

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6565121号
(P6565121)

(45) 発行日 令和1年8月28日(2019.8.28)

(24) 登録日 令和1年8月9日(2019.8.9)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 38/18 (2006.01)	A 6 1 K 38/18 Z N A
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16
A 6 1 K 31/40 (2006.01)	A 6 1 K 31/40
A 6 1 K 31/366 (2006.01)	A 6 1 K 31/366
A 6 1 K 31/505 (2006.01)	A 6 1 K 31/505

請求項の数 24 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-505495 (P2016-505495)	(73) 特許権者	509009692
(86) (22) 出願日	平成26年3月19日 (2014.3.19)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニヴァシ ティ オブ ミシガン
(65) 公表番号	特表2016-522163 (P2016-522163A)		アメリカ合衆国 4 8 1 0 9 ミシガン州
(43) 公表日	平成28年7月28日 (2016.7.28)		アナーバー ヒューロン パークウェイ
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/031171		1 6 0 0 ビルディング 5 2 0 セカ ンド フロア
(87) 国際公開番号	W02014/153385	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成26年9月25日 (2014.9.25)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	平成29年3月8日 (2017.3.8)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	61/804,046		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成25年3月21日 (2013.3.21)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 代謝障害を治療する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

非アルコール性脂肪肝疾患 (N A F L D)、脂肪性肝炎及び硬変症からなる群から選択される代謝障害を治療するための医薬の製造における、配列番号 1 のアミノ酸配列を含むニューレグリン 4 (N r g 4) タンパク質、配列番号 1 の全長のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 %、9 5 % または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む N r g 4 バリエーション、または配列番号 1 の残基 1 ~ 5 5、1 ~ 5 2、1 ~ 5 3 または 1 ~ 6 2 を含む生物活性のある断片の使用。

【請求項 2】

前記代謝障害は、N A F L D である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記代謝障害は、脂肪性肝炎である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記代謝障害は、硬変症である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 N r g 4 バリエーションは、配列番号 1 の全長のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記生物活性のある断片は、配列番号 1 のアミノ酸残基 1 ~ 5 2 または 1 ~ 6 2 を含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記 N r g 4 タンパク質は、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記医薬は、治療有効量の脂質低下薬との併用投与のためのものである、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 9】

前記脂質低下薬は、アトルバスタチン、シンバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチン、エゼチミブ、ベザフィブラート、シプロフィブラート、クロフィブラート、ナイアシン、ゲムフィプロジル、及びフェノフィブラートからなる群から選択される、請求項 8 に記載の使用。

10

【請求項 10】

対象由来の検体における、配列番号 1 のアミノ酸配列を含むニューレグリン 4 (N r g 4) タンパク質、または配列番号 1 のアミノ酸配列と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 % または 99 % 同一であるアミノ酸配列を含む N r g 4 バリエーションの水準をモニターする工程を含む、該対象における代謝障害または代謝障害に対する易罹患性をモニターする方法であって、この中で、該代謝障害は非アルコール性脂肪肝疾患 (N A F L D)、脂肪性肝炎及び硬変症からなる群から選択され、正常対象における該水準と比較して該対象において低い該水準は、該代謝障害を示唆しているか、または該代謝障害に対する易罹患性を示しており、かつこの中で、該正常対象は、該代謝障害に罹患していないことが判

20

【請求項 11】

対象由来の検体における、配列番号 1 のアミノ酸配列を含むニューレグリン 4 (N r g 4) タンパク質、配列番号 1 のアミノ酸配列と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 % または 99 % 同一であるアミノ酸配列を含む N r g 4 バリエーション、または配列番号 1 の残基 1 ~ 55、1 ~ 52、1 ~ 53 または 1 ~ 62 を含むこれらの生物活性のある断片の水準を経時的にモニターする工程を含む、該対象における代謝障害の進行をモニターするための方法であって、この中で、該代謝障害は非アルコール性脂肪肝疾患 (N A F L D)、脂肪性肝炎及び硬変症からなる群から選択され、経時的な該 N r g 4 タンパク質、バリエーション、またはこれらの生物活性のある該断片の水準の低下は、該代謝障害の進行を示唆

30

【請求項 12】

対象由来の検体における、配列番号 1 のアミノ酸配列を含むニューレグリン 4 (N r g 4) タンパク質、配列番号 1 のアミノ酸配列と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 % または 99 % 同一であるアミノ酸配列を含む N r g 4 バリエーション、または配列番号 1 の残基 1 ~ 55、1 ~ 52、1 ~ 53 または 1 ~ 62 を含むこれらの生物活性のある断片の水準を判定する工程を含む、該対象における代謝障害の治療の有効性をモニターするための方法であって、この中で、該代謝障害は非アルコール性脂肪肝疾患 (N A F L D)、脂肪性肝炎及び硬変症からなる群から選択され、経時的な該 N r g 4 タンパク質、バリエーション、またはこれらの生物活性のある該断片の水準の上昇は、有効な治療を示唆している、

40

【請求項 13】

前記代謝障害は、N A F L D である、請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記代謝障害は、脂肪性肝炎である、請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

前記代謝障害は、硬変症である、請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

非アルコール性脂肪肝疾患 (N A F L D)、脂肪性肝炎及び硬変症からなる群から選択される代謝障害を治療するための組成物であって、配列番号 1 のアミノ酸配列を含むニュー

50

ーレグリン4 (N r g 4) タンパク質、配列番号1の全長のアミノ酸配列と少なくとも90%、95%または99%同一であるアミノ酸配列を含むN r g 4 バリエーション、または配列番号1の残基1~55、1~52、1~53または1~62を含む生物活性のある断片を含む、組成物。

【請求項17】

前記代謝障害は、N A F L Dである、請求項16に記載の組成物。

【請求項18】

前記代謝障害は、脂肪性肝炎である、請求項16に記載の組成物。

【請求項19】

前記代謝障害は、硬変症である、請求項16に記載の組成物。

10

【請求項20】

前記N r g 4 バリエーションは、配列番号1の全長のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項16に記載の組成物。

【請求項21】

前記生物活性のある断片は、配列番号1のアミノ酸残基1~52または1~62を含む、請求項16に記載の組成物。

【請求項22】

前記N r g 4 タンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列を含む、請求項16に記載の組成物。

【請求項23】

前記組成物は、治療有効量の脂質低下薬と併用投与されることを特徴とする、請求項16~22のいずれか1項に記載の組成物。

20

【請求項24】

前記脂質低下薬は、アトルバスタチン、シンバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチン、エゼチミブ、ベザフィブラート、シプロフィブラート、クロフィブラート、ナイアシン、ゲムフィブロジル、及びフェノフィブラートからなる群から選択される、請求項23に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

政府の支援

本発明は、米国国立衛生研究所によって授与される研究費第H L 0 9 7 7 3 8号及び第D K 0 7 7 0 8 6号の下での政府の支援で実施した。当該政府は、本発明におけるある権利を有する。

【0002】

電子提出される資料の参照による組み込み

本出願は、本開示の別個の部分として、その全体が参照により組み込まれるコンピュータ可読形式における配列表(ファイル名: 4 6 7 6 8 S _ S e q L i s t i n g . t x t、2014年3月18日作成、3,026バイト、A S C I Iテキストファイル)を含有する。

40

【0003】

本発明の分野

本発明は、代謝障害などのニューレグリン4 (N r g 4) を特徴とする容態を治療する方法に関する。

【背景技術】

【0004】

メタボリックシンドロームは、2型糖尿病、心血管疾患、及び非アルコール性脂肪肝疾患(N A F L D)についての危険を劇的に高める地球全体の流行となった。高い肝グルコース産生及びリポタンパク質分泌はインスリン抵抗性における高血糖及び高脂血症の病因

50

に寄与する。肥満も、成人及び子供の両方に影響するNAFLDの明確な特徴である、肝臓における過剰な脂肪蓄積と関連している。脂肪肝はしばしば、肝機能に及ぼす明らかな有害作用のない良性の容態として存在するのに対し、進行性肝損傷、炎症及び線維化が、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)を罹患しているNAFLD患者の20~30%において観察される。NASHは、末期肝疾患のための主要な危険因子として明らかになりつつある。肝臓のグルコース及び脂質の代謝を制御する調節網は、この20年間における研究の焦点であり続けた。これらの研究は、グルコース及び脂質の恒常性維持に寄与する分子レベルの及び生理学的な機序への厳しい目を提供している。しかしながら、異なる組織間の、特に脂肪組織と肝臓の間のクロストークを仲介するホルモンの手掛かりはほとんど定義されていないままである。

10

【0005】

ニューレグリン(NRG)は、保存された表皮成長因子(EGF)様ドメインを含有する成長因子のファミリーである。今日まで、4つのニューレグリン遺伝子(Nrg1~4)が、広範な代替的なスプライシングを通じてシグナル伝達リガンドの多様なアレイを生じる哺乳類動物において識別されてきた。NRGは典型的には、EGF様ドメインを含有する細胞外断片を遊離するようタンパク質分解性開裂を受ける膜貫通タンパク質として合成される。遺伝子レベルの及び生化学的な研究は、NRGがチロシンキナーゼ受容体のErbBファミリーを通じてシグナル伝達し、傍分泌、自己分泌、及び内分泌の様式で生物学的効果を発揮することを実証してきた。Nrg1は、神経筋系、特に神経筋シナプス及び末梢神経の発達において広範に特徴づけられてきた。加えて、Nrg1は、心臓の恒常性維持及び中枢神経系の発達における重要な役割を担っている。Nrg1及びNrg3の遺伝的多型はそれぞれ、統合失調症及びヒルシュブルング病についての危険性と関連している。NRGは、標的細胞における驚くべき特異的生物学的応答を誘発する。Nrg4は、他のNRGメンバーとの配列相同性を基に発見され、115個のアミノ酸からなる前駆体タンパク質をコードすると予測された。特にグルコース及び脂質の代謝ならびにNAFLDに及ぼすNrg4の生物学的効果を仲介する関連する細胞の受容体は、まだ確立されていない。

20

【0006】

先の見解は、2型糖尿病、心血管疾患、及び非アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD)などの疾患を治療する上で有用な組成物及び製剤についての持続的な需要に関する証拠を提供する。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

Nrg4は、肝臓における肝細胞を標的とする脂肪細胞由来因子として識別された。Nrg4の発現は、肥満に関するマウスモデルにおける脂肪組織において顕著に低下した。Nrg4ノックアウトマウスを用いて、Nrg4欠損が食餌誘発性の高血糖、高脂血症及び脂肪肝を悪化させることが判定された。対照的に、Nrg4の脂肪特異的遺伝子導入発現は、高脂肪食摂取後のこれらの代謝性パラメータを有意に改善した。総合すると、これらの研究は、Nrg4を、2型糖尿病、高脂血症、及びNAFLDの治療のための治療生物製剤の開発のための新規の標的として識別した。

40

【0008】

本開示の一態様において、代謝障害を治療する必要のある患者へ治療有効量のNrg4、Nrg4バリエーション、またはこれらの生物活性のある断片を投与することを含む、代謝障害を治療する方法が提供される。

【0009】

いくつかの実施形態において、前記代謝障害は、非アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD)、脂肪性肝炎、II型糖尿病、高血糖、高脂血症、脂質異常血症、肥満、高インスリン血症、インスリン抵抗性、高コレステロール血症、非家族性高コレステロール血症、家族性高コレステロール血症、ヘテロ接合性家族性高コレステロール血症、ホモ接合性家族

50

性高コレステロール血症、混合型脂質異常血症、粥状硬化症、早発性冠動脈性心疾患、脂質異常血症、高トリグリセリド血症、高脂肪酸血症、及び硬変症からなる群から選択される。

【0010】

いくつかの実施形態において、前記生物活性のある断片は、配列番号1の残基5～46、5～55、5～62、1～46、1～55、1～52、1～53、4～52、4～53、または1～62を含む。

【0011】

いくつかの実施形態において、前記Nrg4パリアントは、配列番号1と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%同一である。

10

【0012】

いくつかの実施形態において、前記Nrg4、Nrg4パリアント、またはこれらの生物活性のある断片は、ウイルスベクターによってコードされる。

【0013】

いくつかの実施形態において、前記Nrg4、Nrg4パリアント、またはこれらの生物活性のある断片は、化学的に合成されまたは組換え源から精製される。

【0014】

本開示の別の態様において、ニューレグリン4(Nrg4)における欠損を特徴とする疾患または容態を治療する必要がある患者へ、治療有効量のNrg4(配列番号1)、Nrg4パリアント、またはこれらの生物活性のある断片を投与することを含む、当該疾患または容態を治療する方法が提供される。

20

【0015】

いくつかの実施形態において、前記疾患または容態は、健常患者由来の脂肪組織におけるNRG4の発現と比較して、脂肪組織におけるNRG4の発現が低下している。いくつかの実施形態において、当該脂肪組織は、褐色脂肪組織または白色脂肪組織である。

【0016】

いくつかの実施形態において、前記疾患または容態は、脂肪細胞と体組織の間にある異常な情報伝達である。

【0017】

いくつかの実施形態において、前記疾患または容態は、代謝障害である。いくつかの実施形態において、当該代謝障害は、非アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD)、脂肪性肝炎、II型糖尿病、高血糖、高脂血症、脂質異常血症、肥満、高インスリン血症、インスリン抵抗性、高コレステロール血症、非家族性高コレステロール血症、家族性高コレステロール血症、ヘテロ接合性家族性高コレステロール血症、ホモ接合性家族性高コレステロール血症、混合型脂質異常血症、粥状硬化症、早発性冠動脈性心疾患、脂質異常血症、高トリグリセリド血症、高脂肪酸血症、及び硬変症からなる群から選択される。

30

【0018】

いくつかの実施形態において、前記生物活性のある断片は、配列番号1の残基5～46、5～55、5～62、1～46、1～55、1～52、1～53、4～52、4～53、または1～62を含む。

40

【0019】

いくつかの実施形態において、前記Nrg4パリアントは、配列番号1と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%同一である。

【0020】

いくつかの実施形態において、前記Nrg4、Nrg4パリアント、またはこれらの生物活性のある断片は、ウイルスベクターによってコードされる。

【0021】

いくつかの実施形態において、前記Nrg4、Nrg4パリアント、またはこれらの生物活性のある断片は、化学的に合成されまたは組換え源から精製される。

【0022】

50

本開示の別の態様において、非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）、脂肪性肝炎、II型糖尿病、高血糖、高脂血症、脂質異常血症、肥満、高インスリン血症、インスリン抵抗性、高コレステロール血症、非家族性高コレステロール血症、家族性高コレステロール血症、ヘテロ接合性家族性高コレステロール血症、ホモ接合性家族性高コレステロール血症、混合型脂質異常血症、粥状硬化症、早発性冠動脈性心疾患、脂質異常血症、高トリグリセリド血症、高脂肪酸血症、及び硬変症からなる群から選択される容態を治療する必要のある患者へ、治療有効量のNrg4、Nrg4バリエーション、またはこれらの生物活性のある断片を投与することを含む、当該容態を治療する方法が提供される。いくつかの実施形態において、当該生物活性のある断片は、配列番号1の残基5～46、5～55、5～62、1～46、1～55、1～52、1～53、4～52、4～53、または1～62を含む。いくつかの実施形態において、当該Nrg4バリエーションは、配列番号1と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%同一である。

10

【0023】

本開示のさらに別の態様において、肝臓における脂肪蓄積を低下させる必要のある患者へ、治療有効量のNrg4、Nrg4バリエーション、またはこれらの生物活性のある断片を投与することを含む、肝臓における脂肪蓄積を低下させる方法が提供される。いくつかの実施形態において、当該Nrg4、Nrg4バリエーション、またはこれらの生物活性のある断片は、治療有効量の脂質低下薬と併用投与される。いくつかの実施形態において、当該脂質低下薬は、アトルバスタチン、シンバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチン、エゼチミブ、ベザフィブラート、シプロフィブラート、クロフィブラート、ナイアシン、

20

【0024】

本開示のさらに別の態様において、血糖値を低下させる必要のある患者へ、治療有効量のNrg4、Nrg4バリエーション、またはこれらの生物活性のある断片を投与することを含む、血糖値を低下させる方法が提供される。いくつかの実施形態において、当該Nrg4、Nrg4バリエーション、またはこれらの生物活性のある断片は、治療有効量のインスリン、GLP-1、メトホルミン、またはDPP4阻害薬と併用投与される。

【0025】

本開示のさらに別の態様において、Nrg4、Nrg4バリエーション、またはこれらの生物活性のある断片、及び医薬として許容し得る担体を含む医薬組成物が提供される。いくつかの実施形態において、当該生物活性のある断片は、配列番号1の残基5～46、5～55、5～62、1～46、1～55、1～52、1～53、4～52、4～53、または1～62を含む。いくつかの実施形態において、当該Nrg4バリエーションは、配列番号1と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%同一である。

30

【0026】

本開示のなおも別の態様において、検査個体由来の検体におけるNrg4水準を判定する工程を含む、検査個体における代謝障害を診断する方法が提供され、この中で、正常個体におけるNrg4水準と比較して検査個体において低いNrg4水準は、当該容態を示唆しておりかつこの中で、当該正常個体は、代謝障害に罹患していないことが判っている。

40

【0027】

本開示の別の態様において、個体由来の検体におけるNrg4水準を検出する工程を含む、個体における代謝障害を診断するための方法が提供され、この中で、同じ個体における先行Nrg4水準と比較して低いNrg4水準は、代謝障害を示唆している。

【0028】

本開示の別の態様において、検査個体由来の検体におけるNrg4水準を判定する工程を含む、検査個体における代謝障害に対する易罹患性を判定するための方法が提供され、この中で、正常な個体由来の検体におけるNrg4水準と比較して低い、検査個体におけるNrg4水準は、当該容態に対する易罹患性を示しており、かつこの中で、当該正常な

50

個体は、代謝障害に罹患していないことが判っている。

【0029】

本開示の別の態様において、個体由来の検体におけるNrg4水準を検出する工程を含む、個体における代謝障害に対する易罹患性を判定するための方法が提供され、この中で、同じ個体における先行Nrg4水準と比較して低いNrg4水準は、代謝障害に対する易罹患性を示唆している。

【0030】

本開示の別の態様において、個体由来の検体におけるNrg4水準を経時的に判定する工程を含む、個体における代謝障害の進行を判定するための方法が提供され、この中で、経時的なNrg4水準の低下は、代謝障害の進行を示唆している。

10

【0031】

本開示の別の態様において、個体由来の検体におけるNrg4水準を判定する工程を含む、個体における代謝障害の治療の有効性をモニターするための方法が提供され、この中で、経時的なNrg4水準の上昇は、有効な治療を示唆している。

【0032】

段落[0018]～段落[0023]の方法に関するいくつかの実施形態において、前記代謝障害は、非アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD)、脂肪性肝炎、II型糖尿病、高血糖、高脂血症、脂質異常血症、肥満、高インスリン血症、インスリン抵抗性、高コレステロール血症、非家族性高コレステロール血症、家族性高コレステロール血症、ヘテロ接合性家族性高コレステロール血症、ホモ接合性家族性高コレステロール血症、混合型脂質異常血症、粥状硬化症、早発性冠動脈性心疾患、脂質異常血症、高トリグリセリド血症、高脂肪酸血症、及び硬変症からなる群から選択される。

20

【0033】

先の方法のいくつかの実施形態において、Nrg4水準は、Nrg4の血清タンパク質濃度の尺度である。

【0034】

いくつかの実施形態において、Nrg4水準は、NRG4 mRNA水準の尺度である。

【0035】

いくつかの実施形態において、Nrg4水準は、Nrg4活性の尺度である。

【0036】

いくつかの実施形態において、Nrg4活性は、特異的な結合の活性である。

30

【0037】

別の態様において、本開示には、薬品の調製のためのNrg4の使用を含む。別の態様において、本開示には、NAFLD、脂肪性肝炎、II型糖尿病、高血糖、高脂血症、脂質異常血症、肥満、高インスリン血症、インスリン抵抗性、高コレステロール血症、非家族性高コレステロール血症、家族性高コレステロール血症、ヘテロ接合性家族性高コレステロール血症、ホモ接合性家族性高コレステロール血症、混合型脂質異常血症、粥状硬化症、早発性冠動脈性心疾患、脂質異常血症、高トリグリセリド血症、高脂肪酸血症、及び硬変症の治療のための、Nrg4及びNrg4を含む組成物の使用を含む。他の関連する態様も本開示に提供される。

40

【0038】

本開示の他の特徴及び利点は、以下の詳細な説明から明らかとなる。しかしながら、詳細な説明及び具体的な実施例は、本開示の好ましい実施形態を示しながらも、例示だけを意図している。その理由は、本開示の精神及び範囲内の種々の変更及び改変が、この詳細な説明から当業者に明らかとなるからである。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

代謝障害を治療する必要のある患者へ治療有効量のNrg4、Nrg4バリエーション、またはこれらの生物活性のある断片を投与することを含む、代謝障害を治療する方法。

(項目2)

50

前記代謝障害は、非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）、脂肪性肝炎、2型糖尿病、高血糖、高脂血症、脂質異常血症、肥満、高インスリン血症、インスリン抵抗性、高コレステロール血症、非家族性高コレステロール血症、家族性高コレステロール血症、ヘテロ接合性家族性高コレステロール血症、ホモ接合性家族性高コレステロール血症、混合型脂質異常血症、粥状硬化症、早発性冠動脈性心疾患、脂質異常血症、高トリグリセリド血症、高脂肪酸血症、及び硬変症からなる群から選択される、項目1に記載の方法。

（項目3）

前記生物活性のある断片は、配列番号1の残基5～46、5～55、5～62、1～46、1～55、1～52、1～53、4～52、4～53、または1～62を含む、項目1または2に記載の方法。

10

（項目4）

前記Nrg4バリエントは、配列番号1と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%同一である、項目1または2に記載の方法。

（項目5）

前記Nrg4、Nrg4バリエント、またはこれらの生物活性のある断片は、ウイルスベクターによってコードされる、項目1～4のいずれか一項に記載の方法。

（項目6）

前記Nrg4、Nrg4バリエント、またはこれらの生物活性のある断片は、化学的に合成されまたは組換え源から精製される、項目1～4のいずれか一項に記載の方法。

（項目7）

ニューレグリン4（Nrg4）の欠損を特徴とする疾患または容態を治療する必要のある患者へ、治療有効量のNrg4（配列番号1）、Nrg4バリエント、またはこれらの生物活性のある断片を投与することを含む、該疾患または容態を治療する方法。

20

（項目8）

前記疾患または容態は、健常患者由来の脂肪組織におけるNRG4の発現と比較して、脂肪組織におけるNRG4の発現が低下している、項目7に記載の方法。

（項目9）

前記脂肪組織は、褐色脂肪組織または白色脂肪組織である、項目8に記載の方法。

（項目10）

前記疾患または容態は、脂肪細胞と体組織の間にある異常な情報伝達である、項目7、8、または9に記載の方法。

30

（項目11）

前記疾患または容態は、代謝障害である、項目7に記載の方法。

（項目12）

前記代謝障害は、非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）、脂肪性肝炎、II型糖尿病、高血糖、高脂血症、脂質異常血症、肥満、高インスリン血症、インスリン抵抗性、高コレステロール血症、非家族性高コレステロール血症、家族性高コレステロール血症、ヘテロ接合性家族性高コレステロール血症、ホモ接合性家族性高コレステロール血症、混合型脂質異常血症、粥状硬化症、早発性冠動脈性心疾患、脂質異常血症、高トリグリセリド血症、高脂肪酸血症、及び硬変症からなる群から選択される、項目11に記載の方法。

40

（項目13）

前記生物活性のある断片は、配列番号1の残基5～46、5～55、5～62、1～46、1～55、1～52、1～53、4～52、4～53、または1～62を含む、項目7に記載の方法。

（項目14）

前記Nrg4バリエントは、配列番号1と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%同一である、項目7に記載の方法。

（項目15）

前記Nrg4、Nrg4バリエント、またはこれらの生物活性のある断片は、ウイルスベクターによってコードされる、項目7に記載の方法。

50

(項目16)

前記Nrg4、Nrg4バリエーション、またはこれらの生物活性のある断片は、化学的に合成されまたは組換え源から精製される、項目7に記載の方法。

(項目17)

肝臓における脂肪蓄積を低下させる必要のある患者へ、治療有効量のNrg4、Nrg4バリエーション、またはこれらの生物活性のある断片を投与することを含む、肝臓における脂肪蓄積を低下させる方法

(項目18)

前記Nrg4、Nrg4バリエーション、またはこれらの生物活性のある断片は、治療有効量の脂質低下薬と併用投与される、項目17に記載の方法。

10

(項目19)

前記脂質低下薬は、アトルバスタチン、シンバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチン、エゼチミブ、ベザフィブラート、シプロフィブラート、クロフィブラート、ナイアシン、ゲムフィプロジル、及びフェノフィブラートからなる群から選択される、項目18に記載の方法。

(項目20)

血糖値を低下させる必要のある患者へ、治療有効量のNrg4、Nrg4バリエーション、またはこれらの生物活性のある断片を投与することを含む、血糖値を低下させる方法。

(項目21)

前記Nrg4、Nrg4バリエーション、またはこれらの生物活性のある断片は、治療有効量のインスリン、GLP-1、メトホルミン、またはDPP4阻害薬と併用投与される、項目20に記載の方法。

20

(項目22)

Nrg4、Nrg4バリエーション、またはこれらの生物活性のある断片、及び医薬として許容し得る担体を含む組成物。

(項目23)

前記生物活性のある断片は、配列番号1の残基5~46、5~55、5~62、1~46、1~55、1~52、1~53、4~52、4~53、または1~62を含む、項目22に記載の組成物。

(項目24)

前記Nrg4バリエーションは、配列番号1と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%同一である、項目22に記載の組成物。

30

(項目25)

検査個体由来の検体におけるNrg4水準を判定する工程を含む、検査個体における代謝障害を診断する方法であって、この中で、正常個体におけるNrg4水準と比較して該検査個体において低いNrg4水準は、当該容態を示唆しておりかつこの中で、該正常個体は、該代謝障害に罹患していないことが判っている、該方法。

(項目26)

個体由来の検体におけるNrg4水準を検出する工程を含む、個体における代謝障害を診断するための方法であって、この中で、同じ個体における先行Nrg4水準と比較して低いNrg4水準は、該代謝障害を示唆している、該方法。

40

(項目27)

検査個体由来の検体におけるNrg4水準を判定する工程を含む、該検査個体における代謝障害に対する易罹患性を判定するための方法であって、この中で、正常な個体由来の検体におけるNrg4水準と比較して低い、該検査個体におけるNrg4水準は、該容態に対する易罹患性を示しており、かつこの中で、該正常な個体は、該代謝障害に罹患していないことが判っている、該方法。

(項目28)

個体由来の検体におけるNrg4水準を検出する工程を含む、個体における代謝障害に対する易罹患性を判定するための方法であって、この中で、同じ個体における先行Nrg

50

4水準と比較して低いNrg4水準は、該代謝障害に対する易罹患性を示唆している、該方法。

(項目29)

個体由来の検体におけるNrg4水準を経時的に判定する工程を含む、個体における代謝障害の進行を判定するための方法であって、この中で、経時的なNrg4水準の低下は、代謝障害の進行を示唆している、該方法。

(項目30)

個体由来の検体におけるNrg4水準を判定する工程を含む、該個体における代謝障害の治療の有効性をモニターするための方法であって、この中で、経時的なNrg4水準の上昇は、有効な治療を示唆している、該方法。

(項目31)

前記代謝障害は、非アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD)、脂肪性肝炎、II型糖尿病、高血糖、高脂血症、脂質異常血症、肥満、高インスリン血症、インスリン抵抗性、高コレステロール血症、非家族性高コレステロール血症、家族性高コレステロール血症、ヘテロ接合性家族性高コレステロール血症、ホモ接合性家族性高コレステロール血症、混合型脂質異常血症、粥状硬化症、早発性冠動脈性心疾患、脂質異常血症、高トリグリセリド血症、高脂肪酸血症、及び硬変症からなる群から選択される、項目25~30のいずれか一項に記載の方法。

(項目32)

Nrg4水準は、Nrg4の血清タンパク質濃度の尺度である、項目25~31のいずれか一項に記載の方法。

(項目33)

Nrg4水準は、NRG4 mRNA水準の尺度である、項目25~31のいずれか一項に記載の方法。

(項目34)

Nrg4水準は、Nrg4活性の尺度である、項目25~31のいずれか一項に記載の方法。

(項目35)

前記Nrg4活性は、特異的な結合の活性である、項目34に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】ヒト及びマウスのNrg4タンパク質配列の整列。EGF様ドメインは、3つの保存されたジスルフィド結合(Cys残基を連結する棒)を特徴とする。推定N連結型グリコシル化部位(N³⁹YT)、タンパク質分解性開裂部位(矢印)、及び予測された膜貫通ドメイン(TM)が示されている。ヒト及びマウスのNrg4のEGF様ドメイン(アミノ酸1~およそアミノ酸52)が高度に保存されていることに留意されたい。

【図2】脂肪組織における及び培養脂肪細胞におけるNrg4の発現。(A)異なる組織におけるNrg4 mRNAのTaqman定量的PCR分析。Nrg4は、褐色脂肪組織(BAT)及び白色脂肪組織(WAT)において豊富に発現する。3匹のC57BL/6JマウスからプールしたRNA試料を分析した。(B)Nrg4 mRNA発現は、褐色脂肪細胞(上)及び白色脂肪細胞(3T3-L1、下)の分化中に誘導される。UCP1及びPPARは、分化マーカーとして含まれた。示しているのは、1つの代表的な試験の三つ組ウェル由来の平均±標準偏差である。

【図3】Nrg4欠損マウスは、寒冷耐性があり、正常な寒冷誘導性熱産生を有する。(A)寒冷曝露後の野生型マウス及びNrg4ノックアウトマウスの直腸温。マウスを大気温から4℃へと合計4時間転移させ、食餌及び水を自由摂取とした。(B)肩甲骨間褐色脂肪組織の組織学的反応(ヘマトキシリン・エオシン)(尺度棒=100µm)。(C)大気室温(室温、野生型=5、ノックアウト=6)または寒冷温度(寒冷、野生型=5、ノックアウト=7)へ曝露したマウスにおけるBAT遺伝子発現の定量的PCR分析。(D)寒冷曝露後の野生型マウス及びNrg4ノックアウトマウスにおける血漿トリグリセ

10

20

30

40

50

リド類 (TG)、ケトン (β-ヒドロキシブチラート)、及び非エステル化脂肪酸 (NEFA) の濃度。

【図4】Nr g 4 のEGF様ドメインは、肝細胞へ結合する。(A)分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) 対照またはSEAP-Nr g 4融合タンパク質 (アミノ酸1~62) の概略図。(B)SEAP-Nr g 4^{N62}は、肝細胞へ特異的に結合するが、褐色脂肪組織、心臓、筋肉、及び脾臓における細胞へは結合しない。(C)過剰のGST-Nr g 4^{N62}融合タンパク質は、肝細胞に存在するNr g 4結合部位と競合する。肝臓切片を、3.0 µg/mLのGSTまたはGST-Nr g 4組換えタンパク質の存在下でSEAP-Nr g 4^{N62}とともにインキュベートした。

【図5】肥満による脂肪Nr g 4発現の調節。(A)痩身マウスまたは食餌誘発性肥満マウス由来の白色脂肪組織及び褐色脂肪組織におけるNr g 4 mRNA水準の定量的PCR分析。野生型C57BL/6J雄マウスを標準食 (n=5) または高脂肪食 (n=6) で3か月間維持した。定量的PCR分析のために、全RNAを脂肪組織から単離した。(B)野生型マウス (n=5) またはレプチン受容体欠損db/dbマウス (n=6) 由来の脂肪組織におけるNr g 4 mRNA水準の定量的PCR分析。A~Bにおけるデータは平均±平均の標準誤差。* p < 0.05。(C)標準食 (n=3) または高脂肪食 (n=3) を摂餌したマウス由来の精巢上体白色脂肪組織から分離した間質血管画分 (SVF) 及び脂肪細胞画分におけるNr g 4 mRNA水準の定量的PCR分析。* p < 0.01標準食対高脂肪食。(D)ビヒクル(-)またはTNF (10 ng/mL) を用いて示した時間処理した成熟3T3-L1脂肪細胞におけるNr g 4発現。示しているのは、1つの代表的な試験の三つ組ウェル由来の平均±標準偏差である。* p < 0.01 TNF 対ビヒクル。

【図6】Nr g 4発現水準と代謝パラメータの間の相関。1群54匹の野生型C57BL/6J雄マウスに高脂肪食を2か月間摂餌した。精巢上体白色脂肪組織における相対的なNr g 4 mRNA発現及び代謝パラメータを測定した。(A~B) Nr g 4 mRNA発現は、体重 (A) 及び精巢上体白色脂肪重量 (B) と逆相関している。(C)高いNr g 4 (下側の箱) 及び低いNr g 4 (上側の箱) の発現水準はそれぞれ、低い及び高い血糖値と関係している。(D)高いNr g 4 (下側の箱) 及び低いNr g 4 (上側の箱) の発現水準はそれぞれ、低い及び高い肝脂肪含有量と関係している。

【図7】Nr g 4欠損は、食餌誘発性のインスリン抵抗性及び高脂血症を悪化させる。(A)標準食または高脂肪食 (HFD) を摂餌した野生型マウス (黒色、n=8) 及びNr g 4ノックアウトマウス (灰色、n=9) の体重。血漿レプチン水準をHFD摂餌8週間後に測定した。(B)摂餌条件及び絶食条件下で測定した血漿グルコース及び血漿インスリンの水準。(C)トリグリセリド、総コレステロール、及びβ-ヒドロキシブチラートの血漿濃度。データは平均±平均の標準誤差を表す。* p < 0.05。

【図8】Nr g 4欠損は、食餌誘発性脂肪肝を悪化させる。(A)高脂肪食を7週間摂餌した野生型マウス (黒色、n=9) 及びNr g 4ノックアウトマウス (灰色、n=8) における肝トリグリセリド含有量。データは平均±平均の標準誤差を表す。* p < 0.05。(B)高脂肪食7週間後の野生型マウス及びNr g 4ノックアウトマウス由来の精巢上体白色脂肪組織及び肝臓の切片のヘマトキシリン・エオシン染色。尺度棒 = 100 µm。

【図9】脂肪組織におけるNr g 4の遺伝子導入 (トランスジェニック) 発現は、マウスを食餌誘発性代謝障害から保護する。(A)脂肪特異的Nr g 4トランスジェニックマウス (TG) は、食餌誘発性肥満から保護される。(B)高脂肪食摂餌8週間後の野生型マウス (n=10) 及びトランスジェニックマウス (n=9) における血漿レプチン濃度。(C)野生型マウス及びトランスジェニックマウスにおける血漿グルコース (摂食時及び絶食時)、総コレステロール (摂食時)、及びβ-ヒドロキシブチラート (絶食時) の濃度。A~Cにおけるデータは、平均±平均の標準誤差を表す。* p < 0.05。

【図10】Nr g 4トランスジェニックマウスは、よりグルコース耐性、インスリン感受性があり、かつ食餌誘発性脂肪肝から保護される。(A)高脂肪食10週間後の野生型マウス及びトランスジェニックマウスにおける糖負荷試験。(B)高脂肪食12週間後の野

10

20

30

40

50

生型マウス及びトランスジェニックマウスにおけるインスリン耐性試験。A～Bにおけるデータは、平均±平均の標準誤差を表す（ $n = 8 \sim 10$ ）。* $p < 0.05$ 。（C）高脂肪食を11週間摂餌した野生型マウス（灰色、 $n = 9$ ）及びトランスジェニックマウス（黒色、 $n = 9$ ）における肝トリグリセリド含有量。データは平均±平均の標準誤差を表す。* $p < 0.05$ 。（D）精巣上体白色脂肪組織及び肝臓の切片のヘマトキシリン・エオシン染色。

【図11】高脂肪食摂餌11週間後の野生型マウス及びトランスジェニックマウスにおける肝臓遺伝子発現に関する定量的PCR分析。データは平均±平均の標準誤差を表す。* $p < 0.05$ 。

【図12】組換えNr g 4は、食餌誘発性肥満マウスにおける血中グルコースを低下させる。高脂肪食を摂餌した肥満マウスにGSTまたはGST-Nr g 4^{N62}を2回（体重1gあたり4 μ g）、合計6時間腹腔内注射した。Nr g 4は、インスリン分泌を促進することを経ることなく、血糖値を低下させることに留意されたい。

【図13】2型糖尿病及び非アルコール性脂肪肝疾患を治療するための有望な治療用生物製剤としてNr g 4を示すモデル。Nr g 4は、血中グルコース及び血中脂質を低下させるとともに肝脂肪含有量を減少させるよう肝臓に作用する脂肪細胞由来のホルモンである。

【図14】Nr g 4の細胞外断片の放出に重要なアミノ酸のマッピング。SEAP-Nr g 4融合ベクターをSEAPcDNAと全長のNr g 4（アミノ酸1～115）の間に構築し、HEK293細胞中へと一過性にトランスフェクトした。アラニン突然変異の位置をイムノプロットの上に示す。条件培地及び全細胞溶解物を収集し、抗SEAP抗体を用いたイムノプロットングによって分析した。アミノ酸53～54または53の突然変異が、培地中への融合タンパク質の分泌を顕著に減少させたことに留意されたい。

【図15】肥満のマウスモデルにおける褐色脂肪組織及び白色脂肪組織におけるNr g 4の低い発現。（A）痩身マウス（白色の棒）または肥満マウス（黒色の棒）由来の精巣上体白色脂肪（eWAT）及び褐色脂肪組織におけるNr g 4 mRNA発現の定量的PCR分析。食餌誘発性肥満のために、野生型雄マウスに標準食（ $n = 5$ ）または高脂肪食（ $n = 6$ ）を3か月間摂餌した。遺伝的肥満のために、野生型マウス（ $n = 3$ ）及びob/obマウス（ $n = 4$ ）からなる群ならびに野生型マウス（ $n = 5$ ）及びdb/dbマウス（ $n = 6$ ）からなる別の群を分析した。（B）痩身マウス（ $n = 3$ ）または食餌誘発性肥満マウス（ $n = 3$ ）由来の精巣上体白色脂肪から分離した間質血管画分（SVF）及び脂肪細胞画分（Ad）におけるNr g 4 mRNA発現の定量的PCR分析。a～bにおけるデータは平均±平均の標準誤差を表す。* $p < 0.05$ 。（C）ビヒクル（Veh）、TNF（10ng/mL）またはIL1（40ng/mL）を用いて6時間処理した後の分化した褐色脂肪細胞または3T3-L1脂肪細胞におけるNr g 4 mRNA発現の定量的PCR分析。データは、三つ組で実施した1つの代表的な試験由来の平均±標準偏差を表す。* $p < 0.05$ 対ビヒクル。

【図16】Nr g 4欠損は、食餌誘発性肥満を悪化させ、かつ血漿トリグリセリド水準を高める。（A）標準食または高脂肪食を摂餌した野生型マウス（黒色、 $n = 8$ ）及びNr g 4ノックアウトマウス（灰色、 $n = 9$ ）における体重、体脂肪率、及び%除脂肪体重。（B）摂餌条件下及び絶食条件下での野生型マウス及びNr g 4ノックアウトマウスにおける血漿トリグリセリド水準。（C） α -ヒドロキシブチラートの血漿濃度。データは平均±平均の標準誤差を表す。* $p < 0.05$ 。

【図17】Nr g 4欠損は、食餌誘発性脂肪肝を悪化させる。（A）高脂肪食を7週間摂餌した野生型マウス（黒色、 $n = 9$ ）及びNr g 4ノックアウトマウス（灰色、 $n = 8$ ）における肝トリグリセリド含有量。データは平均±平均の標準誤差を表す。* $p < 0.05$ 。（B）高脂肪食7週間後の野生型マウス及びNr g 4ノックアウトマウス由来の褐色脂肪組織、精巣上体白色脂肪組織及び肝臓の切片に関するヘマトキシリン・エオシン染色。尺度棒 = 100 μ m。

【図18】Nr g 4欠損マウスは、高脂肪食誘発性のより重症な耐糖能障害及びインスリン抵抗性を発症した。（A）高脂肪食を摂餌した野生型マウス及びノックアウトマウスに

10

20

30

40

50

における摂餌時及び絶食時血糖値及び絶食時血漿インスリン水準。(B)高脂肪食で13週間後の野生型マウス(n=7、黒色菱形、黒色線)及びNrg4ノックアウトマウス(n=7、白色正方形、赤色線)における糖負荷試験。(C)高脂肪食で15週間後の野生型マウス(n=7)及びNrg4ノックアウトマウス(n=9)におけるインスリン耐性試験。データは、平均±平均の標準誤差を表す。* p < 0.05、ノックアウト対野生型。

【図19】Nrg4欠損は、肝脂肪生成遺伝子プログラムの異常な活性化を促進する。(A)自由摂餌の野生型マウス及びNrg4ノックアウトマウスにおける肝遺伝子発現の定量的PCR分析。データは、平均±平均の標準誤差を表す。* p < 0.05、ノックアウト対野生型。(B)肝組織を高脂肪食摂餌の野生型マウス及びNrg4ノックアウトマウスから抽出し、定量的PCR分析及びイムノブロットング分析のために加工した。示される抗体を用いた全肝溶解物のイムノブロット(上); pSREBP1は、SREBP1タンパク質前駆体を示す。肝核抽出物を用いた核SREBP1(nSREBP1)のイムノブロット(下)。ラミンA/Cイムノブロットは、搭載対照として含まれた。

【図20】Nrg4は、初代肝細胞におけるLXR活性化による脂質生成遺伝子発現の誘導を減弱させる。SEAPまたはSEAP-Nrg4N62を含有する条件培地の存在下でビヒクルまたはT0901317を用いて処理した初代肝細胞における遺伝子発現の定量的PCR分析。データは、平均±標準偏差を表す。* p < 0.05。

【図21】脂肪組織におけるNrg4の遺伝子導入発現は、食餌誘発性肥満からマウスを保護する。(A)高脂肪食摂餌の前及び12週間後の野生型マウス(黒色の棒、n=10)及びaP2-Nrg4トランスジェニックマウス(Tg、白色の棒、n=9)の成長曲線。(B)体組成。(C)高脂肪食摂餌6週間後の野生型マウス及びaP2-Nrg4トランスジェニックマウスにおける摂餌量及び酸素摂取量。酸素摂取量の値は、体重(真ん中のパネル)及び除脂肪体重(右側のパネル)に対して標準化した。

【図22】Nrg4トランスジェニックマウスは、高脂肪食誘発性代謝障害から保護される。(A)高脂肪食摂餌10週間後の野生型マウス(白色の棒、n=9)及びトランスジェニックマウス(黒色の棒、n=8)における血漿代謝産物濃度。(B)高脂肪食摂餌の野生型マウス(白色の棒、n=9)及びトランスジェニックマウス(黒色の棒、n=8)における摂餌時及び絶食時の血糖値ならびに絶食時血漿インスリン水準。データは平均±平均の標準誤差を表す。* p < 0.05、野生型対トランスジェニック。

【図23】Nrg4トランスジェニックマウスは、高脂肪食誘発性の耐糖能障害及びインスリン抵抗性から保護される。(A)高脂肪食摂餌の野生型マウス(白色、n=9)及びトランスジェニックマウス(黒色、n=8)における耐糖能試験。(B)高脂肪食摂餌の野生型マウス(白色、n=9)及びトランスジェニックマウス(黒色、n=8)におけるインスリン耐性試験。データは、平均±平均の標準誤差を表す。* p < 0.05、野生型対トランスジェニック。

【図24】Nrg4トランスジェニックマウスは、肝脂質生成を減弱させることを通じて高脂肪食誘発性脂肪肝から保護される。(A)高脂肪食摂餌マウスにおける脂肪組織及び肝臓の切片に関するヘマトキシリン・エオシン染色。尺度棒=100µm。(B)肝トリグリセリド含有量。(C)全肝溶解物(上)及び肝核抽出物(下)を用いたイムノブロット。SREBP1前駆体及び核SREBP1の水準がトランスジェニックマウス由来の肝臓において低かったことに留意されたい。(D)自由摂餌の野生型マウス(白色)及びトランスジェニックマウス(黒色)における肝遺伝子発現の定量的PCR分析。データは、平均±平均の標準誤差を表す。* p < 0.05、野生型対トランスジェニック。

【図25】組換えNrg4は、食餌誘発性肥満マウスにおける血中グルコース及び血中インスリンを低下させる。高脂肪食摂餌の肥満マウスにGSTまたはGST-Nrg4^{N62}を1日2回(体重1gあたり4µg)を合計5日間腹腔内注射した。Nrg4はインスリン分泌を促進することを経ることなく血糖値を低下させることに留意されたい。

【発明を実施するための形態】

【0040】

定義 本明細書で使用する場合、用語「Nrg4」(配列番号1)とは、ヒトNRG4

10

20

30

40

50

遺伝子によってコードされるタンパク質を指す。N r g 4 は、他の N R G メンバーとの配列相同性を基に発見された上、115個のアミノ酸からなる前駆体タンパク質をコードすると予測される。N r g 4 は、マウスとヒトの間で高度に保存されており、E G F 様ドメインにおける90%を超えるアミノ酸配列同一性を有する（およそアミノ酸1～52、図1）。したがって、いくつかの実施形態において、用語「N r g 4」とは、配列番号2、すなわち、マウス N R G 4 遺伝子によってコードされるタンパク質を指す。

【0041】

本明細書で使用する場合、用語「治療すること」または「治療」とは、疾患または容態の変化または改善をもたらすために、治療有効量の N r g 4、N r g 4 バリエーション、またはこれらの生物活性のある断片を、本明細書に説明するとおり、治療を必要とする患者へ投与することを指す。ある態様における治療は、容態の時間経過を変化させるために単回用量または規則的な間隔で複数回用量の投与を必要とする。

10

【0042】

本明細書で使用する場合、「投与すること」とは、ヒト患者を含む動物へ医薬剤を提供することを意味し、医療専門家によって投与すること及び自己投与を含むがこれらに限定されない。

【0043】

本明細書で使用する場合、用語「併用投与」とは、ヒト患者を含む動物への2つ以上の医薬剤の投与を指す。ある態様において、医薬剤は、単一の医薬組成物中にまたは別個の医薬組成物中にある。併用投与には、同じまたは異なる経路の投与を通じて各医薬剤を投与することを含む。併用投与はまた、並列のまたは連続した投与を包含する。

20

【0044】

本明細書で使用する場合、用語「治療有効量」とは、治療上の利益をヒト患者を含む動物へ提供する医薬剤の量を指す。

【0045】

本明細書で使用する場合、「医薬として許容し得る担体」には、当業者に公知であるように、溶媒、分散倍体、被膜、界面活性剤、抗酸化物質、保存料（例えば、抗菌薬、抗真菌薬）、等張剤、吸収遅延剤、塩類、保存料、薬剤、薬剤安定化剤、ゲル、結合剤、賦形剤、崩壊剤、潤滑剤、甘味料、香味剤、色素、これらのこのような類似の材料及び組み合わせのいずれか及びすべてを含む（Remington's, 1990）。

30

【0046】

本明細書で使用する場合、用語「代謝障害」とは、代謝機能における変化または攪乱を特徴とする容態を指す。「代謝の」及び「代謝」は、当該技術分野で周知の用語であり、概して、生体内で生じる全範囲の生化学的過程を含む。

【0047】

本発明の N r g 4 バリエーションは、特定の残基において天然アミノ酸の保存的置換を含んでもよい。共通の側鎖特性を共有しかつ保存的置換を発生させるのに適したアミノ酸残基は、以下の通り分類される。すなわち、

- (1) 疎水性：ノルロイシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、
- (2) 中性親水性：システイン、セリン、トレオニン、
- (3) 酸性：アスパラギン酸、グルタミン酸、
- (4) 塩基性：アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン、リジン、アルギニン、
- (5) 鎖の向きに影響する残基：グリシン、プロリン、及び
- (6) 芳香族：トリプリン、チロシン、フェニルアラニン

40

である。

【0048】

N r g 4

シグナル伝達リガンドのニューレグリンファミリーのメンバーであるニューレグリン4 (N r g 4) は、血漿グルコース及び脂質水準ならびに N A F L D の発症を調節する新規

50

の脂肪由来ホルモンとして本明細書で発見された。Nr g 4 発現は、脂肪組織において非常に豊富であり、褐色脂肪細胞及び白色脂肪細胞の分化の間に誘導される。結合アッセイを用いたところ、Nr g 4 は、飽和可能な様式で推定受容体（または複数の受容体）を通じて肝細胞へ排他的に結合することが発見された。脂肪細胞におけるNr g 4 発現の水準は、マウスにおける肥満の食餌誘発性モデル及び遺伝的モデルにおいて有意に低下しており、Nr g 4 の不全が肥満関連代謝障害の発症に寄与するかもしれないことを示唆している。このことを支持して、Nr g 4 欠損マウスは、高脂肪食摂餌後により重症な高血糖、高脂血症、及び脂肪肝を発症した。対照的に、Nr g 4 の脂肪特異的遺伝子導入発現は血中のグルコース及び脂質を低下させ、肝臓の脂肪含有量を減少させた。本明細書に説明される研究は、代謝の恒常性維持を維持する上での有益な役割を担っている新規の脂肪由来ホルモンとしてNr g 4 を確立した。このようなものとして、Nr g 4 の治療的標的化は、例えば2型糖尿病、高脂血症、及び非アルコール性脂肪肝疾患を治療するための新たな手段を提供する。

10

【0049】

本明細書で提供される方法には、投与されることになっているNr g 4 が配列番号1と少なくとも45%同一、少なくとも50%同一、少なくとも55%同一、少なくとも60%同一、少なくとも65%同一、少なくとも70%同一、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも96%同一、少なくとも97%同一、少なくとも98%同一、または少なくとも99%同一のNr g 4 バリエーションである方法を含む。

20

【0050】

本発明のNr g 4 バリエーションは、特定の残基において天然アミノ酸の保存的置換を含んでもよい。共通の側鎖特性を共有しかつ保存的置換を発生させるのに適したアミノ酸残基は、以下の通り分類される。すなわち、

- (1) 疎水性：ノルロイシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、
- (2) 中性親水性：システイン、セリン、トレオニン、
- (3) 酸性：アスパラギン酸、グルタミン酸、
- (4) 塩基性：アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン、リジン、アルギニン、
- (5) 鎖の向きに影響する残基：グリシン、プロリン、及び
- (6) 芳香族：トリプリン、チロシン、フェニルアラニン

30

である。

【0051】

また、本開示において想定されるのは、Nr g 4 の不十分な水準または活性を特徴とする容態を治療するための、Nr g 4 の1つ以上の生理活性のある断片の投与を含む方法である。Nr g 4 断片としては、配列番号1の最初の4つの残基を欠失するNr g 4 断片、配列番号1のアミノ酸残基5~46、5~55、5~62、1~46、1~55、1~52、1~53、4~52、4~53、または1~62を含むまたはこれらからなる断片が挙げられるが、それらに限定されない。当業者は、関連の生物学的アッセイにおいて活性についてスクリーニングすることによって活性断片について容易にスクリーニングすることができる。種々の実施形態において、Nr g 4 断片は、アミノ酸残基x~yを含み、またはこれらからなり、この中で、xは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、または55であり、かつyは26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、

40

50

84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、または115である。

【0052】

提供される方法における使用のためのNrg4、Nrg4バリエーション、またはこれらの生物活性のある断片は、当該技術分野で公知のいずれかの方法に由来する。例えば、一態様におけるNrg4は、内在性Nrg4を発現する細胞に由来する。あるいは、Nrg4、そのバリエーション、または断片の源は、Nrg4またはその前駆体をコードする核酸ベクターを用いて形質転換した細胞に、ならびに種々の態様において、有用な源組換えタンパク質である哺乳類動物細胞、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、生体全体、または他の細胞

10

【0053】

Nrg4のN末端断片(Nrg4のアミノ酸1~およそアミノ酸52)は、EGF様ドメインを含有し、肝細胞上で該N末端断片の受容体へ結合することができる。哺乳類動物細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)から産生及び精製される合成ペプチドまたは組換えNrg4)を使用して、血糖値を低下させてもよい。Nrg4を用いた長期治療は、遺伝子導入Nrg4発現によって惹起される効果と同様に、肝脂肪含有量を低下させることがある。合成ペプチドはとりわけ、N末端アセチル化、C末端アミド化、アシル化、グリコシル化及びペグ化を用いて修飾され、薬物動態特性をさらに改善することができる。加えて、Nrg4の生物活性を保有するより小さなペプチドを使用してもよい。

20

【0054】

Nrg4タンパク質の組換え産生のために、組換えNrg4タンパク質をコードしかつ細菌細胞、哺乳類動物細胞、または昆虫細胞におけるタンパク質発現に対処する配列を制御する単離されたDNAベクター及び/または組換えベクターが提供される。いくつかの場合において、組換えNrg4をコードする配列が、組換えタンパク質精製を容易にすることができるがこれに限定されない追加的なアミノ酸配列と融合されるべきであることは望ましい。例えば、一態様において、発現したNrg4タンパク質は、1つ以上のヒスチジンタグ、グルタチオンS-転移酵素(GST)配列、マルトース結合タンパク質(MBP)配列、旗配列及び/またはmycタグ付きRGT配列を含む融合タンパク質として発現する。組換えタンパク質の精製を支援するこれらの追加的な配列は任意に、プロテアーゼ

30

【0055】

Nrg4の活性または発現を調節することのできる化合物 Nrg4発現を調節する化合物(すなわち、Nrg4調節因子)も本開示の範囲内であるよう想定される。Nrg4発現は、肥満において重度に抑止されるので、脂肪細胞におけるNrg4発現を回復する化合物または治療が治療上の利益を生じるよう使用されてもよいことは見込める。Nrg4発現が、TNFなどの炎症性シグナルによって阻害されることは本明細書で実証される。このようなものとして、脂肪細胞におけるNrg4水準を回復させる抗炎症性化合物は、本開示の範囲内にあるとみなされる。

【0056】

Nrg4放出/活性化を調節する化合物(すなわち、Nrg4調節因子)も本開示の範囲内であるよう想定される。Nrg4は、タンパク質分解性開裂及び放出または膜結合型タンパク質からのNrg4可溶性細胞外ドメインの放出を受ける膜貫通タンパク質前駆体として合成される。組織及び循環への可溶性Nrg4の放出は、Nrg4を活性化させるために重要である。Nrg4を開裂させる実際のプロテアーゼの識別は公知ではないままである。この不確実性にもかかわらず、放出事象を活性化させかつ活性のあるNrg4の放出を高める化合物は、投与されるNrg4と類似の代謝上の利益を達成するためにスクリーニングして使用してもよい。

40

【0057】

Nrg4の回転置換を調節する化合物(すなわち、Nrg4調節因子)も、本開示の範

50

圈内であるよう想定される。多くのホルモンは、循環中での迅速な回転置換を受ける。Nrg4のタンパク質分解性分解を遮断する化合物は、血漿中のNrg4の濃度を高め得かつ代謝上の利益を達成し得る。

【0058】

Nrg4受容体の結合及びシグナル伝達を調節する化合物（すなわち、Nrg4調節因子）も、本開示の範囲内であるよう想定される。Nrg4の受容体へのNrg4の結合を改善しかつ下流のシグナル伝達事象を補強する追加的な化合物を用いて、標的細胞におけるNrg4作用を長期化及び/または亢進させてもよい。

【0059】

Nrg4投与によって治療される容態 提供される方法は、Nrg4、Nrg4バリエーションまたはこれらの生物活性のある断片の投与によって緩和することのできるいずれかの容態の治療に利用される。提供される方法のいくつかの態様において、当該容態は、代謝障害である。例示的な代謝障害としては、2型糖尿病、高血糖、高インスリン血症、インスリン抵抗性、及び肥満が挙げられるが、これらに限定されない。他の態様において、当該容態は、非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）、脂肪性肝炎、高脂血症、脂質異常血症、高コレステロール血症、非家族性高コレステロール血症、家族性高コレステロール血症、ヘテロ接合性家族性高コレステロール血症、ホモ接合性家族性高コレステロール血症、混合型脂質異常血症、粥状硬化症、早発性冠動脈性心疾患、脂質異常血症、高トリグリセリド血症、高脂肪酸血症、及び硬変症である。方法はまた、Nrg4、Nrg4バリエーション、またはこれらの生物活性のある断片の投与が、高い脂質水準を特徴とする障害または容態を治療するためである方法を含み、このような脂質としては、LDL-C、アポB、VLDL-C、IDL-C、非HDL-C、Lp(a)、血清トリグリセリド、肝トリグリセリド、Ox-LDL-C、小LDL粒子、小VLDL、リン脂質、及び酸化型リン脂質が挙げられる。

【0060】

いくつかの実施形態において、Nrg4、Nrg4バリエーション、またはこれらの生物活性のある断片の投与によって緩和することのできる容態は、健常患者由来の脂肪組織におけるNRG4の発現と比較して、脂肪組織におけるNRG4の低い発現を特徴とする。脂肪組織は、褐色脂肪組織または白色脂肪組織であることができる。

【0061】

Nrg4、Nrg4バリエーション、またはこれらの生物活性のある断片の投与によって治療可能な容態を示す「NRG4の低い発現」とは、容態のないことが判っている個体由来の検体中のNRG4発現と比較して、容態のあることが判っている個体由来の検体中の低水準のNRG4発現として定義してもよい。NRG4発現の水準は例えば、当該容態を罹患している個体由来の検体において少なくとも1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2.0倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍、3.0倍、3.1倍、3.2倍、3.3倍、3.4倍、3.5倍、3.6倍、3.7倍、3.8倍、3.9倍、4.0倍、4.1倍、4.2倍、4.3倍、4.4倍、4.5倍、4.6倍、4.7倍、4.8倍、4.9倍、5.0倍、5.1倍、5.2倍、5.3倍、5.4倍、5.5倍、5.6倍、5.7倍、5.8倍、5.9倍、または6.0倍低くあり得る。

【0062】

いくつかの実施形態において、Nrg4、Nrg4バリエーション、またはこれらの生物活性のある断片の投与によって緩和することのできる容態は、脂肪細胞と体組織の間の異常な情報伝達である。

【0063】

理論によって結び付けられるよう望むことなく、投与されたNrg4、Nrg4バリエーション、またはこれらの生物活性のある断片は、新規の脂質生成に關与する遺伝子の発現を負に調節する。この肝脂質生成の下方調節は、Nrg4の有益な代謝効果の基礎となりそうである。

10

20

30

40

50

【0064】

組成物及び製剤化

最適なNr g 4またはNr g 4調節因子の製剤化は、投与経路及び所望の薬用量に応じて、当業者によって判断される。このような製剤化は、投与される薬剤の物理的な状態、安定性、生体内での放出速度、及び生体内でのクリアランス速度に影響するかもしれない。

【0065】

本明細書に説明される前記代表的なNr g 4またはNr g 4調節因子の剤形のほかに、医薬として許容し得る賦形剤及び担体は概して、当業者に公知であり、したがって本発明において含まれる。このような賦形剤及び担体は、例えば、「レミントンの医薬の科学 (Remingtons Pharmaceutical Sciences)」 Mac k Pub . Co . , ニュージャージー州において説明される。

10

【0066】

本発明に従った使用のためのNr g 4またはNr g 4調節因子を含む医薬組成物は、医薬として使用することのできる調製物中への治療用組成物の加工を容易にする賦形剤及び補助剤を含む1つ以上の生理学的に許容され得る担体を用いて、従来の様式で製剤化される。これらの医薬組成物は、それ自体公知の様式で、例えば、従来混合、溶解、造粒、糖衣錠製造、練り粉状化、乳化、カプセル化、封入または凍結乾燥の加工によって製造され得る。適切な製剤化は、選択される投与の経路による。

【0067】

治療有効量のNr g 4またはNr g 4調節因子の組成物が、例えば皮内、経皮または皮下注射によって投与される場合、当該組成物は、一態様において、発熱物質非含有の非経口的に許容され得る水溶液の形態である。pH、等張性、安定性、及びこれらに類するものに対する当然の顧慮を有するこのような非経口的に許容され得るタンパク質またはポリヌクレオチドの溶液の調製は、当該技術分野における技術内である。組成物は任意に、本発明のNr g 4、Nr g 4調節因子または他の有効成分に加えて、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、デキストロース注射液、デキストロース及び塩化ナトリウム注射液、乳酸化リンゲル注射液、または当該技術分野で公知のような他のビヒクルなどの等張性ビヒクルを含有する。Nr g 4またはNr g 4調節因子組成物は、別の態様において、安定化剤、保存料、緩衝液、抗酸化物質、または当業者に公知の他の添加物も含有する。本発明の薬剤は、水溶液中で、好ましくはハックス溶液、リンゲル溶液、または生理学的塩類緩衝液などの生理学的に適合性のある緩衝液中で製剤化される。経粘膜投与については、浸透させられるべき関門に適した浸透剤を製剤中に使用する。このような浸透剤は概して、当該技術分野で公知である。

20

30

【0068】

Nr g 4またはNr g 4調節因子の製剤化は、ある態様において、以下に説明するような短時間作用性、迅速放出性、長期間作用性、または持続放出性であるよう設計される。したがって、医薬製剤の1つの型は、徐放のためにまたは遅延放出のために製剤化される。本Nr g 4またはNr g 4調節因子は、他の態様において、例えばミセルもしくはリポソームまたはいくつかの他のカプセル化形態を含み、あるいは、長期の貯蔵及び/または送達の効果を提供するために延長放出形態で投与してもよい。それゆえ、医薬的Nr g 4またはNr g 4調節因子の製剤化は任意に、ペレットもしくはシリンダへと圧縮され、デポー注射液としてまたはステントなどのインプラントとして筋肉内にまたは皮下に植え込まれる。このようなインプラントは、シリコン及び生分解性重合体などの公知の不活性材料を採用してもよい。

40

【0069】

経口投与については、前記組成物は、前記活性のある化合物を、当該技術分野で周知の医薬として許容し得る担体と組み合わせることによって容易に製剤化することができる。このような担体によって、本発明の化合物は、治療されることになっている患者による経口消化のために、錠剤、丸薬、糖衣錠、散剤、カプセル剤、液体、液剤、ゲル剤、シロツ

50

ブ剤、スラリー剤、懸濁剤及びこれらに類するものとして製剤化することができる。

【0070】

吸入による投与については、本発明による使用のための組成物は、適切な噴出剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適切な気体の使用とともに、加圧パックまたは噴霧器からのエアゾールスプレー体裁の形態で簡便に送達される。

【0071】

非経口投与のための N r g 4 または N r g 4 調節因子を含む組成物には、水溶性形態における組成物の水溶液を含む。任意で、前記懸濁剤は、組成物の溶解度を高めて、非常に濃縮した溶液の調製を可能にする適切な安定化剤または薬剤も含有してもよい。あるいは、有効成分は、使用前に、適切なビヒクル、例えば、殺菌した発熱物質非含有水を用いた構成のための粉末形態であってもよい。

10

【0072】

前記組成物はまた、例えば、カカオバターまたは他のグリセリドなどの従来の坐薬基剤を含有する坐薬または保持浣腸などの直腸組成物中に製剤化してもよい。すでに説明した製剤に加えて、前記化合物はまた、デポー調製物としても製剤化してもよい。このような長期作用製剤は、植え込みによって（例えば、皮下的にまたは筋肉内に）または筋肉内注射によって投与してもよい。したがって、例えば、当該組成物は、適切な重合体材料もしくは疎水性材料とともに（例えば、許容され得る油におけるエマルジョンとして）、またはイオン交換樹脂として、あるいは、難溶性 (sparingly soluble) 誘導体として、例えば難溶性塩として製剤化してもよい。

20

【0073】

前記組成物は、適切な固体またはゲル層の担体または賦形剤も含んでもよい。

【0074】

本発明の組成物は、タンパク質またはペプチド抗原とともに本発明のタンパク質または他の有効成分からなる複合体の形態であってもよい。

【0075】

前記組成物は、発達中の骨及び軟骨のための構造を提供しかつ身体へと最適に再吸収することができるよう、タンパク質含有組成物または他の有効成分含有組成物を組織損傷部位へ送達することのできるマトリックスを含んでもよい。このようなマトリックスは、他の植え込まれた医用適用のための現に使用中の材料から形成してもよい。マトリックス材料の選択は、生体適合性、生分解性、機械的特性、化粧上の様相及び界面特性を基にしている。

30

【0076】

前記組成物はさらに、タンパク質もしくは他の有効成分の活性を高めるかまたは治療におけるその活性もしくは使用を補強するかのいずれかである他の薬剤を含有してもよい。このような追加的な因子及び/または薬剤は、本発明のタンパク質または他の有効成分との相乗効果を生み出すために、あるいは副作用を最小限にするために、医薬組成物中に含んでもよい。

【0077】

本出願の治療用組成物の製剤化及び投与のための技術は、「レミントンの医薬の科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences)」, Mack Publishing Co. ペンシルバニア州イーストン市、最新版において見出され得る。個々の有効成分へ適用され、単独で投与される場合、治療有効量とは、当該成分単独を指す。併用へ適用される場合、治療有効量とは、併用であろうと、連続的であろうとまたは同時に投与されるであろうと、治療効果を結果的に生じる有効成分の組み合わせられた量を指す。

40

【0078】

(投与)

提供される方法による N r g 4 または N r g 4 調節因子の投与は、いずれかの経路を介

50

してである。従来の投与経路、例えば、非経口的、皮下的、静脈内、皮内、筋肉内、乳腺内、腹腔内、髄腔内、眼内、球後、肺内、気管内点滴、気管支内点滴、エアゾール、舌下、経口、鼻内、肛門内、膈内、または経皮送達、あるいは特定部位における外科的植え込みによるものが企図される。具体的に企図されるのは、静脈内投与を含む方法である。

【0079】

提供される方法における治療は、種々の態様において、単回用量または経時的な複数回用量からなる。Nr g 4またはNr g 4調節因子の投与は全身的または局所的であり、及び治療有効量のNr g 4タンパク質組成物の単回部位注射または注入を含んでもよい。あるいは、治療用Nr g 4またはNr g 4調節因子組成物が、前記患者へ複数の部位で送達されることが企図される。複数回投与は、同時に与えられまたは経時的に投与される。また企図されるのは、Nr g 4またはNr g 4調節因子が期間ベースで、例えば毎日、毎週、または毎月投与される追加的な療法である。

10

【0080】

ある実施形態において、治療用化合物の非経口投与は、初回のボラスの後に連続注入を用いて実施して、薬剤製品の治療循環水準を維持する。当業者は、個々の患者の良好な医学的実施及び臨床容態によって判断するような有効な薬用量及び投与療法を容易に最適化する。提供される方法には、Nr g 4が経口的に及び注射によって投与されるものを含む。Nr g 4またはNr g 4調節因子が注射される方法において、注射は静脈内または皮下である。ある態様において、注射は、デポー形成組成物を用いてであり、デポー形成を含む実施形態において、デポー形成組成物は、適切な送達装置を患者に植え込むことによって投与される。一態様において、送達装置は皮下に植え込まれ、ある態様において、送達装置はポンプである。

20

【0081】

投薬頻度は、Nr g 4の薬物動態パラメータ及び投与経路による。投与経路に応じて、適切な用量は体重、体表面積または器官の大きさに従って算出される。動物モデルの利用可能性は、与えられる治療薬の適切な薬用量の判断を容易にするうえで特に有用である。

【0082】

適切な治療用量を判断するのに必要な計算のさらなる改善は、過度の実験無しで当業者によって常規に行われる。最終投薬療法は、Nr g 4またはNr g 4調節因子の作用を修飾する因子、例えば、比活性、患者の応答性、患者の年齢、容態、体重、性別及び食事、いずれかの容態の重症度、投与時間、同時治療の種類、もしいずれかがあれば、治療の頻度、及び望ましい効果の性質、ならびに他の臨床的因子を考慮して、担当医によって判断される。研究が実施される場合、具体的な疾患及び容態のための治療に関する適切な薬用量水準及び持続期間に関するさらなる情報が出現する。

30

【0083】

ある実施形態において、Nr g 4またはNr g 4調節因子は単独で投与され、他の実施形態において、Nr g 4またはNr g 4調節因子は、標的容態へ向かうまたはその他の症状へ向かう他の治療薬とともに投与される。薬用量水準のオーダーは、体重1 kg当たり1日当たり約0.01 mg ~ 30 mg、例えば、約0.1 mg ~ 10 mg / kgである。

【0084】

Nr g 4またはNr g 4調節因子の単位薬用量も提供される。「単位用量」は、適切な担体中に分散した治療用組成物の個別の量として定義される。

40

【0085】

Nr g 4またはNr g 4調節因子及び提供される治療方法が人間医学及び獣医学の分野において有用であることは認識される。したがって、治療されることになっている対象は、ヒトまたは他の哺乳類動物などの哺乳類動物である。獣医学的目的のためには、対象としては、例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ及びヤギを含む家畜動物、イヌ及びネコなどの伴侶動物、外来性動物及び/または動物園動物、マウス、ラット、ウサギ、モルモット及びハムスターを含む実験動物、ならびにニワトリ、シチメンチョウ、アヒル及びガチョウなどの家禽が挙げられる。治療中の患者は、いずれかの年齢であり、例えば、10 ~ 5

50

0歳の間の年齢、20歳以下、または10歳以下である。

【0086】

加えて、本発明のNrg4またはNrg4調節因子は、非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）、脂肪性肝炎、II型糖尿病、高血糖、高脂血症、脂質異常血症、肥満、高インスリン血症、インスリン抵抗性、高コレステロール血症、非家族性高コレステロール血症、家族性高コレステロール血症、ヘテロ接合性家族性高コレステロール血症、ホモ接合性家族性高コレステロール血症、混合型脂質異常血症、粥状硬化症、早発性冠動脈性心疾患、脂質異常血症、高トリグリセリド血症、高脂肪酸血症、または硬変症のためのいずれかの本治療とともに使用される。例えば、ある実施形態において、本発明の方法は、わかっている代謝障害、心血管障害及び/または脂質亢進障害の療法との組み合わせで有用であることは企図される。このような療法の前、後または途中で、Nrg4、バリエーションもしくは断片、またはNrg4調節因子を含む組成物は投与される。

10

【0087】

併用療法

提供されるNrg4またはNrg4調節因子組成物を用いた治療の有効性を高めるために、ある態様において、これらの組成物を、具体的な疾患または容態の治療において有効な他の療法と組み合わせることが望ましい。

【0088】

いくつかの場合において、本発明の組成物は、数分から数週間に及ぶ間隔だけ、他の薬剤治療に先行または追従する。両様式を互いの約12～24時間以内にまたは互いの約6～12時間以内に投与することは企図される。いくつかの状況において、それぞれの投与の間で数日（2、3、4、5、6または7）～数週間（1、2、3、4、5、6、7または8）が経過するように、治療のための期間を有意に延長することが望ましい。

20

【0089】

ある具体的な場合において、Nrg4組成物またはNrg4調節因子組成物は、代謝障害を予防または治療するためのあるいは心血管疾患を予防または治療するための第二の薬剤と併用して投与される。例えば、併用療法において有用な薬剤としては、血糖低下薬（すなわち、血糖を低下させる薬剤）または脂質低下薬（すなわち、脂質水準を低下させる薬剤）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0090】

血糖低下薬

目下、2型糖尿病の治療のための種々の薬理的アプローチがある。当該アプローチは、異なる作用様式を介して作用する。すなわち、1)スルホニル尿素（例えば、グリメピリド、グリセンチド、スルホニル尿素、AY31637）は、インスリン分泌を本質的に刺激し、2)ピグアニド（例えば、メトホルミン）は、グルコース利用を促進し、肝グルコース産生を低下させ、及び腸グルコースの生産量を減少させることによって作用し、3) - グルコシダーゼ阻害薬（例えば、アカルボース、ミグリトール）は、炭水化物の消化及び結果的には腸からの吸収を遅延させ、食後高血糖を低下させ、4)チアゾリジンジオン（例えば、トログリタゾン、ピオグリタゾン、ロシグリタゾン、グリピジド、バラグリタゾン、リボグリタゾン、ネトグリタゾン、トログリタゾン、エングリタゾン、AD5075、T174、YM268、R102380、NC2100、NIP223、NIP221、MK0767、シグリタゾン、アダグリタゾン、CLX0921、ダルグリタゾン、CP92768、BM152054）は、インスリン作用を亢進させ、したがって、末梢組織におけるグルコース利用を促進し、5)グルカゴン様ペプチド及びアゴニスト（例えば、エキセンジン）またはその安定化薬（例えば、シタグリプチンなどのDPP4阻害薬）は、グルコース刺激性インスリン分泌を増強し、ならびに6)インスリンまたはその類似体（例えば、LANATUS（登録商標））は、組織グルコース利用を刺激して肝グルコース生産量を阻害する。上記の薬理的アプローチは、個々にまたは併用療法で利用してもよい。

30

40

【0091】

50

脂質低下薬

用語「脂質低下薬」とは、個体における脂質の低下を達成するために個体へ提供される医薬剤を指す。例えば、ある実施形態において、脂質低下薬は、LDL-C、アポB、VLDL-C、IDL-C、非HDL-C、Lp(a)、血清トリグリセリド、肝トリグリセリド、Ox-LDL-C、小LDL粒子、小VLDL、リン脂質、及び酸化型リン脂質のうちの1つ以上を低下させるために個体へ提供される。理想的には、脂質低下薬の投与は、個体における1つ以上の血清脂質の減少を経時的にもたらす。

【0092】

このようなある実施形態において、本発明の医薬組成物と併用投与してもよい脂質低下薬としては、アトルバスタチン、シンバスタチン、ロスバスタチン、プラバスタチン、フルバスタチン、エゼチミブ、ベザフィブラート、シプロフィブラート、クロフィブラート、ゲムフィプロジル、及びフェノフィブラートが挙げられるが、これらに限定されない。このようなある実施形態において、脂質低下薬は、本発明の医薬組成物の投与の前に投与される。このようなある実施形態において、脂質低下薬は、本発明の医薬組成物の投与後に投与される。このようなある実施形態において、脂質低下薬は、本発明の医薬組成物と同時に投与される。このようなある実施形態において、併用投与される脂質低下薬の用量は、当該脂質低下薬が単独で投与される場合に投与される用量と同じである。このようなある実施形態において、併用投与される脂質低下薬の用量は、当該脂質低下薬が単独で投与される場合に投与される用量よりも少ない。このようなある実施形態において、併用投与される脂質低下薬の用量は、当該脂質低下薬が単独で投与される場合に投与される用量よりも多い。

【0093】

キット

本発明はまた、本明細書に説明される障害の治療における使用のためのキットも企図する。このようなキットには、医薬として許容され得る担体中に先に説明されるNrg4（配列番号1）、Nrg4パリアント、またはこれらの生物活性のある断片を含む少なくとも第一の無菌の組成物が含まれる。別の成分は、任意で、治療用組成物の投与に適した容器及びビヒクルとともにある当該障害の治療のための第二の治療薬である。当該キットは任意で、第一及び第二の組成物を懸濁、希釈、当該組成物の送達を果たすための溶液または緩衝液を含む。当該キットはまた、任意で、本発明の方法において使用する組成物のうちの1つ以上の送達のためのカテーテル、注射器または他の送達装置を含む。別の態様において、当該キットは任意でさらに、治療法のための投与プロトコルを含有する説明書を含む。

【0094】

Nrg4欠損を特徴とする容態を診断する方法

本開示はまた、非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）、脂肪性肝炎、II型糖尿病、高血糖、高脂血症、脂質異常血症、肥満、高インスリン血症、インスリン抵抗性、高コレステロール血症、非家族性高コレステロール血症、家族性高コレステロール血症、ヘテロ接合性家族性高コレステロール血症、ホモ接合性家族性高コレステロール血症、混合型脂質異常血症、粥状硬化症、早発性冠動脈性心疾患、脂質異常血症、高トリグリセリド血症、高脂肪酸血症、及び硬変症からなる群から選択される代謝障害の容態を罹患していると疑われる患者由来の検体中のNrg4水準を判定することを含む、当該患者における当該代謝障害を診断する方法も企図する。

【0095】

患者検体におけるNrg4の水準の判定は、当該患者における容態を管理する方法を判断する上で有用であることは認識される。例えば、低水準のNrg4は、代謝障害及び肝疾患と関係しているので、臨床医は、患者の治療に関して行う判断を容易にするために、Nrg4の水準に関する情報を使用してもよい。したがって、Nrg4の水準が上記の容態のうちの1つの初期段階を示す場合、適切な治療法が処方され得る。

【0096】

代謝障害を示すN r g 4の水準は、当該障害のないことが判っている個体由来の検体中のN r g 4水準よりも、当該障害を有することが判っている個体由来の検体中に存在する低水準のN r g 4として定義してもよい。N r g 4の水準は例えば、当該障害を罹患している個体由来の検体において少なくとも1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2.0倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍、3.0倍、3.1倍、3.2倍、3.3倍、3.4倍、3.5倍、3.6倍、3.7倍、3.8倍、3.9倍、4.0倍、4.1倍、4.2倍、4.3倍、4.4倍、4.5倍、4.6倍、4.7倍、4.8倍、4.9倍、5.0倍、5.1倍、5.2倍、5.3倍、5.4倍、5.5倍、5.6倍、5.7倍、5.8倍、5.9倍、または6.0倍低くあり得る。

10

【0097】

本発明の方法が、診断を支援する方法及び予後方法を含むことは認識される。本発明の方法が、患者の管理または治療の時間経過を判断する上で医師に有用であることも認識される。

【0098】

提供される方法を用いて識別されるN R G 4マーカーは、一態様においては治療効果を評価するために使用される（例えば、病因のうちの1つ以上の症状の寛解）。N r g 4欠損と関連した容態の寛解が、N r g 4水準の上昇と関連することができる場合、患者から採取した検体中のN r g 4水準は、治療経過の前（背景のために）及び途中もしくは後（例えば、指定した時刻に、周期的にもしくは無作為に）測定される。N r g 4水準の上昇が一過性であってもよいので、当該方法は一態様において、各治療の前後に密接に規則正しい間隔で実施される（例えば、6時間ごと、12時間ごと、18時間ごと、24時間ごと、2日間ごと、3日間ごと、4日間ごと、5日間ごと、6日間ごと、7日間ごと、8日間ごと、9日間ごと、10日間ごと、11日間ごと、12日間ごと、13日間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、5週間ごと、6週間ごと、7週間ごと、2か月間ごと、3か月間ごと、4か月間ごと、5か月間ごと、6か月間ごと、7か月間ごと、8か月間ごと、9か月間ごと、10か月間ごと、11か月間ごと、毎年、またはそれより長い）。治療経過及び他の臨床的変数に応じて、当業者の臨床医は、診断目的または疾患/治療モニタリング目的のためにアッセイを実施するのに適したスケジュールを判断することができる。

20

30

【0099】

種々の実施形態において、N r g 4タンパク質は、いくつかの十分に認識された免疫学的結合アッセイのうちのいずれかを用いて、検体中で検出及び/または定量化される（例えば、U . S . Pat . No . 4 , 3 6 6 , 2 4 1 , 4 , 3 7 6 , 1 1 0 , 4 , 5 1 7 , 2 8 8 及び 4 , 8 3 7 , 1 6 8 号を参照されたい）。一般的なイムノアッセイに関する総説については、細胞生物学における方法（Methods in Cell Biology）第37巻：細胞生物学における抗体（Antibodies in Cell Biology）、浅井編、Academic Press, Inc. ニューヨーク（1993）、基礎及び臨床の免疫学（Basic and Clinical Immunology）第7版、Stites及びTerr編（1991）も参照されたい。

40

【0100】

別の実施形態において、イムノプロット（ウェスタンプロット）分析は、検体中のN r g 4の存在を検出及び定量するのに使用される。当該技術は概して、分子量を基にしたゲル電気泳動法によって検体のタンパク質を分離すること、当該分離したタンパク質を適切な固体支持体（ニトロセルロース膜、ナイロン膜、または誘導体化ナイロン膜など）へ転移させること、ならびにN r g 4を特異的に結合する抗体とともに当該検体をインキュベートすることを含む。抗N r g 4抗体は、固体支持体上のN r g 4へ特異的に結合する。これらの抗体は直接標識してもよく、またはそれに替わるものとして、抗N r g 4抗体へ特異的に結合する標識した抗体（例えば、標識したヒツジ抗マウス抗体）を用いてその後検出してもよい。

50

【0101】

別の実施形態において、Nrg4の定量的アッセイは、正の結果、例えば、測定されたNrg4水準が対照検体について測定されたまたは公知の水準よりも高いまたは低い場合、高いまたは低いNrg4水準を示すとみなされる（例えば、正常健康個体について公知のもしくは測定された水準、または同じ個体由来の異なる時刻に判定された「基線/参照」水準のいずれか）。特に好ましい実施形態において、当該アッセイは、検体と「対照」の間の差が統計的に有意である場合、正の結果を示すとみなされる（例えば、85%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上及び最も好ましくは98%以上の信頼水準）。

【0102】

本開示の一実施形態において、抗体はNrg4タンパク質を溶液から免疫沈降させ、ならびにポリアクリルアミドゲルのウェスタンまたはイムノブロット上のNrg4タンパク質と反応する。別の実施形態において、抗体は、保存された血清検体中のNrg4タンパク質を検出する。

【実施例】

【0103】

以下の実施例は、説明のために提供されるのであって、本発明の範囲を限定するためのいずれかの方法にはない。

【0104】

実施例1：Nrg4は、肝細胞を標的とする脂肪細胞由来因子である。本実施例において、腹腔内注射後にNrg4が肝細胞へ結合して血中グルコース濃度を下げることがホルモン結合アッセイを用いて実証される。Nrg4欠損マウスにおける代謝研究はまた、Nrg4欠損が高脂肪食摂餌後の高血糖及び高脂血症の発症を悪化させることも実証した。加えて、Nrg4を欠損するマウスは、より重症の脂肪肝を発症した。これらの知見は、全身のグルコース及び脂質の代謝の調節におけるNrg4の重要な役割を明確にしている。

【0105】

材料及び方法

Nrg4トランスジェニックマウスの作出

マウスNrg4 cDNA (5' UTR及び部分的3' UTRを含む) をpCR2.1 TOPOベクター中へとTAクローン化した。AP2プロモーターを当該ベクター上のHindIIIとKpnIの間に挿入し、その一方で、ヒト成長ホルモンポリAをEcoRVとXbaIの間に挿入した。全ベクターをHindIII及びApaIを用いた二重消化によって線形化して、遺伝子導入カセットを放出し、C57BL/6Jマウス卵へと微量注入して、AP2-Nrg4トランスジェニック仔を作出した。

【0106】

Nrg4ノックアウトマウスを突然変異マウス地域供給センター (Mutant Mouse Regional Resource Center (MMRRC)) から購入した。

【0107】

脂肪細胞の分化及び処置

SV40T-ラージ抗原で不死化した褐色脂肪細胞前駆細胞を、10%ウシ胎児血清 (FBS) 含有DMEM中でコンフルエント2日後まで培養した (0日として計数)。0.5 mMのIBMX、125 μMのインドメタシン、1 μMのデキサメタゾンを含むカクテルを、10%のFBS、20 nMのインスリン及び1 nMのT3を含む分化維持DMEMへと添加することによって分化を誘導した。誘導から2~3日後、細胞を維持培地のみで培養した。遺伝子発現分析のために、褐色脂肪細胞分化の間の異なる日付で全RNAを分離した。

【0108】

3T3-L1脂肪細胞前駆細胞を、10%ウシ成長血清 (BGS) 含有DMEM中でコ

10

20

30

40

50

ンフルエント2日後まで培養した(0日として計数)。0.5 mMのIBMX、1 μMのデキサメタゾン及び1 μg/mLのインスリンを含有するカクテルを、10% FBSを補充したDMEMへ添加することによって、分化を誘導した。誘導3日後、10%のFBS + 1 μg/mLのインスリンを含有するDMEM中で細胞をさらに2日間培養した後、10%のFBSを補充したDMEM中で維持した。TNF 処置のために、10 ng/mLのTNF を、10%のFBS DMEM中で培養した成熟(8日)3T3-L1脂肪細胞へRNA分離前にそれぞれ6時間添加した。IL-1 処置のために、40 ng/mLのIL-1 を、10%のFBS DMEM中で培養した成熟(8日)3T3-L1脂肪細胞へRNA分離の前に6時間添加した。

【0109】

Nrg4 結合アッセイ

SEAPまたはSEAP-Nrg4^{N62}を発現するベクターを293T細胞にトランスフェクトした。トランスフェクトの24時間後、細胞を無血清培地へさらに2日間切り替えた後、培地を収集してCentriconを用いて濃縮した。簡潔には、凍結組織切片をSEAPまたはSEAP-Nrg4^{N62}条件培地を用いて室温で45分間インキュベートした後、0.1% トゥーン含有PBS中で4回洗浄し、20 mMのHEPES (pH 7.4)、60%のアセトン、及び3%のホルムアルデヒドを含有する溶液中で固定した。内在性アルカリフォスファターゼを65 で30分間失活させた後、融合タンパク質由来の酵素活性を、NBT/BCIP基質を用いて検出した。競合結合のために、凍結組織切片を4 μg/μLのGSTまたはGST-Nrg4^{N62}を用いて30分間プレインキュベートした後、SEAP-Nrg4^{N62}条件培地を用いてさらに1時間同時インキュベートした。

【0110】

結果 Nrg4は、Nrg1、Nrg2、及びNrg3も含む細胞外シグナル伝達リガンドのニューレグリンファミリーのメンバーである。Nrg4の主要なコード分子種は、115のアミノ酸からなるタンパク質をコードすると推定され、Cys9-Cys23、Cys17-Cys34、及びCys36-Cys45の間の3つの特徴的なジスルフィド結合を有する単一のEGF様ドメイン、推定N連結型グリコシル化部位、及び膜貫通ドメインを含有する(図1)。他のニューレグリンと同様に、Nrg4は、膜貫通タンパク質として合成され、受容体結合及びシグナル伝達のために細胞外EGF様ペプチドを遊離するタンパク質分解性開裂を受ける。Nrg4の放出の原因となるプロテアーゼの識別は現在わかっていないが、マトリックスメタロプロテアーゼであると思われる。Nrg4は、マウスとヒトの間でEGF様ドメインにおける90%超のアミノ酸配列同一性で高度に保存されている(Nrg4のアミノ酸1~およそアミノ酸52、図1)。

【0111】

Nrg4発現は、膵臓、乳腺上皮細胞、前立腺癌、及びリンパ腫細胞株において報告されてきた。しかしながら、Nrg4 プレ mRNA 転写産物は、複雑な選択的スプライシングを受け、タンパク質コード能力を欠失すると見えるいくつかのスプライシング分子種を生じる。加えて、先行の免疫組織化学的研究で使用されたNrg4抗体の特異性は不確実なままである。このようなものとして、Nrg4の発現及びその調節に関する実際の特性は結論として確立されていない。Nrg4のコード分子種を特異的に検出するTaqman定量的PCR(定量的PCR)法が本明細書で開発された。Nrg4 mRNAは、褐色脂肪組織(BAT)及び白色脂肪組織(WAT)において豊富に発現するが、腎臓、骨格筋、脳、精巣、小腸、肝臓、心臓、脾臓、肺、及び脾臓を含む検討した他の組織においては発現しないことが判った(図2のA)。脂肪組織へのNrg4発現の制限は、正常な生理学的条件下で、Nrg4が、身体における脂肪細胞と他の組織の間の情報伝達を仲介するリガンドとして機能しているのかもしれないことを示唆している。Nrg4発現はまた、褐色脂肪細胞及び白色脂肪細胞の分化の間に調節されるかどうかを判定するために検討した。褐色脂肪細胞についてのマーカーであるUCP1と同様、Nrg4 mRNA発現は、褐色脂肪細胞分化の間に高度に誘導される(図2のB)。Nrg4 mRNA水準はまた

10

20

30

40

50

、3T3-L1白色脂肪細胞の分化の間、有意に高かった(図2のB)。

【0112】

褐色脂肪は、げっ歯類動物における寒冷曝露への応答における適応性熱産生において重要な役割を担っている。Nr g 4が褐色脂肪組織において高度に発現しているため、寒冷誘発性熱産生におけるその潜在的な役割を評価した。野生型マウス及びNr g 4欠損マウスを寒冷温度(4℃)へ曝露し、直腸温度を異なる時点で測定した。これら2群のマウスにおける深部体温は、冷却曝露中にほぼ識別不可能であったため、Nr g 4は、急速な冷却ストレスに対する防御に対して必要とされていないことを示唆した(図3のA)。褐色脂肪の組織学的様相は、野生型群とノックアウト群の間で類似していた(図3のB)。UCP1及び脱ヨード酵素2(DIO2)のような褐色脂肪遺伝子の寒冷誘導性発現も類似していた(図3のC)。興味深いことに、血漿トリグリセリド(TG)濃度はNr g 4欠損マウスにおいてより高かったのに対し、血漿非エステル化脂肪酸及びケトン(β-ヒドロキシブチラート)の水準はより低かった(図3のD)。これらの知見は、その脂肪特異的発現にもかかわらず、Nr g 4が身体における他の細胞型を標的としようであることを示唆している。

10

【0113】

Nr g 4の結合及び作用のための組織標的を識別するために、分泌型アルカリフォスファターゼ(SEAP)とNr g 4のN末端の62個のアミノ酸の間の融合タンパク質(SEAP-Nr g 4^{N62})を生成し、結合アッセイをすでに説明した通り実施した。このNr g 4断片は、EGF様ドメインを含有しており、シグナル伝達を開始する上で競合すると推定される。SEAPまたはSEAP-Nr g 4^{N62}プラスミドを用いて一過性にトランスフェクトしたHEK293T細胞から条件培地を収集し、Centriconスピニングを用いて濃縮した。結合アッセイを組織切片に関して実施した後、広範な洗浄、固定、熱失活、及びアルカリフォスファターゼ基質(BCIP/NBT)を用いたインキュベーションを実施した。SEAP及びSEAP-Nr g 4^{N62}の両方について、背景シグナルのみが褐色脂肪、心臓、骨格筋、及び脾臓において検出された(図4のA)。対照的に、肝細胞へのSEAP-Nr g 4^{N62}の強力な結合が観察された(図4のB)。さらに、過剰量のGST-Nr g 4^{N62}の存在は、肝細胞へのGSTではなく、SEAP-Nr g 4^{N62}の結合を消滅させ、肝細胞における推定上のNr g 4の結合部位が限定され飽和可能であることを示唆した(図4のC)。

20

30

【0114】

実施例2：脂肪細胞Nr g 4発現は肥満において下方調節される

本実施例において、高度に感受性のあるかつ特異的なTaqman定量的PCRアッセイを用いて、Nr g 4が褐色脂肪組織及び白色脂肪組織において豊富に発現することを発見した。他の組織においては、mRNA発現はほとんど検出されなかった。Nr g 4の発現は、脂肪細胞分化の間に高度に誘導性であった。この発現特性は、Nr g 4が、脂肪組織と他の代謝組織の間のクロストークを仲介する上で、まだ認識されていない役割を担っているかもしれないことを示唆している。Nr g 4 mRNA発現は、食餌誘発性肥満マウス及び遺伝的肥満マウス由来の脂肪組織において顕著に低下した。このようなものとして、肥満は、Nr g 4発現及び作用に関する可能性のある欠損と関係している。

40

【0115】

材料及び方法

代謝測定 血漿グリセロール/トリグリセリド、ケトン/コレステロール及び非エステル化脂肪酸濃度を、市販のアッセイキット(それぞれSigma、Stanbio Laboratory、和光純薬)を用いて測定した。

【0116】

遺伝子発現分析

白色脂肪組織由来の全RNAを、Invitrogen製の市販のキットを用いて抽出した。他の組織及び培養細胞由来のRNAは、TRIzol法を用いて抽出した。定量的リアルタイムPCR(定量的PCR)分析のために、等量のRNAをMMLV-RTを用

50

いて逆転写させた後、SYBR Green (Life Technologies) を用いた定量的PCR反応を実施した。mRNAの相対的な量をリボソームタンパク質36B4に対して標準化した。

【0117】

Taqman PCRを用いてNrg4のコード分子種を検出するために、エキソン3及びエキソン6の接合部を包含するセンスプライマー(5' CCCAGCCCATTCGTG TAGGTG 3' (配列番号3))、エキソン6におけるアンチセンスプライマー(5' ACCACGAAAGCTG - CCGACAG 3' (配列番号4))、及びエキソン6にあるがセンスプライマーとアンチセンスプライマーの間のtaqmanプローブ(5' 6 - FAM - CGGAGCACGCTGCGAAGAGGTT - BHQ 3' (配列番号5))を生成した。Taqman PCRを、ABI製のTaqman Universal PCR Master Mixシステムを用いて実施し、Nrg4コード分子種の相対的な量をリボソームタンパク質36B4に対して標準化した。

【0118】

結果

Nrg4の発現が肥満において調節不全であるかどうかを判定するために、標準食(瘦身)または60%脂肪由来の熱量を含有する高脂肪食(HFD)(肥満)を摂餌したマウス由来の脂肪組織から分離した全RNAについての定量的PCR分析を実施した。期待していたように、炎症性サイトカインであるTNFの発現は、高脂肪食摂餌マウス由来の精巢上体白色脂肪において高かった(図5のA)。褐色脂肪におけるNrg4発現は、2群間で類似していたのに対し、そのmRNA水準は、食餌誘発性肥満マウスにおける精巢上皮白色脂肪において顕著に低かった(図5のA及び図15のA)。同様に、Nrg4発現はまた、肥満に関する2つのさらに重症な遺伝モデルであるレプチン欠損(ob/ob)マウスまたはレプチン受容体欠損(db/db)マウス由来の精巢上皮の白色脂肪及び褐色脂肪の両方において有意に低下した(図5のB及び図15のA)。Nrg4発現の下方調節は、脂肪細胞において特異的に生じた(図5のC及び図15のB)。実際、Nrg4 mRNA水準は、精巢上体白色脂肪の間質血管画分において非常に低かった。対照的に、成熟脂肪細胞画分は豊富なNrg4を発現し、これは肥満を劇的に減少させた。炎症誘発性サイトカインが、脂肪組織インスリン抵抗性及び代謝調節不全と関係していたので、炎症誘発性サイトカインシグナル伝達が培養脂肪細胞におけるNrg4発現を調節するかどうかを判定するために実験を行った。完全に分化した褐色脂肪細胞及び3T3-L1脂肪細胞をビヒクル(PBS)、TNF またはIL-1を用いて異なる時間処理した後、遺伝子発現分析のために、処理した細胞から全RNAを分離した。ビヒクルと比較して、TNF 及びIL-1 処理は、褐色脂肪細胞及び白色脂肪細胞の両方におけるNrg4 mRNA発現を劇的に低下させた(図5のD及び図15のC)。

【0119】

脂肪におけるNrg4発現と肥満の重症度との関係をさらに検討した。一群の野生型C57BL/6J雄マウスに高脂肪食をおよそ2か月間摂餌させて肥満を誘発させた。高脂肪食マウスは、種々の重症度の肥満を発症し、体重は30.7gから51.9gまで及んだ。代謝パラメータをこれらのマウスにおいて測定し、当該パラメータと内臓脂肪におけるNrg4発現との関係を検討した。Nrg4 mRNA発現は、体重($R^2 = 0.632$)及び精巢上体白色脂肪重量($R^2 = 0.726$)の両方と逆相関していた(図6のA及びB)。さらに、低いNrg4発現を有するマウスは、より重症の高血糖を発症する傾向にあり、肝臓におけるより高い脂肪含有量を有する傾向にあった。対照的に、白色脂肪における高いNrg4発現は、より低い血中グルコース及び肝臓脂肪蓄積と関係していた(図6のC及びD)。総合すると、これらの研究は、Nrg4発現が肥満において非常に低下することを実証しており、Nrg4発現の機能不全は高グリセリド血症及び脂肪肝などの肥満関連代謝障害の発症と連関しているかもしれないことを強く示唆している。

【0120】

実施例3: Nrg4の欠損は、食餌誘発性のインスリン抵抗性、脂肪肝及び高トリグリ

セリド血症を悪化させる

上昇するNr g 4水準は代謝上の利益を与えるかもしれないという概念実証の証拠を提供するために、脂肪特異的Nr g 4トランスジェニックマウスを作出して、本実施例における肥満におけるNr g 4発現低下を救出した。Nr g 4欠損とは顕著に対照的に、Nr g 4トランスジェニックマウスは、血中グルコース濃度及び血中脂質濃度を有意に低下させ、肝臓における脂肪の蓄積を減少させた。したがって、Nr g 4ホルモンシグナル伝達の補強は、肥満と関係した代謝障害の発症を寛解させると予測される。

【0121】

Nr g 4機能不全が代謝障害の病因発生に寄与する程度を定義するために、代謝パラメータを、高脂肪食摂餌後の野生型(WT)マウス及びNr g 4ノックアウト(KO)マウスにおいて測定した。Nr g 4 KOマウスは、生存可能であり、正常に成長し、標準食摂餌時には野生型の同腹子と区別ができない。高脂肪食摂餌後、Nr g 4欠損マウスは、対照よりも体重がわずかに増えた(図7のA)。加えて、血糖値はNr g 4欠損マウスにおいてより高かった(図7のB)。血漿インスリン濃度もNr g 4欠損マウスにおいて高く(図7のB)、Nr g 4が、グルコースの恒常性維持を維持する上で、特に肥満などの代謝ストレス状態において保護的役割を担っているのかもしれないことを示唆した。血漿トリグリセリド水準はNr g 4欠損マウスにおいてより高かったのに対し、ケトン体の主要構成要素である - ヒドロキシブチラートの濃度は、欠損群においてより低かった(図7のC)。ケトン体は、肝脂肪酸酸化の生成物であるので、これらの結果は、肝細胞へのNr g 4結合、及び肝脂質代謝を調節する上でのこの因子の潜在的な役割と一致している。この可能性をさらに検査するために、肝脂肪含有量を測定した。対照と比較して、Nr g 4欠損マウスは、高脂肪食摂餌後の肝臓におけるトリグリセリドの沈着が高まった(図8のA)。組織学的染色は、Nr g 4ノックアウト肝細胞における脂質の蓄積の顕著な増加があることを示した。対照的に、脂肪組織の組織学的様相は、2群間で類似のままであった(図8のB)。

【0122】

Nr g 4シグナル伝達の損失が食餌誘発性代謝調節不全、特に血糖制御、脂肪肝の進行、及び血漿トリグリセリドの恒常性維持を悪化させると、これらの研究から結論付けることができる。

【0123】

実施例4：脂肪組織におけるNr g 4の遺伝子導入発現は食餌誘発性代謝調節不全を寛解させる

【0124】

本実施例は、機構水準で、Nr g 4が代謝性遺伝子発現を調節することを通じてシグナル伝達することを実証する。Nr g 4は、新規の脂質生成に関与する遺伝子の発現を負に調節する。この肝脂質生成の下方調節は、Nr g 4の有益な代謝効果の基礎となっていそうである。

【0125】

(結果)

上記のように、脂肪細胞Nr g 4発現は、マウスにおける食餌誘発性肥満及び遺伝的肥満を有意に低下した(図5のA及びB)。したがって、脂肪組織におけるNr g 4の遺伝子導入過剰発現は、肥満によって誘導される代謝の恒常性維持の悪化を標準化または救出するかもしれない。さらに、組換えNr g 4タンパク質の投与は、高血糖、非アルコール性脂肪肝疾患、及び高脂血症を治療する上で治療上の利益を提供するかもしれない。これらの可能性を検査するために、脂肪特異的Nr g 4トランスジェニックマウスを、脂肪細胞における遺伝子の遺伝子導入発現に対処する上で広範に使用されているaP2プロモーター/エンハンサーの制御下で作出した。褐色脂肪組織及び白色脂肪組織におけるNr g 4の種々の水準の遺伝子導入発現を有する5つの独立したトランスジェニック始祖を作出した。系統#111は、さらなる研究のために選択され、その理由はNr g 4導入遺伝子が、痩身マウスにおけるその発現をわずかに上回る水準まで脂肪組織において特異的に発

10

20

30

40

50

現するからであった。A P 2 - N r g 4トランスジェニックマウスは、生後の成長、身体的様相、及び一般的な行動特徴に関して非トランスジェニック同腹子と区別することはできなかった。

【 0 1 2 6 】

N r g 4の遺伝子導入発現が、マウスを食餌誘発性代謝障害から保護するかどうかを判定するために、対照マウス及びトランスジェニックマウスに高脂肪食を摂餌させた。トランスジェニック群は、高脂肪食摂餌11週間後、対照よりもわずかに体重増加が少なかった(図9のA)。代謝測定は、A P 2 - N r g 4トランスジェニックマウスが摂餌条件下及び絶食条件下の両方でより低い血中グルコースを有していたことを示す(図9のC)。より低い血漿ケトン水準を有しているN r g 4欠損マウスとは対照的に、トランスジェニックマウスは、一晚絶食後に高いケトン水準を有しており(図9のC)、肝脂肪酸酸化及びケトン生成がN r g 4の遺伝子導入発現によって高まるのかもしれないことを示唆した。血漿トリグリセリド濃度は、トランスジェニック群においてより低かった。耐糖能試験及びインスリン耐性試験は、A P 2 - N r g 4トランスジェニックマウスが、より高い耐糖能及びインスリン感受性であったことを示す(図10のA~B)。改善された血漿代謝特性に加えて、肝脂肪蓄積は、トランスジェニックマウスにおいて有意に減少した(図10のC~D)。一貫して、遺伝子発現分析は、トランスジェニックマウス由来の肝臓では、主要な脂質生成遺伝子の発現がより低いことを示した。F S P 2 7及びs 3 - 1 2などの脂質滴関連遺伝子の発現もトランスジェニック肝において有意により低かった(図11)。総合すると、これらの研究は、上昇するN r g 4水準が、血糖制御に及ぼす望ましい効果を結果的に生じるかもしれず、かつ脂肪肝疾患に対して有意な保護を達成するかもしれないという遺伝的証拠を提供する。

【 0 1 2 7 】

原理実証研究を実施して、組換えN r g 4タンパク質の潜在的な治療効果を評価した。G S T及びG S T - N r g 4^{N 6 2}融合タンパク質を、関連する発現ベクターを含有する細菌から発現及び精製した。2回のG S T及びG S T - N r g 4^{N 6 2}の投与を食餌誘発性肥満マウスへ3時間空けて腹腔内投与した。血漿検体及び組織検体を第二の投与3時間後に、代謝産物測定及び遺伝子発現分析のために収集した。血漿グルコース濃度は、対照よりもG S T - N r g 4^{N 6 2}で処置したマウスにおいて有意に低かった。インスリン水準も、G S T - N r g 4^{N 6 2}処置後に低い傾向にあり(図12)、血中グルコースを低下させるG S T - N r g 4^{N 6 2}の能力が、インスリン分泌促進物質として作用するのは異なる機序を通じて仲介されることを示唆した。この短期間実験において、血漿脂質及び肝脂質に及ぼすG S T - N r g 4^{N 6 2}の有意な効果は観察されなかった。興味深いことに、S R E B P 1 c及びS C D 1を含む新規の脂質生成に関与する鍵酵素の発現は、G S T - N r g 4^{N 6 2}によって有意に低下した。

【 0 1 2 8 】

実施例5：合成N r g 4ペプチド

2型糖尿病及び非アルコール性脂肪肝疾患を治療する上で外来的に投与されたN r g 4の治療能力を評価するために、N r g 4のE G F様ドメイン(アミノ酸1~52)に対応するN r g 4ペプチドを合成する。N末端アセチル化及びC末端アミド化を導入して、循環中のペプチドの安定性を改善する。このペプチドの生物活性を培養細胞において評価し、生体内研究を急性及び慢性の処置条件下で実施する。急性実験のために、本ペプチドを異なる用量で腹腔内注射を介して送達し、注射後に血漿及び肝臓の代謝産物濃度を測定する。これらの研究は、食餌誘発性肥満マウスモデル及び遺伝的肥満マウスモデルにおいて実施する。肝遺伝子発現を分析して、関与する標的代謝経路を研究する。慢性処置については、本ペプチドを、腹腔内注射または浸透圧ポンプシステムを介して送達し、定常かつ制御された送達を達成する。処置の開始後の異なる時点で代謝分析を実施する。薬物動態特性を変化させて、迅速なクリアランス及び/または失活を克服する。この目的のために、脂肪アシル基の化学修飾(例えば、パルミチル化)を有するN r g 4ペプチドを生成する。アシル化ペプチドは、血清アルブミンと関係があることが示され、かつ循環における

半減期、及び生物学的利用能を大いに改善した。ペグ化及びグリコシル化などの追加的な化学的修飾も生成させる。

【0129】

実施例6：哺乳類動物細胞において産生される組換えNrg4

現に臨床的な使用における多くの生物治療薬は、操作された哺乳類細胞株から精製された組換えタンパク質である。ポリヒスチン (polyhistine) タグ付き分泌タンパク質 (His-Nrg4) としてNrg4を産生するプラスミドを構築する。His-Nrg4を分泌する安定してトランスフェクトしたチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株を作製し、アフィニティマトリックスを用いて組換えNrg4を精製する。この組換えタンパク質は、適切なグリコシル化及びジスルフィド結合を含有しかつ、天然のNrg4と類似の薬物動態特性を有すると期待される。組換えNrg4の生物活性をマウスにおいて評価する。追加的に、血中グルコースを低下させ及び非アルコール性脂肪肝疾患を治療する上での治療効果の生体内評価のために、CHO細胞からタグのついていないNrg4を精製するプロトコルを確立する。

10

【0130】

実施例7：Nrg4の細胞外断片の放出に重要なアミノ酸のマッピング

Nrg4の細胞外開裂部位をマッピングするために、アラニン変異体のパネルを、EGF様ドメインと膜貫通ドメインの間に位置するアミノ酸51~61に関して作製した。検出を容易にするために、全長の野生型及び変異体のNrg4タンパク質を分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) のC末端へ融合させた。成熟Nrg4の開裂及び分泌は、一過性にトランスフェクトしたHEK293細胞からの条件培地 (CM) 中のSEAP-Nrg4融合タンパク質の存在によって検出される。イムノブロットング分析は、SEAP-Nrg4タンパク質が、トランスフェクトした細胞からのCM中に産生され、放出され、かつ容易に検出可能であることを示し、Nrg4細胞外ドメインの放出を示した (図14)。アラニンによって置換されるアミノ酸53~54 (53-2A) またはアミノ酸53 (53-A) を有する突然変異体は、全細胞溶解物中の前駆体タンパク質の類似の発現にもかかわらず、CM中で検出可能なSEAP-Nrg4融合タンパク質の水準を顕著に低下させた。対照的に、アミノ酸51~52、54、55~57、55~58、58~59、または60~61でのアラニン突然変異体は、培地中へのSEAP-Nrg4の放出に及ぼす中程度の効果を有していた。これらの結果は、アミノ酸53がプロテアーゼによるNrg4の開裂及び細胞外空間へのその放出に決定的であることを示す。

20

30

【0131】

実施例8：Nrg4欠損は、高脂肪食摂餌後に重度の肥満、インスリン抵抗性、肝脂肪蓄積、及び高脂血症を結果的に生じる

追加的な研究を実施して、Nrg4欠損を有する対象に及ぼす高脂肪食の効果を判定した。

【0132】

材料及び方法 体組成及び代謝ケージ研究

野生型マウス及びNrg4ノックアウトマウスに標準食または高脂肪食を摂餌させた。NMR分析装置 (Minispec LF90II, Bruker Optics) を用いて体脂肪量及び除脂肪体重を測定した。酸素摂取量 (VO₂)、自発的運動量及び摂餌量を、光学ビーム活性モニタリング装置を装備した集積開放型回路熱量計である包括的実験室モニタリングシステム (Comprehensive Laboratory Monitoring System (CLAMS)) (Columbus Instruments) を用いて測定した。マウスは、密閉されたチャンバー (7.9インチ×4インチ×5インチ) で飼育し、餌と水は自由に摂れるようにした。本研究は、20~23、12時間の明暗周期 (暗期：午後6時~午前6時) に設定した実験室において実施した。測定は、72時間連続して実施した。この時間に、動物にはチャンバーの内側に配置された装備された給餌装置及び飲水装置を通じて食餌及び水が提供された。各動物の食餌量を、チャンバーの下に装着した精確な秤を通じてモニターした。各チャンバーにおけるVO

40

50

2 は、10 分間の間隔で 5 秒間連続して測定し、運動活動は、X 次元及び Z 次元において毎秒記録した。

【0133】

代謝測定

トリグリセリド (Sigma) 及び非エステル化脂肪酸 (和光純薬) の血漿濃度は、市販のアッセイキットを用いて測定した。肝トリグリセリドは、すでに説明した通り抽出及び測定した。血漿インスリンは、ELISA アッセイキット (Crystal Chem) を用いて測定した。耐糖能試験及びインスリン耐性試験を実施した。

【0134】

Nrg4 機能不全が代謝障害の病因発生に寄与している程度を定義するために、高脂肪食 (Research Diets 社、D12492) 摂餌後の野生型 (WT) マウス及び Nrg4 欠損マウスにおける代謝パラメータを測定した。Nrg4 ノックアウトマウスは、期待されるメンデル比で出生した。Nrg2 ノックアウトマウスは、標準食を摂餌した場合の対照と類似の摂餌量、身体活動水準、酸素消費量を示しかつ類似の体重を獲得した (図 16 の A)。高脂肪食摂餌後、Nrg4 欠損マウスは、わずかにより多くの体重を獲得し、それにともない、体脂肪率が有意に高まり、%除脂肪体重は低下した。血漿トリグリセリド (TAG) 水準は、Nrg4 欠損マウスにおいてより高かった (図 16 の B) のに対し、ケトン体の主要構成要素である β -ヒドロキシブチラートの濃度は、欠損群においてより低かった (図 16 の C)。ケトン体は、肝脂肪酸酸化の産物であるので、これらの結果は、肝細胞への Nrg4 結合と一致している。これらの結果はまた、肝脂肪代謝を調節する上での Nrg4 についての役割を実証している。

【0135】

次に、肝脂肪含有量を Nrg4 ノックアウトマウス及び野生型マウスにおいて測定した。Nrg4 欠損マウスは、高脂肪食摂餌後に肝臓における高いトリグリセリド沈着を有していることがわかった (図 17 の A)。脂肪含有量は、Nrg4 欠損マウス肝においておよそ 60% ほど増加した。組織学的評価 (ヘマトキシリン・エオシン染色) は、Nrg4 欠損マウスが高脂肪食摂餌後に、対照群よりも重症の脂肪肝を発症させているが、褐色脂肪組織及び白色脂肪組織の組織学的評価は類似しているようであることが明らかとなった (図 17 の B)。

【0136】

対照と比較して、絶食時血糖値及び摂餌時血漿インスリン水準は、ノックアウト群において高かった (図 18 の A)。さらに、耐糖能試験 (GTT) 及びインスリン耐性試験 (ITT) は、Nrg4 欠損マウスが対照マウスよりも重症の耐糖能及びインスリン抵抗性を発症させていることが明らかとなった (図 18 の B 及び C)。総合すると、これらの結果は、Nrg4 が、グルコースの恒常性維持を維持する上で、特に高脂肪誘発性肥満などの代謝ストレス状態において保護的役割を担っていることを実証している。

【0137】

これらの研究は、Nrg4 シグナル伝達の欠損が、食餌誘発性代謝調節不全、特に血糖制御、脂肪肝の進行、及び血漿トリグリセリドの恒常性維持を悪化させることを実証している。

【0138】

実施例 9 : Nrg4 は肝臓における脂質生成遺伝子プログラムの誘導を阻害する

本実施例は、Nrg4 が肝臓における脂質生成遺伝子発現を減弱させることを通じてシグナル伝達することを実証する。理論によって結び付けられることなく、この肝脂質生成の下方調節は、Nrg4 の有益な代謝効果の基礎となると考えられている。

【0139】

方法及び材料 イムノプロットング分析

50 mM のトリス (pH 7.5)、150 mM の NaCl、5 mM の NaF、25 mM の β -グリセロリン酸、1 mM のオルトバナジン酸ナトリウム、10% のグリセロール、1% のトリトン X-100、1 mM のジチオトレイトール (DTT)、及び新たに添加さ

10

20

30

40

50

れたプロテアーゼ阻害薬を含有する溶解緩衝液中で肝臓を均質化することによって、全肝溶解物を調製した。肝核抽出物も調製した。簡潔には、0.6%のNP40、150mMのNaCl、10mMのHEPES(pH=7.9)、1mMのEDTA、及びプロテアーゼ阻害薬カクテルを含有する氷冷した均質化緩衝液中でダウンスホモジナイザーを用いて、凍結肝臓を均質化した。均質化液を4、450rpmで短時間遠心分離して組織片を取り除いた。懸濁液を新たなチューブに移し、4、3,000rpmで5分間遠心分離した。核ペレットを均質化緩衝液で洗浄し、20mMのトリス(pH=7.5)、25%のグリセロール、1.5mMのMgCl₂、200μMのEDTA、20mMのKCl、及びプロテアーゼ阻害薬を含有する低塩緩衝液中で再懸濁した。20mMのトリス(pH=7.5)、1.5mMのMgCl₂、200μMのEDTA、1.2MのKCl、及びプロテアーゼ阻害薬を含有する高塩緩衝液(1/2容積)の添加後、各タンパク質を4で2時間、抽出した。イムノプロットング実験は、SREBP1及びChrebp(Santa Cruz Biotechnology)、チューブリン(Sigma)、及びラミンA/C、ホスホErbB4及び全ErbB4、ホスホAKT(S473)及び全AKT、リン光体-AMPK(Thr172)及び全AMPK(Cell Signaling)に対する特異的抗体を用いて実施した。

10

【0140】

肝細胞の分離及び処理

初代肝細胞をC57BL/6JマウスからII型コラゲナーゼ(Invitrogen、カリフォルニア州カールスバッド市)を用いることによって分離した。肝細胞は、10% BGSを含有するDMEM培地中で37及び5%CO₂で維持した。アデノウイルス感染を分離当日実施した。24時間後、細胞を、ビヒクル(DMSO)またはT0901317(5μmol/L)とともにGST及びGST-Nrg4Ex(10μg/mL)を用いて24時間処理した。シグナル伝達については、細胞を、0.1%BSAを補充したDMEMへと12時間切り替えた後にGST及びGST-Nrg4Ex処理をした。組換えアデノウイルスは、すでに説明された通り(Lira, Cell Metabolism 8:105~117, 2008)、AdEasyアデノウイルスベクター(Stratagene, カリフォルニア州サンタクララ市)を用いて生成した。

20

【0141】

結果

肝臓がNrg4によって標的とされる主要代謝組織であることを確立したので、Nrg4が肝代謝を調節する機序を判定するために実験を実施した。遺伝子発現分析は、PGC-1、PGC1、ChREBP、及びSREBP2を含む肝代謝のいくつかの転写調節因子のmRNA水準が対照肝とノックアウト肝の間で類似していることを示した(図19のA)。対照的に、新規の脂質生成及びトリグリセリド合成の鍵調節因子であるSREBP1cのmRNA発現は、Nrg4ノックアウトマウス肝において有意に誘導された。重要なことに、SREBP1前駆体(pSREBP1)のタンパク質水準ならびに核におけるSREBP1の開裂しかつ転写活性のある分子種(nSREBP1)も上昇した(図19のB)。ホスホAMPK及び、mTOR複合体2の基質であるホスホAKT(S473)の水準は、野生型肝及びノックアウト肝の間で類似していた。

30

40

【0142】

定量的PCR分析は、グルコースキナーゼ(Gck)、アセチルCoAカルボキシラーゼ1(Acc1)、細胞質ゾルリンゴ酸酵素(Me1)、脂肪酸合成酵素(Fasn)、ステアロイルCoA脱飽和酵素(Scd1)、及びグリセロールキナーゼ(Gyk)を含む脂質生成に関与するいくつかの公知のSREBP1標的遺伝子のmRNA発現が、対照マウスよりもNrg4欠損マウスの肝臓において有意に高いことを示した(図19のA)。脂肪肝と関係する脂質滴タンパク質であるFsp27の発現も高かった。対照的に脂肪酸酸化、糖新生、及びミトコンドリア酸化的代謝に関与する遺伝子の発現は、2群間で類似していた。

【0143】

50

理論によって結び付けられることなく、Nr g 4 欠損マウス肝における脂質生成の異常な活性化は、脂質生成遺伝子プログラムに及ぼすNr g 4 シグナル伝達の直接的な効果から結果として生じているのかもしれない。あるいは、中程度でありながらも体脂肪率の増加は、Nr g 4 欠損マウスにおける肝脂質代謝の崩壊に関与しているのかもしれないことは起こり得る。これら2つの可能性を区別するために、初代肝細胞における脂質生成遺伝子発現に及ぼすNr g 4 の効果を検討した。SEAPまたはSEAP-Nr g 4 N62を含有するCMの存在下で、ビヒクル(DMSO)またはSrebp1c及び脂質生成遺伝子発現を強力に刺激する肝X受容体についてのアゴニストであるT0901317を用いて培養肝細胞を処理した。Srebp1c、Fasn、及びScd1の基礎的発現は類似していたが、LXR活性化に応じたこれらの誘導は、SEAP-Nr g 4 N62によって有意に低下した(図20)。

10

【0144】

実施例10：脂肪組織におけるNr g 4 の遺伝子導入発現は、食餌誘発性代謝調節不全を寛解させる

【0145】

本実施例は、上昇するNr g 4 水準が、血中グルコース調節に対する有益な効果を提供し、かつ脂肪肝疾患の重症度を低下させることを実証する。

【0146】

先に説明したように、脂肪細胞Nr g 4 発現は、マウスにおける食餌誘発性肥満及び遺伝的肥満において有意に低下した。このようなものとして、脂肪組織におけるNr g 4 の遺伝子導入過剰発現は、肥満によって誘導される代謝の恒常性維持の悪化を標準化または救出するかもしれない。さらに、組換えNr g 4 タンパク質の投与は、高血糖、非アルコール性脂肪肝疾患、及び高脂血症を治療する上での治療上の利益を提供するかもしれない。これらの可能性を検査するために、脂肪細胞における遺伝子の遺伝子導入発現に対処する上で広く用いられてきたaP2プロモーター/エンハンサーの制御下で脂肪特異的Nr g 4 を用いてトランスジェニックマウスを作出した。褐色脂肪組織及び白色脂肪組織におけるNr g 4 の種々の水準の遺伝子導入発現を有する5つの独立した遺伝子導入始祖を作出した。1つの特定の系統(#111として内部で指定)をさらなる研究に選択した。その理由は、Nr g 4 導入遺伝子が、痩身マウスにおけるNr g 4 発現をわずかに上回る水準で脂肪組織において特異的に発現していたからである。AP2-Nr g 4 トランスジェニックマウスは、生後の成長、身体的様相、及び一般的な行動特徴に関して非トランスジェニック同腹子とは区別できなかった。

20

30

【0147】

Nr g 4 の遺伝子導入発現がマウスを食餌誘発性代謝障害から保護するかどうかを判定するために、対照マウス及びトランスジェニックマウスに高脂肪食を摂餌させた。トランスジェニック群は、高脂肪食摂餌11週間後に対照群よりもわずかに少ない体重を獲得した(図21のA)。体組成分析は、%体脂肪量がトランスジェニック群において低下するのに対し、%除脂肪体重が大きく類似しているままであることを明らかにした(図21のB)。次に、全身エネルギー代謝を、包括的実験動物モニタリングシステム(Comprehensive Lab Animal Monitoring System(CLAMMS))を用いて測定した。対照マウス及びトランスジェニックマウスは類似の摂餌量を有していたが、トランスジェニックマウスは、体重または除脂肪体重に対して標準化した場合、有意に高い酸素消費量(VO2)を呈した(図21のC)。トランスジェニックマウスはまた、赤外線破壊装置によってモニターした場合、高い運動活動水準を有しているように見えた。トランスジェニックマウスは、一晩の飢餓後により低い血漿TAG濃度及びより高い水準のケトンを有しており(図22A)、肝脂肪酸酸化及びケトン生成が、Nr g 4 の遺伝子導入発現によって高まるのかもしれないことを示唆した。総コレステロール水準もトランスジェニック群においてより低かった。

40

【0148】

Nr g 4 欠損とは対照的に、Nr g 4 トランスジェニックマウスは、摂餌時及び絶食時

50

の両条件下で、対照よりも血糖値が低かった（図22B）。絶食時血漿インスリン水準もトランスジェニック群においてより低かった。耐糖能試験は、Nrg4トランスジェニックマウスが、グルコースの腹腔内負荷（2mg/kg）後に耐糖能を改善していたことを示す（図23A）。改善されたグルコース代謝と一致して、トランスジェニックマウスはインスリン耐性試験においてインスリンに対してより応答性があった（図23のB）。組織学的分析は、トランスジェニックマウスがあまり重症ではない脂肪肝を発症している（図24のA）のに対し、脂肪組織の組織学的分析は2群間で類似していることを示した。一貫して、肝トリグリセリド含有量は、トランスジェニック群において低かった（図24のB）。

【0149】

次に、遺伝子発現研究を実施して、Nrg4の遺伝子導入上昇にตอบสนองする下流の代謝経路を研究した。SREBP1cのmRNA及びタンパク質の水準は、トランスジェニックマウス肝において有意に低かった（図24のC及びD）。Gck、Ac1、Acc1、Me1、Fasn、及びScd1を含む肝脂質生成遺伝子の発現水準はしたがって、脂肪組織におけるNrg4の遺伝子導入発現に応じて減弱した。Fsp27mRNA発現も顕著に低下した。総合すると、これらの研究は、上昇するNrg4水準が血糖値及び脂質水準に及ぼす望ましい効果を結果的に生じるという遺伝的証拠を提供し、かつNrg4過剰発現が非アルコール性脂肪肝疾患の治療において有益であるかもしれないという証拠を提供する。

【0150】

実施例11：組換えNrg4断片

2型糖尿病及び非アルコール性脂肪肝疾患を治療する上で外来的に投与されるNrg4の治療上の能力を評価するために、組換えNrg4タンパク質を発現するベクター（GST-Nrg4）を、細菌宿主を用いて作出した。原理実証研究を実施して、組換えNrg4タンパク質の潜在的な治療効果を評価した。GST-Nrg4融合タンパク質及びGSTを、関連発現ベクターを含有する細菌から発現及び精製した。1日当たり2用量のGSTまたはGST-Nrg4を食餌誘発性肥満マウスに5日間連続して腹腔内投与した。代謝産物測定及び遺伝子発現分析のために、最後の注射の2時間後に血漿検体及び組織検体を収集した。血漿のグルコース濃度及びインスリン濃度は、対照においてよりもGST-Nrg4で処置したマウスにおいて低かった（図25）。理論によって結び付けられることなく、これらの結果は、血中グルコースを低下させるGST-Nrg4の能力が、インスリン分泌促進物質として作用するのは異なる機序を通じて仲介されることを示す。新規の脂質生成に関与する酵素の発現は、リンゴ酸酵素1（ME1）及びステアロイルCoA脱飽和酵素1（SCD1）を含む、GST-Nrg4によって有意に低下した。

【0151】

本開示は、本明細書に説明される本発明の方法及び組成物の実施についての具体的な様式を含むことが判っているまたは含むよう提唱された特定の実施形態の点で説明されてきた。説明した本発明の種々の改変及び変更は、本発明の範囲及び精神から逸脱することなく、当業者に明らかであろう。本開示は具体的な実施形態を提供しているが、請求されるような本発明が、このような具体的な実施形態に過度に限定されるべきではないことは理解されるべきである。実際、関連分野における当業者に対して明白な本発明を実施するために説明された様式の種々の改変は、以下の特許請求の範囲内であるよう企図される。

【0152】

参考文献

Cohen, J. C., Horton, J. D. 及びHobbs, H. H. ヒト脂肪肝疾患：古い問いと新たな見解（Human fatty liver disease: old questions and new insights. Science 332, 1519~1523 (2011)）。

【0153】

James, O. 及びDay, C. 非アルコール性脂肪性肝炎：富裕に関する別の疾患

10

20

30

40

50

(Non-alcoholic steatohepatitis: another disease of affluence). *Lancet* 353, 1634~1636 (1999)。

【0154】

Jornayvaz, F. R., Samuel, V. T. 及び Shulman, G. I. .メタボリックシンドロームと関係した動脈硬化誘発性脂質異常血症及び非アルコール性脂肪肝疾患の病理発生における筋インスリン抵抗性の役割 (The role Of muscle insulin resistance in the pathogenesis of atherogenic dyslipidemia and non alcoholic fatty liver disease associated with the metabolic syndrome). *Annu Rev Nutr* 30, 273~290 (2010)。

10

【0155】

Szczepaniak, L. S. ら, 肝トリグリセリド含有量を測定するための磁気共鳴画像法: 一般的な集団における脂肪肝の有病率 (Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence Of hepatic steatosis in the general population). *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288, E462~468 (2005)。

20

【0156】

Browning, J. d. ら, 米国における都市集団における脂肪肝の有病率: 民族性の影響 (Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity). *Hepatology* 40, 1387~1395 (2004)。

【0157】

Loomba, R., Sirlin, C. B., Schwimmer, J. B. 及び Lavine, J. E. 小児非アルコール性脂肪肝疾患における進展 (Advances in pediatric nonalcoholic fatty liver disease). *Hepatology* 50, 1282~1293 (2009)。

30

【0158】

Chitturi, S. ら, 非アルコール性脂肪性肝炎及びインスリン抵抗性: インスリンの過剰分泌及びインスリン抵抗性症候群との具体的な関係 (NAFLD and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome). *Hepatology* 35, 373~379 (2002)。

【0159】

Schneider, M. R. 及び Wolf, E. 一見したところの表皮成長因子受容体リガンド (The epidermal growth factor receptor ligands at a glance). *Journal of cellular physiology* 218, 460~466 (2009)。

40

【0160】

Burgess, A. W. 表皮成長因子受容体ファミリー: 構造生理学シグナル伝達及び治療標的 (EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic targets). *Growth factors* 26, 263~274 (2008)。

【0161】

Falls, D. L. ニューレグリン及び神経筋系: 答えと問いに関する10年間 (N

50

euregulins and the neuromuscular system: 10 years of answers and questions). *Journal of neurocytology* 32, 619~647 (2003)。

【0162】

Reiss, K. 及び Saftig, P. 放出酵素の「ジスインテグリン及びメタロプロテアーゼ」(ADAM)ファミリー: 生理学的機能及び細胞機能 (The “a disintegrin and metalloprotease” (ADAM) family Of sheddases: physiological and cellular functions). *Seminars in cell & developmental biology* 20, 126~137 (2009)。

10

【0163】

Blobel, C. P., Carpenter, G. 及び Freeman, M. ErbB生物学におけるプロテアーゼ活性の役割 (The role Of protease activity in ErbB biology). *Experimental cell research* 315, 671~682 (2009)。

【0164】

Tang, C. S. ら, ゲノム全体のコピー数分析は新たなHSCR遺伝子NRG3を明らかにする (Genome-wide copy number analysis uncovers a new HSCR gene: NRG3). *PLoS genetics* 8, e1002687 (2012)。

20

【0165】

Stefansson, H. ら, ニューレグリン1と統合失調症に対する易罹患性 (Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia). *American journal of human genetics* 71, 877~892 (2002)。

【0166】

Hayes, N. V., Newsam, R. J., Baines, A. J. 及び Gulllick, W. J. ニューレグリン4遺伝子の細胞膜関連産物の特徴づけ (Characterization Of the cell membrane-associated products Of the Neuregulin 4 gene). *Oncogene* 27, 715~720 (2008)。

30

【0167】

Harari, d. ら, ニューレグリン-4: ErbB-4受容体チロシンキナーゼを通じて作用する新規の成長因子 (Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase). *Oncogene* 18, 2681~2689 (1999)。

【0168】

Falls, d. L. ニューレグリン: 機能、形態、及びシグナル伝達戦略 (Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies). *Experimental cell research* 284, 14~30 (2003)。

40

【0169】

Dunn, M. ら, ヒト乳癌におけるニューレグリン1、2、3及び4の同時発現 (Co-expression of neuregulins 1, 2, 3 and 4 in human breast cancer). *The Journal of pathology* 203, 672~680 (2004)。

【0170】

Hayes, N. V. ら, 前立腺癌におけるニューレグリン4の新規のスプライシングバリエーションの識別及び特徴づけ (Identification and charac

50

terization of novel spliced variants of neuregulin 4 in prostate cancer). Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research 13, 3147~3155 (2007).

【0171】

Ebi, M.ら, 胃腸悪性リンパ腫におけるニューレグリン4及びHER4の役割 (The role of neuregulin4 and HER4 in gastrointestinal malignant lymphoma). Molecular medicine reports 4, 1151~1155 (2011).

10

【0172】

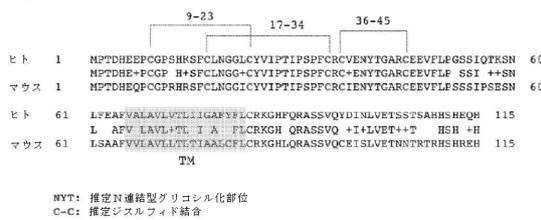
Muller, H., Dai, G.及びSoares, M.J. アルカリフォスファターゼ-PL-I融合タンパク質を用いて識別される胎盤ラクトゲン-I (PL-I) 標的組織 (Placental lactogen-I (PL-I) target tissues identified with an alkaline phosphatase-PL-I fusion protein). The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society 46, 737~743 (1998).

【0173】

Lin, J.及びLinzer, d.I. 新規の妊娠特異的ホルモンによる巨核球分化の誘導 (Induction of megakaryocyte differentiation by a novel pregnancy-specific hormone). The Journal of biological chemistry 274, 21485~21489 (1999).

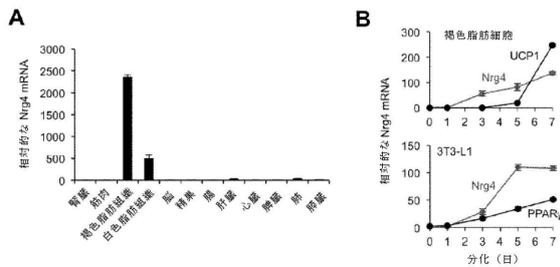
20

【図1】



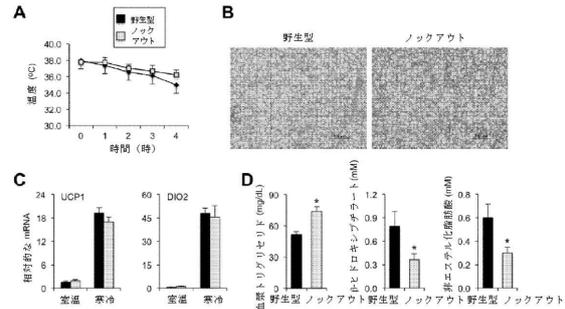
【図2】

【図2】



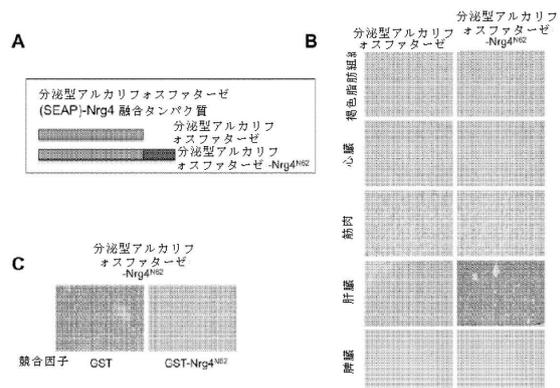
【図3】

【図3】



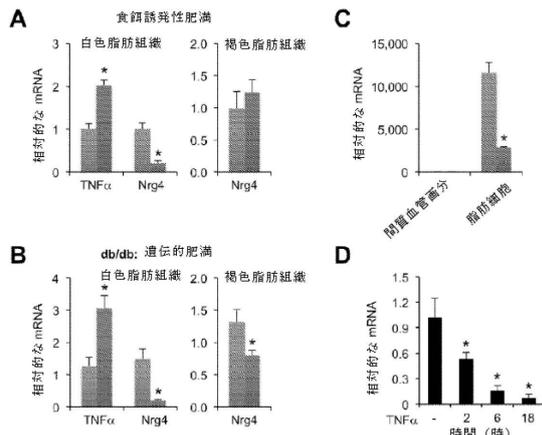
【図4】

【図4】



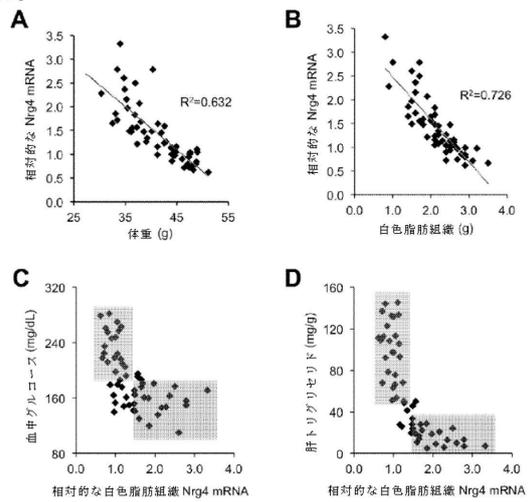
【 図 5 】

【 図 5 】



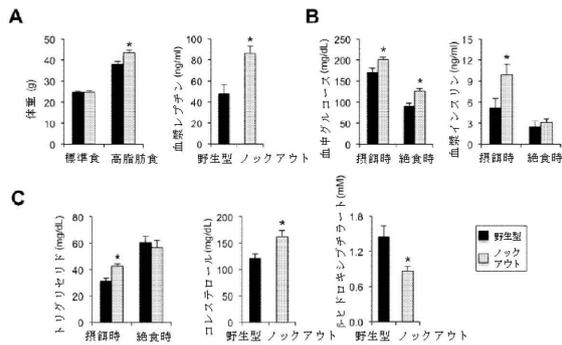
【 図 6 】

【 図 6 】



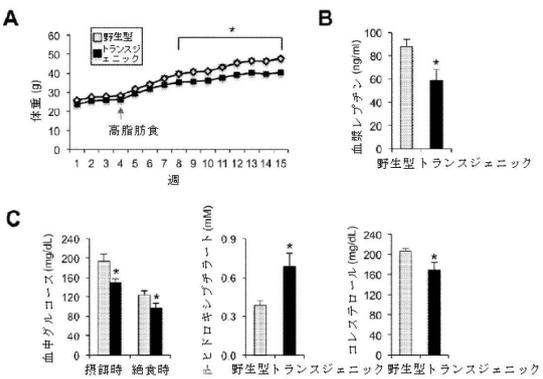
【 図 7 】

【 図 7 】



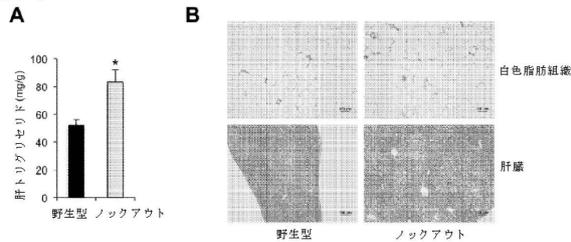
【 図 9 】

【 図 9 】



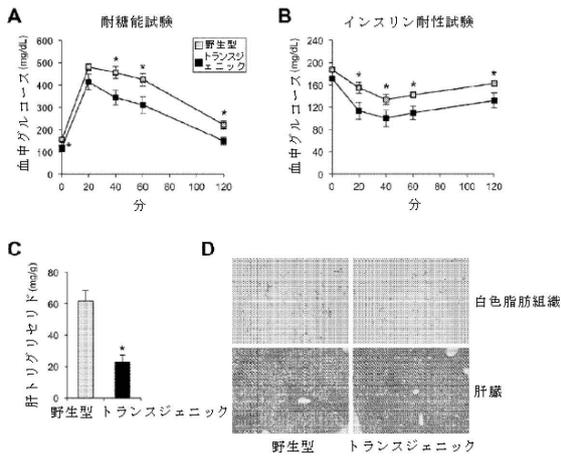
【 図 8 】

【 図 8 】



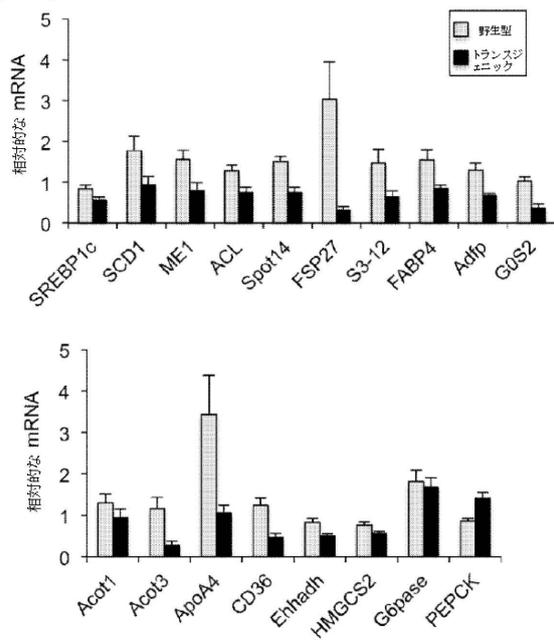
【 図 1 0 】

【 図 1 0 】



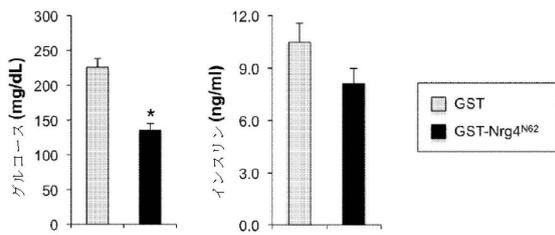
【 図 1 1 】

【 図 1 1 】



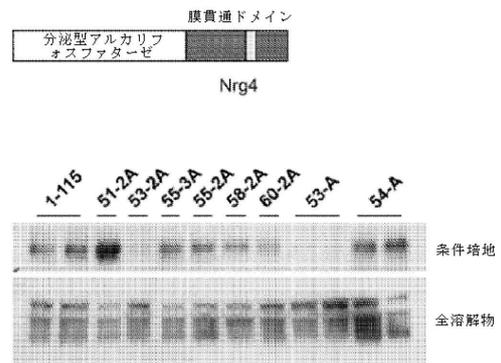
【 図 1 2 】

【 図 1 2 】



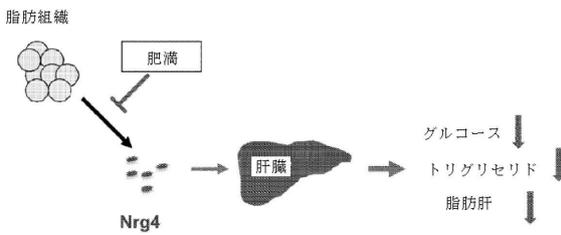
【 図 1 4 】

【 図 1 4 】



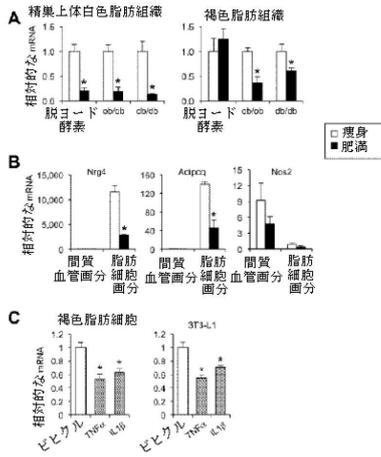
【 図 1 3 】

【 図 1 3 】



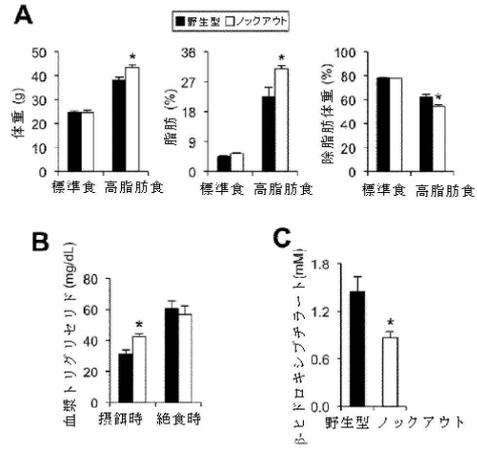
【図15】

【図15】



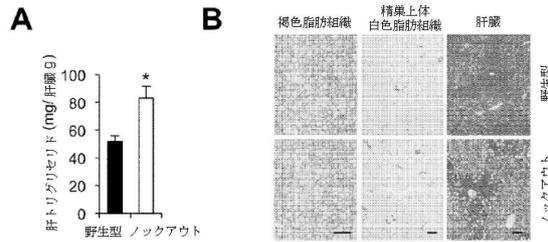
【図16】

【図16】



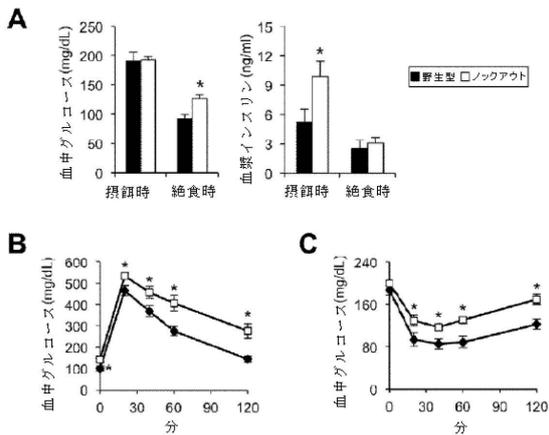
【図17】

【図17】



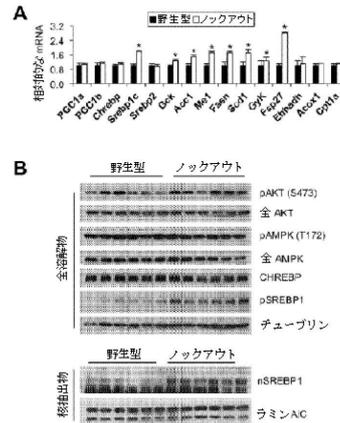
【図18】

【図18】



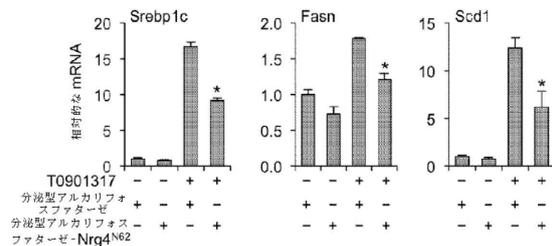
【図19】

【図19】



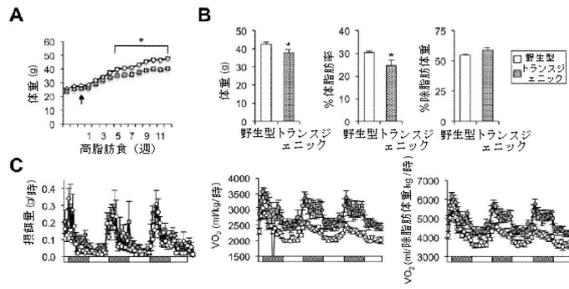
【図20】

【図20】



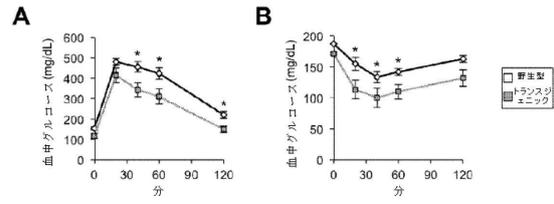
【 図 2 1 】

【 図 2 1 】



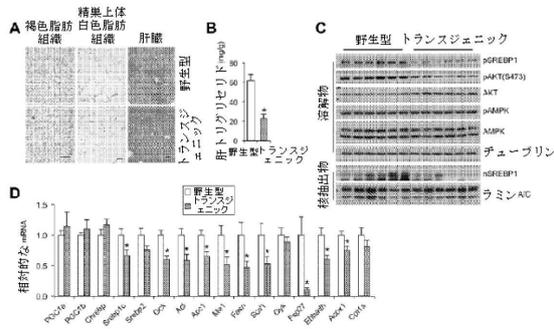
【 図 2 3 】

【 図 2 3 】



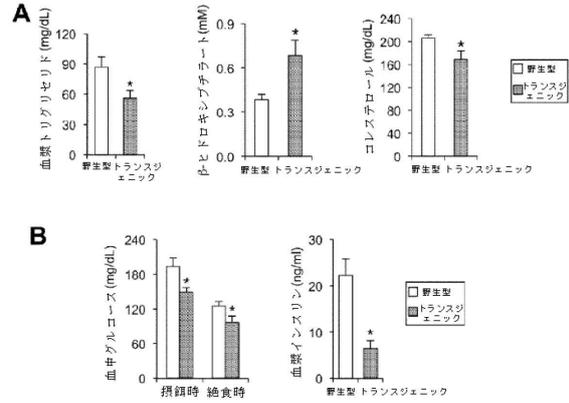
【 図 2 4 】

【 図 2 4 】



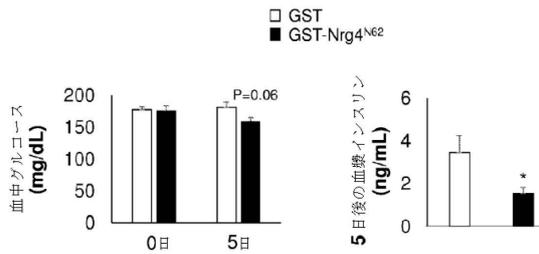
【 図 2 2 】

【 図 2 2 】



【 図 2 5 】

【 図 2 5 】



【配列表】

0006565121000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 31/405	(2006.01)	A 6 1 K 31/405
A 6 1 K 31/397	(2006.01)	A 6 1 K 31/397
A 6 1 K 31/455	(2006.01)	A 6 1 K 31/455
A 6 1 K 31/192	(2006.01)	A 6 1 K 31/192
A 6 1 K 31/216	(2006.01)	A 6 1 K 31/216
G 0 1 N 33/68	(2006.01)	G 0 1 N 33/68
C 0 7 K 14/475	(2006.01)	C 0 7 K 14/475
C 1 2 N 15/12	(2006.01)	C 1 2 N 15/12

(72)発明者 リン, ジェンディエ
 アメリカ合衆国 ミシガン 48109, アナーバー, ウォッシュテナウ アベニュー 210, ライフ サイエンス インスティテュート 5437

(72)発明者 ワン, グオシャオ
 アメリカ合衆国 ミシガン 48109, アナーバー, ウォッシュテナウ アベニュー 210, ライフ サイエンス インスティテュート 5437

審査官 小森 潔

(56)参考文献 特表2003-510029(JP,A)
 米国特許出願公開第2004/0005622(US,A1)
 特表2004-525603(JP,A)
 Journal of Biological Chemistry, 2012年, Vol. 287, No. 47, p39850-39858
 日本消化器病学会雑誌, 1985年, Vol. 82, No. 1, p65-71
 日本消化器病学会雑誌, 1984年, Vol. 81, No. 26 taikai, p2472, P237

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 38/18
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
 CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)