

(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
2011年5月19日(19.05.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/058994 A1

- (51) 国際特許分類:
A01K 67/027 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/070006
- (22) 国際出願日: 2010年11月10日(10.11.2010)
- (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 2009-258382 2009年11月11日(11.11.2009) JP
特願 2010-181161 2010年8月12日(12.08.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人熊本大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8608555 熊本県熊本市黒髪二丁目3番1号 Kumamoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 富澤一仁 (TOMIZAWA Kazuhito) [JP/JP]; 〒8608555 熊本県熊本市本荘1丁目1番1号 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP). 魏范研(WEI Fanyan) [CN/JP]; 〒8608555 熊本県熊本市本荘1丁目1番1号 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP).
- (74) 代理人: 松尾憲一郎 (MATSUO Kenichiro); 〒8100042 福岡県福岡市中央区赤坂1丁目10番17号 しんくみ赤坂ビル7階 Fukuoka (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, CL, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, 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 (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

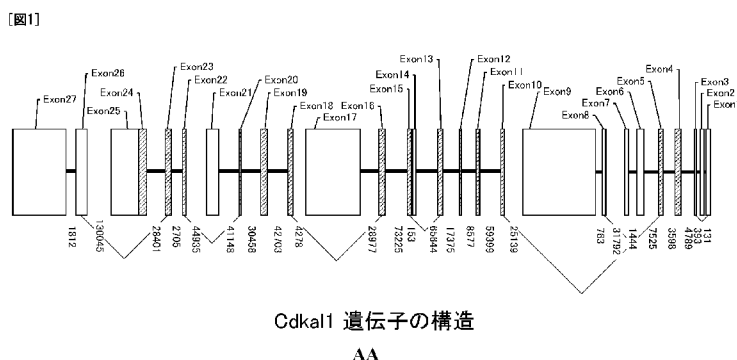
添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

[続葉有]

(54) Title: NONHUMAN ANIMAL MODEL OF TYPE 2 DIABETES

(54) 発明の名称: 2型糖尿病モデル非ヒト動物



AA Cdkal1 GENE STRUCTURE

(57) Abstract: Provided is a novel nonhuman animal model of type 2 diabetes which spontaneously causes a pathology similar to nonobese type 2 diabetes common among Japanese people, wherein the function of the Cdkal1 gene is specifically suppressed on the chromosome of the pancreas β cell. Specifically, the nonhuman animal model of type 2 diabetes may be prepared by mating: a nonhuman animal having a site-specific recombinase-recognition sequence on the 3'-untranslated region and the 5'-untranslated region of a predetermined region containing one or more exons in the Cdkal1 gene; and a nonhuman animal in which a site-specific recombinase gene which recognizes the aforementioned site-specific recombinase-recognition sequence, and can cutout the aforementioned predetermined region is inserted in a manner so as to be able to express on the downstream of the promoter of a gene that specifically expresses in the pancreas.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2011/058994 A1

- 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))

日本人に多い非肥満型の2型糖尿病と類似の病態を自然発症する新しい2型糖尿病モデル非ヒト動物を提供する。Cdkal1遺伝子の機能が、膵臓の β 細胞の染色体上で特異的に欠損した2型糖尿病モデル非ヒト動物とした。具体的には、Cdkal1遺伝子の1又は複数のエキソンを含む所定領域の3'側非翻訳領域と5'側非翻訳領域とに部位特異的組み換え酵素認識配列を有する非ヒト動物と、前記部位特異的組み換え酵素認識配列を認識して前記所定領域を切り出し可能な部位特異的組み換え酵素の遺伝子が、膵臓で特異的に発現する遺伝子のプロモータの下流に発現可能に挿入された非ヒト動物と、を交配させることにより作製してもよい。

明 細 書

発明の名称： 2型糖尿病モデル非ヒト動物

技術分野

[0001] 本発明は、Cdkal1遺伝子の機能が染色体上で欠損した2型糖尿病モデル非ヒト動物、及び同2型糖尿病モデル非ヒト動物を用いた糖尿病の予防・治療剤のスクリーニング方法に関する。

背景技術

[0002] 従来より糖尿病は、糖代謝の異常によって血糖値が病的に高まり、様々な合併症を生じる病気として知られている。

[0003] 特に、インスリン分泌低下と感受性低下を原因とする2型糖尿病は、本邦の全糖尿病患者の大部分を占めると考えられており、遺伝的素因に、過食、食事内容、ストレス、運動不足といった多くの環境因子が加わって発症、進行するという複雑な多因子疾患である。

[0004] そのため、今日に至るまで多くの研究者により、2型糖尿病の病態を呈すると考えられる非ヒト動物を用いて、2型糖尿病の研究が行われている。

[0005] このような非ヒト動物としては、例えば、米国のジャクソン研究所で見いだされたob/obマウスやdb/dbマウスが挙げられる。

[0006] これらのマウスは、過食によるエネルギー摂取の増加に加え、エネルギー消費の低下をきたし、高血糖、高インスリン血症、インスリン抵抗性、白色脂肪細胞の重量増加などの表現型が認められる。

[0007] そして、1994年にはob/obの責任遺伝子がポジショナルクローニングにより同定され、レプチンと命名された（例えば、非特許文献1参照。）。そして1995年には、レプチン受容体遺伝子がクローニングされdb/dbマウスの責任遺伝子であることが明らかにされた（例えば、非特許文献2参照。）。現在、この両マウスは、レプチンの生理機能、薬理機能を含めた糖尿病、肥満の研究に広く用いられているモデルである。

[0008] これらの発生工学的手法を用いて開発された動物の応用研究は、インスリ

ン分泌や作用の分子機構の詳細な解明に役立つだけでなく、幾つかの遺伝因子や環境因子の負荷により、多因子疾患としての2型糖尿病の病態解明を可能にするものと期待されている。また、糖尿病の発症や病態の解明に留まらず、遺伝子治療／再生医療を含む新しい治療法、治療薬の開発に応用されることが期待されるため、不可欠といえる研究分野であるといえる。

先行技術文献

非特許文献

- [0009] 非特許文献1 : Zhang Y. et al., Nature 1994; 372 (6505) :425-432
非特許文献2 : Tartaglia LA. et al., Cell 1995; 83 (7) : 1263-1271

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0010] しかしながら、上記従来 of 2 型糖尿病の研究に用いられてきた ob/ob マウスや db/db マウス等の非ヒト動物は、レプチンやその受容体の欠損による極端な肥満が起こるため、肥満を伴わない 2 型糖尿病患者の病態を代表しているものとは言い難い。
- [0011] すなわち、レプチンやレプチン受容体に変異をもつ糖尿病患者は極めて希であり、一般的な 2 型糖尿病の研究に用いる非ヒト動物としては必ずしも好適ではなかった。
- [0012] また、KK マウスや Ay マウスなどといったその他の非ヒト動物が 2 型糖尿病の研究に用いられることもあるが、これらの非ヒト動物も肥満を伴う上、原因遺伝子が未だ不明であり、実用研究での使用は困難であるという問題があった。
- [0013] 本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであって、日本人に多い非肥満型の 2 型糖尿病と類似の病態を自然発症する新しい 2 型糖尿病モデル非ヒト動物を提供することを課題としている。
- [0014] また本発明は、非ヒト動物を 2 型糖尿病モデル非ヒト動物として使用方法、及び、Cdkal1 異常に起因する 2 型糖尿病予防・治療剤のスクリーニン

グ方法を提供することも課題としている。

課題を解決するための手段

- [0015] 上記従来課題を解決するために、請求項1に係る本発明では、Cdkal1遺伝子の機能が、膵臓の β 細胞の染色体上で特異的に欠損した2型糖尿病モデル非ヒト動物とした。
- [0016] また、請求項2に係る本発明では、請求項1に記載の2型糖尿病モデル非ヒト動物において、Cdkal1遺伝子の1又は複数のエキソンを含む所定領域の3'側非翻訳領域と5'側非翻訳領域とに部位特異的組み換え酵素認識配列を有する非ヒト動物と、前記部位特異的組み換え酵素認識配列を認識して前記所定領域を切り出し可能な部位特異的組み換え酵素の遺伝子が、膵臓で特異的に発現する遺伝子のプロモータの下流に発現可能に挿入された非ヒト動物と、を交配させることにより作製されたことに特徴を有する。
- [0017] また、請求項3に係る本発明では、請求項2に記載の2型糖尿病モデル非ヒト動物において、前記所定領域は、少なくともエキソン5を含むことに特徴を有する。
- [0018] また、請求項4に係る本発明では、請求項1～3いずれか1項に記載の2型糖尿病モデル非ヒト動物において、前記非ヒト動物が、齧歯目動物であることに特徴を有する。
- [0019] また、請求項5に係る本発明では、請求項4に記載の2型糖尿病モデル非ヒト動物において、前記齧歯目動物が、マウスであることに特徴を有する。
- [0020] また、請求項6に係る本発明では、Cdkal1遺伝子の機能が、膵臓の β 細胞の染色体上で特異的に欠損した非ヒト動物を、2型糖尿病モデル非ヒト動物として使用する方法とした。
- [0021] また、請求項7に係るCdkal1異常に起因する2型糖尿病予防・治療剤のスクリーニング方法では、Cdkal1遺伝子の機能が、膵臓の β 細胞の染色体上で特異的に欠損した2型糖尿病モデル非ヒト動物に被験物質を投与して、該非ヒト動物の2型糖尿病の程度を評価することとした。
- [0022] また、請求項8に係る本発明では、請求項7に記載のCdkal1異常に起因す

る2型糖尿病予防・治療剤のスクリーニング方法において、前記被験物質を、Cdkal1遺伝子の機能が、膵臓の β 細胞の染色体上で特異的に欠損した非ヒト動物と、野生型非ヒト動物とに投与して、両非ヒト動物を比較・評価することに特徴を有する。

[0023] また、請求項9に係る2型糖尿病モデル非ヒト動物の作製方法では、Cdkal1遺伝子の機能を、膵臓の β 細胞の染色体上で特異的に欠損させることとした。

発明の効果

[0024] 請求項1に係る本発明では、Cdkal1遺伝子の機能が、膵臓の β 細胞の染色体上で特異的に欠損した2型糖尿病モデル非ヒト動物としたため、日本人に多い非肥満型の2型糖尿病と類似の病態を自然発症する新しい2型糖尿病モデル非ヒト動物を提供することができる。

[0025] また、膵臓において、臓器特異的にCdkal1遺伝子がノックアウトされることとなるため、膵臓以外の部位でのCdkal1遺伝子の発現に影響を及ぼすおそれがない。それゆえ、本発明に係る2型糖尿病モデル非ヒト動物を例えば試験・研究等に供した場合には、対照となる野生型の非ヒト動物と比較する際に、膵臓以外の部位でのCdkal1遺伝子の発現の差異について考慮する必要がなく、前記野生型の非ヒト動物を対照としてより正確な比較実験を行うことができる。

[0026] また、請求項2に係る本発明では、Cdkal1遺伝子の1又は複数のエキソンを含む所定領域の3'側非翻訳領域と5'側非翻訳領域とに部位特異的組み換え酵素認識配列を有する非ヒト動物と、前記部位特異的組み換え酵素認識配列を認識して前記所定領域を切り出し可能な部位特異的組み換え酵素の遺伝子が、膵臓で特異的に発現する遺伝子のプロモータの下流に発現可能に挿入された非ヒト動物と、を交配させることにより作製したため、膵臓で臓器特異的に部位特異的組み換え酵素が発現して前記所定領域を切り出し、正常なCdkal1遺伝子の発現を妨げることができる。

[0027] また、請求項3に係る本発明では、前記所定領域は、少なくともエキソン

5を含むこととしたため、膵臓で臓器特異的に、正常なGdkal1遺伝子の発現をより確実に妨げることができる。

[0028] また、請求項4に係る本発明では、前記非ヒト動物が、齧歯目動物であることとしたため、実験等に広く使用される動物でありながら、2型糖尿病の病態を表す2型糖尿病モデル非ヒト動物を提供することができる。

[0029] また、請求項5に係る本発明では、前記齧歯目動物が、マウスであることとしたため、実験等に広く使用され、また、多くの知見が得られている動物でありながら、2型糖尿病の病態を表す2型糖尿病モデル非ヒト動物を提供することができる。

[0030] また、請求項6に係る本発明では、Gdkal1遺伝子の機能が、膵臓の β 細胞の染色体上で特異的に欠損した非ヒト動物を、2型糖尿病モデル非ヒト動物として使用する方法としたため、非ヒト動物を2型糖尿病モデル非ヒト動物として使用する方法を提供することができる。

[0031] また、請求項7に係る本発明では、Gdkal1遺伝子の機能が、膵臓の β 細胞の染色体上で特異的に欠損した2型糖尿病モデル非ヒト動物に被験物質を投与して、該非ヒト動物の2型糖尿病の程度を評価することとしたため、Gdkal1異常に起因する2型糖尿病予防・治療剤のスクリーニング方法を提供することができる。

[0032] また、請求項8に係る本発明では、前記被験物質を、Gdkal1遺伝子の機能が、膵臓の β 細胞の染色体上で特異的に欠損した非ヒト動物と、野生型非ヒト動物とに投与して、両非ヒト動物を比較・評価することとしたため、発症した2型糖尿病の病態を野生型非ヒト動物と比較できるGdkal1異常に起因する2型糖尿病予防・治療剤のスクリーニング方法を提供することができる。

[0033] また、請求項9に係る本発明では、Gdkal1遺伝子の機能を、膵臓の β 細胞の染色体上で特異的に欠損させる2型糖尿病モデル非ヒト動物の作製方法としたため、日本人に多い非肥満型の2型糖尿病と類似の病態を自然発症する新しい2型糖尿病モデル非ヒト動物を作出可能な方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0034] [図1] Cdkal1遺伝子の構造を示した説明図である。

[図2] 本実施形態に係る2型糖尿病モデル非ヒト動物を作製するための概念を示した説明図である。

発明を実施するための形態

[0035] 本発明は、Cdkal1遺伝子の機能が、膵臓の β 細胞の染色体上で特異的に欠損した2型糖尿病モデル非ヒト動物を提供するものである。

[0036] Cdkal1遺伝子は、2型糖尿病の危険因子であることが知られている。(Science (2007) 316, 1331; Science (2007) 316, 1336; Science (2007) 316, 1341; Nat Genet (2007) 39, 770)

[0037] しかしながら、このCdkal1遺伝子から発現するCdkal1の機能は未だ解明されておらず、何故にCdkal1遺伝子と2型糖尿病とが関連するのかは不明の状態であった。

[0038] 一方、本発明者らは、このCdkal1遺伝子と2型糖尿病との関連性について鋭意研究を行うことにより、Cdkal1遺伝子領域に特異的な変異(一塩基多型)を持つ人は、変異を持たない人と比べて膵臓 β 細胞からのインスリン分泌が有意に低下しており、これに基づき2型糖尿病が発症しやすくなっていることを新たに見出した。

[0039] 具体的には、Cdkal1は、tRNAを化学修飾する酵素であって、インスリンを翻訳する際に、tRNAを修飾することによって翻訳を促進する機能が推定されている。

[0040] そして、この新たな発見に着想を得た本発明者らは、膵臓 β 細胞特異的にCdkal1遺伝子を欠損させたノックアウト非ヒト動物の作製を行い、本発明を完成させたのである。

[0041] 以下に説明する本実施形態において、Cdkal1遺伝子の機能が膵臓の β 細胞の染色体上で特異的に欠損した2型糖尿病モデル非ヒト動物とは、Cdkal1をコードする非ヒト動物の膵臓の β 細胞における内在性遺伝子が破壊、欠損、置換等の遺伝子変異により不活性化され、Cdkal1を発現する機能を失った非

ヒト動物をいう。

- [0042] ここで非ヒト動物は、哺乳類に属する非ヒト動物、例えば、マウス、ラット等の齧歯目動物を具体的に挙げることができるが、特にこれらに限定されるものではない。すなわち、*Cdkal1*をコードする内在性遺伝子を備えた非ヒト動物であって、実験用に用いられるものであれば、特に限定されるものではない。
- [0043] また、本実施形態に係る2型糖尿病モデル非ヒト動物は、*Cdkal1*遺伝子の1又は複数のエキソンを含む所定領域の3'側非翻訳領域と5'側非翻訳領域とに部位特異的組み換え酵素認識配列を有する非ヒト動物と、前記部位特異的組み換え酵素認識配列を認識して前記所定領域を切り出し可能な部位特異的組み換え酵素の遺伝子が、膵臓で特異的に発現する遺伝子のプロモータの下流に発現可能に挿入された非ヒト動物と、を交配させることにより作製されたものであっても良い。
- [0044] 本実施形態において、部位特異的組換え酵素とは、部位特異的組換えの過程、即ちDNAの分子内あるいは分子間の特定部位で起こる組換えの過程を触媒する酵素を意味する。また、部位特異的組み換え酵素認識配列とは、部位特異的組み換え酵素の認識配列である所定の塩基配列を意味する。部位特異的組換え酵素は認識配列に挟まれたDNA断片を切り出し環状化させる機能を持つが、逆の反応（環状分子を認識配列を介して挿入する）も行う。
- [0045] ここで、本実施形態における部位特異的組換え酵素や、部位特異的組み換え酵素認識配列としては、特に制限はないが、例えばFRT配列を認識する出芽酵母由来のFLP recombinase、味噌醤油酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) 由来のR/R SシステムにおけるRS配列を認識する酵素R(Onouchi H et al. (1995) *Mol. Gen. Genet.* 247, 653-660、Onouchi H et al. (1991) *Nucl. Acids Res.* 19, 6373-6378)、bacteriophage P1由来のCre/lox(Cre/loxP)システムにおけるlox(loxP)配列を認識する酵素Cre(Albert H et al. (1995) *Plant J.* 7, 649-659、Liu Q et al. (1998) *Current Biol.* 8, 1300-1309、Abmmski K et al. (1983) *Cell* 32, 1301-1311)などが例示できる。

- [0046] また、部位特異的組み換え酵素の遺伝子上流側に配置されるプロモータは、例えば、インスリンのプロモータや、PDX1のプロモータなど、2型糖尿病モデルとする非ヒト動物の膵臓で特異的に発現する遺伝子のプロモータであれば特に限定されるものではない。
- [0047] また、本実施形態に係る2型糖尿病モデル非ヒト動物は、前述の部位特異的組み換え酵素により切り出される2以上の部位特異的組み換え酵素認識配列によって囲まれた所定領域は、少なくともエキソン5を含むこととするのが好ましい。
- [0048] 図1にも示すように、Cdkal1遺伝子は、27のエキソンを有している。なお、図1では、右側を5'側、左側3'側として示している。図1中において、白抜きで示したエキソンは、少なくとも β 細胞においてスプライシングにより翻訳されないエキソンである。また、図1中の数値は、各エキソン間の塩基数を示している。
- [0049] Cdkal1遺伝子中に複数あるエキソンのうち、エキソン1～エキソン3は、前述のように、タンパク質をコードしていないエキソンであることが明らかとなっているため、このエキソン1～エキソン3を欠損させた場合であっても、Cdkal1の発現を阻止することは不可能である。また、エキソン4は、タンパク質をコードしているエキソンであるが、本発明者らの研究により、このエキソン4を欠損させても、さらに下流域のエキソンが、正しい読み枠で翻訳されてしまう可能性があると考えられる。
- [0050] また、エキソン6以降のエキソンを欠損させた場合であっても、Cdkal1の発現を阻止することは可能であると考えられるが、前述の部位特異的組み換え酵素の切り出し長さに限界があり、良好な切り出しが行われな可能性も考えられる。
- [0051] 併せて、欠損させるエキソンは、できるだけ上流側である方が、翻訳産物がCdkal1様の機能を発現してしまう可能性を低くすることができる。
- [0052] そこで、Cdkal1遺伝子の少なくともエキソン5を欠損させることにより、Cdkal1の発現を確実に阻止することができ、しかも、部位特異的組み換え酵素

による前記所定領域の切り出しを良好とすると共に、翻訳産物がCdkal1様の機能を発現してしまうのを防ぐことができる。

[0053] また、本発明者らが本実施形態に係る2型糖尿病モデル非ヒト動物（Cdkal1ノックアウトマウス）及び野生型マウスを用いて糖負荷試験を行った結果、後に詳述するが、Cdkal1ノックアウトマウスの血糖値が野生型マウスより有意に高く、Cdkal1ノックアウトマウスに耐糖機能の異常が見られた。一方、Cdkal1ノックアウトマウスでは1型糖尿病に特徴的な体重の増加が認められなかった。

[0054] このように、本実施形態に係る2型糖尿病モデル非ヒト動物は、ヒト2型糖尿病の病態を有するの2型糖尿病の病態を極めて良好に再現するものである。

[0055] また、本実施形態に係る2型糖尿病予防・治療剤のスクリーニング方法としては、本実施形態に係る2型糖尿病モデル非ヒト動物に被験物質を投与して、該非ヒト動物の2型糖尿病の程度を評価する方法であれば特に制限されるものではなく、被験物質の投与方法としては、例えば、経口投与、静脈内投与、経腹投与、など様々な投与方法を挙げることができる。

[0056] また、2型糖尿病の程度を評価する方法としては、非ヒト動物の空腹時の血糖値や糖負荷時の血糖値を調べたり、血中の糖化ヘモグロビン（HbA1c）濃度の値を調べる方法を挙げることができる。

[0057] また、2型糖尿病の程度を評価するに際しては、前記被験物質を、Cdkal1遺伝子の機能が膵臓の β 細胞の染色体上で特異的に欠損した非ヒト動物と、野生型非ヒト動物とに投与して、両非ヒト動物を比較・評価するのが好ましい。

[0058] なお、本実施形態における野生型の非ヒト動物とは、上記Cdkal1遺伝子の機能が欠損した非ヒト動物と同種の動物を意味し、中でも同腹の動物を好適に例示することができる。また上記Cdkal1遺伝子の機能が欠損した非ヒト動物としては、メンデルの法則に従い出生してくるものが、Cdkal1欠損型と同腹の野生型を得ることができ、これらを用いて正確な比較実験をすることが

できる点で好ましい。そして上記のように、Cdkal1遺伝子の2型糖尿病モデル非ヒト動物の好適例としては、Cdkal1ノックアウトマウスを、野生型マウスとしては該ノックアウトマウスと同腹の野生型マウスを、それぞれ具体的に挙げるができる。

[0059] このように、本実施形態に係る2型糖尿病予防・治療剤のスクリーニング方法は、糖尿病治療薬の開発に貢献できるものであると言える。

[0060] また、本実施形態に係る2型糖尿病モデル非ヒト動物の作製方法によれば、非ヒト動物のCdkal1遺伝子の機能を、膵臓の β 細胞の染色体上で特異的に欠損させることとしている。

[0061] この作製方法における非ヒト動物は、特に限定されるものではないが、一般に実験等で使用される系統が明確な非ヒト動物であるのが好ましい。例えば、野生で捕獲した非ヒト動物を用いて、本実施形態に係る作製方法にて2型糖尿病モデル非ヒト動物を作出することも可能であるが、遺伝的に不明な部分や、系統的に不明な部分が多くあるため、系統が明確な非ヒト動物を用いる方が、2型糖尿病の研究や2型糖尿病予防・治療剤のスクリーニングに好適である。

[0062] 以下、本実施形態に係る2型糖尿病モデル非ヒト動物について、非ヒト動物がマウスの場合を例にとり、作製手順に従いながら具体的に説明する。

[0063] [ターゲティングベクターの調製]

本実施形態において使用するターゲティングベクターは、図2に示すストラテジーに基づいて作製した。

[0064] 具体的には、まず、Bac clone からCdkal1断片(2856-8800) (配列番号1)のPCR産物を得て、以下の制限酵素サイトを利用してpBS11SKIにサブクローニングを行った。

Psp0MI - Cdkal1(2856-8800) - XhoI…… (1)

[0065] 次に、loxP配列を含むように設計したプライマーを用い、Bac clone からCdkal1断片(8801-9800) (配列番号2)の5'上流側にloxP配列(配列番号3)を含むPCR産物を得て、以下の制限酵素サイトを利用してpBS11SKIにサブクロー

ニングした。

XhoI - loxP-Cdkal1(8801-9800) - NotI…… (2)

[0066] 次に、loxP配列を含むように設計したプライマーを用い、Bac cloneからCdkal1断片(9801-12500) (配列番号4) の3' 下流側にloxP配列を含むPCR産物を得て、以下の制限酵素サイトを利用してpBSIIISKにサブクローニングした。

NotI - Cdkal1(9801-12500) - SacII…… (3)

[0067] 次に、下記の通りNeomycin耐性遺伝子 (配列番号5) やFRT配列 (配列番号6) を含む予め作製しておいたベクター (pBS-FRT-Neor-FRT-loxP) に、 (3) のCdkal1の断片を挿入した。

Vector: pBS-FRT-Neor-FRT-loxP NotI-SacII digest

Insert: pBSIIISK + Cdkal1(9801-12500) NotI-SacII digest

Construct1: pBS-FRT-Neor-FRT-loxP-Cdkal1(9801-12500)

[0068] 次に、下記の通りCdkal1断片 (1) 及び (2) を連結した。

Vector: pBSIIISK+ Cdkal1(2856-8800) XhoI-NotI digest

Insert: pBSIIISK+ loxP-Cdkal1(8801-9800) XhoI-NotI digest

Construct2: pBSIIISK+ Cdkal1(2856-8800)- loxP-Cdkal1(8801-9800)

[0069] 次に、下記の通りネガティブ選択マーカースとしてジフテリア毒素フラグメント (DTA) (配列番号7) をConstruct2に入れた。

Vector: Construct2 PspOMI digest

Insert: pBS-DTA NotI-PspOMI digest

Construct3: pBSIIISK+ DTA- Cdkal1(2856-8800)- loxP-Cdkal1(8801-9800)

[0070] そして、下記の通り完全なターゲティングベクター (配列番号8) を構築した。

Vector: Construct3 NotI-SacII digest

Insert: Construct1 PspOMI-SacII digest

Construct4: pBSIIISK+DTA-Cdkal1(2856-8800)-loxP-Cdkal1(8801-9800)- FRT-Neor-FRT-loxP-Cdkal1(9801-12500)

[0071] [マウスES細胞への導入及び組換え細胞のスクリーニング]

上述のようにして得られたターゲティングベクターを線状化したのち、エレクトロポレーション（電気穿孔）法によってマウスES細胞に導入し、G418（ネオマイシン）に抵抗性を持つES細胞の中から相同組み替えにより、内在性Cdkal1遺伝子がターゲティングベクターに含まれる外来Cdkal1遺伝子に置き換わったES細胞を選択した。なお、マウスES細胞は、C57BL6由来のES細胞を用いた。

[0072] [キメラマウスの作製]

スクリーニングされたES細胞をマウス（C57BL6）の胚盤胞中にインジェクションし、胚盤胞を仮親のマウス子宮に戻し、キメラマウスを作製した。

[0073] [2型糖尿病モデル非ヒト動物（マウス）の作製]

次に、得られたキメラマウスを用いて、2型糖尿病モデル非ヒト動物（マウス）の作製を行った。なお、各マウスの遺伝子型等の検証については、それぞれのマウスの尻尾等から組織を採取し、DNAを精製してPCR法により行っている。

[0074] まず、得られたキメラマウスを野生型マウスと交配させ、ヘテロ接合体マウス ($Cdkal1^{flox/+}$, $neomycin^{+}$) を得た。

[0075] 次に、このヘテロ接合体マウス ($Cdkal1^{flox/+}$, $neomycin^{+}$) を、FLP発現マウスと交配させ、ネオマイシン遺伝子が除去されたヘテロ接合体マウス ($Cdkal1^{flox/+}$) を得た。

[0076] 次に、得られたネオマイシン遺伝子が除去されたヘテロ接合体マウス ($Cdkal1^{flox/+}$) 同士を交配させ、ネオマイシン遺伝子が除去されたホモ接合体マウス ($Cdkal1^{flox/flox}$) を得た。

[0077] 次いで、得られたホモ接合体マウス ($Cdkal1^{flox/flox}$) と、ラットインスリンプロモーター配列をもつCreリコンビナーゼ遺伝子を有するRIP-Creマウスと交配させ、RIP-Cre遺伝子を有するヘテロ接合体マウス ($Cdkal1^{flox/+}$, $RIP-Cre/0$) を得る。なお、このヘテロ接合体マウス ($Cdkal1^{flox/+}$, $RIP-Cre/0$) は、本実施形態において、膵臓で特異的に発現する遺伝子のプロモータの下流に発現可能に挿入された非ヒト動物としての役割を担うものである。

[0078] 次に、このヘテロ接合体マウス ($Cdkal1^{flox/+}$, $RIP-Cre/0$) と、ネオマイシン除去ホモ接合体マウス ($Cdkal1^{flox/flox}$) を交配させる。ここで、このホモ接合体マウス ($Cdkal1^{flox/flox}$) は、 $Cdkal1$ 遺伝子の 1 又は複数のエキソンを含む所定領域の 3' 側非翻訳領域と 5' 側非翻訳領域とに部位特異的組み換え酵素認識配列を有する非ヒト動物としての役割を担うものである。

[0079] そして、 $Cdkal1$ 遺伝子の機能が、膵臓の β 細胞の染色体上で特異的に欠損した 2 型糖尿病モデル非ヒト動物としての、 $Cdkal1$ 欠損マウス ($Cdkal1^{flox/flox}$, $RIP-Cre/0$) を得た。

[0080] 次に、野生型のマウスと、上述の方法により作出した本実施形態に係る 2 型糖尿病モデル非ヒト動物 (マウス) (以下、「ノックアウトマウス」ともいう。) とを用い、体重及び血糖値の経時変化について検証を行った。

[0081] [体重の経時変化の検証]

雄マウス (野生型 4 匹、ノックアウトマウス 6 匹)、雌マウス (野生型 9 匹、ノックアウトマウス 7 匹) を用いて、3 週齢から 7 週齢までの体重の変化を測定した。その結果を表 1 に示す。

[0082] [表1]

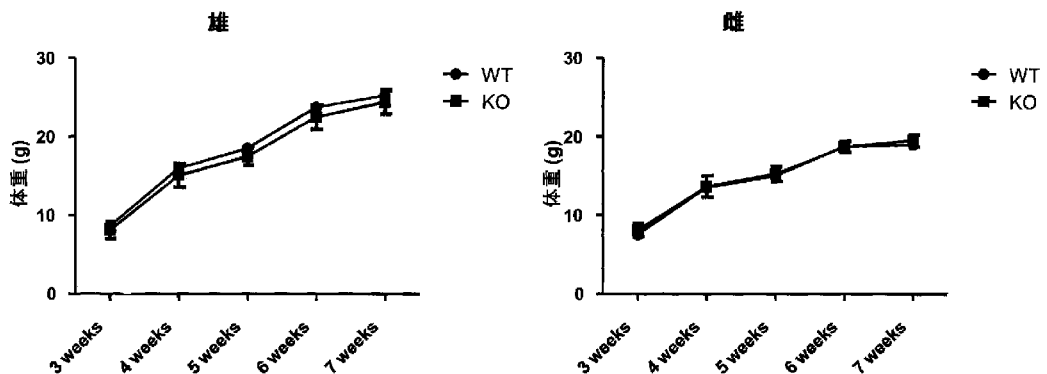


表 1 にも示すように、雄マウス及び雌マウスともに、野生型とノックアウトマウスとの間に、顕著な体重経時変化の差異は見られず、また、反復測定 2 元配置分散分析 (Two-way repeated measure ANOVA) による有意差検定においても、有意差はなかった。すなわち、ノックアウトマウスでは、1 型糖尿病に特徴的な体重の増加が認められなかった。

[0083] [血糖値の経時変化の検証]

5週齢の雄マウス（野生型4匹、ノックアウトマウス6匹）、及び、雌マウス（野生型9匹、ノックアウトマウス7匹）を用いて、血糖値の経時変化について検証を行った。

[0084] 試験方法は、一晩絶食させたそれぞれのマウスに対して、0.1g/mlのグルコース溶液を体重1g辺り1mg経腹投与し、投与直後から90分後までの血糖値の変化を採血して測定した。その結果を表2に示す。

[0085] [表2]

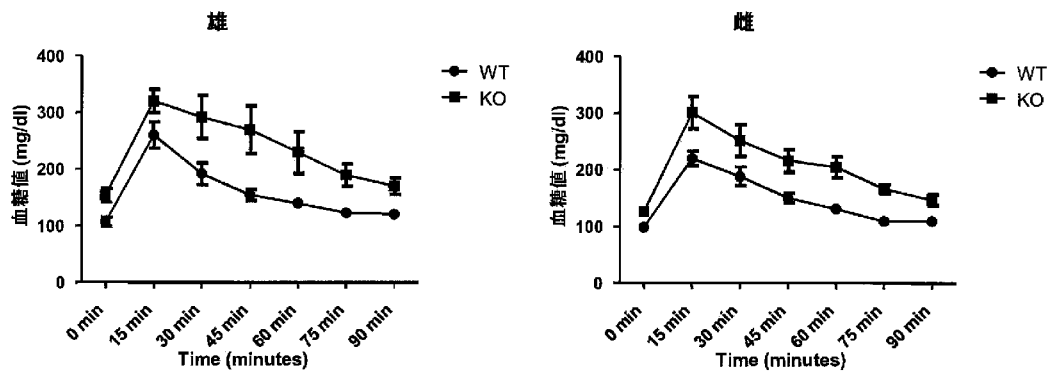


表2にも示すように、雄マウス及び雌マウスともに、野生型とノックアウトマウスとの間に、顕著な血糖値変化の差異が認められた。すなわち、雄雌にかかわらず、ノックアウトマウスは、野生型に比して、血糖値のピークを迎えた後の低下割合が鈍化する傾向が見られた。

[0086] また、反復測定2元配置分散分析 (Two-way repeated measure ANOVA) による有意差検定においても、野生型とノックアウトマウスとの間に、有意な差が認められた（雄マウス： $p < 0.01$ 、雌マウス： $p < 0.0001$ ）。すなわち、ノックアウトマウスでは、体重の増加が認められず、高血糖状態が持続するという2型糖尿病に特徴的な病態が観察された。

[0087] [高脂肪食を与えた時の体重変化の検証]

次に、ノックアウトマウス (KO) 及び野生型マウス (WT) に対し、総カロリーのうち脂肪由来のカロリーが45%となるような高脂肪食 (HFD)、又は総カロリーのうち脂肪由来のカロリーが10%となるような低脂肪食 (LFD) を9週

間にわたり与え、体重変化を測定した。その結果を表3に示す。

[0088] [表3]

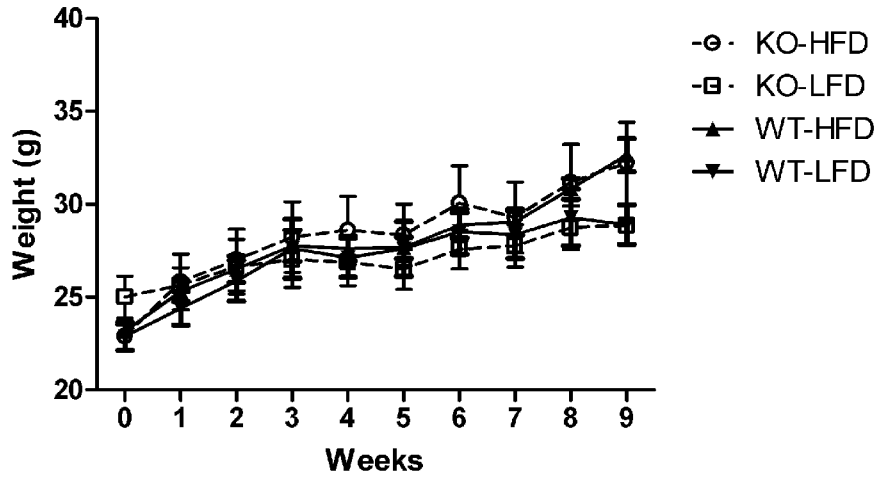
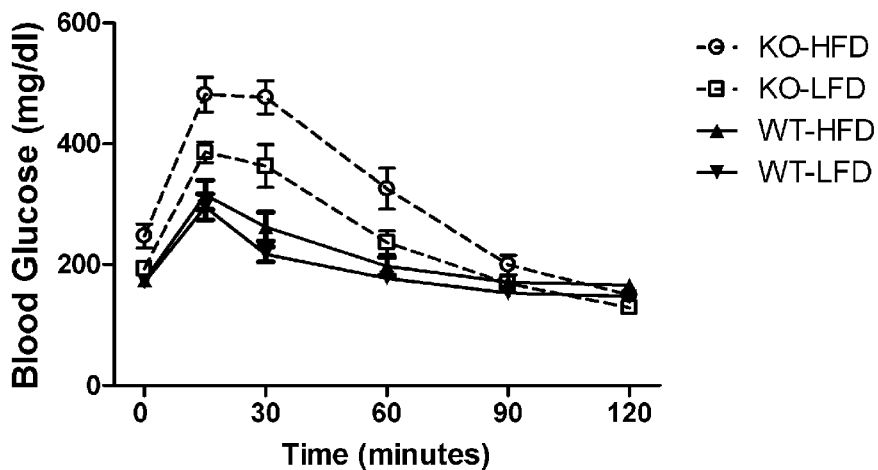


表3にも示すように、高脂肪食を摂取したKOマウスの体重と、高脂肪食を摂取したWTマウスの体重とを比較しても、両者の体重に顕著な差は認められなかった。また、分散分析(ANOVA)による有意差検定においても、有意な差は認められなかった。

[0089] [高脂肪食を3週間与えた後の血糖値の経時的変化の検証]

次に、KOマウス及びWTマウスを午前8時から7時間絶食させた後、1gブドウ糖/kg体重となるようにマウスにブドウ糖液を経腹投与し、経時的に尾より血液を採取し、血糖値を測定した。その結果を表4に示す。

[0090] [表4]

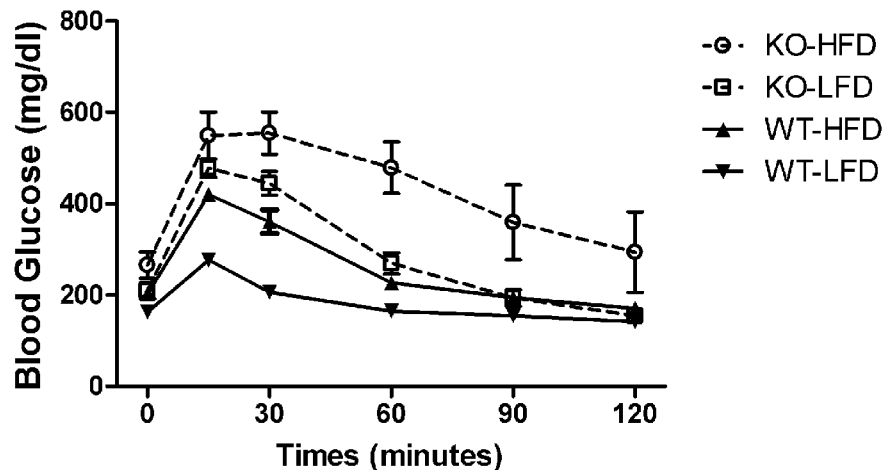


分散分析 (ANOVA) による有意差検定の結果、高脂肪食を 3 週間摂取した K0 マウスは他のすべての実験群よりピークの血糖値が有意に高かった。一方、3 週間高脂肪食を摂取した WT マウスにおいては、血糖値の変化は低脂肪食を摂取した WT マウスと比して差異が認められなかった。すなわち、高脂肪食を摂取した K0 マウスは、体重の増加が認められず、高脂肪による血糖値コントロールの悪化という 2 型糖尿病に見られる病態が観察された。

[0091] [高脂肪食を 9 週間与えた後の血糖値の経時的変化の検証]

次に、K0 マウス及び WT マウスを午前 8 時から 7 時間絶食させた後、1 g ブドウ糖 / kg 体重となるようにマウスにブドウ糖液を経腹投与し、経時的に尾より血液を採取し、血糖値を測定した。その結果を表 5 に示す。

[0092] [表 5]

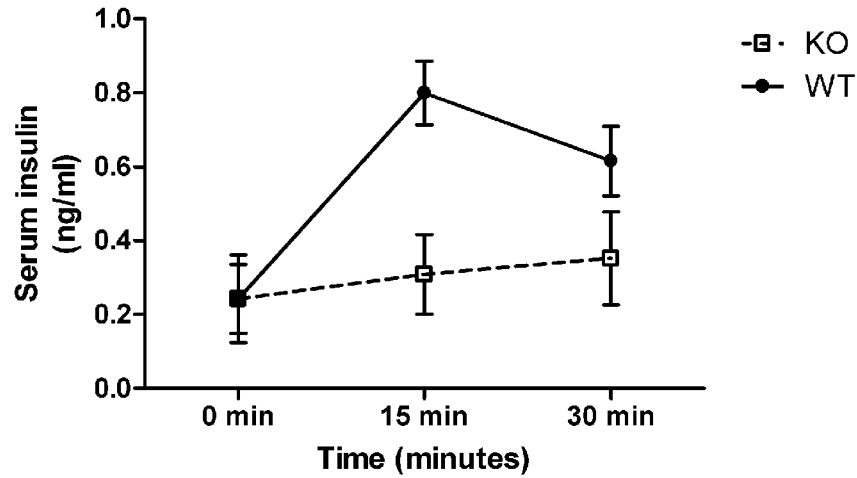


高脂肪食を 9 週間摂取した K0 マウスでは、高脂肪食又は低脂肪食を摂取した WT マウスと比して、ピーク時の血糖値のみならず、2 時間後の血糖値も著しく高かった。すなわち、高脂肪食を 9 週間にわたり摂取した K0 マウスでは、高脂肪の長期摂取による 2 型糖尿病の悪化という病態が見られた。

[0093] [高脂肪食を 8 週間与えた後の血中インスリン量の経時的変化の検証]

次に、高脂肪食を摂取した K0 マウス又は WT マウスを午前 8 時から 7 時間絶食させた後、1 g ブドウ糖 / kg 体重となるようにマウスにブドウ糖液を経腹投与し、経時的に尾より血液を採取し、血中インスリン量を ELISA 法により測定した。その結果を表 6 に示す。

[0094] [表6]

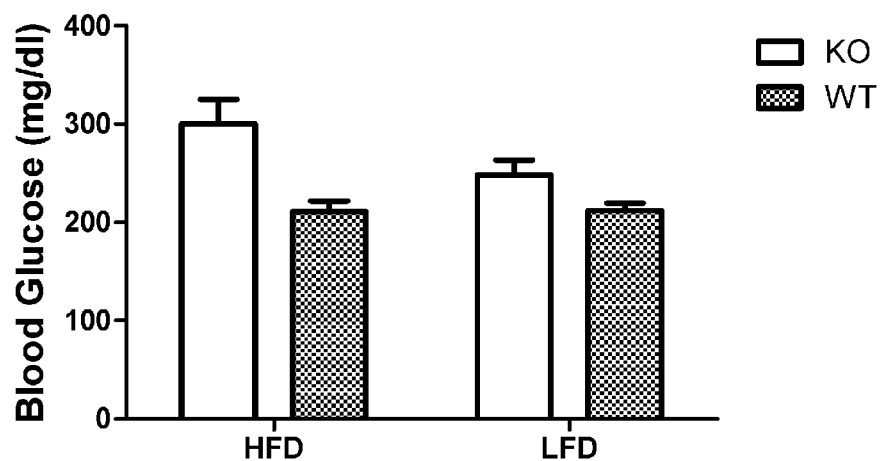


高脂肪食を摂取したKOマウスでは、WTマウスと比して、ブドウ糖投与後のインスリン分泌が有意に低下した ($p < 0.05$)。すなわち、高脂肪食を摂取したKOマウスでは、インスリン分泌能の低下という2型糖尿病の病態が見られた。

[0095] [高脂肪食を3週間与えた後の空腹時血糖値の検証]

次に、高脂肪食又は低脂肪食を3週間摂取した時点で、マウスを午前8時から7時間絶食させたのち、尾より血液を採取し、空腹時血糖値を測定した。その結果を表7に示す。

[0096] [表7]



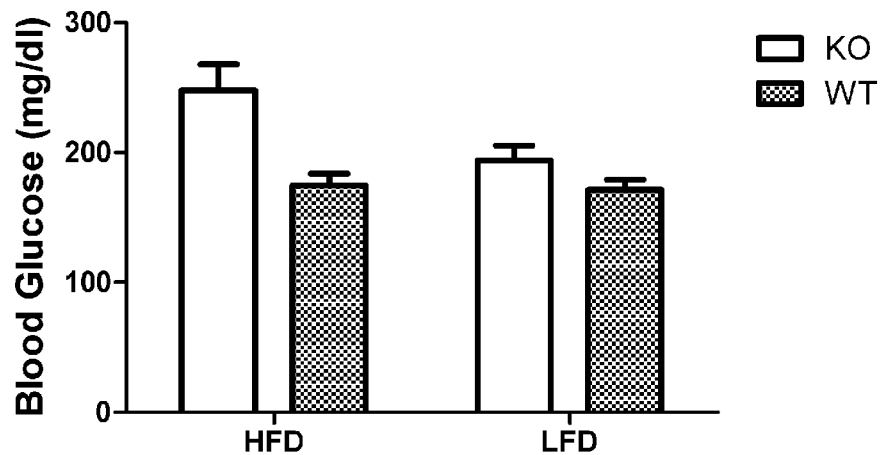
高脂肪食を摂取したKOマウスでは、高脂肪食を摂取したWTマウスと比して、空腹時血糖値が有意に高かった。一方、低脂肪食を摂取したKOマウスでは

、WTマウスと比して差異が認められなかった。すなわち、高脂肪を摂取したKOマウスでは、空腹時血糖値の上昇という2型糖尿病の病態が見られた。

[0097] [高脂肪食を3週間与えた後の随時血糖値の検証]

次に、高脂肪食又は低脂肪食を3週間摂取した時点で、午前10時に尾より血液を採取し、随時血糖値を測定した。その結果を表8に示す。

[0098] [表8]



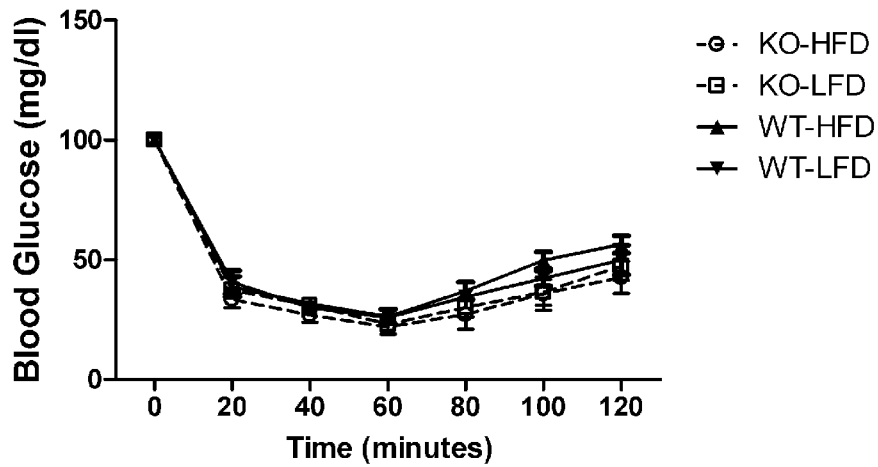
高脂肪食を摂取したKOマウスでは、高脂肪食を摂取したWTマウスと比して、随時血糖値が有意に高かった。一方、低脂肪食を摂取したKOマウスでは、WTマウスと比して差異が認められなかった。すなわち、高脂肪を摂取したKOマウスでは、随時血糖値の上昇という2型糖尿病の病態が見られた。

[0099] [高脂肪食を8週間与えた後のインスリン感受性の検証]

次に、高脂肪食を摂取したKOマウス又はWTマウスを1U/kg体重となるようにインスリンを経腹投与し、経時的に尾より血液を採取し、血糖値を測定した。その結果を表9に示す。

[0100]

[表9]



すべての実験群において、インスリン投与による血糖値の低下度合いに差異が認められなかった。すなわち、高脂肪食を摂取したKOマウスは、インスリン抵抗性を有する2型糖尿病ではなく、インスリン分泌不全による2型糖尿病の病態が見られた。

[0101] [Cdkal1異常に起因する2型糖尿病予防・治療剤のスクリーニング]

上記〔血糖値の経時変化の検証〕に用いたノックアウトマウスに対し、2型糖尿病治療薬として知られているGlucagon-like peptide-1受容体のアゴニストであるExendin-4を被験物質として経腹投与し、ノックアウトマウスの2型糖尿病の程度を評価することで、Cdkal1異常に起因する2型糖尿病予防・治療剤のスクリーニングを模擬的に行った。

[0102] 2型糖尿病の程度を評価する方法としては、野生型とノックアウトマウスの空腹時の血糖値や糖負荷時の血糖値を調べ、両者を比較・評価することにより行った。また、Exendin-4は、体重1kg当たり0.1mgを一日2回、2週間投与した。その結果を表10に示す。

[0103]

[表10]

Exendin-4による耐糖能の改善

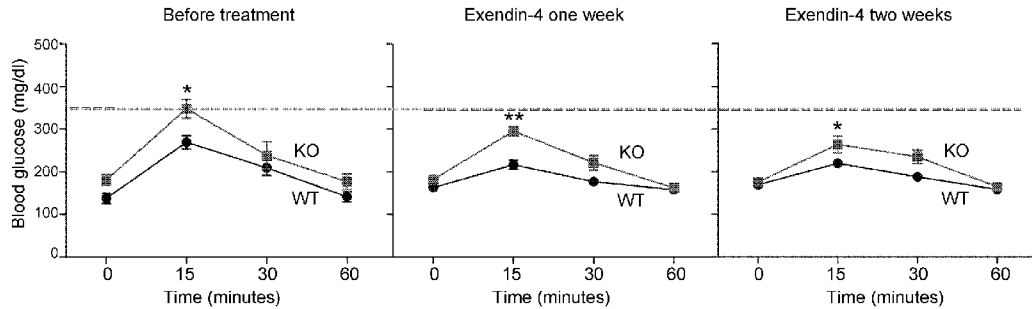


表10にも示すように、Exendin-4の投与前後においてグルコース負荷15分後の血糖値は、KOがWTマウスより有意に高かった (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。一方、Exendin-4を投与して1週間後及び2週間後の結果を参照すると、WT及びKOマウスともにExendin-4投与による耐糖能の改善が有意に見られた (ANOVAによる検定 $p = 0.02$)。

[0104] これらの結果より、本実施形態に係る2型糖尿病モデル非ヒト動物では、Exendin-4の投与により、耐糖能が改善されることが示された。

[0105] すなわち、2型糖尿病予防・治療剤としての機能が未知の被験物質を、本実施形態に係る2型糖尿病モデル非ヒト動物に投与することにより、2型糖尿病予防・治療剤のスクリーニングが可能であることが示唆された。

[0106] 上述してきたように、本実施形態に係る2型糖尿病モデル非ヒト動物では、Cdkal1遺伝子の機能が、膵臓の β 細胞の染色体上で特異的に欠損した2型糖尿病モデル非ヒト動物としたため、日本人に多い非肥満型の2型糖尿病と類似の病態を自然発症する新しい2型糖尿病モデル非ヒト動物を提供することができる。

[0107] しかも、膵臓において、臓器特異的にCdkal1遺伝子がノックアウトされることとなるため、膵臓以外の部位でのCdkal1遺伝子の発現に影響を及ぼすおそれがない。それゆえ、本発明に係る2型糖尿病モデル非ヒト動物を例えば試験・研究等に供した場合には、対照となる野生型の非ヒト動物と比較する

際に、膵臓以外の部位でのCdkal1遺伝子の発現の差異について考慮する必要がなく、前記野生型の非ヒト動物を対照としてより正確な比較実験を行うことができる。

[0108] また、特開2006-034132号公報に記載の2型糖尿病発症マウスのように、野生で捕獲したマウスを交配させて作製したものと異なり、系統が明確であることから、より正確な2型糖尿病の研究や、2型糖尿病予防・治療剤のスクリーニングに寄与することができるものと言える。

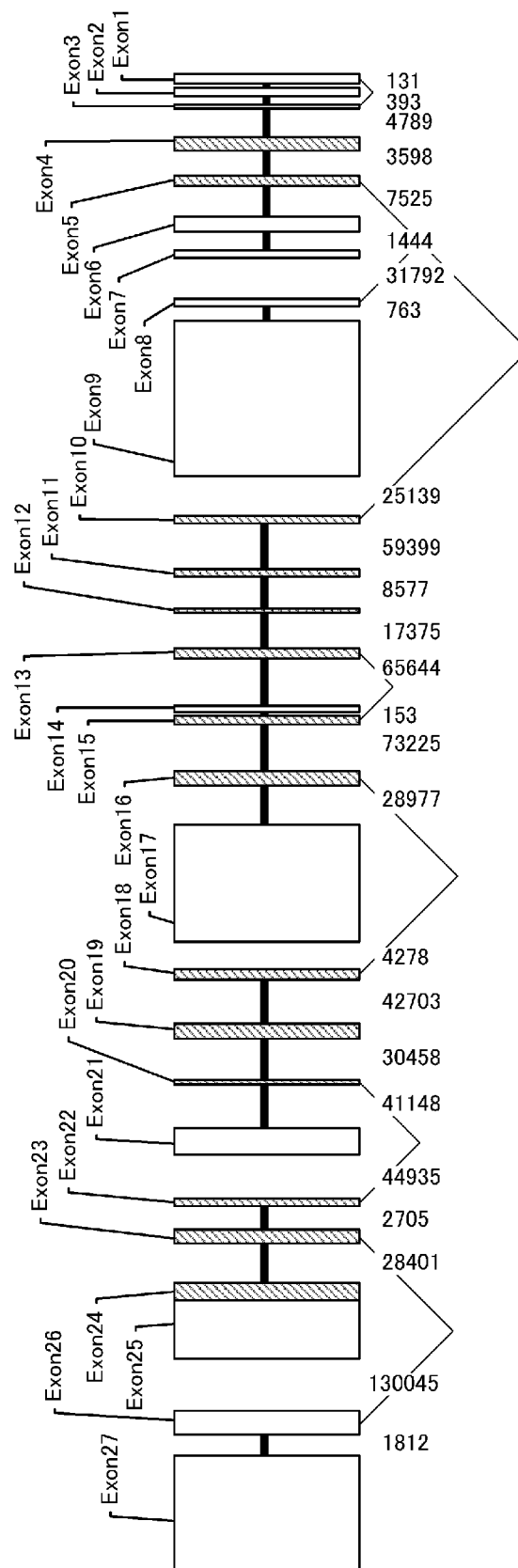
[0109] 最後に、上述した各実施の形態の説明は本発明の一例であり、本発明は上述の実施の形態に限定されることはない。このため、上述した各実施の形態以外であっても、本発明に係る技術的思想を逸脱しない範囲であれば、設計等に応じて種々の変更が可能であることは勿論である。

請求の範囲

- [請求項1] Cdkal1遺伝子の機能が、膵臓の β 細胞の染色体上で特異的に欠損した2型糖尿病モデル非ヒト動物。
- [請求項2] Cdkal1遺伝子の1又は複数のエキソンを含む所定領域の3'側非翻訳領域と5'側非翻訳領域とに部位特異的組み換え酵素認識配列を有する非ヒト動物と、
前記部位特異的組み換え酵素認識配列を認識して前記所定領域を切り出し可能な部位特異的組み換え酵素の遺伝子が、膵臓で特異的に発現する遺伝子のプロモータの下流に発現可能に挿入された非ヒト動物と、を交配させることにより作製されたことを特徴とする請求項1に記載の2型糖尿病モデル非ヒト動物。
- [請求項3] 前記所定領域は、少なくともエキソン5を含むことを特徴とする請求項2に記載の2型糖尿病モデル非ヒト動物。
- [請求項4] 前記非ヒト動物が、齧歯目動物であることを特徴とする請求項1～3いずれか1項に記載の2型糖尿病モデル非ヒト動物。
- [請求項5] 前記齧歯目動物が、マウスであることを特徴とする請求項4に記載の2型糖尿病モデル非ヒト動物。
- [請求項6] Cdkal1遺伝子の機能が、膵臓の β 細胞の染色体上で特異的に欠損した非ヒト動物を、2型糖尿病モデル非ヒト動物として使用する方法。
- [請求項7] Cdkal1遺伝子の機能が、膵臓の β 細胞の染色体上で特異的に欠損した2型糖尿病モデル非ヒト動物に被験物質を投与して、該非ヒト動物の2型糖尿病の程度を評価することを特徴とする、Cdkal1異常に起因する2型糖尿病予防・治療剤のスクリーニング方法。
- [請求項8] 前記被験物質を、Cdkal1遺伝子の機能が、膵臓の β 細胞の染色体上で特異的に欠損した非ヒト動物と、野生型非ヒト動物とに投与して、両非ヒト動物を比較・評価することを特徴とする請求項7に記載のCdkal1異常に起因する2型糖尿病予防・治療剤のスクリーニング方法。
- [請求項9] Cdkal1遺伝子の機能を、膵臓の β 細胞の染色体上で特異的に欠損さ

せる2型糖尿病モデル非ヒト動物の作製方法。

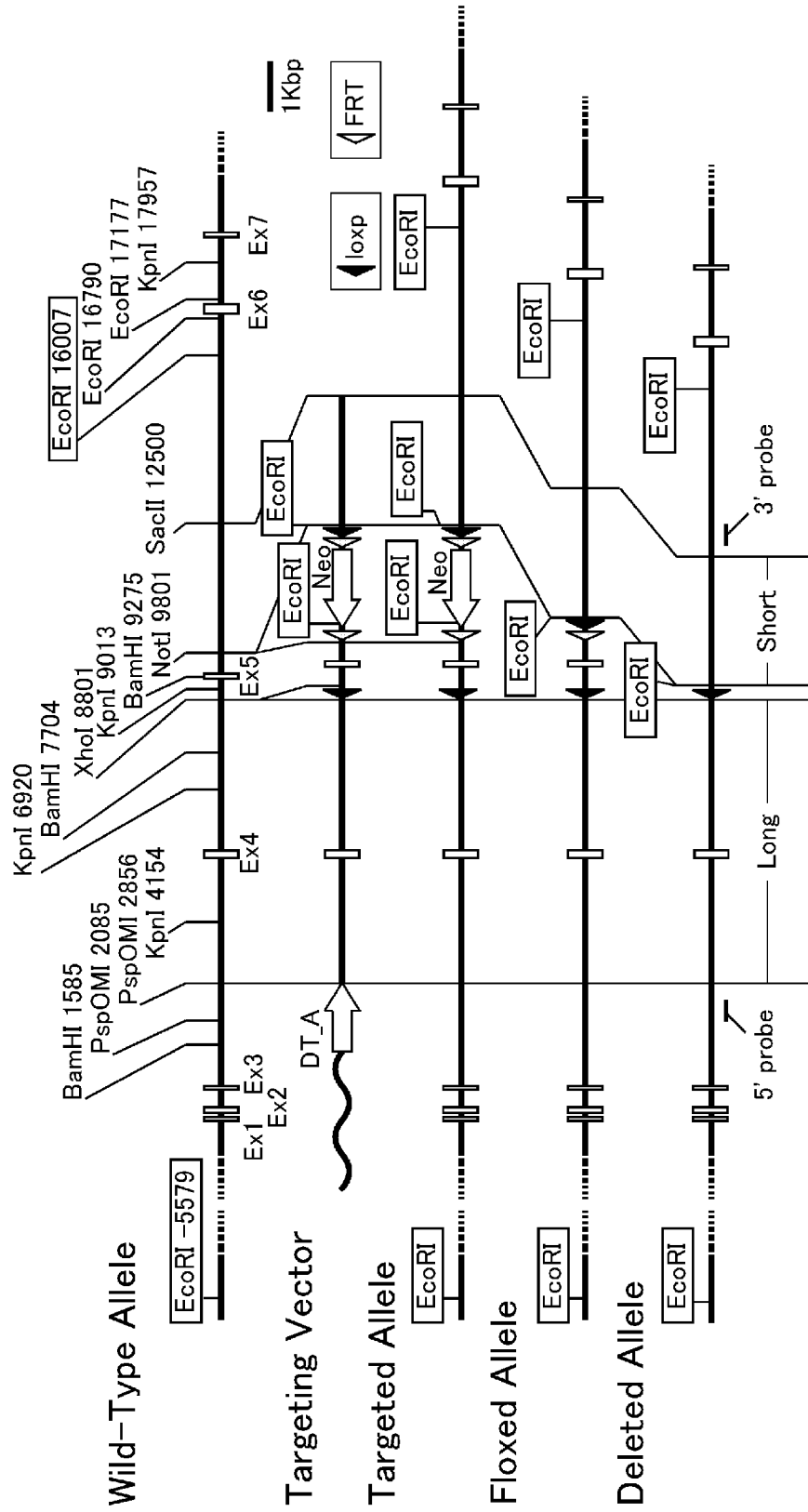
[図1]



Cdkal1 遺伝子の構造

図2

ES細胞の系統 (C57BL6)
マウスの系統 (C57BL6)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/070006

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01K67/027(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/15(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)

A01K67/027, C12N15/09, G01N33/15

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	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, CiNii

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Kazuhito TOMIZAWA, "Cdk5 to 2-gata Tonyobyo Hassho", Igaku no Ayumi, 19 July 2008 (19.07.2008), vol.226, no. 3, pages 245, 246, entire text	1-9
X	Kazuhito TOMIZAWA, "Cdk5 no Hishinkei Seigyo Saibo ni Okeru Kino: Insulin Bunpi no Seigyo", Protein, nucleic acid and enzyme, 01 June 2009 (01.06.2009), vol. 54, no. 7, pages 808 to 812, particularly, pages 811, 812	1-9
X	SCOTT, L, J. et al., A Genome-Wide Association Study of Type 2 Diabetes in Finns Detects Multiple Susceptibility Variants, SCIENCE, 2007.06.01, Vol. 316, pp. 1341-1345, p. 1344	1-9

 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
01 December, 2010 (01.12.10)Date of mailing of the international search report
14 December, 2010 (14.12.10)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/070006

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HORIKOSHI, M. et al., Variations in the HHEX gene are associated with increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population, <i>Diabetologia</i> , 2007, Vol. 50, pp. 2461-2466, entire text	1-9
X	STEINTHORSOTTIR, V. et al., The Type 2 Diabetes Gene CDKAL1 Discovered by Genome-wide Association is Expressed in Beta Cells and Modulated by Glucose Concentration, <i>Circulation</i> [online], 2007, http://circ.ahajournals.org/cgi/content/meeting_abstract/116/16_MeetingAbstracts/II_507?maxtoshow=&hits=10&RESULTFORMAT=&fulltext=CDKAL1&searchid=1&FIRSTINDEX=0&volume=116&issue=16+Supplement&resourcetype=HWCIT , [retrieval date 2010.11.25]	1-9
A	JP 2006-34132 A (Yoshiumi MATSUSHIMA), 09 February 2006 (09.02.2006), & US 2006/0021072 A1	1-9
P,X	Kazuhito TOMIZAWA, "tRNA Shushoku to 2-gata Tonyobyō Hassho", Dai 12 Kai The RNA Society of Japan Nenkai Yoshishu, 27 July 2010 (27.07.2010), page 4, SP-2	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. A01K67/027 (2006.01)i, C12N15/09 (2006.01)i, G01N33/15 (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. A01K67/027, C12N15/09, G01N33/15

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 1971-2010年
 日本国実用新案登録公報 1996-2010年
 日本国登録実用新案公報 1994-2010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)
 CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, CiNii

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	富澤一仁, Cdk5 と 2 型糖尿病発症, 医学の歩み, 2008.07.19, Vol. 226, No. 3, p. 245, 246, 全文	1-9
X	富澤一仁, Cdk5 の非神経制御細胞における機能: インスリン分泌の制御, 蛋白質 核酸 酵素, 2009.06.01, Vol. 54, No. 7, pp. 808-812, 特に p. 811, 812 参照	1-9

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。

<p>* 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</p>	<p>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</p>
---	---

国際調査を完了した日 01.12.2010	国際調査報告の発送日 14.12.2010
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) 太田 雄三 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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	SCOTT, L, J. et al., A Genome-Wide Association Study of Type 2 Diabetes in Finns Detects Multiple Susceptibility Variants, SCIENCE, 2007.06.01, Vol. 316, pp. 1341-1345, p. 1344 参照	1-9
X	HORIKOSHI, M. et al., Variations in the HHEX gene are associated with increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population, Diabetologia, 2007, Vol. 50, pp. 2461-2466, 全文	1-9
X	STEINTHORSDDOTTIR, V. et al., The Type 2 Diabetes Gene CDKAL1 Discovered by Genome-wide Association is Expressed in Beta Cells and Modulated by Glucose Concentration, Circulation[online], 2007, http://circ.ahajournals.org/cgi/content/meeting_abstract/116/16_MeetingAbstracts/II_507?maxtoshow=&hits=10&RESULTFORMAT=&fulltext=CDKAL1&searchid=1&FIRSTINDEX=0&volume=116&issue=16+Supplement&resourcetype=HWCIT , [検索日 2010.11.25]	1-9
A	JP 2006-34132 A (松島芳文) 2006.02.09, & US 2006/0021072 A1	1-9
P, X	富澤一仁, tRNA 修飾と 2 型糖尿病発症, 第 12 回日本 RNA 学会年会要旨集, 2010.07.27, p. 4, SP-2	1-9