

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-518213

(P2006-518213A)

(43) 公表日 平成18年8月10日(2006.8.10)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z	4 B O 2 4
C O 7 K 14/52 (2006.01)	C O 7 K 14/52	4 B O 6 3
C O 7 K 16/24 (2006.01)	C O 7 K 16/24	4 H O 4 5
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-502500 (P2006-502500)	(71) 出願人	594016872
(86) (22) 出願日	平成16年2月20日 (2004.2.20)		サントル、ナショナル、ド、ラ、ルシェ
(85) 翻訳文提出日	平成17年10月21日 (2005.10.21)		ルシュ、シアンティフィック、(セーエヌエ
(86) 国際出願番号	PCT/IB2004/000947		ルエス)
(87) 国際公開番号	W02004/074514		フランス国パリ、リュ、ミケ、ランジュ、
(87) 国際公開日	平成16年9月2日 (2004.9.2)		3
(31) 優先権主張番号	03290412.0	(74) 代理人	100075812
(32) 優先日	平成15年2月20日 (2003.2.20)		弁理士 吉武 賢次
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100091487
			弁理士 中村 行孝
		(74) 代理人	100094640
			弁理士 紺野 昭男
		(74) 代理人	100107342
			弁理士 横田 修孝
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 2型糖尿病およびその早期発症の診断の方法

(57) 【要約】

本発明はヒト遺伝学の分野に属し、t i e g 2 遺伝子のエクソン2に位置するA 1 8 5 G 変異ならびにG - 1 5 3 4 C、5 4 a、3 0 4 a、+ 6 5 9 C > T (T h r 2 2 0 M e t) および + 1 0 3 9 G > T (A l a 3 4 7 S e r) 変異の同定に基づく、ヒト被験者における2型糖尿病 (T 2 D)、早期発症2型糖尿病および若年発症成人型糖尿病 (M O D Y) の新規な診断および治療の方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

t i e g 2 遺伝子の配列中に生殖細胞系の変異があるかどうかを決定することを含んでなり、該変異は2型糖尿病の素因の指標となるヒト被験者における2型糖尿病、早期発症型2型糖尿病および若年発症成人型糖尿病(MODY)の素因を診断する方法であって、該変異は、そのコード配列が配列番号1で表されるt i e g 2 遺伝子の開始コドンに関して番号が付されたA 1 8 5 G、配列番号4に示されるG - 1 5 3 4 C、図4 Aおよび4 Bに示される5 4 aまたは3 0 4 a、ならびにその配列が図7および8にそれぞれ示される配列番号4 0および4 1に表される+ 6 5 9 C > T (T h r 2 2 0 M e t) および+ 1 0 3 9 G > T (A l a 3 4 7 S e r) から選択される方法。

10

【請求項2】

変異A 1 8 5 G、G - 1 5 3 4 C、5 4 aまたは3 0 4 a、+ 6 5 9 C > T (T h r 2 2 0 M e t) および+ 1 0 3 9 G > T (A l a 3 4 7 S e r) から選択される変異と密接に関連する生殖細胞系の変異の存在を判定することを含んでなる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

分子(1)前記サンプルから単離されたt i e g 2 遺伝子ゲノムDNA領域と、(2)t i e g 2 遺伝子DNAのヒト野生型領域と相補的な核酸プローブとを互いにハイブリダイズさせて二重らせんを形成させた場合に、分子(1)と(2)の間に、前記サンプルから単離されたt i e g 2 遺伝子ゲノムDNAの配列中に少なくとも1つの変異が存在することによるミスマッチが存在するかどうかを決定することを含んでなる、t i e g 2 遺伝子の配列中の変異を同定する方法。

20

【請求項4】

分子(1)前記サンプルから単離されたt i e g 2 遺伝子ゲノムDNAのエクソン2と、(2)配列番号2で表されるt i e g 2 遺伝子DNAのヒト野生型エクソン2領域と相補的な核酸プローブとを互いにハイブリダイズさせて二重らせんを形成させた場合に、分子(1)と(2)の間に、前記サンプルから単離されたt i e g 2 遺伝子ゲノムDNAの配列中に少なくとも1つの変異が存在することによるミスマッチが存在するかどうかを決定することを含んでなる、t i e g 2 遺伝子のエクソン2中の変異を同定する方法。

【請求項5】

前記サンプル中のt i e g 2 遺伝子エクソン2領域の増幅、および増幅した配列と野生型t i e g 2 遺伝子エクソン2領域配列(配列番号2で表される)または突然変異型t i e g 2 遺伝子エクソン2領域配列に由来する1以上の核酸プローブとのハイブリダイゼーションを含んでなり、前記プローブまたはプライマーがそれぞれA 1 8 5 GおよびG - 1 5 3 4 Cの配列として、- c a a a g a t c c c R g a a a g g t g a c - (配列番号5)および- g g g g t g c t g a S t g g g a a g a g g - (配列番号6)を包含する(配列中のRはAまたはGを示し、SはCまたはGを示す)、請求項4に記載の方法。

30

【請求項6】

分子(1)前記サンプルから単離されたt i e g 2 遺伝子ゲノムDNAと、(2)配列g a c a c a c a c c t c a X g g a c a g t - (配列番号42)(配列中、XはCまたはT)に由来するプローブおよび配列t t g g t c c t g c c c c a g g g a Y c c c t c c c t c c g - (配列番号43)(配列中、YはGまたはT)に由来するプローブなどの+ 6 5 9 C > T (T h r 2 2 0 M e t) および+ 1 0 3 9 G > T (A l a 3 4 7 S e r) 変異配列を包含するヒトt i e g 2 遺伝子DNAと相補的な核酸プローブとの間にミスマッチが存在するかどうかを決定することを含んでなる、t i e g 2 遺伝子中の変異を同定する方法。

40

【請求項7】

配列番号5乃至36から選択されるプローブまたはプライマーならびに配列番号42および43由来のプライマー。

【請求項8】

50

配列番号3のT I E G 2のG l n 6 2 A r g タンパク質変異体、T h r 2 2 0 M e t タンパク質変異体、A l a 3 4 7 S e r タンパク質変異体および以下の変異：

G l n 6 2 A r g

T h r 2 2 0 M e t

A l a 3 4 7 S e r

のうち少なくとも2つを呈する変異体から選択されるT I E G 2の変異体。

【請求項9】

正常なT I E G 2と請求項8に記載のT I E G 2の変異体とを区別することができる抗体。

【請求項10】

請求項8に記載の抗体、ならびにウエスタンブロット法、免疫組織化学的アッセイおよびE L I S Aアッセイに好適な試薬、または少なくとも1種の請求項7に記載のプロープを含んでなる、診断用キット。

【請求項11】

(i) 候補化合物および(i i) T I E G 2ポリペプチドを混合すること、ならびにT I E G 2ポリペプチドと前記化合物との結合量を測定することを含んでなる、2型糖尿病の予防および/または処置をすることができる化合物のスクリーニング方法。

【請求項12】

ヒト細胞中で野生型T I E G 2のコード配列の発現を可能にするプロモーターと作動可能に連結された野生型T I E G 2のコード配列を含んでなる、遺伝子療法に好適なベクター。

【請求項13】

2型糖尿病の予防および/または処置用薬剤を製造するための請求項11に記載の方法によって同定される化合物または請求項11に記載のベクターの使用。

【請求項14】

請求項8に記載のタンパク質変異体を発現する、2型糖尿病の研究に用いられる動物モデル。

【請求項15】

配列番号3のT I E G 2のG l n 6 2 A r g タンパク質変異体、T h r 2 2 0 M e t タンパク質変異体、A l a 3 4 7 S e r タンパク質変異体および以下の変異：

G l n 6 2 A r g

T h r 2 2 0 M e t

A l a 3 4 7 S e r

のうち少なくとも2つを呈する変異体から選択されるT I E G 2の変異体の発現をもたらす、調節エレメントと作動可能に連結された請求項8に記載のタンパク質変異体をコードする核酸分子配列をそのゲノムに組み込んでいる、トランスジェニック非ヒト哺乳動物。

【請求項16】

2型糖尿病、早期発症型2型糖尿病および若年発症成人型糖尿病(M O D Y)に用いられる動物モデルとして、そのゲノム中に内在性t i e g 2遺伝子の破壊を含んでなる、トランスジェニック非ヒト哺乳動物。

【請求項17】

遺伝子の破壊が、A 1 8 5 G、G - 1 5 3 4 C、5 4 a、3 0 4 a、+ 6 5 9 C > Tおよび+ 1 0 3 9 G > Tである、請求項16に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明はヒト遺伝学の分野に属し、t i e g 2遺伝子のエクソン2に位置するA 1 8 5 G変異ならびにG - 1 5 3 4 C、5 4 a、3 0 4 a、+ 6 5 9 C > T (T h r 2 2 0 M e t) および+ 1 0 3 9 G > T (A l a 3 4 7 S e r) 変異の同定に基づく、ヒト被験

10

20

30

40

50

者における2型糖尿病、早期発症2型糖尿病および若年発症成人型糖尿病(MODY)の新規な診断および治療の方法に関する。

【0002】

2型糖尿病は、インスリン非依存性糖尿病(NIDDM)または成人発症型糖尿病としても知られる、最も多く見られる糖尿病の種類である。2型糖尿病では、膵細胞がインスリンをわずかしか産生しない、もしくは全く産生しないか、または全身の細胞がインスリンを利用することができない(インスリン抵抗性)。これは欧米諸国で全症例の95%に相当し、米国だけで約1500万人が罹患している。

【0003】

今日現在、糖尿病の診断には空腹時血漿グルコース(FPG)検査が用いられている。しかし、この検査はひとたび病気を発症した場合にしか適さない。従って、この疾病に関連する遺伝的リスク因子を評価することのできる診断検査が必要である。このような検査は、リスクのある人々の生活習慣を適応させるため、また疾病の発症を予防するために大きな関心が寄せられるだろう。

【0004】

2型糖尿病の発生において遺伝因子の関与を裏付ける強力な証拠がある。例えば、一卵性双生児間の2型糖尿病のリスク率は約60~90パーセントである(Bennett PH. *Epidemiology of diabetes mellitus*. In: Rifkin H, Porte D Jr., eds. *Ellenburg and Rifkin's Diabetes Mellitus*. New York: Elsevier, 1990: 363-77)。その上、2型糖尿病の第一度近親者がいる場合、この病気を発症するリスクは2倍となる(Leslie RD, Pyke DA. *Genetics of diabetes*. In: Alberti KG, Krall LP, eds. *The diabetes annual*. Amsterdam: Elsevier, 1987: 39-54)。

【0005】

もっと最近では、多数の科学研究によって、2型糖尿病に対する遺伝的素因が存在するということが確定された。本発明者らは糖尿病および肥満家系のゲノムワイドスキャンを行い、それによってこのような疾患との関連の証拠を示すいくつかのゲノム領域を同定するに至った(Vionnet N et al. (2000): *Genomewide search for type 2 diabetes susceptibility genes in French whites: Evidence for a novel susceptibility locus for early onset diabetes on chromosome 3q27 qter and independent replication of a type 2 diabetes locus on chromosome 1q21 q24*. *Am. J. Hum. Genet.* 67: 1470-1480 and Hager J et al. (1998): *A genome wide scan for human obesity genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 10*. *Nat. Genet.* 20: 304-308.)。

【0006】

マイクロサテライトマーカールを用いるさらなる微細マッピングによって、この領域を約5M塩基まで限定することが可能となり、これによりこの領域へ候補遺伝子を同定し、LDマッピング戦略を適用することが可能となった。LDマッピングは膨大な量の一塩基多型(SNP)の遺伝子型解析を伴う。

【0007】

数年かけて、本発明者らは位置的遺伝子候補を同定するための完璧な戦略および方法を開発した。これには統計分析、生物情報学の情報ルート、SNP遺伝子型解析および組織発現プロファイリングが含まれる。本発明者らのアプローチは、結果としてchr2区間の微細マッピング、および位置クローニングアプローチによるこのゲノム領域の分析をもたらした。第2染色体の領域に対して確立されたSNPマップにより、TIEG2を2型糖尿病に対する感受性に関連する遺伝子として同定するに至った。

【0008】

両TIEG遺伝子は、TGF- β によって誘発され(Cook et al. 1998; Blok et al. 1995)、膵細胞増殖を制御する可能性がある(Cook et al. 1998; Cook and Urrutia 2000)。外分泌PANC1細胞系統でのTIEG1の過剰発現はアポトーシスを誘発し(Tachibana et al. 1997)、類似の増殖阻害効果がTIEG2にも示された(Cook et al. 1998)。外分泌膵臓の腺房細胞においてTIEG2を発現するトランスジェニックマウス(

10

20

30

40

50

Mladek et al. 1999)は、TGF- β を過剰発現しているマウスと類似の膵臓萎縮を示す(Sanvito et al. 1995)。さらに、TIEG1は骨芽細胞中でTGF- β と類似の効果を誘発することが示されている(Hefferan et al. 2000)。このように、TGF- β に誘発されるTIEG1および2は、TGF- β の効果、特に外分泌膵臓組織に見出される効果を模倣することができる。

【0009】

本発明に関して、本発明者らは、TIEG2のエクソン2に位置する変異体A185G (= 2SNP199b、TG2Q62R、TG2AI85G)を同定および分析し、TIEG2が2型糖尿病(T2D)に対する感受性に関連していることを明らかにした。SNP199b (A > G)はTIEG2のエクソン2中の非同義(Gln62Arg)変異で、転写の際のTIEG2の抑制特性を変化させることができる。

10

【0010】

本発明に関して、本発明者らはA185Gと密接な不平衡にある、さらなる変異体G-1534Cを同定および分析した。この変異は翻訳開始部位から1.5Kbに位置し、TIEG2遺伝子のまだ定義されていないプロモーター中に存在すると思われる。この配列をTransFac(Heinemeyer et al 1998)で解析すると、C対立遺伝子の導入によってAP-1部位が作成されることが予測された。-1534Cおよび185G対立遺伝子双方の存在は、非機能的TIEG2タンパク質の過剰発現をもたらす結果となりうる。本発明者らはTIEG2におけるまれな突然変異が若年発症成人型糖尿病(MODY)および早期発症T2Dに関連することも見出した。

20

【0011】

この点に関して、機能性の低いTIEG2の調節によって引き起こされうる、膵臓の発達における前駆細胞の調節の変化および/またはヒト成人膵臓における細胞の新生の変化は、外分泌細胞と内分泌細胞との間のバランスを変える可能性がある。

【0012】

TIEG2は膵臓の内分泌と外分泌のバランスに関連しており、本明細書ではこれを2型糖尿病の発生に影響しうる、膵臓の発達および再生に重要なものであると仮定される。TIEG2は偏在発現するが、骨格筋、外分泌膵臓、脳および脂肪組織でmRNAレベルが高く、このことは、いくつかの組織で2型糖尿病に対する感受性に影響を与えうる増殖/分化および細胞周期の調節を含み得るさらなる役割をTIEG2が有する可能性があることを示唆するものである。

30

【0013】

説明

従って、本発明は、2型糖尿病に対する対応の改善に寄与し、TIEG2を媒介とするシグナル伝達が2型糖尿病に対する感受性に関連がある証拠を示す。結果として、TIEG2は、2型糖尿病のための薬剤設計のための新規な標的となる。TIEG2変異体TG2Q62Rの2型糖尿病との関連は、2型糖尿病への素因を分析する診断検査として特に有用である。

【0014】

第1の態様では、本発明は、ヒト被験者における2型糖尿病、早期発症型2型糖尿病および若年発症成人型糖尿病(MODY)の素因を診断するための方法に関し、この方法はtieg2遺伝子の配列中に生殖細胞系の変異があるかどうかを判定することを含み、該変異が2型糖尿病の素因の指標となり、該変異は、そのコード配列が配列番号1に示されるtieg2遺伝子の開始コドンに関して番号が付されたA185G、配列番号4に示されるG-1534C、図4Aおよび4Bに示される54aまたは304a、ならびにその配列が図7および8にそれぞれ示される配列番号6および7に示される+659 C > T (Thr220Met)および+1039 G > T (Ala347Ser)から選択される。

40

【0015】

本発明はまた、上述のように、変異体A185G、G-1534C、54aまたは30

50

4 a、+659 C>T (Thr220Met) および +1039 G>T (Ala347Ser) から選択される変異体と、密接に関連する生殖細胞系変異の存在を決定することを含んでなる、2型糖尿病に対する素因を診断する方法に関する。

【0016】

本発明はより一般には、tieg2遺伝子の研究に関する。この点で、本発明は、分子(1)前記サンプルから単離されたtieg2遺伝子ゲノムDNA領域と、(2)tieg2遺伝子DNAのヒト野生型領域と相補的な核酸プローブとを互いにハイブリダイズさせて二重らせんを形成させた場合に、分子(1)と(2)の間に、前記サンプルから単離されたtieg2遺伝子ゲノムDNAの配列中に少なくとも1つの変異が存在することによるミスマッチが存在するかどうかを決定することを含んでなる、tieg2遺伝子の配列中の変異を同定する方法に関する。

10

【0017】

より具体的には、本発明は、分子(1)前記サンプルから単離されたtieg2遺伝子ゲノムDNAのエクソン2と、(2)配列番号2で示されるtieg2遺伝子DNAのヒト野生型エクソン2領域と相補的な核酸プローブとを互いにハイブリダイズさせて二重らせんを形成させた場合に、分子(1)と(2)の間に、前記サンプルから単離されたtieg2遺伝子ゲノムDNAの配列中に少なくとも1つの変異が存在することによるミスマッチが存在するかどうかを決定することを含んでなる、tieg2遺伝子のエクソン2中の変異を同定する方法を対象とする。

【0018】

上述の方法では、サンプルのmRNAを、前記プローブと前記tieg2遺伝子に対応するRNAとのハイブリダイゼーションに適した条件下で、tieg2遺伝子プローブと接触させ、前記プローブのハイブリダイゼーションを判定し、ハイブリダイゼーション後のシグナルレベルを標準のシグナル(陽性対照、陰性対照または双方のいずれか)と比較する。

20

【0019】

このハイブリダイゼーション複合体は、プローブ、または直接にはmRNAの標識化によると思われるシグナルを発する。用いることができる種々の標識は当業者に周知であり、³²P、³³P、³⁵S、³Hまたは¹²⁵Iが挙げられる。非放射性標識は、ピオチン、アビジン、ストレプトアビジン、ジオキシゲニン、ハプテン、色素、発光物質(放射性発光物質、化学発光物質、生物発光物質、蛍光物質またはリン光発光物質など)のようになりバンドから選択することができる。本願中に記載されているSNPを同定するためには、tieg2遺伝子プローブと前記サンプルから単離されたゲノムDNAとを、前記プローブと前記遺伝子とのハイブリダイゼーションに適した条件下で接触させ、前記プローブのハイブリダイゼーションを判定することができる。

30

【0020】

前記tieg2遺伝子領域プローブは、「野生型」DNA(すなわち、探索されるSNPがプローブ上に存在せず、本発明のSNPがサンプル中のDNA上に存在しない場合にハイブリダイゼーションが起こる)か、または「突然変異」DNA(すなわち、探索されるSNPを有し、SNPがサンプル中のDNA上に存在する場合にのみハイブリダイゼーションが起こる)のいずれかである。この実施形態で用いる対立遺伝子特異的プローブ、それらの長さ、またはハイブリダイゼーション条件を決定する技術は当業者に公知である。

40

【0021】

別の実施形態では、本発明は、tieg2遺伝子エクソン2領域の生殖細胞系配列または前記サンプルのその他の領域に変化があるかどうかを、変性または非変性ポリアクリルアミドゲル上で、前記サンプル由来の一本鎖DNAの電気泳動移動度のシフトを観察することによって決定することにより実行される。前記一本鎖核酸は、好適なプライマーを用いるゲノムDNAの増幅および変性(このような目的では、通常、ゲルおよび電気泳動条件は変性されている)後に得てもよい。

50

【0022】

別の実施形態では、本発明は、t i e g 2 遺伝子エクソン2領域の全てまたは一部、あるいは前記サンプル由来のその他の領域の増幅、および前記の増幅されたDNAの配列の決定によって実行される。

【0023】

別の実施形態では、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いて、特定のt i e g 2 突然変異対立遺伝子が前記サンプル中に存在するかどうかを決定するが、この場合には増幅のみが起こる。

【0024】

例えば、これらのプライマーは、それぞれA 1 8 5 GおよびG - 1 5 3 4 Cの配列 - c a a a g a t c c c R g a a a g g t g a c - (配列番号5)および - g g g g t g c t g a S t g g g a a g a g g - (配列番号6)を包含し、配列中のRはAまたはGを示し、SはCまたはGを示す。

【0025】

本発明はまた、分子(1)前記サンプルから単離されたt i e g 2 遺伝子ゲノムDNAと、(2)配列g a c a c a c a c c t c a X g g a c a g t - (配列番号42)(配列中、XはCまたはT)に由来するプローブおよび配列t t g g t c c t g c c c c a g g g a Y c c c t c c c t c c g - (配列番号43)(配列中、YはGまたはT)に由来するプローブなどの+ 6 5 9 C > T (T h r 2 2 0 M e t)および+ 1 0 3 9 G > T (A l a 3 4 7 S e r)変異配列を包含するヒトt i e g 2 遺伝子DNAと相補的な核酸プローブとの間にミスマッチが存在するかどうかを決定することを含んでなる、t i e g 2 遺伝子中の変異を同定する方法を対象とする。

【0026】

この点に関して、本発明は、+ 6 5 9 C > T (T h r 2 2 0 M e t)および+ 1 0 3 9 G > T (A l a 3 4 7 S e r)変異配列を包含するプライマーを対象とする。例えば、+ 6 5 9 C > T変異のプライマーは、配列 - g a c a c a c a c c t c a X g g a c a g t - (配列番号42)(配列中、XはCまたはT)を包含するか、またはこれに由来するものであってよい。+ 1 0 3 9 G > T変異のプライマーは、配列 - t t g g t c c t g c c c c a g g g a Y c c c t c c c t c c g - (配列番号43)(配列中、YはGまたはT)を包含するか、またはこれに由来するものであってよい。

【0027】

別の実施形態では、前記サンプル由来のt i e g 2 遺伝子エクソン2領域の全てまたは一部をクローニングしてクローン配列を作出し、前記クローン配列の配列を決定する。

【0028】

上述の方法は、前記サンプルのt i e g 2 遺伝子エクソン2領域配列の増幅、および増幅した配列と野生型t i e g 2 遺伝子エクソン2領域配列(配列番号2で示される)または突然変異型t i e g 2 遺伝子エクソン2領域配列に由来する1以上の核酸プローブとのハイブリダイゼーションによって実施することができ、前記プローブは、A 1 8 5 G変異体およびG - 1 5 3 4 C変異体に特異的なプローブから選択される。

【0029】

A 1 8 5 G変異アッセイは、オリゴヌクレオチドプライマーを用いるPCRによりエクソン2 T I E G 2 のゲノム配列5' - C T C G G T G T T T G T T G C T A T A G A C T - 3' (配列番号7)および5' - C A G G G A A T C T T C T C A C A A G T T C T - 3' (配列番号8)、表1)を増幅することによって実施することができ、その後、対立遺伝子の変異を、プローブL C R e d 6 4 0 - A T C C C A G A A A G G T G A C C T (配列番号33)およびT C T T G T T T G T A T G A G C T C C T G G G T C A - フルオレセイン(配列番号34)を用いてライトサイクラー(Roche)を使用して示差的T_m変化により評価することができる。

【0030】

10

20

30

40

50

G - 1 5 3 4 C 変異アッセイは、オリゴヌクレオチドプライマーを用いるPCRによりTIEG2の上流のゲノム配列(5' - G T T T A A G A C G A A A G A A C C G T G A T A - 3' (配列番号9)および5' - G A A C A G C A A G T G C G A G G A C - 3'、(配列番号10)、表1)を増幅することによって実施することができ、その後、対立遺伝子の変異を、プローブLCRed640 - T C T T C C C A C T C A G C A C (配列番号35)およびT C C C T G C G T C C A C T C C A G C T C C C A G A - フルオレセイン(配列番号36)を用いてライトサイクラー(Roche)を使用して示差的T_m変化により評価することができる。

【0031】

プローブに付着させた蛍光分子は例として示しているものであって、これに限定されるものではない。 10

さらに別の実施形態では、本発明は、配列番号5～配列番号36から選択されるプローブまたはプライマーを対象とする(下記表1参照)。

【0032】

ならびに少なくとも1種類の同定された変異を含む診断キットを対象とする。

【0034】

本発明はまた、前記サンプル中の *t i e g 2* 遺伝子エクソン2領域と、野生型または突然変異型 *t i e g 2* 遺伝子エクソン2領域配列に由来する1以上の核酸プローブとの *i n s i t u*ハイブリダイゼーションを決定することを含んでなる方法に関する。このような方法としては、T座でのCGH-*f i s h*法またはCGHアレイ法が挙げられる。

【0035】

発明者らは、TIEG2にGln62Arg変異が存在すると、TIEG2転写抑制活性を阻害する可能性があることをいく通りかの方法で証明した。従って、*t i e g 2* 遺伝子のエクソン2領域またはその他の領域での他の改変もまた、TIEG2タンパク質の転写抑制活性の変化をもたらし、mSin3Aとの相互作用の変化によって、2型糖尿病に対する素因につながるの推測には信憑性がある。

10

【0036】

概して、最初にMadタンパク質について示されたように、コリプレッサーmSin3Aとの相互作用はヒストン脱アセチル化酵素の動員および機能的転写抑制複合体の形成を誘起する。近年、最初の抑制ドメイン近傍のリン酸化がmSin3AとTIEG2との結合を阻害し、結果としてTIEG2の抑制活性が失われることが示されている(ElIenrieder et al 2002)。同様に、62R変異が起こるとmSin3A結合が妨げられ、TIEG2の抑制活性が変化しうる。その上、-1534C(%)変異を有する185G変異が起こると、TIEG2のプロモーター中のAP-1反応部位の導入を介してTIEG2に可能な転写のアプレギュレーションを誘導し、結果として非機能的TIEG2タンパク質の過剰発現をもたらし得る。

20

【0037】

従って、一実施形態では、本発明は、ヒト被験者において2型糖尿病に対する素因を診断する方法に関し、この方法ではTIEG2タンパク質とmSin3Aとの相互作用および前記サンプル中のTIEG2 mRNAの発現レベルの変化が調査される。タンパク質と核酸の間の相互作用の変化は、当技術分野で公知の技術で検出が可能である。

【0038】

第二の態様では、本発明は、配列番号3のTIEG2のGln62Arg変異体、TIEG2のThr220Met変異体およびTIEG2のAla347Ser変異体に関する。これはまた、以下の変異：

30

Gln62Arg

Thr220Met

Ala347Ser

のうち少なくとも1、2または3つを呈するTIEG2の変異体に関する。特に、これらのポリペプチドは免疫プロット法または免疫細胞化学によって検出することができる。

【0039】

従って、本発明は、患者のサンプルにおいて前記変異の存在または不在を検出するのに使用可能な、これらのTIEG2変異体に特異的な抗体、すなわち正常なTIEG2と変異体TIEG2とを区別することのできる抗体を対象とする。免疫学的アッセイは当技術分野で標準的な知識を用いて実施できる。これらのものとしては、ウエスタンプロット法、免疫組織化学的アッセイおよびELISAアッセイが挙げられる。本発明はこれらの試験に好適なこのような抗体および試薬を含む診断キットを包含する。

40

【0040】

本発明は、2型糖尿病の、特に遺伝的感受性が懸念される家系の患者のための、処置および/または予防における新規な分野を開拓するものである。従って、本発明はまた、2型糖尿病を予防および/または処置することの可能な化合物をスクリーニングするための方法に関し、その方法は、(i)候補化合物および(ii)TIEG2ポリペプチドを混合すること、ならびにTIEG2ポリペプチドと前記化合物との結合量を測定することを含んでなる。実際、TIEG2のアゴニストはその転写抑制活性を回復させ、2型糖尿病

50

を単独またはその他の処置と組み合わせて処置するために有用な薬剤であると考えられる。

【0041】

この実施形態では、「TIEG2」とは、Gln62Arg、Thr220MetおよびAla347Ser変異ならびに野生型TIEG2を含むものと理解される。

【0042】

本発明はまた、薬学上許容される賦形剤および本発明に記載の方法によって同定された化合物を含む医薬組成物、ならびに2型糖尿病の処置および/または予防を目的とする薬剤の製造のための本発明の方法によって同定された化合物の使用に関する。

【0043】

本発明はまた、本発明の医薬組成物の投与を含んでなる、2型糖尿病の治療方法に関する。

【0044】

Gln62Arg、Thr220MetおよびAla347Ser変異体による欠陥を修正するためには、本発明の別の実施形態としてはベクター、より詳しくは、ヒト細胞中で野生型TIEG2のコード配列の発現を可能にするプロモーターと作動可能に連結された前記コード配列を含んでなる、遺伝子治療に好適なベクターに関する。このようなベクターは直接in vivo遺伝子導入に適合させることができ、アデノウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルス(AAV)などのウイルスベクターが挙げられる。リポソーム、分子複合体、ポリマーおよびその他のベクターを含む、非ウイルスベクターを用いてもよい。組織への直接注射、静脈内もしくは動脈内投与、吸入、または局所適用ならびにその他の投与経路は当技術分野で公知である。

【0045】

本発明はまた、2型糖尿病を研究するために有用な新規な動物モデルに関し、該動物内で前記tieg2変異体が発現される。本発明の動物を得る方法は当業者に公知であり、特に本発明の方法に従って同定することができる薬剤の試験に有用である。この方法には、前記tieg2変異遺伝子、キメラ動物、および前記tieg2変異体を発現するベクターでトランスフェクトされた動物の生殖的伝達が可能な新規な系統をもたらすための遺伝子改変動物を含む。

【0046】

この構築物の、本発明のトランスジェニック動物のゲノムへの挿入は、当業者に周知の方法によって行うことができ、無作為でも標的化してもよい。要するに、当業者であれば、ゲノム内に挿入する配列を含むベクター、および選択マーカー(例えばネオマイシン耐性をもたらすタンパク質をコードする遺伝子)を構築し、それを動物の胚幹(ES)細胞に導入することができる。次に、これらの細胞を選択マーカーで選択し、それを、例えば胚盤胞へのマイクロインジェクションによって、胚へ組み込み、これは妊娠中の雌の子宮を灌流することによって回収することができる。胚の再移植および形質転換動物の選択の後に可能性のある戻し交雑を行って、このようなトランスジェニック動物を得ることができる。「よりクリーンな」動物を得るためには、それが正しい配列に隣接されているならば部位特異的リコンビナーゼを使用して選択マーカー遺伝子を切り出してもよい。

【0047】

従って本発明は、前述のようなTIEG2変異体タンパク質の、すなわちGln62Arg、Thr220MetおよびAla347Serまたはそのいずれかの組み合わせの発現をもたらす調節エレメントと作動可能に連結されているtieg2変異遺伝子の核酸配列またはそのコード配列をそのゲノムに組み込んでいるトランスジェニック非ヒト哺乳動物に関する。

【0048】

前記実施形態に予見されるtieg2配列は、本発明の動物のゲノム内に導入されたヒトtieg2遺伝子配列、またはそのプロモーターが、変異が配列中に存在する間は過剰発現を誘発するよう修飾されている、内在性tieg2遺伝子配列であってよい。

10

20

30

40

50

【0049】

さらに、本発明はまた、TIEG2と2型糖尿病との関連を試験するため、および早期発症T2Dを研究するための動物モデルとして、内在性*tieg2*遺伝子の破壊をそのゲノムに含むトランスジェニック非ヒト哺乳動物に関する。特に、前記破壊には、選択可能なマーカ配列の挿入を含む。特に、前記破壊はホモ接合型の破壊であり、前記ホモ接合型の破壊は結果としてTIEG2をコードする内在遺伝子のヌル変異をもたらす。

【0050】

本発明の哺乳類は好ましくはマウスなどの齧歯類である。

【実施例】

【0051】

実施例1：2型糖尿病(T2D)におけるTIEG2の関与の遺伝的証拠

SNP199b(A>G)はTIEG2のエクソン変異である。SNP199b(TG2Q62R)とT2Dとの強い関連は、家族性T2Dおよび対照群からなるフランス系白人コホートで存在することが示された(優性モデルTG2Q62Rに基づくロジスティック回帰(年齢と性別で階層化) $p < 10^{-5}$)。SNP199b、437b、54aおよび304aは強い関連がある(カイ2乗 $p < 0.0001$)。SNP437b(G>C)は、TIEG2遺伝子の未だ同定されていないプロモーター中に存在する可能性のあるゲノム変異である。本発明者らは、chr2(表現型*large/strict*、*xtd*ロッドスコア4.45($p = 0.04$))との連鎖の証拠を示す家系全員のゲノムワイドスキャンで54aと糖尿病との関連を示した。家族性2型糖尿病との(対照352名に対して糖尿病患者287名のコホートにおける)顕著な関連に対し、さらに異種の「コルベール」集団(糖尿病患者947名)では糖尿病との優性関係は見られなかった。しかし、分散には高いBMI値との劣性関係が残っていた。

【0052】

Gln62Argは、mSin3Aコリプレッサーと相互作用することが示されているTIEG2タンパク質の最初のリプレッサードメインの近傍に位置する。TIEG2のR1ドメインはヘリックス型のコンホメーションをとり、TIEG1、BTEB1、3および4において保存されているこのヘリックス抑制モチーフ(oc-HRM)がmSin3Aとの相互作用を担うことが示されている(Sin相互作用ドメイン; (Zhang et al. 2001))。PIX(UK HGPMP資源センター <http://www.hizmp.mrc.ac.uk/>)を用いるTIEG2(62Gln)および62Arg-TIEG2(TG2Q62Rを含むタンパク質)のタンパク質二次構造の分析は、DSC(使用した3つの2D解析プログラムの中の1つ(King et al. 2000))がSIDの近傍にある62Arg-TIEG2に対して長いヘリックスを予測したことを示した。従って、変化した62Arg-TIEG2のコンホメーションは、-HRMに媒介されるmSin3Aとの相互作用を阻害する可能性がある。

【0053】

それに加えて、グルタミンからアルギニンへの変化がタンパク質に特別な変化を加え、従って、その等電点およびmSin3Aとの結合特性を変える可能性がある。

【0054】

さらに、Gln62Argは、プロテインキナーゼCによってリン酸化されうるセリンの隣に位置する。リン酸化は、タンパク質活性の調節、核への転位またはその他のタンパク質との相互作用ならびにタンパク質分解に対する感受性に重要な役割を果たし得る。

【0055】

G-1534Cは翻訳開始部位から1.5Kbに位置し、TIEG2遺伝子の未だ同定されていないプロモーター中に存在する可能性がある。この配列をTransFac(Heinemeyer et al 1998)で解析すると、C対立遺伝子の導入によってAP-1部位が作り出されることが予測された。-1534Cおよび185G対立遺伝子双方の存在(連鎖不均衡0.95)は、非機能的TIEG2タンパク質の過剰発現をもたらす結果となりうる。

【0056】

10

20

30

40

50

要するに、T I E G 2 は外分泌膵細胞の増殖に関連づけられてはいたが、新規に同定された T G 2 Q 6 2 R (S N P 1 9 9 b) の解析結果は、初めて、変化した T I E G 2 と 2 型糖尿病に対する感受性とを直接関連づけるものである。さらに、本発明者らは、T I E G 2 は偏在的に発現するが、骨格筋、外分泌膵臓、脳および脂肪細胞において高いレベルで発現することが見出されるため、T I E G 2 はこれらの組織への影響によって T 2 D に対する感受性に影響を及ぼす可能性があるものと仮定する。T G 2 Q 6 2 R (S N P 1 9 9 b) と 2 型糖尿病との関連は、2 型糖尿病に対する素因を分析するための診断検査として有用である。

【0057】

2 型糖尿病の発生における T I E G 2 の役割をさらに調査するために、本発明者らが目的としたのは、T I E G 2 の標的遺伝子を同定することであった。発明者らは、まず、膵臓で主要な役割を果たす遺伝子に注目した。報告されている T I E G 2 の S P 1 様結合部位 (Cook et al 1998) を基にして、発明者らは S m a d 4、I G F 2 および P D X - 1 のプロモーター中の T I E G 2 結合エレメントを予想した。P D X - 1 に関して、この結合エレメントは最近同定された <エンハンサー 1> エレメント (Ben-Shushan et al 2001) 中に存在する可能性がある。実際、発明者らは T I E G 2 発現ベクターが P D X - 1 エンハンサーエレメントの活性を数倍刺激することを示しているが、突然変異したエンハンサーエレメントには何の影響も与えなかった。P D X - 1 は膵臓の発達に重要であり、適正な島細胞機能に重要な遺伝子、例えばインスリン遺伝子、の転写を調節する (Hui et al 2002) により概説)。さらに、P D X - 1 遺伝子の突然変異は若年発症成人型糖尿病 4 型 (M O D Y 4) の発生の原因である。従って、T I E G 2 による P D X - 1 の調節は、T I E G 2 の不適切な機能が 2 型糖尿病の発生の一因である可能性があることを示す。発明者らは現在、T I E G 2 による P D X - 1 遺伝子調節の正確な機構を調査している。一方で、これはエンハンサー 1 エレメントとの直接的な相互作用によって生じている可能性がある。他方では、最近、密接に関連する T I E G 1 が s m a d 7 および s m a d 2 の双方の遺伝子発現を調節することが報告された (Johnsen et al 2002a, b) ことから、T I E G 2 は s m a d のシグナル伝達の調節によって P D X - 1 遺伝子発現に影響を及ぼしている可能性がある。

【0058】

従って、本発明者らは、T I E G 2 の G - 1 5 3 4 C および G 1 n 6 2 A r g 変異はいくつかの方法で T I E G 2 の転写活性を阻害し、その結果として 2 型糖尿病の発生と因果関係を持つと結論づける。

【0059】

実施例 2 : まれな T I E G 2 の突然変異に関連する若年発症成人型糖尿病 (M O D Y) および早期発症 2 型糖尿病 (T 2 D) の新規な診断および治療法

本発明者らは、根底にある遺伝子的原因が不明なフランスの M O D Y の家系の 19 名の発端者、ならびに 40 歳までに糖尿病を発症した 171 名の発端者および最低 1 名の罹患第一度近親者 (男性 / 女性 96 / 75、B M I 24.9 ± 0.3 kg / cm²、年齢 49.7 ± 1.0 歳、空腹時グルコースレベル 8.9 ± 0.3 mM、糖尿病の発症年齢 32.6 ± 0.5 歳) について T I E G 2 突然変異のスクリーニングを行った。発明者らは、313 名の T 2 D 患者および 313 名の対照被験体に存在しない、2 種類の稀な突然変異を確認した。突然変異 + 1039 G > T (A l a 4 3 7 S e r) が 4 世代にわたる M O D Y - X 家系 (F R 2 9) で見出され、分析した 3 世代で糖尿病 / グルコース不耐性が遺伝していた (図 5 a)。ヘテロ接合型保因者の 2 名の配偶者 (そのうちの 1 名も糖尿病) および 3 名の糖尿病でない兄弟はこの変異を保有していなかった。A l a 4 3 7 S e r は T I E G 2 の 3 番目のリプレッサードメイン内に位置し、生物情報学的分析でこの変異がこのドメイン (P I X および S O P M) のタンパク質二次構造を変化させるとの予測がなされた。第 2 の突然変異、+ 659 C > T (T h r 2 2 0 M e t) は 2 つの早期発症 T 2 D 家系に存在した。家系 F R 4 7 (図 5 b) では、グルコース不耐性または明らかな糖尿病の 4 名の姉妹のうち 3 名がヘテロ接合型保因者であった。この家系のうち、分析した

糖尿病でない5名の被験者にこの突然変異は存在しなかった。糖尿病を早期発症する家系は、定義では一遺伝子性ではなく、またThr220Metが糖尿病家系の1家族に存在しなかったという事実は、複雑な形質という面において予期しないものではない。またTIEG2は多遺伝子による感受性環境でT2Dの発症に影響を及ぼしうるとする発明者らのこれまでの結論に一致する。家系FR4848(図5c)では、2名の糖尿病被験者がヘテロ接合型保因者であり、糖尿病でない被験者はThr220Metを保有していなかった。2つのリプレッサードメイン間に位置しているとはいえ、220Met-TIEG2タンパク質はこの領域中に長いヘリックス構造を有しうる(PIX)。

【0060】

TIEG2の情報伝達経路の障害の生理学上の結果を分析するため、発明者らはTIEG2によって制御される遺伝子を調査した。発明者らはTIEG2が膵臓のβ細胞系の主要マーカーであるPDX1/IPF1遺伝子およびMODY4遺伝子のエンハンサーE1部位、ならびにインスリン遺伝子プロモーター(図6)を活性化させることを見出した。肥満に関連するT2Dの発生を進行させるβ細胞機能障害はβ細胞塊での代償的增加の障害に関与しているので(S. E. Kahn, J. Clin. Endocrinol. Metab., 2001 and S. E. Kahn, Diabetologia 2003に概説)、PDX1活性のどのような欠陥も糖尿病の発生に劇的な効果を有しうる。

10

【0061】

さらに、トランスフェクション実験は、変異+185A>Gを含む62Arg-TIEG2により、インスリンプロモーターの活性化が損なわれたことを示し、従って糖尿病に対する遺伝的素因を引き起こす新規な機構を解明しうる。

20

【0062】

参考文献

Ben-Shushan E, Marshak S, Shoshkes M, Cerasi E, Melloul D. (2001) A pancreatic beta -cell-specific enhancer in the human PDX-1 gene is regulated by hepatocyte nuclear factor 3beta (HNF-3beta), HNF-1alpha, and SPs transcription factors. *J. Biol. Chem.* 276,17533-17540.

Blok LJ, Grossmann ME, Perry JE, Tindall DJ (1995) Characterization of an early growth response gene, which encodes a zinc finger transcription factor, potentially involved in cell cycle regulation. *Mol Endocrinol* 9:1610-20.

10

Cook T, Gebelein B, Mesa K, Mladek A, Urrutia R (1998) Molecular cloning and characterization of TIEG2 reveals a new subfamily of transforming growth factor-beta-inducible Spl-like zinc finger- encoding genes involved in the regulation of cell growth. *JBiol Chem* 273:25929-36.

20

Cook T, Urrutia R (2000) TIEG proteins join the Smads as TGF-beta-regulated transcription factors that control pancreatic cell growth. *Am JPhysiol Gastrointest Liver Physiol* 278: 6513-21.

Ellenrieder V, Zhang JS, Kaczynski J, Urrutia R.(2002) Signaling disrupts mSin3A binding to the Mad1-like Sin3-interacting domain of TIEG2, an Sp1-like repressor. *EMBO J.* 21,2451-2460.

30

Hefferan TE, Reinholz GG, Rickard DJ, Johnsen SA, Waters KM, Subramaniam M, Spelsberg TC (2000) Overexpression of a nuclear protein, TIEG, mimics transforming growth factor-beta action in human osteoblast cells. *J Biol Chem* 275:20255-9.

Heinemeyer, T., Wingender, E., Reuter, I., Hermjakob, H., Kel, A. E., Kel, O. V., Ignatieva, E. V., Ananko, E. A., Podkolodnaya, O. A., Kolpakov, F. A., Podkolodny N. L. and Kolchanov, N. A.(1998) Databases on Transcriptional Regulation: TRANSFAC, TRRD, and COMPEL. *Nucleic Acids Res.* 26, 364-370

40

Hui H, Perfetti R.(2002) Pancreas duodenum homeobox-1 regulates pancreas development during embryogenesis and islet cell function in adulthood. Eur. J. Endocrinol. 146,129-141.

Johnsen SA, Subramaniam M, Janknecht R, Spelsberg TC. (2002a) TGFbeta inducible early gene enhances TGFbeta/Smad-dependent transcriptional responses. Oncogene 21, 5783-5790. 10

Johnsen SA, Subramaniam M, Katagiri T, Janknecht R, Spelsberg TC. (2002b) Transcriptional regulation of Smad2 is required for enhancement of TGFbeta/Smad signaling by TGFbeta inducible early gene. J. Cell Biochem. 87, 233-241.

Mladek A, Burgart JL, Urrutia R (1999) Morphological changes in the exocrine pancreas of transgenic mice overexpressing the TGFbeta-inducible zinc finger transcription factor TIEG2 in an acinar-specific manner (abstract). Gastroenterology 116:G4837. 20

Sanvito F, Nichols A, Herrera PL, Huarte J, Wohlwend A, Vassalli JD, Orci L (1995) TGF-beta I overexpression in murine pancreas induces chronic pancreatitis and, together with TNF-alpha, triggers insulin-independent diabetes. Biochem Biophys Res Commun 217:1279-86. 30

Tachibana I, Imoto M, Adjei PN, Gores GJ, Subramaniam M, Spelsberg TC, Urrutia R (1997) Overexpression of the TGFbeta-regulated zinc finger encoding gene, TIEG, induces apoptosis in pancreatic epithelial cells. J Clin Invest 99:2365-74. 40

【図面の簡単な説明】

【0063】

【図1】SNPマップとTIEGに近接するコンティグを示す図である。

【図2】TIEG2 CDSを示す図である。E1~4:エクソン1~4、Atg:開始コドン、SまたはT(網掛け部分):報告されたリン酸化部位、Gag...:リプレッサードメイン、Gag...:mSin3Aと相互作用するリプレッサードメイン、Tgc...:Znフィンガードメイン、Cag:A185(G)、Q Gln62(Arg)

【図3】tieg2mtQ62Rを示す図である。凡例:E1~4:エクソン1~4、A 50

【 図 7 】

配列番号40 TIEG2 T220M;変異はグレーの背景に太字で示される

```

1/1 TIEG2 31/11
atg acg acg ccg gac ttc gca ggc cca gac ggc ggc gca gtt gac atc atg gac ata
M H F P D F A G P D D A R A V D I M D I
61/21
tgc gag tcc atc ctg gag agc agc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc
C E S I L E R K R B D E R S T C S I L
121/41
gag cag aca gac atg gaa gct gtc gag gct ctt gtt tgc atg agc tcc tgg ggt cca aaa
E Q T D M E A V E A L W C M S S W G O R
161/61
ccc ctg aaa ggt gag ctg ttc cgg atg age ccc ctc atg cct gtc tct gac tct ggc gat
S Q R G D L L R I R F S T Y V S D S G D
241/81
gtc acc acc act gtc gat atg gat gca ggc acc gca cta cca aca ggc ttc cat tct
V T T T V H M D A A T P E L P R D F H S
301/101
tta tcc act ctg tgc ata act cct cct cca agc cct gat ctc gtc gag cca tcy aca agc
L S T L C I T F P Q S F D L V E F S T R
361/121
aca cct gtt tct ccc caa gta aca gct tcc aaa ggc tgc aca agc gat gtt ctc caa
T P V S P Q V T D S R A C T A T D V L Q
421/141
tcc tcc gca gta ggc gca gct ctg agc ggc gca ggc agc ttc ctg gtt ttc
S S A V V A R A L S G A E R G L L G L
481/161
gac cca gtc acc agc tcc ctc agc agc agc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc
E P V F S S P C R A K A T S V I R R T G
541/181
gag agc cct gtc ggc ttc ccc acc act cag cct cca gat tgc ccc ttt tcc gac agc
E S P A A C F P T I Q T F P D C R L S D S
601/201
aga gaa gga gaa gag cag ctt ctg gca cac ttt gaa act ttg gac gag cca cac ttc a(c/b)g
R E C E Q L L G R F E T L Q
661/221
tgc agc tta ctc agc act aac ttg gtc tcc tcc cag ccc tgc ttc cca acc tct gct ggc
D S L L S T N L V S C G P C L H K S G G
721/241
ctg ctg ctc act gac aca ggc cag cag gca ggc tgc cct ggc gca gtt cag act tgc tca
L L L T D X G Q A G W P G A V O T C S
781/261
cca aag aat tat gaa aat gac ctg acc agc aca acc cct ctg gtt tct gtc tct gtc tct
P E M Y R N D L P R K A T F L I S V S V
841/281
cct gct ccc cct gtc ctt tgc cag atg atc cct gtc act ggc aca agt agc atg tta cca
P A P F V L C Q N I P V T G Q S S H L P
901/301
gct ttt ttg aag ccc ccc ccc cag ttg tct gtc ggc act gtc ggc acc atc cta gct cag
A F L K P P P Q L S V G T V R P I L A Q
961/321
gct gct cca ggc cct cca cct gtc ttc ggc ggc cct gtc cct cag gga gct gtc atg
L A P A P Q P V F V G A V P Q G A V H
1021/341
ttg gtc ctg ccc cag gga ggc ctc ccc ccc cct gcc ccc tgc cca gcc aat gtc atg gct
L V L P Q G A L P F A P C A A N V M A
1081/361
ccc ggc aat acc aag ttg ttg ccc ctt gcc cct gtc cca gta ttc atc acc tot agc caa
A G H T K L L F D A P A F V F I T S S Q
1141/381
aac tgc gtc cct cag gta gac ttt tcc aga agc agc aac tat gtt tgc agc ttc cca ggt
M C V P Q V D F S R S R Y T C S F P G
1201/401
tgc cgg aag acc tac ttc aaa agt tcc cac ctt aag gcc act ctt cgc act ccc aca ggc
C R K T Y F K S S H L E A H L R T H T G
1261/421
ag aag cct ttc aac tgc agc tgg gat ggc tgc gat aca aag ttt cct cgt tgc gat gag
E K F P N C S W D G C D K R F A R S D E
1321/441
ctg tca cgc cac cgc agc act cca aca ggc gag aag ttg gtc tgc cgc gtc gtt ccc
L S S H R R T H T G E S H F V C P V C D
1381/461
cga cgt ttc atg cgc agt gac ccc ctc ggc acc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc
R R F M R S D H L T K B A R R H M T K
1441/481
aag etc cca ggc tgc cag gca ggc gtt ggc agc cag aca gta atc gcc tct gca ggc agc
K I P G W Q A E V G K L N R I A S A E S
1501/501
ccg ggc agc cca ctg gtc agc atg cca ggc tcc ggc tgc
P G S F L V S M P A S A *

```

【 図 8 】

配列番号41 TIEG2 A347S;変異はグレーの背景に太字で示される

```

1/1 TIEG2 31/11
atg acg acg ccg gac ttc gca ggc cca gac ggc ggc gca gtt gac atc atg gac ata
M H F P D F A G P D D A R A V D I M D I
61/21
tgc gag tcc atc ctg gag agc agc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc
C E S I L E R K R B D E R S T C S I L
121/41
gag cag aca gac atg gaa gct gtc gag gct ctt gtt tgc atg agc tcc tgg ggt cca aaa
E Q T D M E A V E A L W C M S S W G O R
161/61
ccc ctg aaa ggt gag ctg ttc cgg atg age ccc ctc atg cct gtc tct gac tct ggc gat
S Q R G D L L R I R F S T Y V S D S G D
241/81
gtc acc acc act gtc gat atg gat gca ggc acc gca cta cca aca ggc ttc cat tct
V T T T V H M D A A T P E L P R D F H S
301/101
tta tcc act ctg tgc ata act cct cct cca agc cct gat ctc gtc gag cca tcy aca agc
L S T L C I T F P Q S F D L V E F S T R
361/121
aca cct gtt tct ccc caa gta aca gct tcc aaa ggc tgc aca agc gat gtt ctc caa
T P V S P Q V T D S R A C T A T D V L Q
421/141
tcc tcc gca gta ggc gca gct ctg agc ggc gca ggc agc ttc ctg gtt ttc
S S A V V A R A L S G A E R G L L G L
481/161
gac cca gtc acc agc tcc ctc agc agc agc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc
E P V F S S P C R A K A T S V I R R T G
541/181
gag agc cct gtc ggc ttc ccc acc act cag cct cca gat tgc ccc ttt tcc gac agc
E S P A A C F P T I Q T F P D C R L S D S
601/201
aga gaa gga gaa gag cag ctt ctg gca cac ttt gaa act ttg gac gag cca cac ttc a(c/b)g
R E C E Q L L G R F E T L Q
661/221
tgc agc tta ctc agc act aac ttg gtc tcc tcc cag ccc tgc ttc cca acc tct gct ggc
D S L L S T N L V S C G P C L H K S G G
721/241
ctg ctg ctc act gac aca ggc cag cag gca ggc tgc cct ggc gca gtt cag act tgc tca
L L L T D X G Q A G W P G A V O T C S
781/261
cca aag aat tat gaa aat gac ctg acc agc aca acc cct ctg gtt tct gtc tct gtc tct
P E M Y R N D L P R K A T F L I S V S V
841/281
cct gct ccc cct gtc ctt tgc cag atg atc cct gtc act ggc aca agt agc atg tta cca
P A P F V L C Q N I P V T G Q S S H L P
901/301
gct ttt ttg aag ccc ccc ccc cag ttg tct gtc ggc act gtc ggc acc atc cta gct cag
A F L K P P P Q L S V G T V R P I L A Q
961/321
gct gct cca ggc cct cca cct gtc ttc ggc ggc cct gtc cct cag gga gct gtc atg
L A P A P Q P V F V G A V P Q G A V H
1021/341
ttg gtc ctg ccc cag gga ggc ctc ccc ccc cct gcc ccc tgc cca gcc aat gtc atg gct
L V L P Q G A L P F A P C A A N V M A
1081/361
ccc ggc aat acc aag ttg ttg ccc ctt gcc cct gtc cca gta ttc atc acc tot agc caa
A G H T K L L F D A P A F V F I T S S Q
1141/381
aac tgc gtc cct cag gta gac ttt tcc aga agc agc aac tat gtt tgc agc ttc cca ggt
M C V P Q V D F S R S R Y T C S F P G
1201/401
tgc cgg aag acc tac ttc aaa agt tcc cac ctt aag gcc act ctt cgc act ccc aca ggc
C R K T Y F K S S H L E A H L R T H T G
1261/421
ag aag cct ttc aac tgc agc tgg gat ggc tgc gat aca aag ttt cct cgt tgc gat gag
E K F P N C S W D G C D K R F A R S D E
1321/441
ctg tca cgc cac cgc agc act cca aca ggc gag aag ttg gtc tgc cgc gtc gtt ccc
L S S H R R T H T G E S H F V C P V C D
1381/461
cga cgt ttc atg cgc agt gac ccc ctc ggc acc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc
R R F M R S D H L T K B A R R H M T K
1441/481
aag etc cca ggc tgc cag gca ggc gtt ggc agc cag aca gta atc gcc tct gca ggc agc
K I P G W Q A E V G K L N R I A S A E S
1501/501
ccg ggc agc cca ctg gtc agc atg cca ggc tcc ggc tgc
P G S F L V S M P A S A *

```

【 配列表 】

2006518213000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/IB2004/000947
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 C12N15/12 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/50 A61K48/00 A01K67/027		
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) IPC 7 C12Q C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	COOK TIFFANY ET AL: "Molecular cloning and characterization of TIEG2 reveals a new subfamily of transforming growth factor-beta-inducible Sp1-like zinc finger-encoding genes involved in the regulation of cell growth." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 40, 2 October 1998 (1998-10-02), pages 25929-25936, XP002247899 ISSN: 0021-9258 the whole document ----- -/--	3,4,12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 7 June 2004	Date of mailing of the international search report 29. 10. 04	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3015	Authorized officer Dumont, E	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/IB2004/000947

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>VIONNET NATHALIE ET AL: "Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: Evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24." AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 67, no. 6, December 2000 (2000-12), pages 1470-1480, XP002247900 ISSN: 0002-9297 the whole document</p>	1-6,8-17
A	<p>NEVE B ET AL: "Rapid SNP allele frequency determination in genomic DNA pools by Pyrosequencing™." BIOTECHNIQUES, vol. 32, no. 5, May 2002 (2002-05), pages 1138-1142, XP001153597 May, 2002 ISSN: 0736-6205 the whole document</p>	1-6,8-17
A	<p>JORDE L B: "Linkage disequilibrium and the search for complex disease genes" GENOME RESEARCH, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, US, vol. 10, no. 10, October 2000 (2000-10), pages 1435-1444, XP002224534 ISSN: 1088-9051 the whole document</p>	1-6,8-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2004/000947

Box 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.: —
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 1 and 2 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compounds.
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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 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:

see additional sheet

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.:
1-6, 8, 9, 11-17 (complete) ;10 (partial)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/IB2004/000947

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: claims 1-6, 8, 9, 11-17(complete, 10 (partial)

subject-matter relating to the diagnosis and therapy of type 2 diabetes, based on the identification of the A185G variation located at exon 2 of the tieg2 gene, as well as the G-1534C, 54a and 304a variations.

Inventions 2-35: claims 7 (complete), 10 (partial)

A probe or a primer from the tieg2 gene, respectively corresponding to one of SEQ ID NO:5-SEQ ID NO: 36 or derived from SEQ ID NO: 42 and 43.

International Application No. PCT/IB2004/000947

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 1 and 2 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compounds.

Continuation of Box II.1

Claims Nos.: -

Rule 39.1(iv) PCT - Diagnostic method practised on the human or animal body

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: -

Present claim 13 relates to the use of a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely the capability of preventing and/or treating type 2 diabetes, as defined in claim 11. The claims covers the use of all compounds having this characteristic or property, whereas the application does not provide support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for such compounds.

In the present case, the claim so lacks support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claim also lacks clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the use of a vector according to claim 12.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be

International Application No. PCT/IB2004/000947

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

overcome.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/566 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/15	Z
	G 0 1 N 33/50	Z

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

(72) 発明者 フィリップ、フロゲル

フランス国バニョル、アブニュ、ド、ラ、デュイ、104

(72) 発明者 クリスチャン、ディナ

フランス国パリ、リュ、ソルニエ、16

(72) 発明者 ベルナドット、ポーリナ、ネーベ

ベルギー国ベー 8930、メネン、グロントウェットストラート、10

(72) 発明者 ダニエル、メロール

イスラエル国アシュケロン、バル、コクバ、29

F ターム(参考) 2G045 AA40 CB17 DA12 DA13 DA36 FB02 FB03 FB05
 4B024 AA11 BA21 BA53 CA04 DA02 DA05 EA02 EA04 GA01 GA11
 HA01 HA12
 4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ42 QQ53 QR08 QR42 QR55 QR62 QS25
 QS36 QX02
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA01 DA76 EA50 FA72
 FA74

专利名称(译)	2型糖尿病及其早发的诊断方法		
公开(公告)号	JP2006518213A	公开(公告)日	2006-08-10
申请号	JP2006502500	申请日	2004-02-20
[标]申请(专利权)人(译)	山藤露娜那边 ドラルシエルシュシアンティフィクセーエヌエルエス肖醒		
申请(专利权)人(译)	中心Nashonaru, 德, 拉, RECHERCHE, Shiantifiku, (NTT节省LSI)		
[标]发明人	フィリップフロゲル クリスチャンディナ ベルナドットポーリナネーベ ダニエルメロール		
发明人	フィリップ、フロゲル クリスチャン、ディナ ベルナドット、ポーリナ、ネーベ ダニエル、メロール		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 C07K14/52 C07K16/24 A01K67/027 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/15 G01N33/50 A61K48/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N15/12		
CPC分类号	C12Q1/6883 A01K2217/05 A01K2217/075 C07K14/4702 C12Q2600/156		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.Z C07K14/52 C07K16/24 A01K67/027 C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/53.D G01N33/15.Z G01N33/50.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/CB17 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045 /FB05 4B024/AA11 4B024/BA21 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063 /QQ02 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045 /CA40 4H045/DA01 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	耀希达凯贤治 中村KoTakashi		
优先权	2003290412 2003-02-20 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明属于人类遗传学领域，位于tieg2基因外显子2的A185G突变和G-1534C，54a，304a，+659 C>T (Thr220Met) 和+1039 G>T (Ala347Ser) 突变的鉴定本发明涉及在人受试者中诊断和治疗2型糖尿病 (T2D)，早发型2型糖尿病和青少年发病成人糖尿病 (MODY) 的新方法。