

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02006/112418

発行日 平成20年12月11日(2008.12.11)

(43) 国際公開日 平成18年10月26日(2006.10.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	2G045
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4B063
G01N 33/15 (2006.01)	G01N 33/15 Z	
G01N 33/50 (2006.01)	G01N 33/50 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 14 頁)

出願番号 特願2007-528129 (P2007-528129)	(71) 出願人 504179255 国立大学法人 東京医科歯科大学 東京都文京区湯島 1-5-45
(21) 国際出願番号 PCT/JP2006/307983	
(22) 国際出願日 平成18年4月14日(2006.4.14)	
(31) 優先権主張番号 特願2005-120421 (P2005-120421)	(74) 代理人 100081271 弁理士 吉田 芳春
(32) 優先日 平成17年4月18日(2005.4.18)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	(72) 発明者 小川 佳宏 東京都文京区湯島 1丁目5番45号 国立 大学法人東京医科歯科大学内
	(72) 発明者 菅波 孝祥 東京都文京区湯島 1丁目5番45号 国立 大学法人東京医科歯科大学内
	Fターム(参考) 2G045 AA40 BB20 CB01 DA14 DA36 DA37 DA60 FB03 GC22 4B063 QA18 QQ53 QQ61 QQ79 QR32 QR55 QR62 QR77 QS32 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脂肪細胞の炎症性変化を抑制する物質のスクリーニング系及びそれを用いたスクリーニング方法

(57) 【要約】

脂肪細胞の炎症性変化を効果的に抑制する物質をスクリーニングするためのスクリーニング系及びそれを用いたスクリーニング方法を提供することを目的とする。

脂肪細胞とマクロファージの共培養からなる、脂肪細胞の炎症性変化の増加に関与するパラクリン因子又は細胞内シグナルを阻害する阻害物質のスクリーニング系である。また、前記スクリーニング系に被検物質を添加して、前記被検物質によるパラクリン因子、又は炎症性サイトカインの遺伝子発現レベルの変化を測定することを特徴とするパラクリン因子又は細胞内シグナルを阻害する阻害物質のスクリーニング方法である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脂肪細胞とマクロファージの共培養からなる、脂肪細胞の炎症性変化の増加に關与するパラクリン因子又は細胞内シグナルを阻害する阻害物質のスクリーニング系。

【請求項 2】

請求の範囲 1 記載のスクリーニング系において、脂肪細胞とマクロファージの共培養が培養液を介した非接触系であることを特徴とするスクリーニング系。

【請求項 3】

請求の範囲 1 又は 2 記載のスクリーニング系に被検物質を添加して、前記被検物質によるパラクリン因子、又は炎症性サイトカインの遺伝子発現レベルの変化を測定することを特徴とするパラクリン因子又は細胞内シグナルを阻害する阻害物質のスクリーニング方法。

10

【請求項 4】

請求の範囲 3 記載のスクリーニング系において、パラクリン因子がマクロファージから産生するTNF- α であることを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項 5】

請求の範囲 3 記載のスクリーニング方法において、パラクリン因子が分化脂肪細胞から分泌される遊離脂肪酸であることを特徴とするスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、脂肪細胞の炎症性変化を抑制する物質をスクリーニングするためのスクリーニング系及びそれを用いたスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、メタボリックシンドロームの分子基盤として全身の軽度の慢性炎症反応が注目され、肥満モデル動物や肥満患者の脂肪組織においてもマクロファージの浸潤が増加することが報告されている。(非特許文献 1)には、脂肪組織に集積したマクロファージは、MCP-1、IL-6、IL-1 α 、TNF- α 等の炎症性サイトカインを分泌し、更なるマクロファージをリクルートすることが報告されている。また、脂肪組織では多くの炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインが産生されており、体脂肪量の増加における両者のバランスの破綻が、肥満を基盤とするメタボリックシンドロームの発症・進展に關与すると考えられている。

30

【0003】

そのため、炎症性サイトカインの産生を阻害する物質のスクリーニングが行なわれている。しかし、このようなスクリーニング方法で用いるスクリーニング系は、脂肪細胞の炎症性サイトカインの産生を効果的に抑制する物質をスクリーニングすることができなかった。

【0004】

【非特許文献 1】JCI Dec 2003, vol112, 1785-1788

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、上記従来状況に鑑み、脂肪細胞の炎症性変化を効果的に抑制する物質をスクリーニングするためのスクリーニング系及びそれを用いた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】

【0006】

上記課題を解決するため、本発明者らは、脂肪組織局所における脂肪細胞とマクロファージとの相互作用の分子機構について検討を行なった。その結果、脂肪細胞に由来する遊

50

遊離脂肪酸がマクロファージにおけるTNF- α 産生を増加し、マクロファージに由来するTNF- α が脂肪細胞における脂肪酸の遊離を増大させ、脂肪組織の炎症反応を増大させることを見出し、この知見に基づき本発明を完成するに至った。

【0007】

本発明は、次の(1)～(5)の構成からなる。

(1) 脂肪細胞とマクロファージの共培養からなる、脂肪細胞の炎症性変化の増加に關与するパラクリン因子又は細胞内シグナルを阻害する阻害物質のスクリーニング系。

(2) (1)記載のスクリーニング系において、脂肪細胞とマクロファージの共培養が培養液を介した非接触系であることを特徴とするスクリーニング系。

(3) (1)又は(2)記載のスクリーニング系に被検物質を添加して、前記被検物質によるパラクリン因子、又は炎症性サイトカインの遺伝子発現レベルの変化を測定することを特徴とするパラクリン因子又は細胞内シグナルを阻害する阻害物質のスクリーニング方法。

(4) (3)記載のスクリーニング方法において、パラクリン因子がマクロファージから産生するTNF- α であることを特徴とするスクリーニング方法。

(5) (3)記載のスクリーニング方法において、パラクリン因子が分化脂肪細胞から分泌される遊離脂肪酸であることを特徴とする。

【発明の効果】

【0008】

本発明のスクリーニング系は、脂肪細胞とマクロファージの共培養から構成されているので、両方の細胞に相互に作用するパラクリン因子、あるいは細胞内シグナルを阻害する阻害剤をスクリーニングするのに有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

まず、本発明を完成するのに至った知見について説明する。本発明者らは、脂肪組織局所における脂肪細胞とマクロファージとの相互作用の分子機構について検討を行なった。その結果、脂肪細胞に由来する遊離脂肪酸がマクロファージにおけるTNF- α 産生を増加し、マクロファージに由来するTNF- α が脂肪細胞における脂肪酸の遊離を増大させ、脂肪組織の炎症反応を増大させることを見出した。すなわち、液性因子であるTNF- α や遊離脂肪酸が、パラクリン因子としてそれぞれ脂肪細胞やマクロファージに作用し、脂肪組織の炎症反応を増大させることが明らかとなった。

【0010】

本発明者らは、以上の知見に基づき本発明を完成させた。以下、本発明を実施するための最良の形態について詳細に説明する。

【0011】

(実施例1)

<共培養の作製>

本発明のスクリーニング系として用いるマクロファージ及び脂肪細胞の共培養の作製方法について説明する。まず、マクロファージ(RAW264, RIKEN BioResource Center, Tsukuba, Japan)と前駆脂肪細胞(3T3-L1, American Type Culuture Collection, Manassas, VA)を、10%ウシ胎仔血清(Sanko Junyaku, Tokyo, Japan)及び抗生物質を含むDulbecco's Modified Eagle培地中で培養を行なった。培養の条件は、37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ /95% Airとした。

なお、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化は、インスリン(Eli Lilly, Indianapolis, IN)、デキサメタゾン、及び3-イソブチル-1-メチル-キサンチンを用いて行なった。なお、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化の後に、さらに培養を行なうことで肥大化させた脂肪細胞を用いることも可能である。

【0012】

続いて、分化脂肪細胞(分化3T3-L1)とマクロファージ(RAW264, 腹腔内マクロファージ)の共培養を行なう。分化脂肪細胞とマクロファージの共培養は、接触法のものを作製

10

20

30

40

50

した。接触法の共培養は、図1(A)に示すように、分化3T3-L1をシャーレで培養し、RAW264を分化3T3-L1の上に播種した。そして、これらの細胞は48時間互いに接触した状態で培養された後に採取した。なお、シャーレは直径6cmのものを用いて、分化3T3-L1及びRAW264は各々 1.5×10^6 個/well、 $1.0 \times 10^3 \sim 10^6$ 個用いた。また、対照培養法では、図1(B)に示すように、脂肪細胞とマクロファージとは分離して培養、採取後に混合した。なお、対照培養法においては、脂肪細胞及びマクロファージの数は同数とした。

【0013】

< 定量的リアルタイムPCR法 >

RNAはAGPC法(Acid guanidinium-Phenol-Chloroform法)により培養した細胞から抽出した。また、定量的リアルタイムPCR法は、ABI Prism 7000 Sequence Detection System using TAQMAN(登録商標) or SYBR(登録商標) Green PCR Master Mix Reagent Kit (Applied Biosystems, foster City, CA)を用いて行なった。

10

【0014】

< 炎症性サイトカイン及び抗炎症性サイトカインの遺伝子発現レベルの測定 >

続いて、培養液中のMCP-1、TNF- α 、及びアディポネクチンの測定方法について説明する。これら炎症性サイトカイン又は抗炎症性サイトカインを脂肪細胞の炎症性変化の指標として用いた。24時間共培養した後の培養上澄におけるMCP-1、TNF- α 、及びアディポネクチンの定量は、市販の固相酵素免疫検定法(ELISA, MCP-1 and TNF- α , R&D; アディポネクチン, Otsuka Pharmaceutical, Tokyo, Japan)を用いて行なった。

【0015】

分化脂肪細胞(分化3T3-L1)及びマクロファージ(RAW264)の共培養を行って、炎症性サイトカイン及び抗炎症性サイトカインの遺伝子発現レベルの測定を行なった。図2(A)~(C)に示すように、炎症性サイトカインであるMCP-1、IL-6、及びTNF- α が産生された($P < 0.01$)。また、図3に示すように、抗炎症性サイトカインであるアディポネクチンの有意な減少が認められた($P < 0.05$)。そして、図4に示すように、MCP-1及びアディポネクチンの変化量は時間の経過に従って増加した。また、図5に示すように、MCP-1の増加量とアディポネクチンの減少量はRAW264に依存した。

20

【0016】

(実施例2)

非接触法の共培養は、具体的には、図6(A)に示すように、トランスウェルを用いて、分化脂肪細胞(分化3T3-L1)及びマクロファージ(RAW264)とが相互に直接接触することがないように非接触法とした以外は(実施例1)と同様に行なった。具体的には、 $0.4 \mu\text{m}$ の孔を有する多孔質膜からなるトランスウェルインサート(Corning, Corning, NY)を用いて、脂肪細胞とマクロファージとを分離して共培養を行なった。そして、24時間培養を行なった後、下層ウェルの分化3T3-L1を採取し、炎症性サイトカイン及び抗炎症性サイトカインの遺伝子発現レベルの測定を行なった。その結果、図7に示すように、分化3T3-L1におけるMCP-1とIL-6の遺伝子発現を亢進した($P < 0.01$)。また、遺伝子発現亢進の程度は、RAW264の量に依存する結果となった。なお、対照培養法は、図6(B)に示すように、脂肪細胞とマクロファージとは分離して培養して行なった。

30

【0017】

以上の結果に示すとおり、分化脂肪細胞とマクロファージの共培養系を用いると、MCP-1の増加が認められ、脂肪細胞の炎症性変化が増大することが分かる。したがって、分化脂肪細胞とマクロファージの共培養系を、脂肪細胞の炎症性変化を阻害する物質、すなわちパラクリン因子の阻害物質のスクリーニングに用いることができる。そして、特に、パラクリン因子は液性物質であり、トランスウェル等を用いた非接触系において、特に脂肪細胞の炎症性変化を阻害する物質をスクリーニングすることができる。

40

【0018】

続いて、(実施例1)及び(実施例2)においてマクロファージとして用いたRAW264以外の物質を用いて共培養を作製した場合について説明する。

【0019】

50

(実施例3)

マクロファージとして、RAW264の代わりにGFPトランスジェニックマウスの腹腔内マクロファージを用いた以外は(実施例1)と同様に行なった。なお、マウスの腹腔内マクロファージは、GFPトランスジェニックマウスから5mM 過ヨウ素酸ナトリウムを用いて4日間熟成させることで得た。その結果、腹腔内マクロファージを用いた共培養においては、図8に示すように、RAW264を用いた場合と同様にMCP-1遺伝子発現が認められ($P<0.01$)、本発明のスクリーニング系に用いることができることがわかった。

【0020】

(比較例1)

マクロファージとして、RAW264の代わりにF4/80を用いた以外は(実施例2)と同様に行なった。その結果、F4/80を用いた共培養においては、対照培養法との差違は認められなかった。

【0021】

(比較例2)

RAW264の代わりに未分化3T3-L1を用いた以外は(実施例1)と同様に行なった。その結果、図8に示すように、未分化3T3-L1を用いた共培養はMCP-1遺伝子発現の増加を殆ど示さないことが分かった。

【0022】

続いて、脂肪細胞の炎症性変化を阻害する物質のスクリーニング方法について説明する。

【0023】

(実施例5)

被検物質として抗TNF-中和抗体を3T3-L1とRAW264からなる共培養系に添加した以外は(実施例1)及び(実施例2)と同様に行なった。炎症性サイトカインであるMCP-1の遺伝子発現を測定した結果、図9(A)に示すように、接触法においてMCP-1の遺伝子発現の亢進を効果的に阻害することがわかる($P<0.01$)。また、図9(B)に示すように、非接触法においてもMCP-1の遺伝子発現の亢進を効果的に阻害することがわかる($P<0.01$)。したがって、本発明のスクリーニング系は、パラクリン因子であるTNF-を阻害する物質のスクリーニングに有用であることがわかる。

【0024】

(実施例6)

被検物質として細胞内シグナルの一つであるMAPキナーゼを阻害する阻害剤であるMAP kinase kinase 1 (MEK1) 阻害剤(以下PD98059, Cell Signaling, Berberly, MA)、c-jun amino-terminal kinase (JNK) 阻害剤(以下SP600125, BIOMOL, Plymouth Meeting, PA)、あるいは細胞内シグナルの一つである転写因子nuclear factor-kB(NF-kB)を阻害する阻害剤であるNF-kB阻害剤(以下BAY11-7085, Merck, San Diego, CA)を用いて前処理を行なった以外は、(実施例1)と同様に行なった。MCP-1の遺伝子発現を測定した結果、PD98059及びSP600125を用いて前処理することでMCP-1がほとんど増加しないことがわかった($P<0.01$)。この結果、脂肪細胞の炎症性変化には細胞内シグナルも重要な役割を担っていることがわかった。すなわち、本発明のスクリーニング系は、パラクリン因子を阻害する物質に限らずに、脂肪細胞の炎症性変化に関わるMAPキナーゼやNF-kB等の細胞内シグナルを阻害する物質のスクリーニングにも有用であることがわかる。

【0025】

(実施例7)

被検物質としてMAPキナーゼの阻害剤であるPD98059、SP600125、あるいはnuclear factor-kB(NF-kB)の阻害剤であるBAY11-7085を用いて前処理を行なった以外は、(実施例2)と同様にトランスウェルを用いた非接触法において行なった。MCP-1の遺伝子発現を測定した結果、図10に示すように、PD98059又はSP600125の添加により、3T3-L1におけるMCP-1の遺伝子発現の亢進を特に妨げることがわかった。したがって、非接触法の共培養についても、(実施例6)と同様に、パラクリン因子を阻害する物質に限らずに、脂肪細胞の

10

20

30

40

50

炎症性変化に関わるMAPキナーゼやNF- κ B等の細胞内シグナルを阻害する物質のスクリーニングに有用であることがわかる。

【0026】

(実施例8)

被検物質として飽和脂肪酸であるパルミチン酸、ラウリン酸を添加した以外は(実施例1)と同様に行なった。炎症性サイトカインであるTNF- α の遺伝子発現を測定した結果、図11に示すように、パルミチン酸、ラウリン酸などのような飽和脂肪酸はTNF- α の遺伝子発現を有意に増加させることがわかった($P < 0.01$)。

【0027】

(実施例9)

また、被検物質として不飽和脂肪酸であるリノレイン酸やエイコサペンタエン酸を添加した以外は(実施例1)と同様に行なった。TNF- α の遺伝子発現を測定した結果、図11に示すように、リノレイン酸やエイコサペンタエン酸のような不飽和脂肪酸は、TNF- α の遺伝子発現に影響を与えないことが分かった。

【0028】

(実施例10)

さらに、被検物質として、PD98059、SP600125、あるいはBAY11-7085を用いて前処理を行ない、遊離脂肪酸の量を測定した以外は(実施例1)と同様に行なった。なお、培養液中の遊離脂肪酸の濃度は、acyl-CoAオキシダーゼに基づいたカラーメトリックアッセイキット(NEFA-C; WAKO Pure Chemicals, Osaka, Japan)を用いて行なった。脂肪細胞の炎症性変化を増大させるパラクリン因子であるパルミチン酸の量を測定した結果、PD98059、SP600125、あるいはBAY11-7085の添加によりTNF- α の産生を亢進するパルミチン酸を有意に抑制することがわかった($P < 0.05$)。これらの結果は、遊離脂肪酸を分泌する脂肪細胞は少なくとも一部がMAPキナーゼ系を介してマクロファージにおける炎症性変化を増加させることを示している。したがって、本発明のスクリーニング系は、パラクリン因子である遊離脂肪酸を阻害する物質のスクリーニングに限らずに、脂肪細胞の炎症性変化に関わるMAPキナーゼやNF- κ B等の細胞内シグナルを阻害する物質のスクリーニングに有用であることがわかる。

【産業上の利用可能性】

【0029】

本発明に係るスクリーニング系は、脂肪細胞とマクロファージからなり、脂肪細胞の炎症性変化を起こすものであり、被検物質を加えることで被検物質が脂肪細胞の炎症性変化に与える影響を調べることができる。したがって、このスクリーニング系は、脂肪細胞の炎症性変化に関わる物質の探索や、脂肪細胞の炎症性変化を抑制する物質のスクリーニングに利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】脂肪細胞(3T3-L1)とマクロファージ(RAW264)の(A)共培養(接触法)、及び(B)対照培養法を示す図である。

【図2】対照培養と共培養(接触法)における(A)MCP-1、(B)IL-6、(C)TNF- α の遺伝子発現レベルを測定した結果である。

【図3】対照培養と共培養(接触法)におけるアディポネクチンの遺伝子発現レベルを測定した結果である。

【図4】対照培養と共培養(接触法)におけるMCP-1とアディポネクチンの遺伝子発現レベルを測定した結果である。

【図5】マクロファージ(RAW264)の細胞数に対する、対照培養法と共培養(接触法)におけるMCP-1とアディポネクチンの遺伝子発現レベルを測定した結果である。

【図6】脂肪細胞(3T3-L1)とマクロファージ(RAW264)の(A)共培養(非接触法)、及び(B)対照培養法を示す図である。

【図7】対照培養と共培養(非接触法)における(A)MCP-1、(B)IL-6の遺伝子発現

10

20

30

40

50

レベルを測定した結果である。

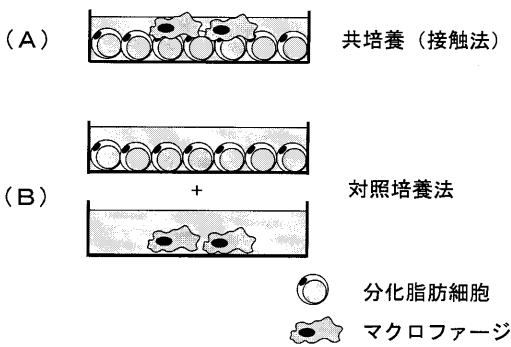
【図 8】未分化3T3-L1, RAW264, 及び腹腔内マクロファージを用いた共培養（接触法）におけるMCP-1遺伝子発現レベルを測定した結果である。

【図 9】（A）接触法及び（B）非接触法の共培養系において対照IgG（1 μg/ml）又は抗TNF- 抗体（1 μg/ml）を添加した際のMCP-1遺伝子発現レベルを測定した結果である。

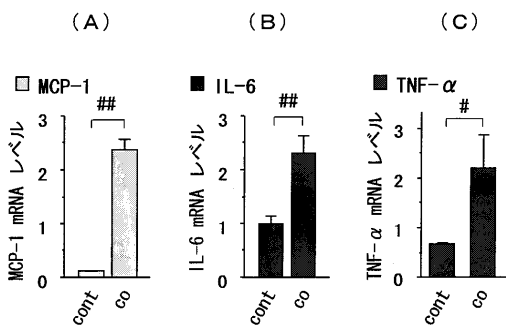
【図 10】非接触法の共培養系においてPD98059（20 μmol/l）又はSP600125（10 μmol/l）を添加した際のMCP-1遺伝子発現レベルを測定した結果である。

【図 11】非接触法の共培養系においてパルミチン酸（50-500 μmol/l）、ラウリル酸（500 μmol/l）、リノレイン酸（500 μmol/l）、又はエイコサペンタエン酸（50 μmol/l）を添加した際のTNF- 遺伝子発現レベルを測定した結果である。

【図 1】



【図 2】

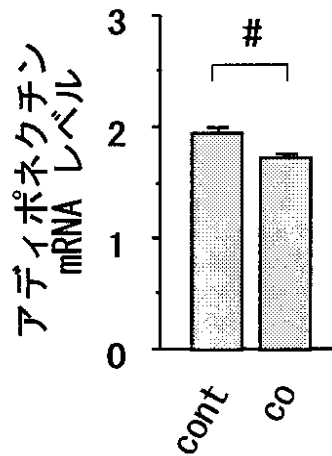


cont: 対照培養法
co: 共培養法

#P < 0.05, ##P < 0.01
n = 8

【図 3】

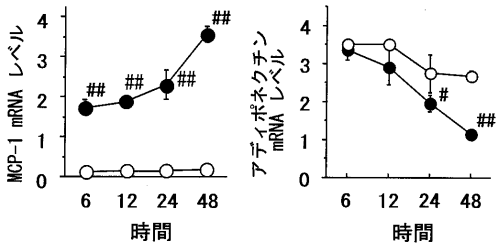
■ Adiponectin



cont: 対照培養法
co: 共培養法

#P < 0.05
n = 8

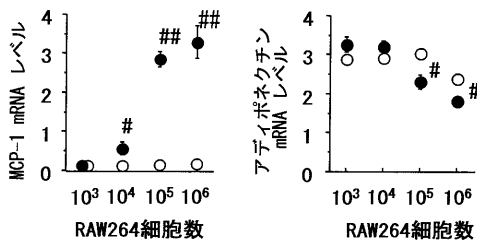
【 図 4 】



○: 対照培養法
●: 共培養 (接触法)

#P < 0.05, ##P < 0.01 vs. 対照培養法
n = 8

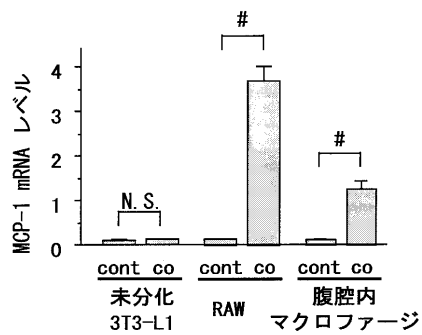
【 図 5 】



○: 対照培養法
●: 共培養 (接触法)

#P < 0.05, ##P < 0.01 vs. 対照培養法
n = 8

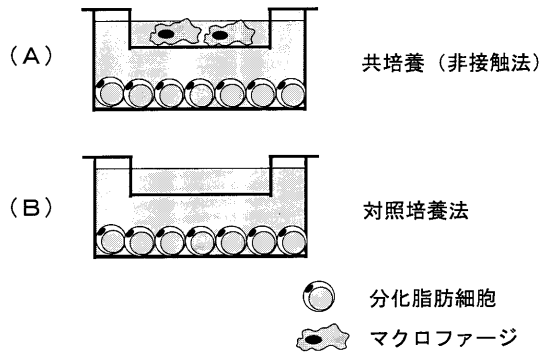
【 図 8 】



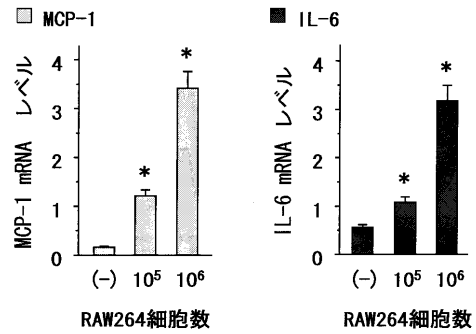
cont: 対照培養法
co: 共培養 (接触法)

#P < 0.01
n = 4

【 図 6 】

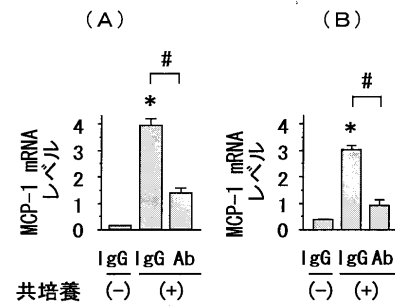


【 図 7 】



#P < 0.01
n = 4

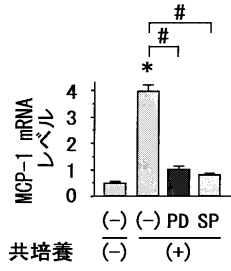
【 図 9 】



IgG: 対照IgG 1 μg/ml
Ab: 抗TNF-α中和抗体 1 μg/ml

#P < 0.01 vs. 共培養 (-)
n = 8

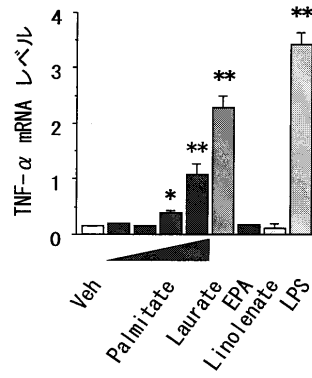
【 図 1 0 】



PD: PD98059 20 $\mu\text{mol/l}$
 SP: SP600125 10 $\mu\text{mol/l}$

* $P < 0.01$ vs. 共培養 (-)
 # $P < 0.01$
 n = 8

【 図 1 1 】



Veh: vehicle
 Palmitate 50-500 $\mu\text{mol/l}$
 Laurate 500 $\mu\text{mol/l}$
 EPA: eicosapentaenoic acid 50 $\mu\text{mol/l}$
 Linolenate 500 $\mu\text{mol/l}$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Veh
 n = 8

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2006/307983
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q1/02 (2006.01), G01N33/50 (2006.01), G01N33/15 (2006.01), C12N15/09 (2006.01), C12N5/06 (2006.01) 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) C12N5/06, C12N15/09, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JDream2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	SUGANAMI, T. et al., A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes., Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol., 2005. October, Vol.25, No.10, pages 2062 to 2068.	1-5
P, X	Yoshihiro OGAWA, "Shibo Saibo to Macrophage no Sogo Sayo", Igaku no Ayumi, 01 April, 2006 (01.04.06), Vol.217, No.1, pages 147 to 152	1-5
P, X	Takayoshi SUGANAMI et al., "Metabolic Syndrome no Bunshi Kiban: Shibo Saibo to Macrophage no Paracrine Chosetsu", Folia endocrinologica Japonica, The Japan Endocrine Society Bunkakai Shorokushu, 2005 Nen 9 Gatsu, Vol.81, No.2, page 541	1-5
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier 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 04 July, 2006 (04.07.06)		Date of mailing of the international search report 11 July, 2006 (11.07.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/307983

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Takayoshi SUGANAMI et al., "Himan no Shibo Soshiki ni Okeru Shibo Saibo to Macrophage no Paracrine Chosetsukei - Kyobaiyokei o Mochiita Kento -", Journal of Japan Society for the Study of Obesity 'Himan Kenkyu', Dai 26 Kai Japan Society for the Study of Obesity Program Shorokushu, 2005 Nen 9 Gatsu, Vol.11, Supplement, page 117	1-5
P, X	Takuya TOYODA et al., "Shibo Saibo to Macrophage no Sogo Sayo ni Okeru Kakunai Juyotai Agonist no Koensho Sayo", Journal of Japan Society for the Study of Obesity 'Himan Kenkyu', Dai 26 Kai Japan Society for the Study of Obesity Program Shorokushu, 2005 Nen 9 Gatsu, Vol.11, Supplement, page 172	1-5
P, X	Takayoshi SUGANAMI et al., "Kyobaiyokei o Mochiita Shibo Saibo Macrophage Sogo Sayo no Bunshi Kiko no Kento", The Journal of the Japan Diabetic Society, 25 April, 2005 (25.04.05), Vol.48, Supplement 2, page S-141	1-5
P, X	Junko NISHIDA et al., "Shibo Saibo Macrophage Kyobaiyokei ni Okeru Shibo Saibo Enshosei Henka no Bunshi Kiko no Kento", Folia endocrinologica Japonica, Dai 78 Kai the Japan Endocrine Society Gakujutsu Sokai Shorokushu, 20 April, 2005 (20.04.05), Vol.81, No.1, page 103	1-5
A	HOTAMISLIGIL, G.S. et al., Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance., Science, 1993, Vol.259, pages 87 to 91.	1-5
A	CLEMENT, K. et al., Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects., FASEB J., 2004, Vol.18, pages 1657 to 1669.	1-5
A	WEISBERG, S.P. et al., Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue., J.Clin.Invest., 2003, Vol.112, No.12, pages 1796 to 1808.	1-5
A	XU, H. et al., Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance., J.Clin. Invest., 2003, Vol.112, No.12, pages 1821 to 1830.	1-5

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2006/307983	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/02 (2006.01), G01N33/50 (2006.01), G01N33/15 (2006.01), C12N15/09 (2006.01), C12N5/06 (2006.01)			
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. C12N 5/06, C12N 15/09, C12Q 1/02, G01N 33/15, G01N 33/50			
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			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN) JSTPlus (JDream2)			
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 請求の範囲の番号	
P, X	SUGANAMI, T. et al., A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2005. Oct., Vol.25, No.10, p.2062-2068.	1-5	
P, X	小川佳宏、脂肪細胞とマクロファージの相互作用、医学のあゆみ、2006年4月1日、第217巻、第1号、147-152頁	1-5	
P, X	菅波孝祥ら、メタボリックシンドロームの分子基盤:脂肪細胞とマクロファージのパラクリン調節、日本内分泌学会雑誌 日本内分泌学会	1-5	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> 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 04.07.2006		国際調査報告の発送日 11.07.2006	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 町田 尚子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3540

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (2005年4月)

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2006/307983
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 請求の範囲の番号
	分科会抄録集、2005年9月、第81巻、第2号、541頁	
P, X	菅波孝祥ら、肥満の脂肪組織における脂肪細胞とマクロファージのパラクリン調節系-共培養系を用いた検討-、日本肥満学会誌「肥満研究」第26回日本肥満学会プログラム・抄録集、2005年9月、第11巻 Supplement、117頁	1-5
P, X	豊田拓矢ら、脂肪細胞とマクロファージの相互作用における核内受容体アゴニストの抗炎症作用、日本肥満学会誌「肥満研究」第26回日本肥満学会プログラム・抄録集、2005年9月、第11巻 Supplement、172頁	1-5
P, X	菅波孝祥ら、共培養系を用いた脂肪細胞・マクロファージ相互作用の分子機構の検討、糖尿病、2005年4月25日、第48巻 Supplement 2、S-141頁	1-5
P, X	西田淳子ら、脂肪細胞・マクロファージ共培養系における脂肪細胞炎症性変化の分子機構の検討、日本内分泌学会雑誌 第78回日本内分泌学会学術総会抄録集、2005年4月20日、第81巻、第1号、103頁	1-5
A	HOTAMISLIGIL, G. S. et al., Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance., Science, 1993, Vol.259, p.87-91.	1-5
A	CLEMENT, K. et al., Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects., FASEB J., 2004, Vol. 18, p.1657-1669.	1-5
A	WEISBERG, S. P. et al., Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue., J. Clin. Invest., 2003, Vol.112, No.12, p.1796-1808.	1-5
A	XU, H. et al., Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance., J. Clin. Invest., 2003, Vol.112, No.12, p.1821-1830.	1-5

フロントページの続き

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

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。