

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02014/010746

発行日 平成28年6月23日 (2016. 6. 23)

(43) 国際公開日 **平成26年1月16日 (2014. 1. 16)**

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 2	4 B 0 2 4
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12	4 B 0 6 5
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	4 C 0 8 7
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/06	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 38 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2014-524904 (P2014-524904)	(71) 出願人	509349141 京都府公立大学法人
(21) 国際出願番号	PCT/JP2013/069226		京都府京都市上京区河原町通広小路 上る 梶井町 4 6 5
(22) 国際出願日	平成25年7月12日 (2013. 7. 12)	(74) 代理人	110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所
(31) 優先権主張番号	特願2012-156066 (P2012-156066)	(72) 発明者	岸田 綱郎 京都府京都市上京区河原町通広小路 上る 梶井町 4 6 5 番地 京都府公立大学法人 京 都府立医科大学内
(32) 優先日	平成24年7月12日 (2012. 7. 12)	(72) 発明者	松田 修 京都府京都市上京区河原町通広小路 上る 梶井町 4 6 5 番地 京都府公立大学法人 京 都府立医科大学内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 褐色脂肪細胞及びその調製方法

(57) 【要約】

本発明は、哺乳動物の体細胞に褐色脂肪細胞関連遺伝子又はその発現産物とリプログラミング関連遺伝子又はその発現産物を導入することで、前記体細胞から褐色脂肪細胞を調製する方法であって、前記褐色脂肪細胞関連遺伝子がPRDM16 (P) 及びC/EBP (C) からなる群から選択される少なくとも1種であり、リプログラミング関連遺伝子がMycファミリーの遺伝子 (c-Myc (M)、N-Myc、L-Myc(L)、S-Myc、B-Myc)、GLIS ファミリーの遺伝子 (GLIS1 (G)、GLIS 2、GLIS 3)、Klfファミリーの遺伝子 (KLF1、KLF2、KLF3、KLF4 (K)、KLF5、KLF6、KLF7、KLF8、KLF9、KLF10、KLF11、KLF12、KLF13、KLF14、KLF15、KLF16、KLF17)、Octファミリーの遺伝子、Soxファミリーの遺伝子、Lin-28からなる群から選択される少なくとも1種である、褐色脂肪細胞を調製する方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物の体細胞に褐色脂肪細胞関連遺伝子又はその発現産物とリプログラミング関連遺伝子又はその発現産物を導入することで、前記体細胞から褐色脂肪細胞を調製する方法であって、前記褐色脂肪細胞関連遺伝子がPRDM16 (P) 及びC/EBP (C) からなる群から選択される少なくとも1種であり、リプログラミング関連遺伝子がMycファミリーの遺伝子、GLIS ファミリーの遺伝子、Klfファミリーの遺伝子、Octファミリーの遺伝子、Soxファミリーの遺伝子、Lin-28からなる群から選択される少なくとも1種である、褐色脂肪細胞を調製する方法。

【請求項 2】

前記体細胞が線維芽細胞または白色脂肪細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

褐色脂肪細胞関連遺伝子又はその発現産物がC/EBP である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

リプログラミング関連遺伝子又はその発現産物がc-MycまたはL-Mycを含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 5】

リプログラミング関連遺伝子又はその発現産物がc-Mycを含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 6】

体細胞に導入される褐色脂肪細胞関連遺伝子又はその発現産物とリプログラミング関連遺伝子又はその発現産物の組み合わせが、PCM、CM、PCL、CL、PCML、CML、PCM Oct3/4、CM Oct3/4、PCMG、CMG、PCL Oct3/4、CL Oct3/4、PCLG、CLG、PCML Oct3/4、CML Oct3/4、PCMLG、CMLG、PCM Oct3/4 G、CM Oct3/4 G、PCL Oct3/4 G、CL Oct3/4 G、PCML Oct3/4 G、CML Oct3/4 G (ここで、Pは「PRDM16」を示し、Cは「C/EBP 」を示し、Mは「c-Myc」を示し、Lは「L-Myc」を示し、Gは「Glis1」を示す) からなる群から選ばれるいずれかの組み合わせである、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 7】

体細胞に導入される褐色脂肪細胞関連遺伝子又はその発現産物とリプログラミング関連遺伝子又はその発現産物の組み合わせが、PCM、CM、PCL、CL、PCML、CML、PCM Oct3/4、CM Oct3/4、PCMG、CMG、PCL Oct3/4、CL Oct3/4、PCLG、CLG、PCML Oct3/4、CML Oct3/4、PCMLG、CMLG、PCM Oct3/4 G、CM Oct3/4 G、PCL Oct3/4 G、CL Oct3/4 G、PCML Oct3/4 G、CML Oct3/4 Gからなる群から選ばれるいずれかの組み合わせである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

体細胞に導入される褐色脂肪細胞関連遺伝子又はその発現産物とリプログラミング関連遺伝子又はその発現産物の組み合わせが、PCM、CM、PCML、CML、PCMG、CMG、PCLG、CLG、PCMLG、CMLGからなる群から選ばれるいずれかの組み合わせである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

哺乳動物の体細胞に由来し、褐色脂肪細胞関連遺伝子又はその発現産物とリプログラミング関連遺伝子又はその発現産物を有する褐色脂肪細胞であって、前記褐色脂肪細胞関連遺伝子がPRDM16 (P) 及びC/EBP (C) からなる群から選択される少なくとも1種であり、リプログラミング関連遺伝子がMycファミリーの遺伝子、GLIS ファミリーの遺伝子、Klfファミリーの遺伝子、Octファミリーの遺伝子、Soxファミリーの遺伝子、Lin-28からなる群から選択される少なくとも1種である、褐色脂肪細胞。

【請求項 10】

肥満、糖尿病、耐糖能異常、脂質代謝異常、動脈硬化性疾患、高血圧、高尿酸血症、痛風、非アルコール性脂肪性肝疾患、メタボリックシンドロームの予防又は治療剤であって、

10

20

30

40

50

請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法により調製された褐色脂肪細胞、または、請求項 9 に記載の褐色脂肪細胞を有効成分とする、予防又は治療剤。

【請求項 1 1】

請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法により調製された褐色脂肪細胞、または、請求項 9 に記載の褐色脂肪細胞の肥満、糖尿病、耐糖能異常、脂質代謝異常、動脈硬化性疾患、高血圧、高尿酸血症、痛風、非アルコール性脂肪性肝疾患、メタボリックシンドロームの予防又は治療のための使用。

【請求項 1 2】

請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法により調製された褐色脂肪細胞、または、請求項 9 に記載の褐色脂肪細胞を含む、移植材料。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、褐色脂肪細胞及びその調製方法に関する。また、本発明は、肥満、糖尿病、耐糖能異常、脂質代謝異常、動脈硬化性疾患、高血圧、高尿酸血症、痛風、非アルコール性脂肪性肝疾患、メタボリックシンドロームの予防又は治療剤およびその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

肥満とこれに関連する代謝疾患、例えば糖尿病、メタボリックシンドロームなどは、先進工業国において、極めて大きな医療、社会上の問題になっている。肥満症においては、白色脂肪細胞が、食物由来の余剰エネルギーを脂肪酸として貯蔵するのみならず、さまざまなホルモンやサイトカインを産生して耐糖能異常、脂質代謝異常を惹起し、II型糖尿病、動脈硬化性疾患、高血圧、高尿酸血症・痛風、非アルコール性脂肪性肝疾患等をもたらす。

20

【0003】

一方、褐色脂肪(BA)細胞は、白色脂肪細胞とは逆に、脂肪酸を酸化分解してそのエネルギーを熱として放出する細胞である。これは、BA細胞が特異的に発現するミトコンドリア内膜蛋白、UCP1(Uncoupling protein 1)が、酸化的リン酸化を脱共役させるためである。マウスなどげっ歯類では、BA細胞は肩甲骨間、後頸部、縦隔、腎周囲等に存在する。また、UCP1ノックアウトマウスの解析等から、BA細胞は肥満と耐糖能異常を抑制することが知られている。

30

【0004】

褐色脂肪細胞は、ヒトでは乳児期にのみ存在し、成人では存在しないと、最近まで考えられてきたが、2009年になって、成人でも鎖骨上部の皮下組織、大動脈周囲等に褐色脂肪細胞が存在することが明らかにされた(非特許文献1~3)。褐色脂肪細胞の数と機能には大きな個人差があり、BMI(体格指数)と空腹時血糖に逆相関する。やせ型のヒトでは多く、肥満、糖尿病、高脂血症の患者では極端に低下している。したがって、肥満、糖尿病、高脂血症等の疾患の遺伝的素因を解析し、環境要因を探索し、病態を解明し、あるいは新しい診断法や治療効果の判定等の技術を開発する上で、褐色脂肪細胞は重要な意義を持つ。褐色脂肪細胞はまた、これら疾患に対する新しい治療薬の開発にも極めて有益であると考えられる。さらに肥満、糖尿病、高脂血症、メタボリック症候群等の患者に褐色脂肪細胞を補充することができれば、これら疾患に対する新しい治療手段となる可能性がある。

40

【0005】

ヒトiPS細胞から間葉系幹細胞、次いで褐色脂肪細胞と白色脂肪細胞を得る方法は知られているが(非特許文献4)、iPS細胞から褐色脂肪細胞と白色脂肪細胞を誘導すると、最終の脂肪細胞を得るまでに時間がかかり、iPS由来であることから癌化のリスクが生じる。

【0006】

体細胞のダイレクト・コンバージョンに関し、例えば以下の報告がある：

50

マウス線維芽細胞 軟骨細胞 (SOX9 + Klf4 + c-Myc遺伝子を導入、特許文献1)
 マウス線維芽細胞 心筋細胞 (GATA4 + Mef2c + Tbx5遺伝子を導入)
 マウス線維芽細胞 肝細胞 (Hnf4 + (Foxa1またはFoxa2またはFoxa3)
 遺伝子を導入)
 マウス線維芽細胞 神経幹細胞 (Sox2 + FoxG1遺伝子を導入など)、
 マウス、ヒト細胞 造血幹細胞

これまで、PRDM16とC/EBP を筋芽細胞や線維芽細胞に遺伝子導入し、「褐色脂肪細胞様の細胞」に誘導することは知られている(特許文献2および非特許文献5)。しかし、PRDM16とC/EBP で誘導した細胞は、UCP1の発現レベルが非常に低いなど、褐色脂肪細胞としての性質は不十分にしか有さない。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】W02010/071210

【特許文献2】W02010/080985A8

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Saito M. et al., Diabetes 58:1526, 2009

【非特許文献2】Cypess A. M. et al., N Eng J Med 360: 1509, 2009

【非特許文献3】Van Marken Lichtenbelt W. D. et al., N Engl J Med 360: 1500, 2009

【非特許文献4】Tim Ahfeldt et al., Nature Cell Biology Vol.14, No.2, 2012

【非特許文献5】Kajimura S, et al. Nature 460: 1154, 2009

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、肥満、糖尿病、耐糖能異常、脂質代謝異常、動脈硬化性疾患、高血圧、高尿酸血症、痛風、非アルコール性脂肪性肝疾患、メタボリックシンドロームの予防又は治療剤、予防又は治療方法、該疾患又は状態の予防又は治療に有効な移植材料及びその調製方法を提供することを目的とする。

30

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、褐色脂肪細胞及びその調製方法、褐色脂肪細胞を含む移植材料、褐色脂肪細胞を含む各種疾患、状態の予防剤又は治療剤、使用を提供するものである。

項1. 哺乳動物の体細胞に褐色脂肪細胞関連遺伝子又はその発現産物とリプログラミング関連遺伝子又はその発現産物を導入することで、前記体細胞から褐色脂肪細胞を調製する方法であって、前記褐色脂肪細胞関連遺伝子がPRDM16(P)及びC/EBP(C)からなる群から選択される少なくとも1種であり、リプログラミング関連遺伝子がMycファミリーの遺伝子、GLISファミリーの遺伝子、Klfファミリーの遺伝子、Octファミリーの遺伝子、Soxファミリーの遺伝子、Lin-28からなる群から選択される少なくとも1種である、褐色脂肪細胞を調製する方法。

40

項2. 前記体細胞が線維芽細胞または白色脂肪細胞である、項1に記載の方法。

項3. 褐色脂肪細胞関連遺伝子又はその発現産物がC/EBPである、項1又は2に記載の方法。

項4. リプログラミング関連遺伝子又はその発現産物がc-MycまたはL-Mycを含む、項1又は2に記載の方法。

項5. リプログラミング関連遺伝子又はその発現産物がc-Mycを含む、項1又は2に記載の方法。

項6. 体細胞に導入される褐色脂肪細胞関連遺伝子又はその発現産物とリプログラミング関連遺伝子又はその発現産物の組み合わせが、PCM、CM、PCL、CL、PCG、CG、PCML、CML

50

、PCMOct3/4、CMOct3/4、PCMG、CMG、PCLOct3/4、CLOct3/4、PCLG、CLG、PCMLOct3/4、CMLOct3/4、PCMLG、CMLG、PCMOct3/4G、CMOct3/4G、PCLOct3/4G、CLOct3/4G、PCMLOct3/4G、CMLOct3/4G (ここで、Pは「PRDM16」を示し、Cは「C/EBP」を示し、Mは「c-Myc」を示し、Lは「L-Myc」を示し、Gは「Glis1」を示す) からなる群から選ばれるいずれかの組み合わせである、項1又は2に記載の方法。

項7. 体細胞に導入される褐色脂肪細胞関連遺伝子又はその発現産物とリプログラミング関連遺伝子又はその発現産物の組み合わせが、PCM、CM、PCL、CL、PCML、CML、PCMOct3/4、CMOct3/4、PCMG、CMG、PCLOct3/4、CLOct3/4、PCLG、CLG、PCMLOct3/4、CMLOct3/4、PCMLG、CMLG、PCMOct3/4G、CMOct3/4G、PCLOct3/4G、CLOct3/4G、PCMLOct3/4G、CMLOct3/4Gからなる群から選ばれるいずれかの組み合わせである、項6に記載の方法。

項8. 体細胞に導入される褐色脂肪細胞関連遺伝子又はその発現産物とリプログラミング関連遺伝子又はその発現産物の組み合わせが、PCM、CM、PCML、CML、PCMG、CMG、PCLG、CLG、PCMLG、CMLGからなる群から選ばれるいずれかの組み合わせである、項6に記載の方法。

項9. 哺乳動物の体細胞に由来し、褐色脂肪細胞関連遺伝子又はその発現産物とリプログラミング関連遺伝子又はその発現産物を有する褐色脂肪細胞であって、前記褐色脂肪細胞関連遺伝子がPRDM16(P)及びC/EBP(C)からなる群から選択される少なくとも1種であり、リプログラミング関連遺伝子がMycファミリーの遺伝子、GLISファミリーの遺伝子、Klfファミリーの遺伝子、Octファミリーの遺伝子、Soxファミリーの遺伝子、Lin-28からなる群から選択される少なくとも1種である、褐色脂肪細胞。

項10. 肥満、糖尿病、耐糖能異常、脂質代謝異常、動脈硬化性疾患、高血圧、高尿酸血症、痛風、非アルコール性脂肪性肝疾患、メタボリックシンドロームの予防又は治療剤であって、項1～8のいずれかに記載の方法により調製された褐色脂肪細胞、または、項9に記載の褐色脂肪細胞を有効成分とする、予防又は治療剤。

項11. 項1～8のいずれかに記載の方法により調製された褐色脂肪細胞、または、項9に記載の褐色脂肪細胞の肥満、糖尿病、耐糖能異常、脂質代謝異常、動脈硬化性疾患、高血圧、高尿酸血症、痛風、非アルコール性脂肪性肝疾患、メタボリックシンドロームの予防又は治療のための使用。

項12. 項1～8のいずれかに記載の方法により調製された褐色脂肪細胞、または、項9に記載の褐色脂肪細胞を含む、移植材料。

【発明の効果】

【0011】

本発明では、上記の先行技術と異なり、リプログラミング関連遺伝子をPRDM16および/またはC/EBPに加えて用いることで、UCP1の発現がより高く、褐色脂肪細胞としての性質がより優れた褐色脂肪細胞を、効率よく誘導することができる。

【0012】

本発明ではまた、上記の先行技術と異なり、PRDM16がなくても、C/EBPに加えてリプログラミング関連遺伝子を用いれば、褐色脂肪細胞としての性質が優れた細胞を、効率よく誘導することができる。

【0013】

褐色脂肪細胞は、生体に移植することで、肥満、メタボリックシンドローム、或いはこれらの関連する疾患又は状態、例えば糖尿病(特にII型糖尿病)、耐糖能異常、脂質代謝異常、動脈硬化性疾患、高血圧、高尿酸血症、痛風、非アルコール性脂肪性肝疾患などの予防又は治療、内臓脂肪の除去などに有効である。

【0014】

また、褐色脂肪細胞は、脂肪の燃焼により内臓脂肪及び/又は皮下脂肪の除去にも有効であるので、褐色脂肪細胞を注入することにより局所的な脂肪の除去、体脂肪率の低下、皮下脂肪の除去などの美容術にも有効である。

【図面の簡単な説明】

【0015】

10

20

30

40

50

【図1】実施例1の概要を示す。

【図2A】実施例2で得られた細胞のウェルNo. 1~12のOilRedO染色結果を示す。aHDF, Day 14。

【図2B】実施例2で得られた細胞のウェルNo. 13~24のOilRedO染色結果を示す。aHDF, Day 14。

【図2C】実施例2で得られた細胞のウェルNo. 25~36のOilRedO染色結果を示す。aHDF, Day 14。

【図2D】実施例2で得られた細胞のウェルNo. 37~48のOilRedO染色結果を示す。aHDF, Day 14。

【図2E】実施例2で得られた細胞のウェルNo. 49~60のOilRedO染色結果を示す。aHDF, Day 14。

【図2F】実施例2で得られた細胞のウェルNo. 61~65のOilRedO染色結果を示す。aHDF, Day 14。

【図3】実施例3で得られた細胞のウェルNo. 1~65の脂肪含量(縦軸)、OilRedO抽出OD(相対値)。aHDF, Day 14。

【図4】実施例4で得られた褐色脂肪細胞のウェルNo. 1~65のUCP1 mRNAレベル(相対値)。aHDF, Day 12。

【図5】実施例5で得られた細胞のUCP1 mRNAの相対レベルを示す。aHDF

【図6】5種の細胞(Control, PRDM16, C/EBP, PRDM16+ C/EBP, PRDM16+ C/EBP +cMyc)のPhase contrast, ミトコンドリア染色、OilRedO染色の結果を示す。aHDF

【図7】ADSCを図1のように処理して得られた細胞のOilRedO染色の結果を示す。ADSC, Day 22。

【図8】ヒト脂肪由来幹細胞(ADSC)を図1のように処理して得られた細胞のUCP1、CIDEA、AdipoQのmRNA発現を定量した結果を示す。縦軸「RQ」はmRNAの相対値を示す。ADSC, Day 22。

【図9】マウスiPS-derived BA細胞、またはコントロールとして非誘導細胞を、同系マウスの腹部皮下に移植したときのOilRed染色像、体重及び直腸温を示す。

【図10】マウスiPS-derived BA細胞、またはコントロールとして非誘導細胞を、同系マウスの腹部皮下に移植したときのサーモグラフィーのイメージング結果を示す。Thermographic visualization shows thermogenesis at the induced BA graft. The temperature on the body surface went up remarkably in transplanted BA group compared with control group.

【図11】iPS-derived BA細胞を移植したマウス及び移植しないマウスについて、高カロリー食及び普通食を与えたときの体重の推移を示す。

【図12】iPS-derived BA細胞を移植したマウス及び移植しないマウスに高カロリー食を与え、4週間後に血清の脂質を調べた結果を示す。

【図13】2型糖尿病マウスの体細胞から樹立したiPS細胞の形態及び幹細胞マーカーの発現について調べた結果を示す。

【図14】iPS細胞から誘導した褐色脂肪細胞(図上)。この細胞をKK-Ayマウスに移植したところ、随時血糖の上昇が緩やかで(左下)、また尿糖は検出されなかった(右下, three weeks post-transplantation)。コントロールとして、移植していないKK-Ayマウスと、褐色脂肪細胞への誘導を行わなかった細胞を移植したマウスでは、糖尿病が進行していた。

【図15】iPS由来のBA細胞を移植したKK-Ayマウス、非移植マウス、GFP Controlマウスの、体重、血清中のNEFAと中性脂肪の測定結果を示す。

【図16】iPS由来のBA細胞を移植したKK-Ayマウス、非誘導細胞を移植したマウス、非移植Controlマウスの、血清中のアディポネクチン量、摂食量を示す。

【図17】ヒト正常皮膚線維芽細胞およびiPS細胞から誘導した褐色脂肪細胞の性状。

【図18】ヒト正常皮膚線維芽細胞から誘導した褐色脂肪細胞の性状

【図19】ヒト正常皮膚線維芽細胞から誘導した褐色脂肪細胞の性状

10

20

30

40

50

【図20】エピゾーマル・ベクターによるヒト正常皮膚線維芽細胞から褐色脂肪細胞へのダイレクト・リプログラミング。

【図21】マウス胎仔線維芽細胞(MEF)から誘導した褐色脂肪細胞。

【図22】マウス胎仔線維芽細胞(MEF)から誘導した褐色脂肪細胞の生体内機能。

【図23】マウス胎仔線維芽細胞(MEF)から誘導した褐色脂肪細胞の生体内機能。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明の褐色脂肪細胞を移植材料として用いて治療する対象となる疾患としては、肥満、メタボリックシンドローム、或いはこれらの関連する疾患又は状態、例えば糖尿病(特にII型糖尿病)、耐糖能異常、脂質代謝異常、動脈硬化性疾患、高血圧、高尿酸血症、痛風、非アルコール性脂肪性肝疾患などが挙げられる。また、腹部や顎の周り、太ももなどの脂肪を除去する美容的な用途にも使用できる。褐色脂肪細胞を投与すると、脂肪量、特に内臓脂肪、皮下脂肪などの白色脂肪細胞が低減され、また高カロリー食を摂取した場合にも体重増加が抑制されるため、肥満、メタボリックシンドローム、或いはこれらの関連する疾患又は状態の予防と治療の両方に有用である。本発明はまた、疾患の予防又は治療に限らず、健康増進や美容(例えば腹部、顎、腕、太ももなどの内臓脂肪、皮下脂肪の除去)等の目的で用いることもできる。その際、ヒトに対する処置も、本明細書では便宜上治療と呼び、「患者」は「健常者」あるいは「ヒト」、「疾患」は「健康増進」や「美容」等と読み替えることができる。

10

【0017】

本発明はまた、ヒトだけでなく、イヌ、ネコ等の愛玩動物やウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ニワトリ等の家畜の疾患の治療にも用いることが可能である。その場合、「患者」あるいは「ヒト」を「患者」あるいは「動物」と読み替えることとする。

20

【0018】

移植材料とは、褐色脂肪細胞を生体内に導入する材料をいう。褐色脂肪細胞は、乳房などに導入する美容的処置の移植材料として使用することもできる。移植材料は、インビトロで体細胞から褐色脂肪細胞に変換した後、同一または別の個体に移植する材料を包含する。

【0019】

本発明の方法の対象となる体細胞としては、特に限定されないが、例えば線維芽細胞、上皮細胞(皮膚表皮細胞、口腔粘膜上皮細胞、気道粘膜上皮細胞、腸管粘膜上皮細胞など)、表皮細胞、歯肉細胞(歯肉線維芽細胞、歯肉上皮細胞)、歯髓細胞、白色脂肪細胞、皮下脂肪、内臓脂肪、筋肉、血液細胞などが挙げられ、好ましくは線維芽細胞、表皮細胞(ケラチノサイト)などが挙げられる。また、間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)、神経幹細胞(Neural stem cell)、肝幹細胞(hepatic stem cell)、腸幹細胞、皮膚幹細胞、毛包幹細胞、色素細胞幹細胞などの体性幹細胞から分化誘導し、あるいは脱分化させ、あるいはリプログラミングさせて作成した体細胞も挙げられる。また、さまざまな体細胞から分化誘導し、あるいは脱分化させ、あるいはリプログラミングさせて別の体細胞に誘導した細胞も挙げられる。また、生殖系列の細胞から分化誘導し、あるいは脱分化させ、あるいはリプログラミングさせて誘導した体細胞も挙げられる。また、胎性幹細胞(Embryonic stem cell: ES細胞)や人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell: iPS細胞)から分化誘導し、あるいはリプログラミングさせて誘導した体細胞も挙げられる。また、厳密には体細胞ではないが、ES細胞、iPS細胞、あるいは生殖系列の細胞も本発明の「体細胞」に包含される(その際には、「体細胞」を「ES細胞」、「iPS細胞」あるいは「生殖系列の細胞」と読み替えるものとする)。また、培養細胞も挙げられ、培養細胞から分化誘導し、あるいは脱分化させ、あるいはリプログラミングさせて誘導した体細胞も挙げられる。体細胞の由来は、成人であっても小児であっても胎児であってもよい。本発明の方法の主要な実施形態として、分化した体細胞に褐色脂肪細胞関連遺伝子又はその発現産物とリプログラミング関連遺伝子又はその発現産物を導入してダイレクト・リプログラミングする方法が挙げられるが、ES細胞、iPS細胞、あるいは他の幹細胞

30

40

50

などの多能性細胞についても、褐色脂肪細胞関連遺伝子又はその発現産物とリプログラミング関連遺伝子又はその発現産物を導入してダイレクト・リプログラミングと同様の本発明方法により、褐色脂肪細胞を得ることができる。

【0020】

体細胞は、ヒト由来であることが特に好ましい。

【0021】

本発明の方法では、体細胞に以下の遺伝子またはその発現産物の組み合わせを導入する。ここで、「発現産物」としては、各遺伝子のmRNA又はタンパク質が挙げられる。

【0022】

褐色脂肪細胞に導くためには、褐色脂肪細胞関連遺伝子またはその発現産物とリプログラミング関連遺伝子またはその発現産物を導入する。褐色脂肪細胞関連遺伝子はPRDM16 (P) 及びC/EBP (C) からなる群から選択される少なくとも1種であり、リプログラミング関連遺伝子はMycファミリーの遺伝子 (c-Myc (M)、N-Myc、L-Myc(L)、S-Myc、B-Myc)、GLISファミリーの遺伝子 (GLIS1 (G)、GLIS 2、GLIS 3)、Klfファミリーの遺伝子 (KLF1, KLF2, KLF3, KLF4 (K), KLF5, KLF6, KLF7, KLF8, KLF9, KLF10, KLF11, KLF12, KLF13, KLF14, KLF15, KLF16, KLF17)、Octファミリーの遺伝子 (Oct3/4など)、Soxファミリーの遺伝子 (Sox2など)、Lin-28からなる群から選択される少なくとも1種であり、好ましくはc-MycまたはL-Mycを含み、より好ましくはc-Mycを含む。

【0023】

具体的な組み合わせ例としては、体細胞に導入される褐色脂肪細胞関連遺伝子又はその発現産物とリプログラミング関連遺伝子又はその発現産物の組み合わせが、PCM、PM、CM、PCL、PL、CL、PCK、PK、CK、PCG、PG、CG、PCML、PML、CML、PCMK、PMK、CMK、PCMG、PMG、CMG、PCLK、PLK、CLK、PCLG、PLG、CLG、PCKG、PKG、CKG、PCMLK、PMLK、CMLK、PCMLG、PMLG、CMLG、PCMKG、PMKG、CMKG、PCLKG、PLKG、CLKG、PCMLKG、PMLKG、CMLKG、PCM Lin-28、PM Lin-28、CM Lin-28、PCL Lin-28、PL Lin-28、CL Lin-28、PCK Lin-28、PK Lin-28、CK Lin-28、PCG Lin-28、PG Lin-28、CG Lin-28、PCML Lin-28、PML Lin-28、CML Lin-28、PCMK Lin-28、PMK Lin-28、CMK Lin-28、PCMG Lin-28、PMG Lin-28、CMG Lin-28、PCLK Lin-28、PLK Lin-28、CLK Lin-28、PCLG Lin-28、PLG Lin-28、CLG Lin-28、PCKG Lin-28、PKG Lin-28、CKG Lin-28、PCMLK Lin-28、PMLK Lin-28、CMLK Lin-28、PCMLG Lin-28、PMLG Lin-28、CMLG Lin-28、PCMKG Lin-28、PMKG Lin-28、CMKG Lin-28、PCLKG Lin-28、PLKG Lin-28、CLKG Lin-28、PCMLKG Lin-28、PMLKG Lin-28、CMLKG Lin-28

、PCM Oct3/4、PM Oct3/4、CM Oct3/4、PCL Oct3/4、PL Oct3/4、CL Oct3/4、PCK Oct3/4、PK Oct3/4、CK Oct3/4、PCG Oct3/4、PG Oct3/4、CG Oct3/4、PCML Oct3/4、PML Oct3/4、CML Oct3/4、PCMK Oct3/4、PMK Oct3/4、CMK Oct3/4、PCMG Oct3/4、PMG Oct3/4、CMG Oct3/4、PCLK Oct3/4、PLK Oct3/4、CLK Oct3/4、PCLG Oct3/4、PLG Oct3/4、CLG Oct3/4、PCKG Oct3/4、PKG Oct3/4、CKG Oct3/4、PCMLK Oct3/4、PMLK Oct3/4、CMLK Oct3/4、PCMLG Oct3/4、PMLG Oct3/4、CMLG Oct3/4、PCMKG Oct3/4、PMKG Oct3/4、CMKG Oct3/4、PCLKG Oct3/4、PLKG Oct3/4、CLKG Oct3/4、PCMLKG Oct3/4、PMLKG Oct3/4、CMLKG Oct3/4

、PCM Sox2、PM Sox2、CM Sox2、PCL Sox2、PL Sox2、CL Sox2、PCK Sox2、PK Sox2、CK Sox2、PCG Sox2、PG Sox2、CG Sox2、PCML Sox2、PML Sox2、CML Sox2、PCMK Sox2、PMK Sox2、CMK Sox2、PCMG Sox2、PMG Sox2、CMG Sox2、PCLK Sox2、PLK Sox2、CLK Sox2、PCLG Sox2、PLG Sox2、CLG Sox2、PCKG Sox2、PKG Sox2、CKG Sox2、PCMLK Sox2、PMLK Sox2、CMLK Sox2、PCMLG Sox2、PMLG Sox2、CMLG Sox2、PCMKG Sox2、PMKG Sox2、CMKG Sox2、PCLKG Sox2、PLKG Sox2、CLKG Sox2、PCMLKG Sox2、PMLKG Sox2、CMLKG Sox2、

PCM Lin-28 Oct3/4、PM Lin-28 Oct3/4、CM Lin-28 Oct3/4、PCL Lin-28 Oct3/4、PL Lin-28 Oct3/4、CL Lin-28 Oct3/4、PCK Lin-28 Oct3/4、PK Lin-28 Oct3/4、CK Lin-28 Oct3/4、PCG Lin-28 Oct3/4、PG Lin-28 Oct3/4、CG Lin-28 Oct3/4、PCML Lin-28 Oct3/4、PML Lin-28 Oct3/4、CML Lin-28 Oct3/4、PCMK Lin-28 Oct3/4、PMK Lin-28 Oct3/4、CMK

10

20

30

40

50

Lin-28 Oct3/4、PCMG Lin-28 Oct3/4、PMG Lin-28 Oct3/4、CMG Lin-28 Oct3/4、PCLK Lin-28 Oct3/4、PLK Lin-28 Oct3/4、CLK Lin-28 Oct3/4、PCLG Lin-28 Oct3/4、PLG Lin-28 Oct3/4、CLG Lin-28 Oct3/4、PCKG Lin-28 Oct3/4、PKG Lin-28 Oct3/4、CKG Lin-28 Oct3/4、PCMLK Lin-28 Oct3/4、PMLK Lin-28 Oct3/4、CMLK Lin-28 Oct3/4、PCMLG Lin-28 Oct3/4、PMLG Lin-28 Oct3/4、CMLG Lin-28 Oct3/4、PCMKG Lin-28 Oct3/4、PMKG Lin-28 Oct3/4、CMKG Lin-28 Oct3/4、PCLKG Lin-28 Oct3/4、PLKG Lin-28 Oct3/4、CLKG Lin-28 Oct3/4、PCMLKG Lin-28 Oct3/4、PMLKG Lin-28 Oct3/4、CMLKG Lin-28 Oct3/4、PCM Oct3/4 Sox2、PM Oct3/4 Sox2、CM Oct3/4 Sox2、PCL Oct3/4 Sox2、PL Oct3/4 Sox2、CL Oct3/4 Sox2、PCK Oct3/4 Sox2、PK Oct3/4 Sox2、CK Oct3/4 Sox2、PCG Oct3/4 Sox2、PG Oct3/4 Sox2、CG Oct3/4 Sox2、PCML Oct3/4 Sox2、PML Oct3/4 Sox2、CML Oct3/4 Sox2、PCMK Oct3/4 Sox2、PMK Oct3/4 Sox2、CMK Oct3/4 Sox2、PCMG Oct3/4 Sox2、PMG Oct3/4 Sox2、CMG Oct3/4 Sox2、PCLK Oct3/4 Sox2、PLK Oct3/4 Sox2、CLK Oct3/4 Sox2、PCLG Oct3/4 Sox2、PLG Oct3/4 Sox2、CLG Oct3/4 Sox2、PCKG Oct3/4 Sox2、PKG Oct3/4 Sox2、CKG Oct3/4 Sox2、PCMLK Oct3/4 Sox2、PMLK Oct3/4 Sox2、CMLK Oct3/4 Sox2、PCMLG Oct3/4 Sox2、PMLG Oct3/4 Sox2、CMLG Oct3/4 Sox2、PCMKG Oct3/4 Sox2、PMKG Oct3/4 Sox2、CMKG Oct3/4 Sox2、PCLKG Oct3/4 Sox2、PLKG Oct3/4 Sox2、CLKG Oct3/4 Sox2、PCMLKG Oct3/4 Sox2、PMLKG Oct3/4 Sox2、CMLKG Oct3/4 Sox2、PCM Lin-28 Sox2、PM Lin-28 Sox2、CM Lin-28 Sox2、PCL Lin-28 Sox2、PL Lin-28 Sox2、CL Lin-28 Sox2、PCK Lin-28 Sox2、PK Lin-28 Sox2、CK Lin-28 Sox2、PCG Lin-28 Sox2、PG Lin-28 Sox2、CG Lin-28 Sox2、PCML Lin-28 Sox2、PML Lin-28 Sox2、CML Lin-28 Sox2、PCMK Lin-28 Sox2、PMK Lin-28 Sox2、CMK Lin-28 Sox2、PCMG Lin-28 Sox2、PMG Lin-28 Sox2、CMG Lin-28 Sox2、PCLK Lin-28 Sox2、PLK Lin-28 Sox2、CLK Lin-28 Sox2、PCLG Lin-28 Sox2、PLG Lin-28 Sox2、CLG Lin-28 Sox2、PCKG Lin-28 Sox2、PKG Lin-28 Sox2、CKG Lin-28 Sox2、PCMLK Lin-28 Sox2、PMLK Lin-28 Sox2、CMLK Lin-28 Sox2、PCMLG Lin-28 Sox2、PMLG Lin-28 Sox2、CMLG Lin-28 Sox2、PCMKG Lin-28 Sox2、PMKG Lin-28 Sox2、CMKG Lin-28 Sox2、PCLKG Lin-28 Sox2、PLKG Lin-28 Sox2、CLKG Lin-28 Sox2、PCMLKG Lin-28 Sox2、PMLKG Lin-28 Sox2、CMLKG Lin-28 Sox2、PCM Lin-28 Oct3/4 Sox2、PM Lin-28 Oct3/4 Sox2、CM Lin-28 Oct3/4 Sox2、PCL Lin-28 Oct3/4 Sox2、PL Lin-28 Oct3/4 Sox2、CL Lin-28 Oct3/4 Sox2、PCK Lin-28 Oct3/4 Sox2、PK Lin-28 Oct3/4 Sox2、CK Lin-28 Oct3/4 Sox2、PCG Lin-28 Oct3/4 Sox2、PG Lin-28 Oct3/4 Sox2、CG Lin-28 Oct3/4 Sox2、PCML Lin-28 Oct3/4 Sox2、PML Lin-28 Oct3/4 Sox2、CML Lin-28 Oct3/4 Sox2、PCMK Lin-28 Oct3/4 Sox2、PMK Lin-28 Oct3/4 Sox2、CMK Lin-28 Oct3/4 Sox2、PCMG Lin-28 Oct3/4 Sox2、PMG Lin-28 Oct3/4 Sox2、CMG Lin-28 Oct3/4 Sox2、PCLK Lin-28 Oct3/4 Sox2、PLK Lin-28 Oct3/4 Sox2、CLK Lin-28 Oct3/4 Sox2、PCLG Lin-28 Oct3/4 Sox2、PLG Lin-28 Oct3/4 Sox2、CLG Lin-28 Oct3/4 Sox2、PCKG Lin-28 Oct3/4 Sox2、PKG Lin-28 Oct3/4 Sox2、CKG Lin-28 Oct3/4 Sox2、PCMLK Lin-28 Oct3/4 Sox2、PMLK Lin-28 Oct3/4 Sox2、CMLK Lin-28 Oct3/4 Sox2、PCMLG Lin-28 Oct3/4 Sox2、PMLG Lin-28 Oct3/4 Sox2、CMLG Lin-28 Oct3/4 Sox2、PCMKG Lin-28 Oct3/4 Sox2、PMKG Lin-28 Oct3/4 Sox2、CMKG Lin-28 Oct3/4 Sox2、PCLKG Lin-28 Oct3/4 Sox2、PLKG Lin-28 Oct3/4 Sox2、CLKG Lin-28 Oct3/4 Sox2、PCMLKG Lin-28 Oct3/4 Sox2、PMLKG Lin-28 Oct3/4 Sox2、CMLKG Lin-28 Oct3/4 Sox2、PC LIN-28、P LIN-28、C LIN-28、PC OCT3/4、P OCT3/4、C OCT3/4、PC SOX2、P SOX2、C SOX2、PC LIN-28 OCT3/4、P LIN-28 OCT3/4、C LIN-28 OCT3/4、PC LIN-28 SOX2、P LIN-28 SOX2、C LIN-28 SOX2、PC OCT3/4 SOX2、P OCT3/4 SOX2、C OCT3/4SOX2、PC LIN-28 OCT3/4 SOX2、P LIN-28 OCT3/4 SOX2、C LIN-28 OCT3/4 SOX2、

(ここで、Pは「PRDM16」を示し、Cは「C/EBP」を示し、Mは「c-Myc」を示し、Lは「L-Myc」を示し、Kは「KLF-4」を示し、Gは「Glis1」を示す)が挙げられる。このうち望ましいのは、PCM、CM、PCL、CL、PCG、CG、PCML、CML、PCMOct3/4、CMOct3/4、PCMG、CMG、PCLOct3/4、CLOct3/4、PCLG、CLG、PCMLOct3/4、CMLOct3/4、PCMLG、CMLG、PCMOct3/4G、CMOct3/4G、PCLOct3/4G、CLOct3/4G、PCMLOct3/4G、CMLOct3/4Gが挙げられる。この

うち特に望ましいのはPCM、CM、PCL、CL、PCML、CML、PCMOct3/4、CMOct3/4、PCMG、CMG、PCLOct3/4、CLOct3/4、PCLG、CLG、PCMLOct3/4、CMLOct3/4、PCMLG、CMLG、PCMOct3/4G、CMOct3/4G、PCLOct3/4G、CLOct3/4G、PCMLOct3/4G、CMLOct3/4Gである。このうちさらに望ましいのは、PCM、CM、PCML、CML、PCMG、CMG、PCLG、CLG、PCMLG、CMLGである。

【 0 0 2 4 】

c-Mycは他のMycファミリーの遺伝子 (N-Myc, L-Myc, S-Myc, B-Myc) と置き換えることも可能である。本明細書ではMycファミリーの代表として「c-Myc」と「L-Myc」を使用して説明しているが、Mycファミリーの他の遺伝子もc-Mycと同様に使用することができる。

【 0 0 2 5 】

KLF-4は他のKlfファミリー (KLF1, KLF2, KLF3, KLF5, KLF6, KLF7, KLF8, KLF9, KLF10, KLF11, KLF12, KLF13, KLF14, KLF15, KLF16, KLF17) の遺伝子に置き換えることも可能である。本明細書ではKlfファミリーの代表として「KLF-4」を使用して説明しているが、Klfファミリーの他の遺伝子もKLF-4と同様に使用することができる。

10

【 0 0 2 6 】

GLIS1(GLIS family zinc finger 1) は他のGLIS ファミリーのメンバーの遺伝子、例えばGLIS 2、GLIS 3に置き換えることも可能である。

【 0 0 2 7 】

同様に、Oct3/4は他のOctファミリーの遺伝子に置き換えることが可能であり、Sox2は他のSoxファミリーの遺伝子に置き換えることが可能である。

【 0 0 2 8 】

上記遺伝子は、いずれも、脊椎動物で高度に保存されている遺伝子であり、本明細書では、特に動物名を示さない限り、ホモログを含めた遺伝子を表すものとする。また、polymorphismを含め、変異を有する遺伝子であっても、野生型の遺伝子産物と同等の機能を有する遺伝子もまた、含まれるものとする。導入される遺伝子は体細胞と同じ哺乳動物由来の遺伝子が好ましく、例えばヒトの体細胞にはヒトの遺伝子を導入する。

20

【 0 0 2 9 】

本発明の方法は、特定の遺伝子を選択する以外は、公知のダイレクト・リプログラミングの手法に準じて行うことができ、例えば以下の文献 1 ~ 6 の方法に準じて行うことができる：

文献 1 Direct Reprogramming of Fibroblasts into Functional Cardiomyocytes by Defined Factors; Masaki Ieda, Ji-Dong Fu, Paul Delgado-Olguin, Vasanth Vedantham, Yohei Hayashi, Benoit G. Bruneau, and Deepak Srivastava *Cell* 142: 375-386, 2010.

30

文献 2 Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. Thomas Vierbuchen, Austin Ostermeier, Zhiping P. Pang, Yuko Kokubu, Thomas C. Südhof & Marius Wernig. *Nature* 463: 1035-1041, 2010

文献 3 Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. Pang ZP, Yang N, Vierbuchen T, Ostermeier A, Fuentes DR, Yang TQ, Citri A, Sebastiano V, Marro S, Südhof TC, Wernig M. *Nature* 476: 220-223, 2011.

文献 4 Generation of hyaline cartilaginous tissue from mouse adult dermal fibroblast culture by defined factors Kunihiro Hiramatsu, Satoru Sasagawa, Hidetatsu Outani, Kanako Nakagawa, Hideki Yoshikawa, and Noriyuki Tsumaki, *Journal of Clinical Investigation*, 121: 640-657, 2011.

40

文献 5 Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. Pengyu Huang, Zhiying He, Shuyi Ji, Huawang Sun, Dao Xiang, Changcheng Liu, Yiping Hu, XinWang & Lijian Hui, *Nature* 475:386-389, 2011.

文献 6 Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. Sayaka Sekiya & Atsushi Suzuki. *Nature* 475:390-393, 2011.

具体的には、褐色脂肪細胞に変換するための導入遺伝子を発現ベクターに組み込み、対象とする体細胞に発現ベクターを導入し、細胞内で発現させることが好ましい。

50

【0030】

遺伝子を導入する方法としては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、セングアイウイルスベクターなどのウイルス性ベクターを感染させる方法のほか、遺伝子とその発現産物の導入の場合には、カチオニック・リポソーム、カチオニック・ポリマー、電気穿孔法等の非ウイルスベクターで、プラスミドベクターやエピゾーマルベクター、遺伝子の発現産物（RNA、タンパク質）をトランスフェクションする方法も用いることができる。また、RNAを導入することもできる。これら遺伝子導入に用いる手段をすべて包括して、本明細書ではベクターと呼ぶ。

【0031】

また、治療目的の遺伝子とともに薬剤選択マーカーとなる遺伝子（ピューロマイシン耐性、ブラストサイジンS耐性、ネオマイシン耐性、ハイグロマイシン耐性など）を導入し、その後薬剤選択を行うことによって、褐色脂肪細胞への変換に必要な遺伝子を発現する細胞を選択してから用いることができる。

【0032】

また、導入因子が遺伝子の発現産物（例えばタンパク質）の場合には、Protein Transduction Domain（PTD）と呼ばれるペプチドを発現産物である蛋白質に結合させ、培地に添加することにより、体細胞内に導入してもよい。褐色脂肪細胞の原料となる体細胞で、褐色脂肪細胞への変換に必要な遺伝子の一部が発現している場合は、その蛋白質に関しては外部から導入する必要がない。

【0033】

褐色脂肪細胞を分化させるための分化誘導培地としては、特に限定されず、通常の細胞培養培地を使用することができる。

【0034】

褐色脂肪細胞を分化させるための分化誘導培地としては、特に限定されず、通常の細胞培養培地を使用することができる。たとえば、以下の既知の褐色脂肪誘導培地TypeIと褐色脂肪誘導培地TypeIIを使用することができるがこれに限定されない。褐色脂肪誘導培地TypeI（100U/mL Penicillinと100 µg/ml Streptomycinを含んだ1% NEAA 10% FBS DMEMに、850nM human Insulin、1nM triiodothyronine(T3)、0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthine（IBMX）、100 nM Dexametazone、125nM Indometacin、1 µg/ml Rosigritazone（いずれも最終濃度）を加えたもの）。褐色脂肪誘導培地TypeII（100U/mL Penicillinと100 µg/ml Streptomycinを含んだ1% NEAA 10% FBS DMEMに、850nM human Insulin、1nM triiodothyronine(T3)、1 µg/mL Rosigritazone（いずれも最終濃度）を加えたもの）。

【0035】

褐色脂肪細胞が得られたことは、UCP1、CIDEA、PGC1、DI02、Cox8b、Otopなどの遺伝子発現を測定することにより評価できる。また網羅的遺伝子発現プロファイルを解析しても評価できる。

【0036】

移植後に免疫応答が起きないようにする目的で、予防又は治療用の移植細胞は、患者自身から樹立した自家細胞であることが望ましい。

【0037】

本発明の遺伝子の導入は、プラスミドで行ってもよく、ウイルスベクター、たとえばレトロウイルスベクターを用いてもよい。導入効率と導入遺伝子の安定保持の観点からはウイルスベクターが好ましく、癌化のリスクを抑えるためにはプラスミドが好ましい。

【0038】

体細胞に導入される遺伝子はLTRプロモーターにより転写させることもできるし、ベクター内部の別のプロモーターから発現させてもよい。例えばCMVプロモーター、EF-1 プロモーター、CAGプロモーターなどの構成的発現プロモーター、または所望の誘導性プロモーターを利用することができる。また、LTRの一部を他のプロモーターに置換したキメラプロモーターを利用してもよい。

10

20

30

40

50

【0039】

本発明により得られる褐色脂肪細胞（移植材料）を用いて治療する対象となる疾患としては、肥満、内臓脂肪型肥満、肥満症、糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病、糖尿病性網膜症、糖尿病性神経障害、糖尿病性腎症、遅延創傷治癒、耐糖能異常、インスリン抵抗性、高血糖症、高インスリン血症、白内障、緑内障、網膜症、神経障害、腎症、歯周病、皮膚疾患、壊疽、潰瘍、脂質代謝異常、高脂肪酸血症、高トリグリセリド血症、高グリセロール血症、高コレステロール血症、高脂血症、低HDL血症、X症候群、細小血管障害、動脈硬化性疾患、閉塞性動脈硬化症、脳血管障害、冠動脈疾患、アテローム硬化症、動脈硬化症、動脈瘤、過血糖（特に食後の過血糖）、高血圧、高尿酸血症、痛風、慢性全身性炎症、非アルコール性脂肪性肝疾患、脂肪肝、肝硬変、肝性糖尿病、胆のう炎、胆石、尿失禁、尿閉、インポテンツ、膀胱炎、内皮機能不全、自律神経障害、湿疹、口腔炎、歯槽膿漏、骨粗しょう症、メタボリックシンドロームなどが挙げられる。

10

【0040】

本明細書において、特に明示のない限り、「治療」という用語は、患者が特定の疾患又は障害を患っている間に行う処置を意図し、これによって疾患若しくは障害の重症度、又は1つ若しくは複数のその症状が軽減されるか、又は疾患若しくは障害の進行が遅延又は減速することを意味する。本明細書において、「治療」には「予防」を含むものとする。

【0041】

本発明で得られる褐色脂肪細胞は、疾患の治療に限らず、美容目的で用いることもできる。たとえば脂肪組織を減らしやせる目的で褐色脂肪細胞を移植することができる。その際、ヒトに対する処置も、本明細書では便宜上治療と呼び、「患者」は「健常者」あるいは「ヒト」、「疾患」は「美容」と読み替えることができる。

20

【0042】

本発明はまた、ヒトだけでなく、イヌ、ネコ等の愛玩動物やウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ニワトリ等の家畜を含む哺乳動物の疾患の治療にも用いることが可能である。その場合、「患者」を「患畜」あるいは「哺乳動物」と読み替えることとする。

【0043】

移植材料とは、肥満、糖尿病、耐糖能異常、脂質代謝異常、メタボリック症候群の治療又は美容的処置のために生体内に導入する、褐色脂肪細胞を含有する材料をいう。移植材料は、インビトロで組織構築を形成させて、同一または別の個体に移植する材料を包含する。本発明で得られた褐色脂肪細胞は、移植材料の作製に使用することができる。褐色脂肪細胞自体も移植材料になる。したがって、褐色脂肪細胞を細胞製剤として患者又は被験体に移植することもできるし、人工材料からなる基材（スキャホルド）とともに移植することができる。

30

【0044】

体細胞は、哺乳動物由来であればよい。褐色脂肪細胞を生体に移植する場合には、移植される被験体由来の体細胞（自家細胞）を用いることが、感染や拒絶応答等の危険を低減させるために好ましい。しかしながら、自家細胞でなく、他人や他の動物の体細胞からあらかじめ準備しておいた褐色脂肪細胞を移植に用いることができる。またはあらかじめ準備しておいた他人や他の動物の体細胞から褐色脂肪細胞を作り、移植に用いることができる。すなわち、褐色脂肪細胞バンク、または褐色脂肪細胞前駆細胞のバンクを作っておき移植目的に供することができる。このような場合、拒絶応答等の危険を低減させるために、あらかじめMHCをタイピングしておくことができる。また、あらかじめ褐色脂肪細胞のキャラクターや造腫瘍性などを確認しておくことができる。

40

【0045】

本明細書において、哺乳動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ヒト、イヌ、ネコ、サル、ウサギ、ウシ、ウマ、ブタなどが挙げられ、特にヒトが挙げられる。

【0046】

本発明はまた、褐色脂肪細胞を用いたさまざまな研究や技術開発等に用いることができる。たとえば褐色脂肪細胞の発生と老化、代謝調節機構、これらに対する栄養、免疫、神

50

経、ホルモン、食品の影響の解析などの基礎研究に有用である。

【0047】

本発明を用いれば、さまざまな疾患や遺伝的背景を有するヒトや動物から簡便、迅速、安価に褐色脂肪細胞を樹立できるので、疾患や遺伝的背景に関連した褐色脂肪細胞の異常を生化学的、分子生物学的、免疫学的等手法により解析することが可能であり、これにより肥満、糖尿病、耐糖能異常、脂質代謝異常、メタボリック症候群等の種々の疾患の発症機序の解明などの研究や診断法の開発に役立てることができる。たとえばこのような疾患において、遺伝的な差異に起因する発症率の違い、疾患の増悪の程度の違い、治療への応答性の違い、治療効果の違いなどを判定あるいは予測することで、テーラーメイド医療に応用できる。またこのような褐色脂肪細胞を用いて、薬剤の開発、薬剤の毒性試験等を行えば、肥満、糖尿病、耐糖能異常、脂質代謝異常、メタボリック症候群等の種々の疾患に対する新規治療法の開発に役立てることができる。

10

【0048】

本発明の遺伝子の組み合わせに、さらに他の遺伝子を加えることも可能である。

【0049】

本発明では、ダイレクト・リプログラミングあるいはこれに準じた方法により体細胞から短期間で褐色脂肪細胞を提供できる。この褐色脂肪細胞は、移植する本人の体細胞から容易に誘導できるので、移植した場合にも免疫学的な拒絶応答などの問題は生じない。また、iPS細胞やES細胞を経由することなく直接体細胞から褐色脂肪細胞を誘導できるため、癌化などの多能性幹細胞に起因する問題を回避できる。

20

【実施例】

【0050】

以下に実施例を示すが、本発明はこの実施例だけに限定されるものではない。

【0051】

実施例1 実験の概略(図1)

レトロウイルスベクタープラスミドpMXs.puroに、C/EBP等の種々の遺伝子のcDNAコーディング配列をGene artシステム組み込んだ。パッケージング細胞 Plat GP細胞を、100U/mL Penicillinと100 µg/ml Streptomycinを含んだ1% NEAA 10% FBS DMEM(通常培地)に懸濁し、ゼラチンコートした10cm培養ディッシュにディッシュあたり 5×10^6 個の濃度で播種した(第3日)。24時間培養後、種々の遺伝子を含むpMXsベクターを、種々の組み合わせで、pCMV VSVベクターと共に、X-tremeGENE 9を用いて以下の比で導入した。すなわち導入遺伝子5 µg、pCMV.VSV 2.5 µg、Opti-MEM 500 µl、X-tremeGENE 9 22.5 µlの混和液を10mlの培地入りの10cmディッシュに添加した(第2日)。24時間後、抗生剤を含まない通常培地に交換(第-1日)。同日(第1日)に、ヒト正常皮膚線維芽細胞株であるaHDF、またはヒト脂肪由来幹細胞であるADSCを、 $1.5 \times 10^4 \sim 2 \times 10^4$ cells/mLで培養ディッシュまたは12 wellプレートに播種した。24時間後(第0日)、Plat GP培養上清を、ポアの直径が0.45 µmのシリジフィルターを通した後、ポリブレン(最終濃度4 µg/mL)と混和した(ウイルス液)。aHDFの培養上清を吸引除去した後、すばやく上記のウイルス液を1mL加え24時間培養した(感染)。コントロール群として、ウイルス感染を行わない細胞も準備した。1日後(第1日)、培養上清を吸引除去し、褐色脂肪誘導培地TypeI(通常培地に850nM human Insulin、1nM triiodothyronine(T3)、0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx)、100 nM Dexametazone、125nM Indometacin、1 µg/ml Rosigritazone(いずれも最終濃度)を加えたもの)を加え2日間培養した。第3日に培地を吸引除去し、褐色脂肪誘導培地TypeII(通常培地に850nM human Insulin、1nM triiodothyronine(T3)、1 µg/mL Rosigritazone(いずれも最終濃度)を加えたもの)を加え、その後2日おきに同じ組成の新しい培養液に交換した。第12-22日に、OilRedO染色、Real-time RT-PCRを行った。レトロウイルスベクターを感染させずに、同じ培養を行った細胞をControlとした。

30

40

【0052】

実施例2 ヒト正常皮膚線維芽細胞から褐色脂肪細胞へのコンバージョン、OilRedO染色像(図2)

50

ヒト正常皮膚線維芽細胞であるaHDFを、12 wellプレートに培養し、図1のように実験した。第14日に各ウェルから培養液を吸引除去し、PBSで1回洗浄を行った後、60%イソプロパノールで固定。OilRedO染色液を加え、37℃で15分間静置した（OilRedO染色液は以下のように作成した。OilRedO粉末0.24gを99.7%イソプロパノール30mLに溶解したのち、20mLの蒸留水を添加。30分間室温放置したのち濾紙を用いて濾過し、OilRedO染色液とした）。60%イソプロパノールで1回洗浄したのち、純水で3回洗浄した。プレートの画像を図2A-Fに示す。プレートの各ウェルには異なる遺伝子の組み合わせが導入されており、どのナンバーのウェルにどの遺伝子の組み合わせが導入されたかは、図3に記載する（図3の下の表中で、No.は図2のNo.と共通でプレートのウェルの番号を指す。また各遺伝子の欄に「1」と記載があるものは、その遺伝子を含むレトロウイルスベクターを感染させたことを、空欄は、その遺伝子を含むレトロウイルスベクターを感染させていないことを表す）。赤く染まっているのは脂質であり、いくつかのウェルでは、小さな多房性の脂肪滴を含む褐色脂肪細胞が認められる。たとえば、図2のNo.36ウェルは、図3のNo.36に示されるとおり、C/EBP β 、L-Myc、c-Mycの遺伝子を含むレトロウイルスベクターを感染させた細胞であり、多くの褐色脂肪細胞が含まれているのが分かる。

10

【0053】

実施例3 ヒト正常皮膚線維芽細胞から褐色脂肪細胞へのコンバージョン、OilRedO染色の半定量と定量（図3）

図2と同じ実験において、OilRedOの染色性を半定量するために、2名の評価者がそれぞれ独立に、プレートを実体顕微鏡観察し、OilRedOの染色性を4段階で評価した（OilRedOの染色性が強いものから順に、+++、++、+、-）。その結果を図3の下の表中に示す。図3の下の表中で、各遺伝子の欄に「1」と記載があるものは、その遺伝子を含むレトロウイルスベクターを感染させたことを、空欄は、その遺伝子を含むレトロウイルスベクターを感染させていないことを表す。

20

【0054】

図2と同じ実験において、脂肪の含量を定量化する目的で、画像撮影の後、各ウェルから蒸留水を取り除き、100%イソプロパノール300 μ lを加えて抽出液を調整した。抽出液を250 μ lずつ、96 well plateに移した後、波長550nmの吸光度(OD550)をマイクロプレートリーダーを用いて測定した。結果を図3に示す。グラフの縦軸はOD550であり、各ウェルの脂肪の含量を示す。たとえばNo.4のPRDM16、C/EBP β 、L-Myc、c-Myc、Glis1の遺伝子を含むレトロウイルスベクターを感染させた細胞は、もっとも多くの褐色脂肪細胞を含むことが分かる。

30

【0055】

実施例4 ヒト正常皮膚線維芽細胞から褐色脂肪細胞へのコンバージョン、UCP1遺伝子のmRNA発現計測（図4）

ヒト正常皮膚線維芽細胞であるaHDFを、12wellプレートに培養し、図1のように実験した。遺伝子導入12日後、一部のウェルからISOGEN IIにてtotal RNAを回収し、Rever Tra Ace qPCR RT Master Mixを用いてcDNAを合成した。UCP1とアクチン遺伝子のmRNAレベルを定量する目的で、Real-time PCR Master Mix、Taqman probe、Specific PrimerおよびcDNAを混和し、AB7300 Real-time PCR systemを用いてReal-time RT-PCRを行った。各細胞のアクチンmRNAレベルに対するUCP1 mRNAレベルの値を計算した。結果を図4に示す。図4の下の表中で、各遺伝子の欄に「1」と記載があるものは、その遺伝子を含むレトロウイルスベクターを感染させたことを、空欄は、その遺伝子を含むレトロウイルスベクターを感染させていないことを表す。グラフの縦軸は、No.64（遺伝子を導入していない細胞）の値を1として計算した相対値であり、バーに書かれた数値も同じである。ND（Not determined）と書かれたものはこの実験では測定していない。PRDM16、C/EBP β 、L-Myc、c-Mycの4つの遺伝子を導入した細胞（No.19）は、controlと比較し、遺伝子レベルにおいて褐色脂肪細胞特異的マーカーであるUncoupling protein-1（UCP-1）のもっとも強力な発現を認めた。また、C/EBP β 、L-Myc、c-Mycの3つの遺伝子を導入した細胞（No.36）や、C/EBP β 、c-Myc、Glis1の3つの遺伝子を導入した細胞（No.38）でも極めて高いUCP1の発

40

50

現を認め、これらの遺伝子があればPRDM16がなくてもヒト線維芽細胞から褐色脂肪細胞へのダイレクト・リプログラミングが効率よく可能であることが分る。

【0056】

実施例5 ヒト正常皮膚線維芽細胞から褐色脂肪細胞へのコンバージョン、UCP1遺伝子のmRNA発現(図5)

ヒト正常皮膚線維芽細胞であるaHDFを、12wellプレートに培養し、図1のように実験した(図4とは遺伝子を組み合わせを変えて独立に行った実験である)。遺伝子導入12日後、一部のウェルからISOGEN IIにてtotal RNAを回収し、Rever Tra Ace qPCR RT Master Mixを用いてcDNAを合成した。UCP1とアクチン遺伝子のmRNAレベルを定量する目的で、Real-time PCR Master Mix、Taqman probe、Specific PrimerおよびcDNAを混和し、AB7300 Real-time PCR systemを用いてReal-time RT-PCRを行った。各細胞のアクチンmRNAレベルに対するUCP1 mRNAレベルの値を計算した。結果を図5に示す。図5の下の表中で、各遺伝子の欄に「+」と記載があるものは、その遺伝子を含むレトロウイルスベクターを感染させたことを、空欄は、その遺伝子を含むレトロウイルスベクターを感染させていないことを表す。グラフの縦軸は、遺伝子を導入していない細胞(一番右のバーに示す)の値を1として計算した相対値である。PRDM16、C/EBP β 、c-Mycの3つの遺伝子を導入した細胞(右から7番目のバー)は、mRNAレベルにおいて褐色脂肪細胞特異的マーカーであるUncoupling protein-1(UCP-1)のもっとも強力な発現を認めた。その発現レベルは、PRDM16とC/EBP β の2つの遺伝子を導入した細胞(左から8番目のバー)で認められるUCP1のmRNAレベルと比較して、100倍以上高いことが分る。

10

20

【0057】

実施例6 ヒト正常皮膚線維芽細胞から褐色脂肪細胞へのコンバージョン、ミトコンドリア染色像(図6)

ヒト正常皮膚線維芽細胞 aHDFを、12wellプレートに培養し、図1のように実験した。遺伝子導入から12日後、位相差顕微鏡で観察した(図6左列)。また一部のウェルではミトコンドリアを可視化する目的で、培養液に終濃度200nMになるようにInvitrogen社製のMito Tracker Red probeを添加し、5%CO₂/95%大気、37℃で15分間静置した後オリンパス社製の蛍光顕微鏡で観察した(図6中央列)。別の一部のウェルでは、図2と同様の方法でOilRedOで染色した(図6右列)。PRDM16、C/EBP β 、c-Mycの3つの遺伝子を導入した群では、多数のミトコンドリアを細胞内に集積した細胞が多数観察された。またこの群ではOilRedO染色により小さな多房性脂肪滴を含む褐色脂肪細胞が確認された。これに比べて、PRDM16、C/EBP β の2つの遺伝子を導入した群では、ミトコンドリア、脂肪滴ともにはるかに少なかった。

30

【0058】

実施例7 ヒト脂肪由来幹細胞から褐色脂肪細胞へのコンバージョン、OilRedO染色像(図7)

ヒト脂肪由来幹細胞(ADSC)を12wellプレートに培養し、図1のように実験した。遺伝子導入から22日後、図2と同様の方法でOilRedO染色を行った。結果を図7に示す。赤く染まっているのは脂質であり、脂肪細胞が誘導されたことを示す。PRDM16、C/EBP β 、cMycの遺伝子を含むレトロウイルスベクターを感染させた細胞では、小さな多房性の脂肪滴を含む褐色脂肪細胞が、数多く認められる(図7左上)。一方GFP(Green fluorescent protein)遺伝子を導入した細胞では、大きな単房性の脂肪滴を含む白色脂肪細胞が認められた(図7右下)。

40

【0059】

実施例8 ヒト脂肪由来幹細胞から褐色脂肪細胞へのコンバージョン、UCP1遺伝子のmRNA発現計測(図8)

ヒト脂肪由来幹細胞(ADSC)を12wellプレートに培養し、図1のように実験した。遺伝子導入22日後、UCP1、CIDEA、AdipoQのmRNA発現を定量する目的で、細胞からtotal RNAを回収し、図4と同様にReal-time RT-PCRを行った。その結果を図8に示す。PRDM16、C/EBP β 、c-Mycの3つの遺伝子を導入した群では、PRDM16、C/EBP β 、L-Mycの3つの遺伝子を

50

導入した群や、PRDM16、C/EBP β 、Glis1の3つの遺伝子を導入した群、GFP遺伝子を導入したControl群と比較して、褐色脂肪細胞特異的因子であるUCP1とCIDEAを有意に高発現していた。一方、褐色脂肪細胞と白色脂肪細胞の共通のマーカである、Adiponectin(AdipoQ)は、PRDM16、C/EBP β 、c-Mycを導入した群およびControl群で有意に高発現していた。

【0060】

これらの結果より、ヒト脂肪由来幹細胞(ADSC)は遺伝子導入を行わないと多くが白色脂肪細胞になるが、PRDM16、C/EBP β 、c-Mycの3つの遺伝子を導入することにより、褐色脂肪細胞に誘導できることが示された。したがって、ヒト正常皮膚線維芽細胞以外の細胞からでもダイレクトに褐色脂肪細胞にコンバートできることが示された。

【0061】

試験例1

図9-12に、マウスiPSから褐色脂肪細胞を誘導し(iPS-derived BA細胞)、C57BL/6マウスに移植した実験を示す。熱産生、体重増加抑制を認め、また高カロリー食を与えると体重増加抑制と血清脂質異常改善を認めたことから、高カロリー食に伴う肥満と脂質代謝異常をiPS-derived BA細胞が是正できる可能性があることが分る。

【0062】

(1) 図9

マウスiPS-derived BA細胞、またはコントロールとして非誘導細胞を、同系マウスの腹部皮下に図左上のように移植した。iPS-derived BA細胞のグラフトは、OilRed染色陽性の脂肪組織の組織像を呈した(右上)。iPS-derived BA細胞を移植したマウスは、体重増加が有意に抑制され(左下)、体温が有意に上昇していた(右下)。

【0063】

(2) 図10

マウスiPS-derived BA細胞、またはコントロールとして非誘導細胞を、同系マウスの腹部皮下に移植した。各群、2匹のサーモグラフィーのイメージング像を示す。iPS-derived BA細胞のグラフト局所で温度が上昇していた(下)。褐色脂肪細胞への誘導を行わなかった細胞のグラフトは周囲組織と同じ温度であった(上)。

【0064】

(3) 図11

移植後、高カロリー食餌を与えたところiPS-derived BA細胞を移植したマウスのみ体重減少が有意に抑制された。

【0065】

(4) 図12

移植後、高カロリー食餌(QF)を与え、4週間後に血清の脂質を調べたところ、iPS-derived BA(iBA)細胞を移植したマウスのみ高脂血症が進行していなかった。NFは通常食餌を与えたマウスである。

【0066】

試験例2

図13-16では、2型糖尿病マウスの体細胞からiPS細胞を作り、そのiPS細胞から褐色脂肪細胞を誘導し(iPS-derived BA細胞)、糖尿病マウスに移植した実験を示す。移植によって随時血糖値低下、体重増加抑制、血清脂質異常改善が認められ、褐色脂肪細胞の移植が糖尿病を制御できることが分る。

【0067】

(1) 図13

2型糖尿病を発症するKK-Ayマウスの体細胞からiPS細胞を作った。得られたiPS細胞は典型的なES細胞様の形態を示し(中央、位相差顕微鏡像)、幹細胞マーカーを発現していた(下: real time RT-PCR、右: 免疫蛍光染色)。KK-Ay iPS1-4は、KK-Ayの体細胞由来の4つの異なるiPS細胞クローンであり、201B7は正常マウス由来のiPS細胞クローンである。

【0068】

(2) 図14

10

20

30

40

50

図13のiPS細胞から褐色脂肪細胞を誘導した(iPS-derived BA細胞)(上)。この細胞をKK-Ayマウスに移植したところ、随時血糖値の上昇が緩やかで(左下)、また尿糖はほとんど検出されなかった(右下)。コントロールとして、移植していないKK-Ayマウス(Non-transplant)と、褐色脂肪細胞への誘導を行わずGFP(green fluorescent protein)遺伝子を導入した細胞を移植したマウス(GFPコントロール)では、糖尿病が進行していた。

【0069】

(3) 図15

iPS由来のBA細胞を移植したKK-Ayマウスは、体重増加が有意に抑制され(上)、血清中のNEFA(左下)と中性脂肪(右下)も低かった。

10

【0070】

(4) 図16

iPS由来のBA細胞を移植したKK-Ayマウスは、血清中のアディポネクチンが有意に高値であった。摂食量はコントロールマウスと同じであった。

【0071】

実施例9

ヒト正常皮膚線維芽細胞およびiPS細胞から誘導した褐色脂肪細胞の性状(図17)

A、ヒト正常皮膚線維芽細胞 aHDFを、12wellプレートに培養し、図1に示す方法で、C/EBPとc-Mycの2つの遺伝子を導入した群の結果を示す。遺伝子導入から12日後、位相差顕微鏡で観察した(左)。また一部のウェルではミトコンドリアを可視化する目的で、培養液に終濃度200nMになるようにInvitrogen社製のMito Tracker Red probeを添加し、5%CO₂/95%大気、37℃で15分間静置した後オリンパス社製の蛍光顕微鏡で観察した(中央)。別の一部のウェルでは、図2と同様の方法でOilRedOで染色した(右)。多数のミトコンドリアが細胞内に集積し、また多房性脂肪滴を含む褐色脂肪細胞が、多数認められる。

20

【0072】

B、ヒト正常皮膚線維芽細胞 aHDFを、12wellプレートに培養し、図1のように実験した。C/EBP、c-Mycの2つの遺伝子を導入した群の結果を示す。遺伝子導入から12日後、免疫染色を行った。上段から順に抗UCP1抗体(1次抗体)とPE Cy5標識抗ウサギIgG抗体(2次抗体)、抗CIDEA抗体(1次抗体)とAlexaFluor488標識抗ウサギIgG抗体(2次抗体)、抗PGC-1抗体(1次抗体)とPE Cy5標識抗ウサギIgG抗体(2次抗体)、および抗Dio2抗体(1次抗体)とAlexaFluor488標識抗ウサギIgG抗体(2次抗体)で染色した細胞である。左は蛍光像、右は微分干渉像。褐色脂肪細胞に特異的な4つのたんぱく質のすべてが多量に発現しているのが分かる。

30

【0073】

C、ヒト正常皮膚線維芽細胞 aHDF、aHDFからAの方法で誘導した褐色脂肪細胞(dBA)、ヒトiPS細胞から誘導した褐色脂肪細胞(iBA)からRNAを回収し、UCP1、CIDEA、AdipoQに特異的なプライマー・プローブを用いたreal time RT-PCR解析を行った。各mRNAの発現量を、アクチンのmRNA発現量で補正した後、aHDFでのmRNA発現量を1として算出した相対的なmRNA発現量を示す。dBAとiBAは、aHDFと比べて極めて高いレベルで、褐色脂肪細胞に特異的な遺伝子のmRNAを発現している。

40

【0074】

実施例10

ヒト正常皮膚線維芽細胞から誘導した褐色脂肪細胞の性状(図18)

A、ヒト正常皮膚線維芽細胞 aHDF、aHDFから図17Aの方法で誘導した褐色脂肪細胞(dBA)、dBAに100 nMのレプチンを添加後24時間培養した細胞(Lep)、およびdBAに1 μMのイソプロテレノールを添加後2時間培養した細胞(Iso)からRNAを回収し、UCP1、レプチンレセプターに特異的なプライマー・プローブを用いたreal time RT-PCR解析を行った。各mRNAの発現量を、アクチンのmRNA発現量で補正した後、aHDFでのmRNA発現量を1として算出した相対的なmRNA発現量を示す。dBAは、aHDFと比べて極めて高いレベルでUCP1とレプチンレセプターのmRNAを発現し、これらの発現はレプチンあるいはイソプロテレノール

50

ルの刺激でさらに増強することが分かる。

【 0 0 7 5 】

B、ヒト正常皮膚線維芽細胞 aHDF、aHDFから図 1 7 Aの方法で誘導した褐色脂肪細胞 (dBA)、および dBAに 1 μ Mのイソプロテレノールを添加後2時間培養した細胞 (Iso)を準備した。24時間培養前後の培地中のグルコースの濃度をグルコースBテスト (和光)で測定した。コントロールとして、細胞を培養しない培地を24時間インキュベートし、それぞれのグルコース濃度の減少率を算出した。dBAは線維芽細胞に比し、より多くのグルコースを消費すること、その消費量はイソプロテレノールの刺激でさらに増加することが分かる。

【 0 0 7 6 】

C、ヒト正常皮膚線維芽細胞 aHDF、およびaHDFから図 1 7 Aの方法で誘導した褐色脂肪細胞 (dBA)からDNAを採取した。PPAR g 遺伝子上流域 (転写開始点の-431 ~ -151 bp)、およびUCP1遺伝子上流域 (転写開始点の-693 ~ -348 bp)のCpGジヌクレオチドのメチル化を、パイサルファイド法で解析した。メチル化を黒で、脱メチル化を白で示す。線維芽細胞ではどちらの領域も高度にCpGメチル化されているのに対して、dBAでは低メチル化になっていることが分かる。

【 0 0 7 7 】

実施例 1 1

ヒト正常皮膚線維芽細胞から誘導した褐色脂肪細胞の性状 (図 1 9)

A、ヒト正常皮膚線維芽細胞 aHDFから、図 1 7 Aの方法で褐色脂肪細胞 (dBA)を誘導する実験を行い、遺伝子導入後 0、3、6、9、12 日後の細胞からRNAを採取した。MitoHDに特異的なプライマー・プローブを用いたreal time RT-PCR解析を行った。mRNAの発現量を、アクチンのmRNA発現量で補正した後、aHDFでのmRNA発現量を 1として算出した相対的なmRNA発現量を示す。線維芽細胞からdBAへの誘導にともなって、ミトコンドリアDNAのMT-ND1遺伝子の発現が増強することが分かる。

【 0 0 7 8 】

B、ヒト正常皮膚線維芽細胞 aHDF、およびaHDFから図 1 7 Aの方法で誘導した褐色脂肪細胞 (dBA)を準備した。6 ウェルプレートに播種後、図のようにインスリン、Phloretin、アンチマイシン、および/またはイソプロテレノールを添加し、2-デオキシグルコースの取り込みを測定した。dBAは線維芽細胞に比して高いグルコース取り込みを示すこと、その取り込みはインスリン刺激により増加すること、インスリン刺激によるグルコース取り込みの増加はPhloretin (グルコーストランスポーター阻害剤)によってキャンセルされることがわかる。また、dBAによるグルコース取り込みはイソプロテレノール刺激により増加すること、イソプロテレノール刺激によるグルコース取り込みの増加はアンチマイシン (ミトコンドリア電子伝達鎖阻害剤)によってキャンセルされることがわかる。

【 0 0 7 9 】

C、ヒト正常皮膚線維芽細胞 aHDF、およびaHDFから図 1 7 Aの方法で誘導した褐色脂肪細胞 (dBA)を準備した。FCCP、アンチマイシン、またはオリゴマイシンを添加し、経時的に細胞外酸素濃度を測定した。縦軸は発光強度であり、数字が高いと酸素濃度が低いことを示す。線維芽細胞と比べてdBAでは酸素消費量が高く、その酸素消費はアンチマイシンまたはオリゴマイシンの添加により抑制されることがわかる。

【 0 0 8 0 】

実施例 1 2

ヒトiPS細胞から図 1 7 Aの方法で褐色脂肪細胞を誘導する。得られた細胞は多房性脂肪滴を含み、UCP1を有意に発現する。また、ヒト白色脂肪細胞から図 1 7 Aの方法で褐色脂肪細胞を誘導する。得られた細胞は多房性脂肪滴を含み、UCP1を有意に発現する。

【 0 0 8 1 】

実施例 1 3

エピゾーマル・ベクターによるヒト正常皮膚線維芽細胞から褐色脂肪細胞へのダイレクト・リプログラミング (図20)

10

20

30

40

50

A、エピゾーマル・ベクターとプラスミド・ベクターの構造を示す。図左：エピゾーマル・ベクター。この中のcDNAとして、何も含まないものをpG.oriP9.E、PRDM16を含むものをpG.oriP9.E.P、CEBPbetaを含むものをpG.oriP9.E.C、c-Mycを含むものをpG.oriP9.E.Mと呼ぶ。図右：プラスミド・ベクター。この中のcDNAとして、何も含まないものをpG.4、PRDM16を含むものをpG.P、CEBPbetaを含むものをpG.C、c-Mycを含むものをpG.Mと呼ぶ。CAG prom：CAGプロモーター、polyA：Poly A additional signal,oriP：Epstein-Barr virus (EBV) origin of replication P,EBNA1：EBV nuclear antigen 1。

【 0 0 8 2 】

B、Aのプラスミドを、ヒト皮膚由来線維芽細胞に電気穿孔法で導入後、12日間培養し、RNAを回収した。UCP1遺伝子特異的プライマー・プローブを用いてreal time RT-PCRを行った。UCP1遺伝子mRNAの発現量を、アクチンのmRNA発現量で補正した後、線維芽細胞でのmRNA発現量を1として算出した相対的なmRNA発現量を示す。pG.oriP9.E.CおよびpG.oriP9.E.Mを共導入したもので最も高くUCP1 mRNAが発現し、褐色脂肪細胞に誘導されたことがわかる。

10

【 0 0 8 3 】

C、ヒト線維芽細胞に記載のプラスミドを導入後、12日間培養した。OilRedO染色像を示す。CEBPbetaとc-Mycをそれぞれ含む2つのエピゾーマルベクター（pG.oriP9.E.CとpG.oriP9.E.M）の共導入により、効率よく褐色脂肪細胞に誘導できたことがわかる。CEBPbetaとc-Mycをそれぞれ含む2つのプラスミドベクター（pG.CとpG.M）の共導入でも、褐色脂肪細胞を誘導できるが、その効率はエピゾーマルベクターよりも劣る。

20

【 0 0 8 4 】

実施例 1 4

マウス胎仔線維芽細胞（MEF）から誘導した褐色脂肪細胞（図 2 1）

実施例 1 と同様に、マウスのPRDM16（P）、C/EBP（C）、L-Myc（L）、およびc-Myc（M）遺伝子を有するレトロウイルスベクターを、種々の組み合わせでマウス胎仔線維芽細胞（MEF）に感染させ、その後褐色脂肪誘導培地で培養した。感染後第 20 日目に、RNAを回収した。レトロウイルスベクターを感染させずに、同じ培養を行った細胞をControlとした。UCP1遺伝子特異的プライマー・プローブを用いてreal time RT-PCRを行った。UCP1遺伝子mRNAの発現量を、アクチンのmRNA発現量で補正した後、線維芽細胞でのmRNA発現量を1として算出した相対的なmRNA発現量を示す。PRDM16（P）、C/EBP（C）、L-Myc（L）の3因子を導入したもので最も高くUCP1 mRNAが発現し、褐色脂肪細胞に誘導されたことがわかる。

30

【 0 0 8 5 】

実施例 1 5

マウス胎仔線維芽細胞（MEF）から誘導した褐色脂肪細胞の生体内機能（図 2 2）

実施例 1 3 の方法で、C57BL/6マウスのMEFにPRDM16（P）、C/EBP（C）およびL-Myc（L）遺伝子を導入して、褐色脂肪細胞（dBA）を誘導した。この細胞、またはGFP遺伝子を導入したMEF（GFP-MEF）を、8週齢の同系マウスの皮下に移植した。これらのマウス、および移植しないマウスに、高脂肪食餌（QF）を与えた。コントロールとして、通常食餌（NF）を与えた非移植マウスも準備した。

40

【 0 0 8 6 】

A、移植後のマウスの体重を示す。非移植およびGFP-MEF移植マウスでは、QF摂取にともないNF摂取マウスに比して体重が著しく増加したが、dBAを移植した群ではこの食餌性の肥満が顕著に抑制できた。

【 0 0 8 7 】

B、移植後 4 週に血清を採取し、非エステル化脂肪酸（NEFA）と中性脂肪（TG）を測定した。非移植およびGFP-MEF移植マウスでは、QF摂取にともないNF摂取マウスに比して血清NEFAとTGが著しく増加したが、dBAを移植した群ではこの食餌性の脂質異常症が顕著に抑制できた。

【 0 0 8 8 】

50

C、移植後7日目に、GFP-MEFまたはdBA移植マウスを麻酔し、低温に2時間暴露した。その後サーモグラフィーで体表温度を測定した。GFP-MEF移植マウスでは移植部の温度は周辺体表温度と変わらなかったが、dBA移植マウスでは移植部の温度上昇が認められた。

【0089】

実施例16

マウス胎仔線維芽細胞(MEF)から誘導した褐色脂肪細胞の生体内機能(図23)糖尿病モデルであるAAkyマウスのMEFから、PRDM16(P)、C/EBP(C)およびL-Myc(L)遺伝子を用いた実施例13の方法で、褐色脂肪細胞(dBA)を誘導した。この細胞、またはGFP遺伝子を導入したMEF(GFP-MEF)を、6週齢の同系マウスの皮下に移植(10 cm Dish confluentx2/マウス)した。これらのマウス、および移植しないマウスを、通常食餌で飼育した。

10

【0090】

A C、マウスの体重(A)、随時血中グルコース(B)、空腹時血中グルコース(C)を示す。dBAを移植したAAkyマウスでは体重増加と血中グルコース上昇が有意に抑制されたことが分かる。

【0091】

D、移植後4週目に、経口グルコース負荷試験を行った。50mg/mouseのグルコースをカテテルでマウスの胃内に投与し、経時的に血中グルコースを測定した。dBAを移植したマウスでは耐糖能が改善していることが分かる。

【0092】

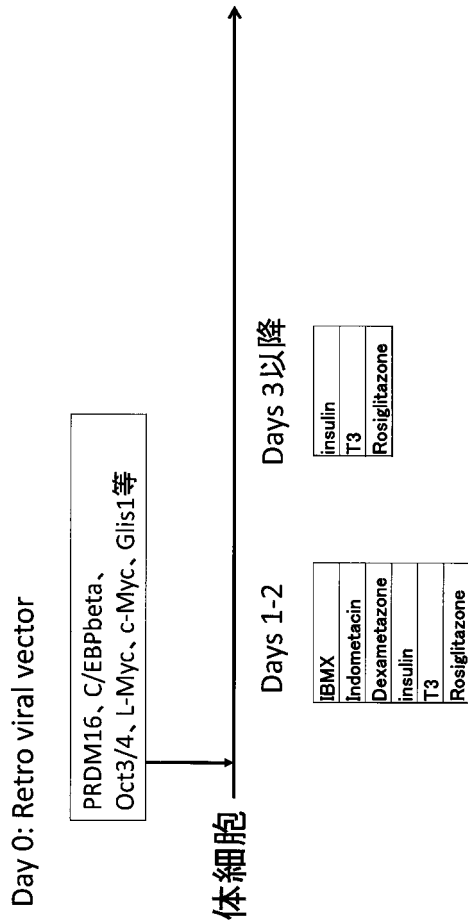
20

E、移植後4週目に、経口グルコース負荷試験を行った。0.0125U/mouseのインスリンをマウスの腹腔内に注射し、経時的に血中グルコースを測定した。dBAを移植したマウスではインスリン抵抗性が改善していることが分かる。

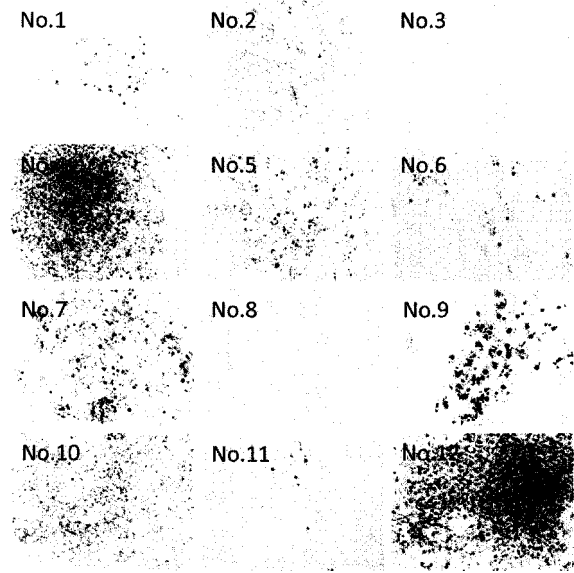
【0093】

F、移植後4週目にマウスの血清を採取し、非エステル化脂肪酸(NEFA)と中性脂肪(TG)を測定した。非移植およびGFP-MEF移植マウスでは、血清NEFAとTGが増加したが、dBAを移植した群ではこの脂質異常症が顕著に抑制できた。

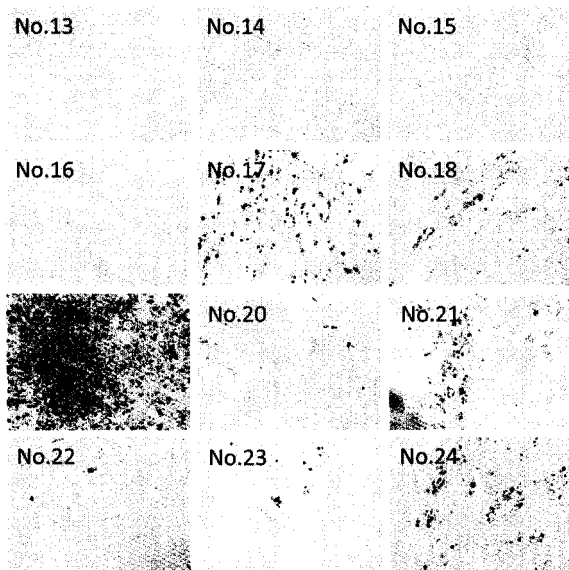
【 図 1 】



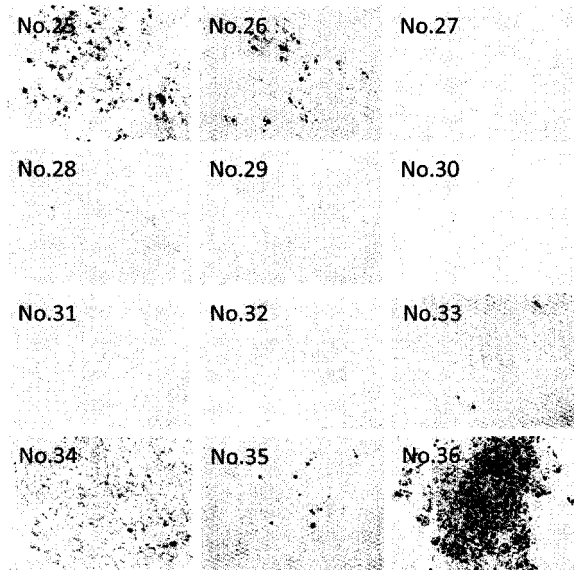
【 図 2 A 】



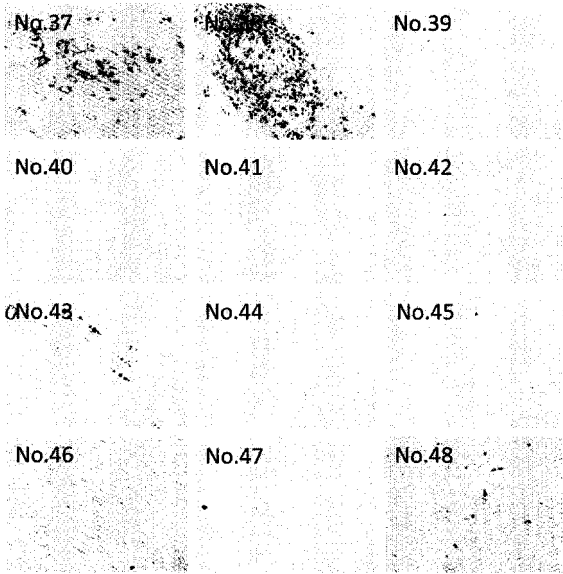
【 図 2 B 】



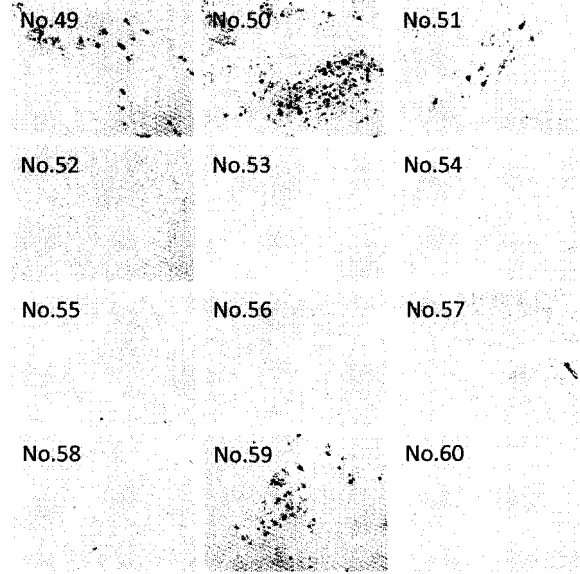
【 図 2 C 】



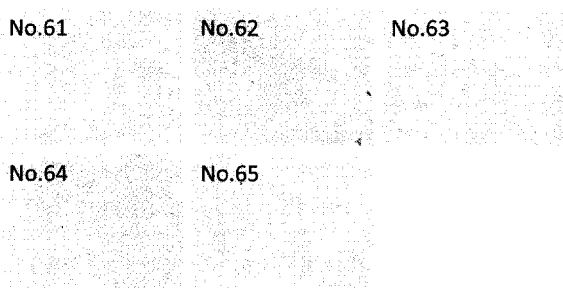
【 図 2 D 】



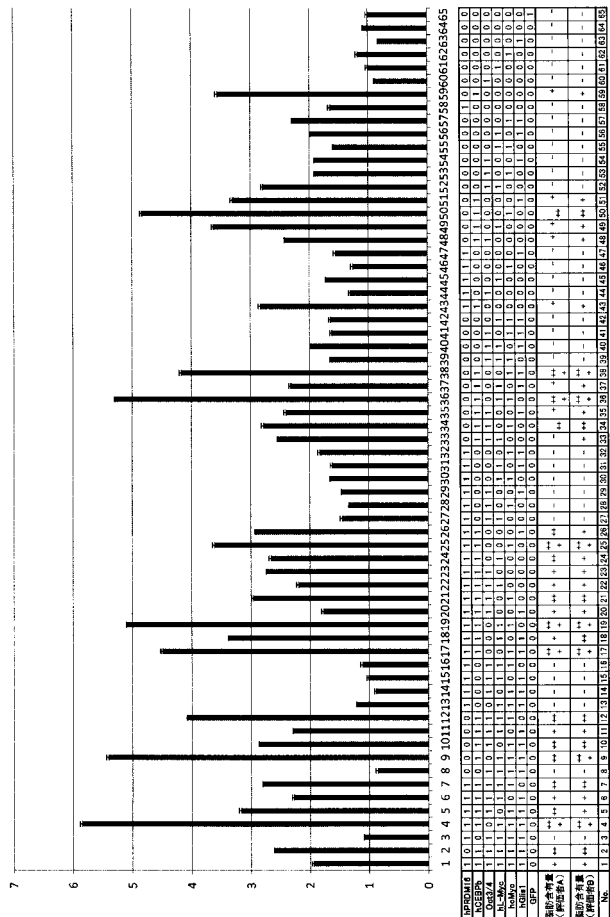
【 図 2 E 】



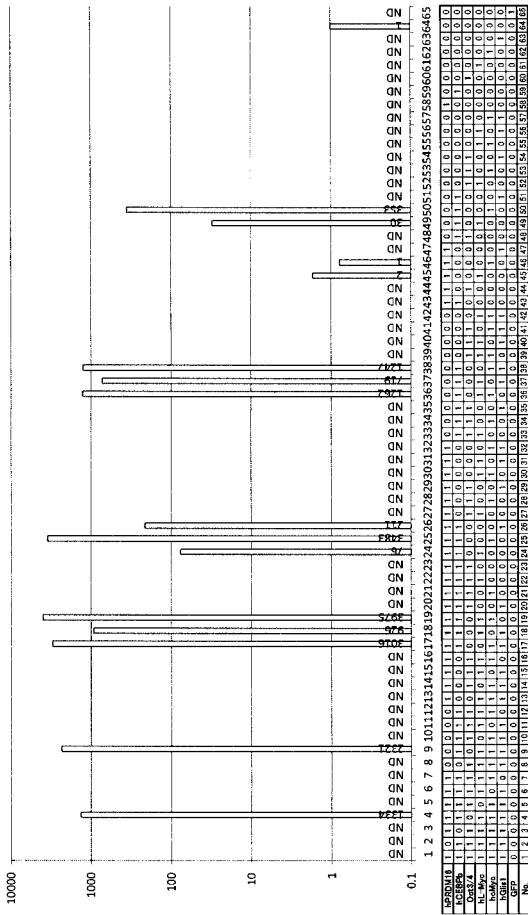
【 図 2 F 】



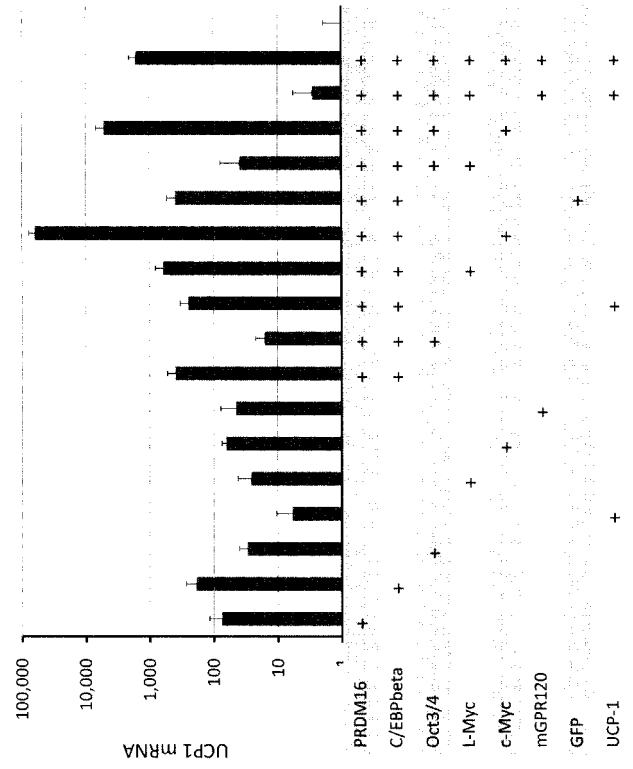
【 図 3 】



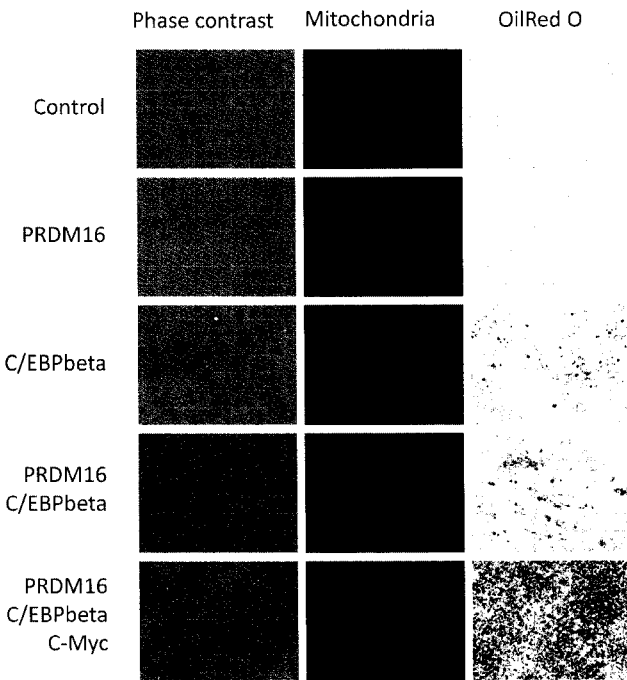
【 図 4 】



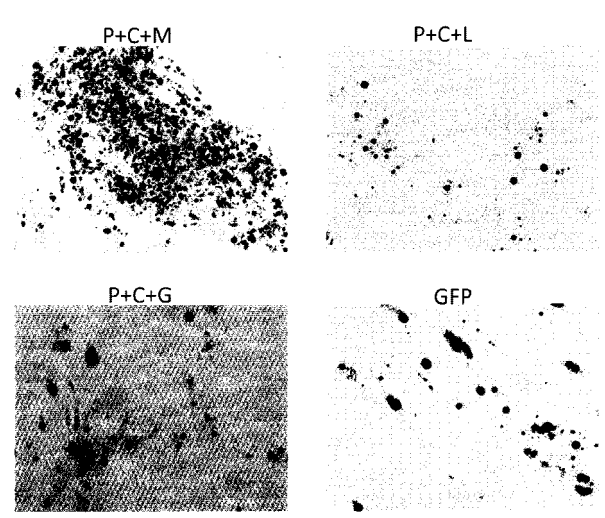
【 図 5 】



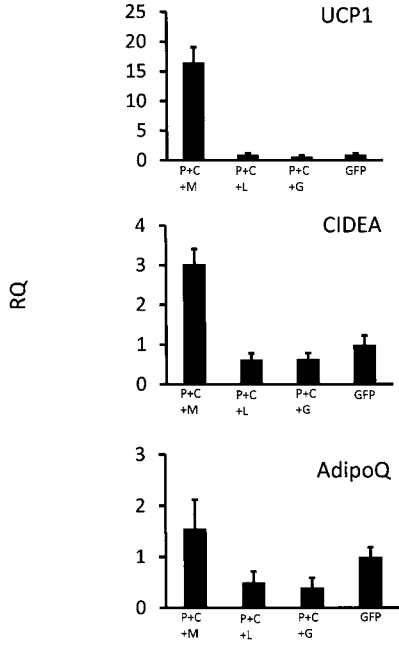
【 図 6 】



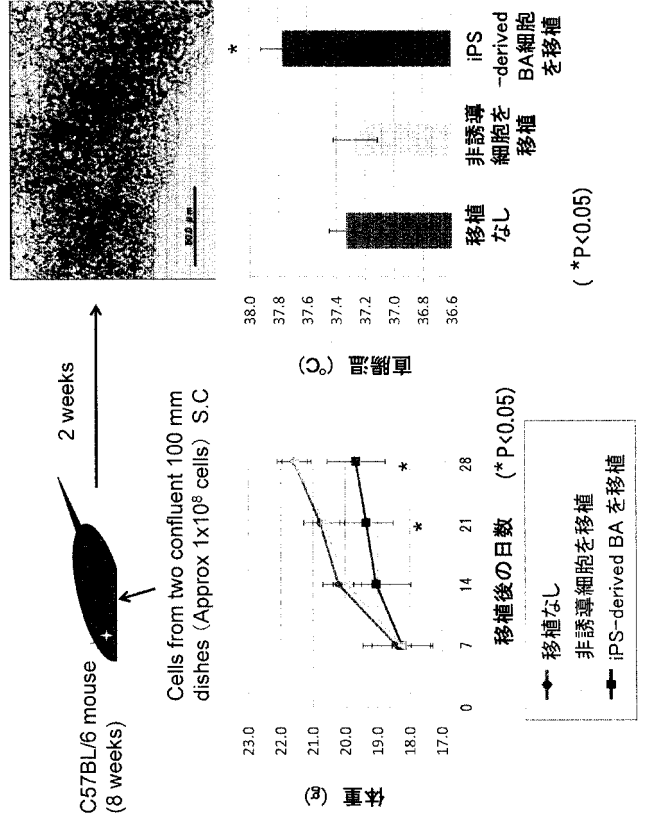
【 図 7 】



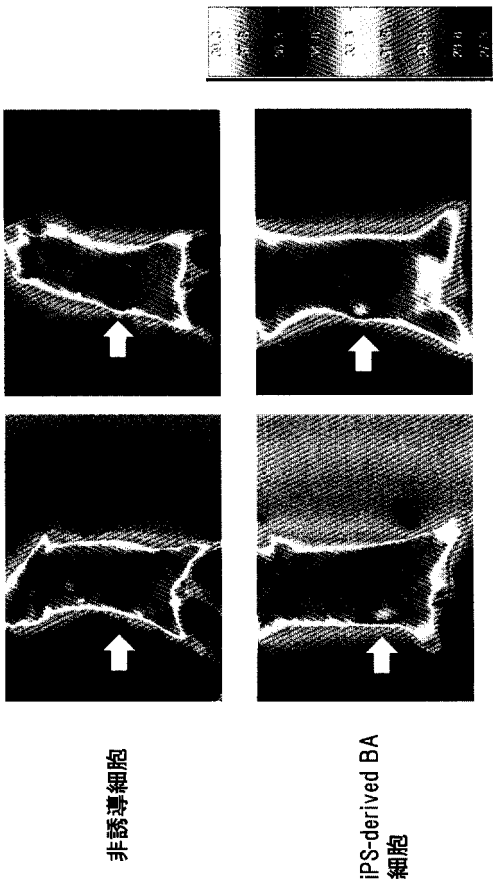
【 図 8 】



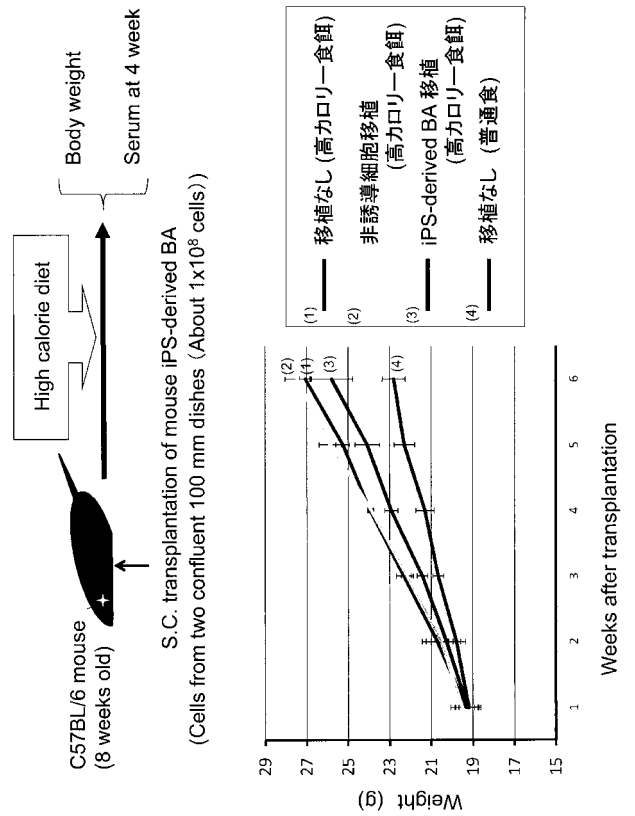
【 図 9 】



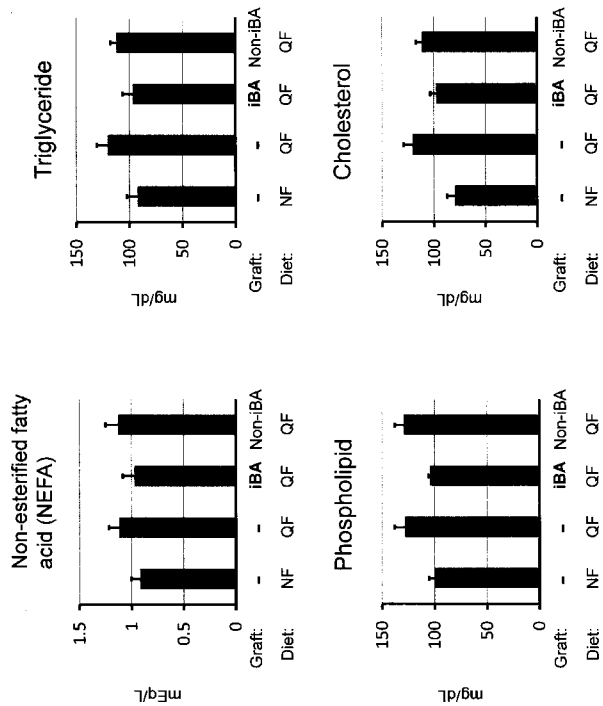
【 図 10 】



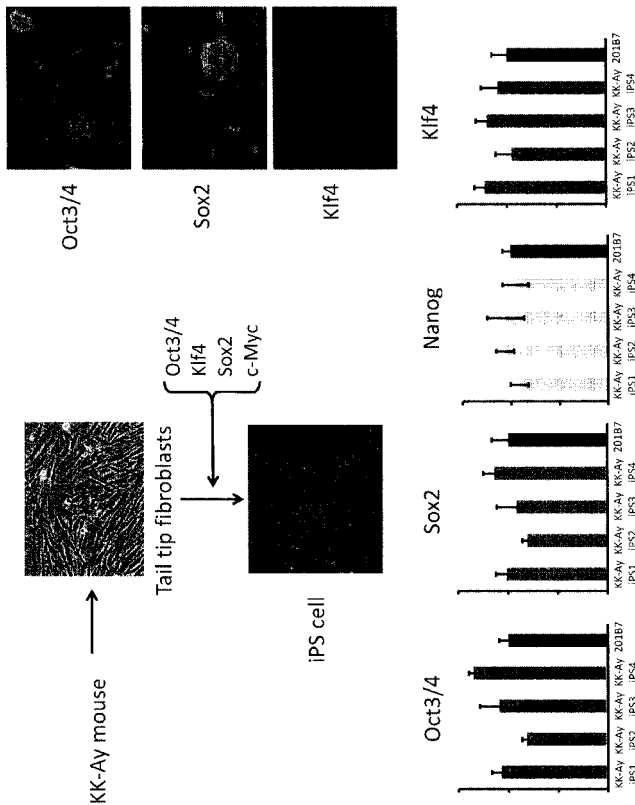
【 図 11 】



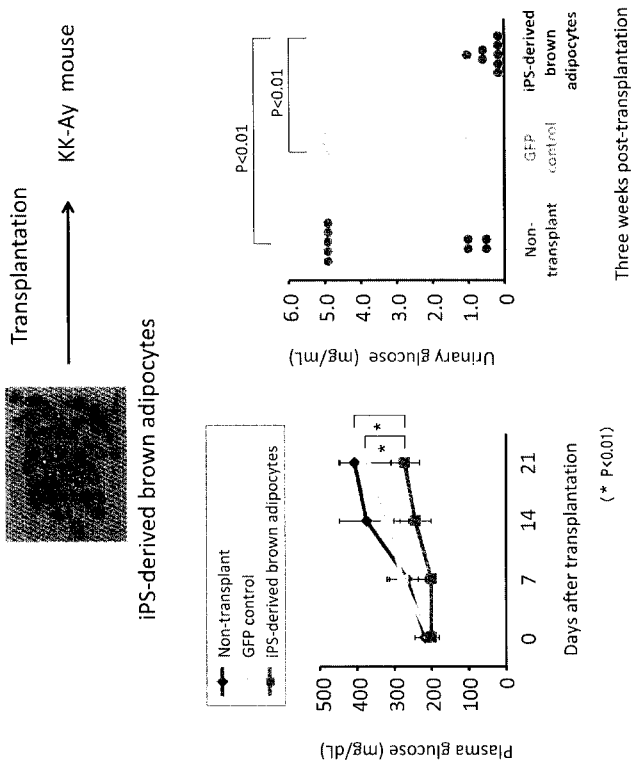
【 1 2 】



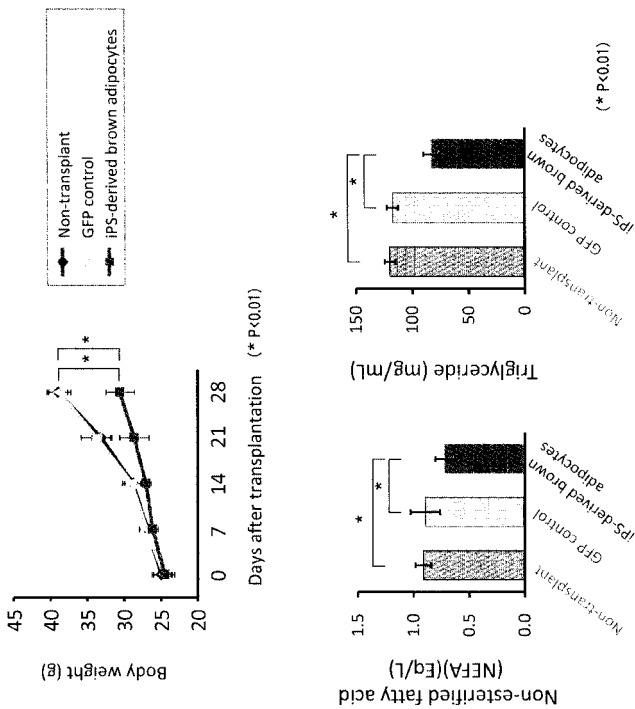
【 1 3 】



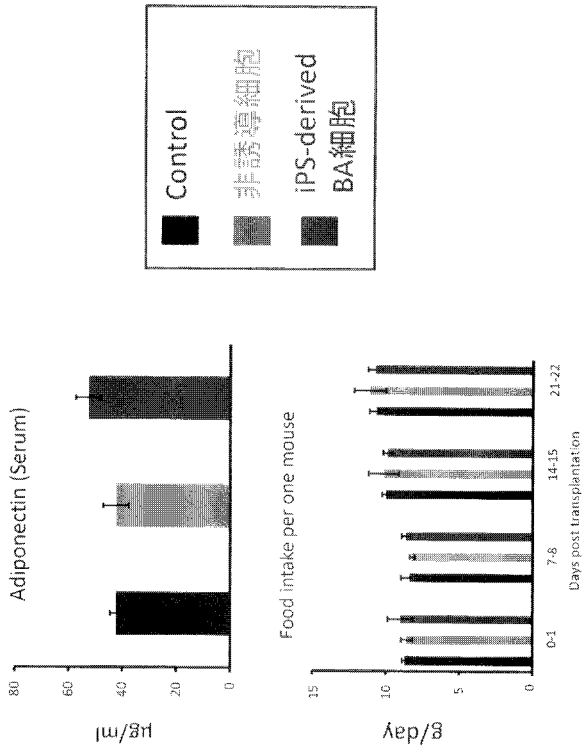
【 1 4 】



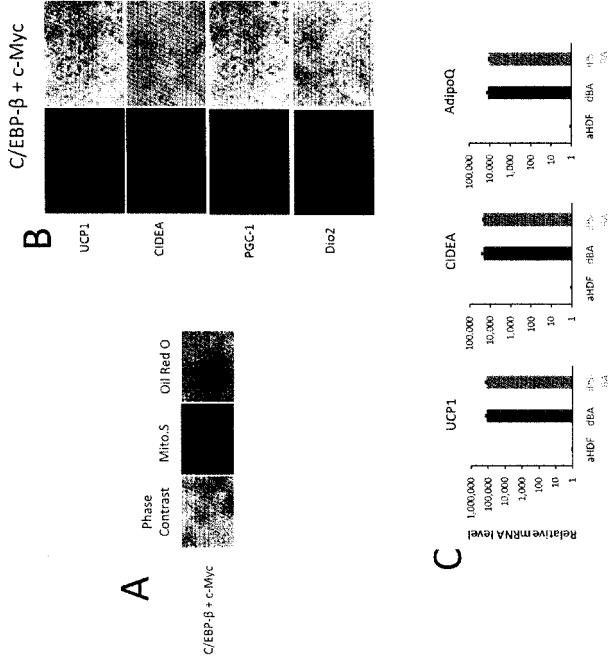
【 1 5 】



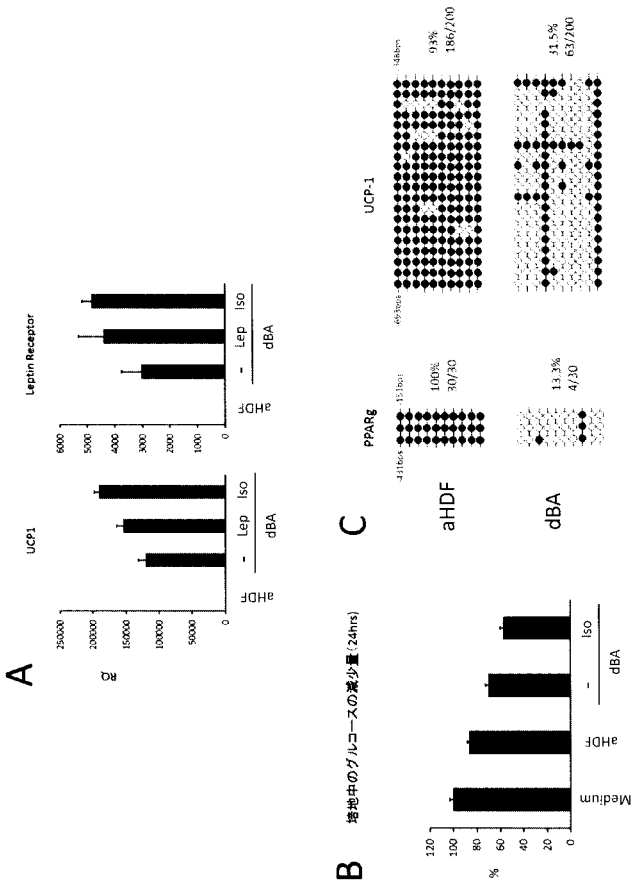
【 図 1 6 】



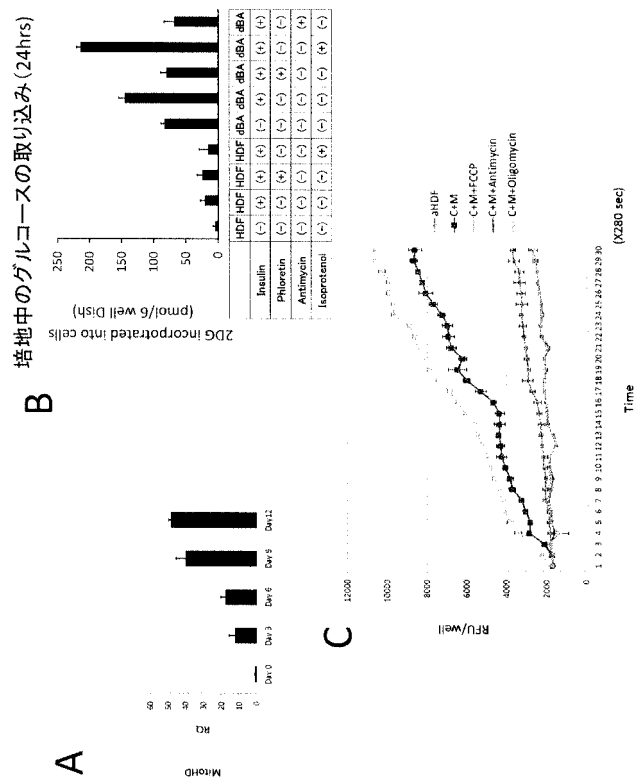
【 図 1 7 】



【 図 1 8 】



【 図 1 9 】



【手続補正書】

【提出日】平成26年6月16日(2014.6.16)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

哺乳動物の体細胞に褐色脂肪細胞関連遺伝子又はその発現産物とリプログラミング関連遺伝子又はその発現産物を導入することで前記体細胞から褐色脂肪細胞を調製する方法であって、褐色脂肪細胞関連遺伝子又はその発現産物とリプログラミング関連遺伝子又はその発現産物の組み合わせが、CM、PCLMG、CLMG、PCLM、CLM、PGMG、PCM及びCMG

(ここで、「P」はPRDM16を示し、「C」はC/EBP β を示し、「L」はL-Mycを示し、「M」はc-Mycを示し、「G」はGLIS1を示す)からなる群から選ばれるいずれかである、褐色脂肪細胞を調製する方法。

【請求項2】

前記体細胞が線維芽細胞または白色脂肪細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

(削除)

【請求項4】

(削除)

【請求項5】

(削除)

【請求項6】

(削除)

【請求項7】

(削除)

【請求項8】

(削除)

【請求項9】

哺乳動物の体細胞に由来し、外因性の褐色脂肪細胞関連遺伝子又はその発現産物と外因性のリプログラミング関連遺伝子又はその発現産物を有する褐色脂肪細胞であって、褐色脂肪細胞関連遺伝子又はその発現産物とリプログラミング関連遺伝子又はその発現産物の組み合わせが、CM、PCLMG、CLMG、PCLM、CLM、PGMG、PCM及びCMG

(ここで、「P」はPRDM16を示し、「C」はC/EBP β を示し、「L」はL-Mycを示し、「M」はc-Mycを示し、「G」はGLIS1を示す)からなる群から選ばれるいずれかである、褐色脂肪細胞。

【請求項10】

肥満、糖尿病、耐糖能異常、脂質代謝異常、動脈硬化性疾患、高血圧、高尿酸血症、痛風、非アルコール性脂肪性肝疾患、メタボリックシンドロームの予防又は治療剤であって、請求項1～2のいずれかに記載の方法により調製された褐色脂肪細胞、または、請求項9に記載の褐色脂肪細胞を有効成分とする、予防又は治療剤。

【請求項11】

請求項1～2のいずれかに記載の方法により調製された褐色脂肪細胞、または、請求項9に記載の褐色脂肪細胞の肥満、糖尿病、耐糖能異常、脂質代謝異常、動脈硬化性疾患、高血圧、高尿酸血症、痛風、非アルコール性脂肪性肝疾患、メタボリックシンドロームの予防又は治療のための使用。

【請求項 1 2】

請求項 1 ~ 2 のいずれかに記載の方法により調製された褐色脂肪細胞、または、請求項 9 に記載の褐色脂肪細胞を含む、移植材料。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2013/069226
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N5/10(2006.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P3/00(2006.01)i, A61P3/04(2006.01)i, A61P3/06(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P9/12(2006.01)i, A61P19/06(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) C12N5/10, A61K35/12, A61P1/16, A61P3/00, A61P3/04, A61P3/06, A61P3/10, A61P9/10, A61P9/12, A61P19/06, C12N5/077, C12N15/09 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 1996-2013 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), WPI		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/050334 A1 (ZHU Yong), 28 April 2011 (28.04.2011), (Family: none)	1-10,12
X Y	WO 2010/080985 A1 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.), 15 July 2010 (15.07.2010), & US 2012/0022500 A1	9-10,12 1-10,12
X Y	KAJIMURA Shingo, et al., "Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/ EBP-β transcriptional complex", Nature, 2009, Vol.460, p.1154-1159	9-10,12 1-10,12
<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 02 September, 2013 (02.09.13)		Date of mailing of the international search report 10 September, 2013 (10.09.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/069226

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	AHFELDT Tim, et al., "Programming human pluripotent stem cells into white and brown adipocytes", Nature Cell Biology, 2012.02, Vol.14, No.2, p.209-219	1-10,12
Y	WO 2011/102531 A1 (KYOTO UNIVERSITY), 25 August 2011 (25.08.2011), & JP 2013-519371 A & US 2013/0029423 A1 & EP 2536828 A1 & CN 102782122 A & KR 10-2012-0131180 A	1-10,12
P,X	WO 2012/147853 A1 (National Center for Global Health and Medicine), 01 November 2012 (01.11.2012), (Family: none)	9-10,12
A	JIMENEZ-PREITNER Maria, et al., "Plac8 Is an Inducer of C/EBP β Required for Brown Fat Differentiation, Thermoregulation, and Control of Body Weight", Cell Metabolism, 2011, Vol.14, p.658-670	1-10,12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/069226

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

C12N5/077(2010.01)i, C12N15/09(2006.01)n

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/069226

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.: 11
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
(See extra sheet)
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:

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 additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/069226

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

Claim 11 is "a use of brown adipocytes for the prevention or treatment of obesity ..." and falls under the category of methods for treatment of the human body by therapy or methods for diagnosis of the human body. Consequently, claim 11 relates to a subject matter for which this International Searching Authority is not required, under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), to carry out an international search.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 3 / 0 6 9 2 2 6									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))											
Int.Cl. C12N5/10(2006.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P3/00(2006.01)i, A61P3/04(2006.01)i, A61P3/06(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P9/12(2006.01)i, A61P19/06(2006.01)i, C12N6/077(2010.01)i, C12N15/09(2006.01)n											
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. C12N5/10, A61K35/12, A61P1/16, A61P3/00, A61P3/04, A61P3/06, A61P3/10, A61P9/10, A61P9/12, A61P19/06, C12N6/077, C12N15/09											
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											
<table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2013年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2013年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2013年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2013年	日本国実用新案登録公報	1996-2013年	日本国登録実用新案公報	1994-2013年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2013年										
日本国実用新案登録公報	1996-2013年										
日本国登録実用新案公報	1994-2013年										
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)											
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), WPI											
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 2011/050334 A1 (ZHU Yong) 2011.04.28, (ファミリーなし)	1-10, 12									
X	WO 2010/080985 A1 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.) 2010.07.15, & US 2012/0022500 A1	9-10, 12									
Y		1-10, 12									
X	KAJIMURA Shingo, et al., "Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP-β transcriptional complex", Nature, 2009, Vol. 460, p.1154-1159	9-10, 12									
Y		1-10, 12									
<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		の日の後に公表された文献									
「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		「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									
「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		「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									
「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)		「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									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 02.09.2013		国際調査報告の発送日 10.09.2013									
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) 鳥居 敬司	4 B 4 0 4 5								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2013/069226
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
Y	AHFELDT Tim, et al., "Programming human pluripotent stem cells into white and brown adipocytes", Nature Cell Biology, 2012.02, Vol.14, No.2, p.209-219	1-10, 12
Y	WO 2011/102531 A1 (KYOTO UNIVERSITY) 2011.08.25, & JP 2013-519371 A & US 2013/0029423 A1 & EP 2538828 A1 & CN 102782122 A & KR 10-2012-0131180 A	1-10, 12
P, X	WO 2012/147853 A1 (独立行政法人国立国際医療研究センター) 2012.11.01, (ファミリーなし)	9-10, 12
A	JIMENEZ-PREITNER Maria, et al., "Plac8 Is an Inducer of C/EBP β Required for Brown Fat Differentiation, Thermoregulation, and Control of Body Weight", Cell Metabolism, 2011, Vol.14, p.658-670	1-10, 12

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 3 / 0 6 9 2 2 6

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 11 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、請求項11は、「褐色脂肪細胞の肥満・・・の予防又は治療のための使用」であり、治療による人体の処置方法又は人体の診断方法に該当するから、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
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の国際調査機関は認めた。

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。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	A 6 1 P	9/10	1 0 1
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P	9/12	A 6 1 P	9/12	
A 6 1 P 19/06 (2006.01)	A 6 1 P	19/06	A 6 1 P	19/06	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/00	A 6 1 P	3/00	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	C 1 2 N	15/00	A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA01 CA09 CA11 CA20 GA11 HA17
 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC20 BA01 CA44
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB65 CA04 MA67 NA10 NA14 ZA42 ZA45
 ZA70 ZA75 ZC21 ZC31 ZC33 ZC35

(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。