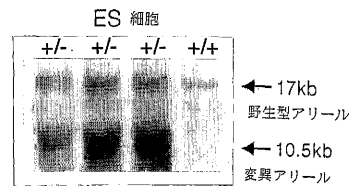
【 図 1 】

図 1



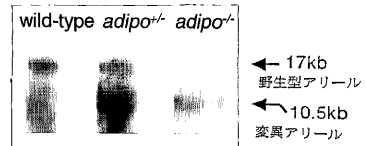
【 図 2 】

図 2



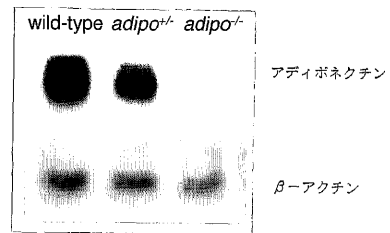
【 図 3 】

図 3

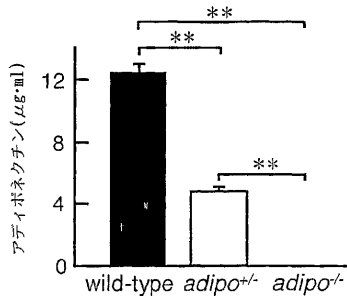


【 図 4 】

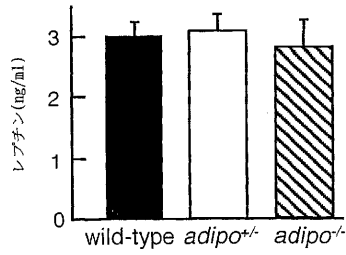
図 4



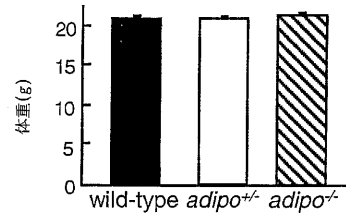
【図5】
図5



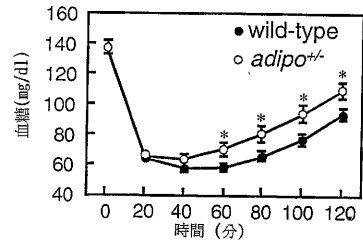
【図6】
図6



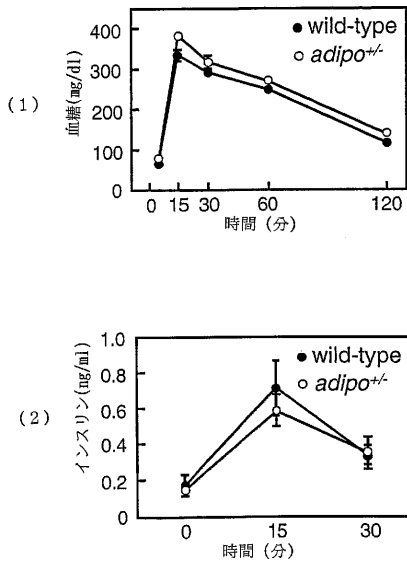
【図7】
図7



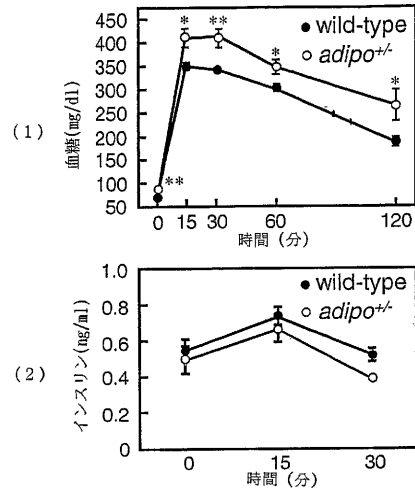
【図8】
図8



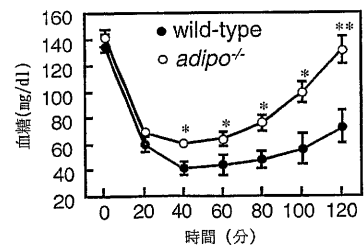
【図9】
図9



【図10】
図10

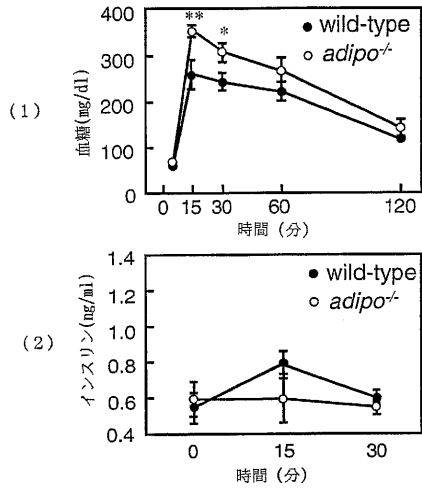


【図11】
図11



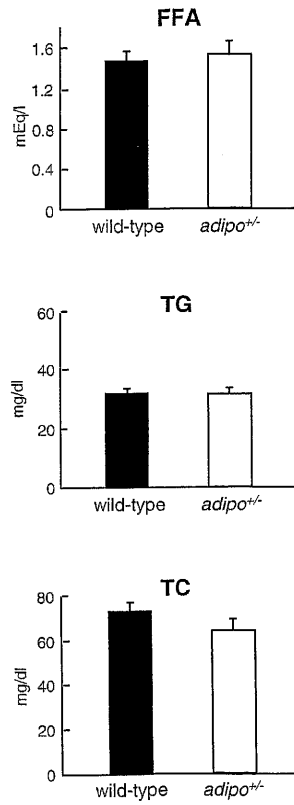
【 図 1 2 】

図 1 2



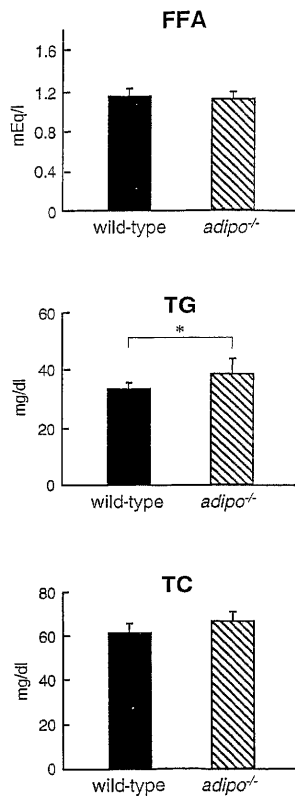
【 図 1 3 】

図 1 3



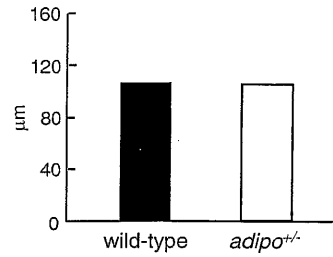
【 図 1 4 】

図 1 4



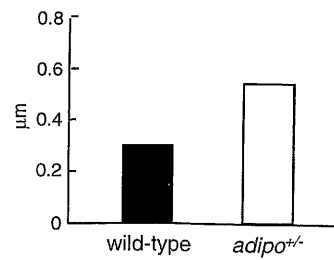
【 図 1 5 】

図 1 5

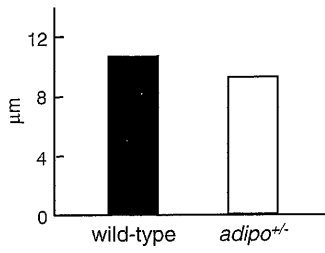


【 図 1 6 】

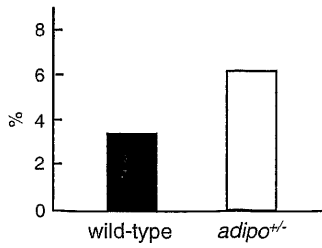
図 1 6



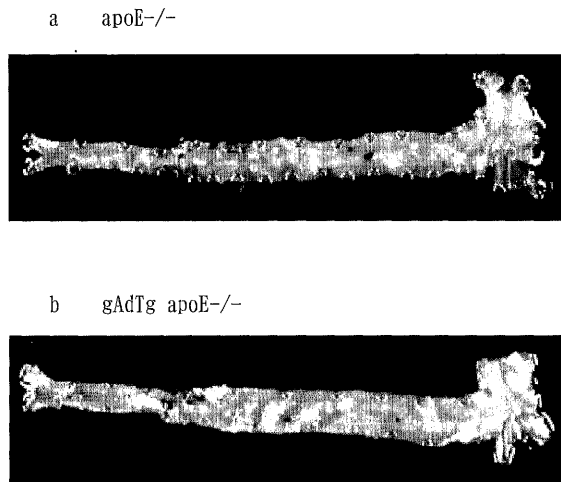
【図 17】
図 17



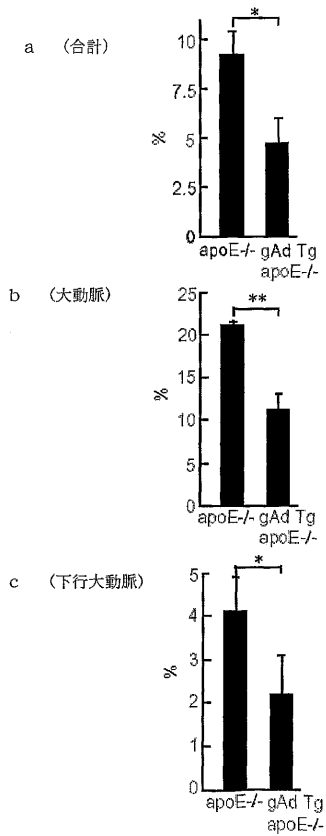
【図 18】
図 18



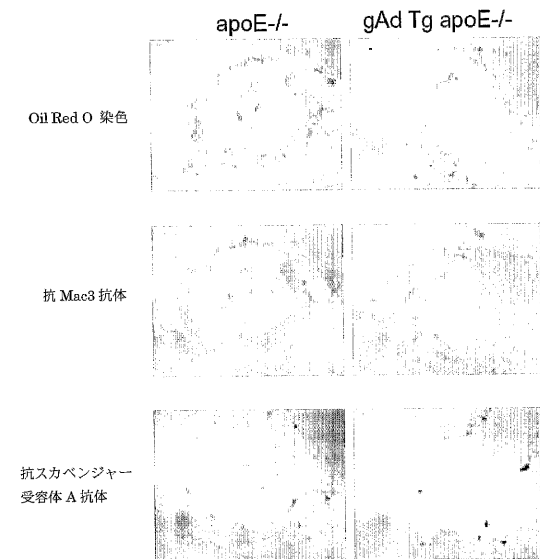
【図 19】
図 19



【図 20】
図 20



【図 21】
図 21



フロントページの続き

- (74)代理人 100089048
弁理士 浅野 康隆
- (74)代理人 100101317
弁理士 的場 ひろみ
- (72)発明者 門脇 孝
神奈川県川崎市麻生区片平3 - 1 6 - 1 4
- (72)発明者 山内 敏正
東京都文京区向丘1 - 3 - 1 - 3 0 6
- (72)発明者 窪田 直人
東京都台東区池之端4 - 8 - 8 - 2 0 5
- (72)発明者 寺内 康夫
東京都港区三田5 - 7 - 1 2 - 8 0 3
- (72)発明者 窪田 哲也
東京都目黒区大橋1 - 8 - 3 - 4 0 8
- (72)発明者 野田 哲生
東京都文京区春日2 - 1 9 - 1 2 - 6 0 1
- (72)発明者 永井 良三
東京都文京区本郷2 - 3 2 - 2 - 1 2 0 4
- (72)発明者 今井 靖
東京都豊島区駒込6 - 1 - 2 - 5 0 6

審査官 岩下 直人

- (56)参考文献 国際公開第02 / 061076 (WO, A1)
Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class
A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages, Circulation,
2001年, Vol.103, No.8, pages 1057-1063

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/00
A61K 48/00
A61P 9/10
CA(STN)
EMBASE(STN)
MEDLINE(STN)
BIOSIS(STN)