

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-30956
(P2010-30956A)

(43) 公開日 平成22年2月12日(2010.2.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	2 G O 4 5
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	4 C O 8 6
A 6 1 P 19/10 (2006.01)	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 19/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/00	
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15	Z

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-195099 (P2008-195099)
(22) 出願日 平成20年7月29日 (2008.7.29)

(71) 出願人 504013775
学校法人 埼玉医科大学
埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38
(74) 代理人 100107515
弁理士 廣田 浩一
(74) 代理人 100107733
弁理士 流 良広
(74) 代理人 100115347
弁理士 松田 奈緒子
(74) 代理人 100136858
弁理士 池田 浩
(72) 発明者 岡崎 康司
埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 学校
法人埼玉医科大学 ゲノム医学研究センタ
一内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨芽細胞分化促進剤及び抑制剤並びに骨形成促進剤、骨粗鬆症の治療薬、抗肥満薬及びスクリーニング方法

(57) 【要約】

【課題】 間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を制御することができ、特に間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を制御しつつ、脂肪細胞への分化を制御することができる骨芽細胞分化促進剤及び抑制剤並びに骨形成促進剤、骨粗鬆症の治療薬、抗肥満薬及びスクリーニング方法の提供。

【解決手段】 e l k 1 遺伝子、 d b i 遺伝子及び m a p 4 k 4 遺伝子のうち少なくとも1つの遺伝子の発現を抑制する核酸鎖を有効成分として含有する骨芽細胞分化促進剤並びに骨形成促進剤、骨粗鬆症の治療薬及び抗肥満薬である。また、 o s b p 1 2 遺伝子、 r a b 7 遺伝子及び v d p 遺伝子のうち少なくとも1つの遺伝子の発現を抑制する核酸鎖を有効成分として含有する骨芽細胞分化抑制剤である。また、 e l k 1 遺伝子、 d b i 遺伝子、 m a p 4 k 4 遺伝子、 o s b p 1 2 遺伝子、 r a b 7 遺伝子及び v d p 遺伝子のうち少なくとも1つの遺伝子の発現量を指標とするスクリーニング方法である。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を促進する骨芽細胞分化促進剤であって、
e l k 1 遺伝子、d b i 遺伝子及びm a p 4 k 4 遺伝子のうち少なくとも1つの遺伝子の、発現を抑制する核酸鎖を有効成分として含有することを特徴とする骨芽細胞分化促進剤。

【請求項 2】

核酸鎖が s i R N A である請求項 1 に記載の骨芽細胞分化促進剤。

【請求項 3】

間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を抑制する骨芽細胞分化抑制剤であって、
o s b p 1 2 遺伝子、r a b 7 遺伝子及びv d p 遺伝子のうち少なくとも1つの遺伝子の、発現を抑制する核酸鎖を有効成分として含有することを特徴とする骨芽細胞分化抑制剤。

10

【請求項 4】

核酸鎖が s i R N A である請求項 3 に記載の骨芽細胞分化抑制剤。

【請求項 5】

請求項 1 から 2 のいずれかに記載の骨芽細胞分化促進剤を含む骨形成促進剤。

【請求項 6】

請求項 1 から 2 のいずれかに記載の骨芽細胞分化促進剤を含む骨粗鬆症の治療薬。

【請求項 7】

請求項 1 から 2 のいずれかに記載の骨芽細胞分化促進剤を含む抗肥満薬。

20

【請求項 8】

間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を促進し、かつ、脂肪細胞への分化を抑制する作用を有する物質のスクリーニング方法であって、e l k 1 遺伝子、d b i 遺伝子及びm a p 4 k 4 遺伝子のうち少なくとも1つの遺伝子の、発現の抑制を指標とすることを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項 9】

間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を抑制し、かつ、脂肪細胞への分化を抑制する作用を有する物質のスクリーニング方法であって、o s b p 1 2 遺伝子、r a b 7 遺伝子及びv d p 遺伝子のうち少なくとも1つの遺伝子の、発現の抑制を指標とすることを特徴とするスクリーニング方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を制御（抑制／促進）することができ、特に、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を制御（抑制／促進）しつつ、脂肪細胞への分化を制御（抑制／促進）することができる骨芽細胞分化促進剤及び抑制剤並びに骨形成促進剤、骨粗鬆症の治療薬、抗肥満薬及びスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

骨粗鬆症は、骨量又は骨塩量の減少によって骨の微細構造が破綻し、骨強度が低下して骨折のリスクが高まった全身性疾患である。日本では骨粗鬆症の患者は約 1, 100 万人と言われており、その 8 割は女性である。さらに、骨粗鬆症は中年以降に多く見られる疾患であるため、近年の高齢化に伴い今後患者数が増加すると推測される。骨粗鬆症は、原発性骨粗鬆症と続発性骨粗鬆症との 2 つに大別される。

40

【0003】

骨粗鬆症の治療方法としては、エストロゲン等の薬物の投与、リン酸カルシウム骨セメントを注入する手術方法、痛みの原因となる神経に麻酔薬を注射する方法等が知られている。しかしながら、エストロゲン投与は乳癌の発症率が高くなるという副作用、骨セメントを注入する手術方法では骨セメントが骨以外の場所に漏れて固まり神経を圧迫するとい

50

う危険性、麻酔薬を注射する方法では脊椎専門医や麻酔医の高度な技術の必要性など、それぞれの方法に特有の問題がある。そのため、効果的に骨の形成を促進し、骨粗鬆症を改善する治療薬が強く求められている。

【0004】

前記原発性骨粗鬆症の一つである老人性骨粗鬆症は、骨を形成する骨芽細胞が減少して骨が脆弱化するだけでなく、骨髄内に脂肪細胞が蓄積して黄色化することから、脂肪細胞の蓄積が症状の進行に関与していると考えられている。したがって、特に老人性骨粗鬆症の治療においては、骨の形成を促進することに加えて、脂肪細胞の蓄積を抑制することにより、より症状が改善できることが期待されている。

【0005】

また、前記続発性骨粗鬆症は、メタボリック症候群との関連が示唆されている。メタボリック症候群は、糖代謝や脂質代謝などの代謝異常が重なる病態をいう。現在、メタボリック症候群の治療には、例えばチアゾリジン誘導体などの、脂肪細胞の蓄積を抑制する薬剤が効果的に用いられている。しかしながら、チアゾリジン誘導体は、その副作用として、骨の形成が抑制され、続発性骨粗鬆症を引き起こしやすくなるという問題がある。この点からも、骨の形成を促進しつつ、脂肪細胞の蓄積を抑制できる薬剤が強く求められている。

【0006】

一方、線虫の16,757遺伝子に関して脂肪蓄積に関するスクリーニングが行われた結果、脂肪蓄積量を減少させる305遺伝子及び増加させる112遺伝子の、計417遺伝子が同定された(非特許文献1参照)。ただし、線虫と哺乳動物とでは、生物種として大きく乖離しているために、線虫で機能が明らかな遺伝子に対する哺乳動物におけるホモログ遺伝子が、そのまま哺乳動物で同じ機能を有するケースは、必ずしも多くはない。前記ホモログ遺伝子が、哺乳動物において骨の形成に関与することについては知られておらず、特に、前記ホモログ遺伝子のうち、elk1遺伝子、dbi遺伝子、map4k4遺伝子、osbp12遺伝子、rab7遺伝子及びvdp遺伝子については、哺乳動物において骨の形成に関与することについては全く知られていない。

【0007】

したがって、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を制御(抑制/促進)することができ、かつ、脂肪細胞への分化を制御(抑制/促進)することができる骨芽細胞分化促進剤は、未だ満足なものが提供されていないのが現状である。

【非特許文献1】Ashrafi et al. (Nature, 2003)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、前記従来における諸問題を解決し、以下の目的を達成することを課題とする。即ち、本発明は、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を制御(抑制/促進)することができ、特に、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を制御(抑制/促進)しつつ、脂肪細胞への分化を制御(抑制/促進)することができる骨芽細胞分化促進剤及び抑制剤並びに骨形成促進剤、骨粗鬆症の治療薬、抗肥満薬及びスクリーニング方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

前記課題を解決するため、本発明者らは鋭意検討した結果、以下のような知見を得た。即ち、elk1遺伝子、dbi遺伝子、map4k4遺伝子、osbp12遺伝子、rab7遺伝子及びvdp遺伝子が、哺乳動物において、間葉系幹細胞から骨芽細胞の分化を制御(抑制/促進)する機能を有していること、更には、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化及び脂肪細胞への分化の両方を制御(抑制/促進)する機能を有しているという知見である。

前記elk1遺伝子、前記dbi遺伝子、前記map4k4遺伝子、前記osbp12

10

20

30

40

50

遺伝子、前記 r a b 7 遺伝子及び前記 v d p 遺伝子は、線虫の遺伝子のホモログであり、前記線虫の遺伝子は、脂肪の蓄積に關与することが知られている。

しかしながら、前記 e l k 1 遺伝子、前記 d b i 遺伝子、前記 m a p 4 k 4 遺伝子、前記 o s b p 1 2 遺伝子、前記 r a b 7 遺伝子及び前記 v d p 遺伝子が、哺乳動物において、間葉系幹細胞から骨芽細胞の分化を制御（抑制／促進）する機能を有していること、更には、間葉系幹細胞から骨芽細胞の分化を制御（抑制／促進）する機能を有しつつ、脂肪細胞の分化を制御（抑制／促進）する機能を有していることは、従来知られておらず、本発明者らによる新たな知見である。

【0010】

本発明は、本発明者らによる前記知見に基づくものであり、前記課題を解決するための手段としては、以下の通りである。

< 1 > 間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を促進する骨芽細胞分化促進剤であって、e l k 1 遺伝子、d b i 遺伝子、m a p 4 k 4 遺伝子のうち少なくとも1つの遺伝子の、発現を抑制する核酸鎖を有効成分として含有することを特徴とする骨芽細胞分化促進剤である。

< 2 > 核酸鎖が s i R N A である < 1 > に記載の骨芽細胞分化促進剤である。

< 3 > 間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を抑制する骨芽細胞分化抑制剤であって、o s b p 1 2 遺伝子、r a b 7 遺伝子及び v d p 遺伝子のうち少なくとも1つの遺伝子の、発現を抑制する核酸鎖を有効成分として含有することを特徴とする骨芽細胞分化抑制剤である。

< 4 > 核酸鎖が s i R N A である < 3 > に記載の骨芽細胞分化抑制剤である。

< 5 > < 1 > から < 2 > のいずれかに記載の骨芽細胞分化促進剤を含む骨形成促進剤である。

< 6 > < 1 > から < 2 > のいずれかに記載の骨芽細胞分化促進剤を含む骨粗鬆症の治療薬である。

< 7 > < 1 > から < 2 > のいずれかに記載の骨芽細胞分化促進剤を含む抗肥満薬である。

< 8 > 間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を促進し、かつ、脂肪細胞への分化を抑制する作用を有する物質のスクリーニング方法であって、e l k 1 遺伝子、d b i 遺伝子及び m a p 4 k 4 遺伝子のうち少なくとも1つの遺伝子の、発現の抑制を指標とすることを特徴とするスクリーニング方法である。

< 9 > 間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を抑制し、かつ、脂肪細胞への分化を抑制する作用を有する物質のスクリーニング方法であって、o s b p 1 2 遺伝子、r a b 7 遺伝子及び v d p 遺伝子のうち少なくとも1つの遺伝子の、発現の抑制を指標とすることを特徴とするスクリーニング方法である。

【発明の効果】

【0011】

本発明によると、前記従来における諸問題を解決することができ、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を制御（抑制／促進）することができ、特に、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を制御（抑制／促進）しつつ、脂肪細胞への分化を制御（抑制／促進）することができる骨芽細胞分化促進剤及び抑制剤並びに骨形成促進剤、骨粗鬆症の治療薬、抗肥満薬及びスクリーニング方法を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

（骨芽細胞分化促進剤）

本発明の骨芽細胞分化促進剤は、e l k 1 遺伝子、d b i 遺伝子、m a p 4 k 4 遺伝子のうち少なくとも1つの遺伝子の、発現を抑制する核酸鎖を有効成分として含み、更に必要に応じてその他の成分を含有してなる。

【0013】

< 有効成分 >

- e l k 1 遺伝子、d b i 遺伝子、m a p 4 k 4 遺伝子 -

前記骨芽細胞分化促進剤における前記 e l k 1 遺伝子、前記 d b i 遺伝子、前記 m a p 4 k 4 遺伝子は、それぞれ、線虫の遺伝子 C 3 7 F 5 . 1、C 4 4 E 4 . 6、Z C 5 0 4 . 4 のホモログ遺伝子である。前記 C 3 7 F 5 . 1、前記 C 4 4 E 4 . 6、前記 Z C 5 0 4 . 4 の各遺伝子は、線虫において脂肪の蓄積に關与することが知られている。しかしながら、哺乳動物の間葉系幹細胞において、前記 e l k 1 遺伝子、前記 d b i 遺伝子、前記 m a p 4 k 4 遺伝子の発現を抑制した場合に、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化が促進されること、特に、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化が促進されつつ、間葉系幹細胞から脂肪細胞への分化が抑制されることは、従来全く知られていない。

【0014】

10

前記 e l k 1 遺伝子、d b i 遺伝子及び m a p 4 k 4 遺伝子の塩基配列は、例えば、ヒト、マウスにおいて公知であり、その配列は Gene Bank (N C B I) などの公共のデータベースを通じて容易に入手することができる (例えば、ヒト e l k 1 遺伝子 : N C B I a c c e s s i o n n u m b e r N M _ 0 0 1 1 1 4 1 2 3、ヒト d b i 遺伝子 : N C B I a c c e s s i o n n u m b e r N M _ 0 0 1 0 7 9 8 6 2、ヒト m a p 4 k 4 遺伝子 : N C B I a c c e s s i o n n u m b e r N M _ 0 0 4 8 3 4)。また、公共データベースにその配列が登録されていない哺乳動物の場合には、常法により、配列が既知の哺乳動物の遺伝子との相同性を利用して、e l k 1 遺伝子、d b i 遺伝子及び m a p 4 k 4 遺伝子をクローニングし、配列を決定することができる。

【0015】

20

- 発現を抑制する核酸鎖 -

e l k 1 遺伝子、d b i 遺伝子及び m a p 4 k 4 遺伝子 (適宜、「標的遺伝子」と称する。) のうちいずれかの発現を抑制するための核酸鎖 (以下、単に「核酸鎖」と称する。) としては、特に制限はなく、遺伝子発現の抑制に用いられる公知の核酸鎖の中から、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、s i R N A、s h R N A、m i R N A、アンチセンス R N A、アンチセンス D N A などが挙げられる。中でも、遺伝子の発現抑制効果が高い点で、s i R N A が好ましい。

【0016】

前記 s i R N A とは、18 ~ 29 塩基長の小分子二本鎖 R N A であり、前記 s i R N A のアンチセンス鎖 (ガイド鎖) と相補的な配列をもつ標的遺伝子の m R N A を切断し、標的遺伝子の発現を抑制する機能を有する。

30

前記 s i R N A は、標的配列に対応するヌクレオチド配列に対応するセンス鎖と、前記センス鎖に相補的なヌクレオチド配列を有するアンチセンス鎖とを含んでなる。前記標的配列としては、前記 e l k 1 遺伝子、前記 d b i 遺伝子及び前記 m a p 4 k 4 遺伝子のうちいずれか1つの遺伝子の、部分配列であれば特に制限はなく、目的に応じて標的配列を選択することができる。

前記 s i R N A の末端構造としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、平滑末端を有するものであってもよいし、突出末端 (オーバーハング) を有するものであってもよい。

【0017】

40

前記 s h R N A とは、18 ~ 29 塩基程度の d s R N A 領域と 3 ~ 9 塩基程度の l o o p 領域を含む一本鎖 R N A であるが、s h R N A は、生体内で発現されることにより、塩基対を形成してヘアピン状の二本鎖 R N A となる。その後、s h R N A は D i c e r (R N a s e I I I 酵素) により切断されて、s i R N A となり、標的遺伝子の発現抑制に機能することができる。

前記 s h R N A の末端構造としても、前記 s i R N A 同様、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、平滑末端を有するものであってもよいし、突出末端 (オーバーハング) を有するものであってもよい。

【0018】

前記 m i R N A は、細胞内在性の、20 ~ 25 塩基程度の非コード R N A である。m i

50

RNAは、ゲノムDNA上のmiRNA遺伝子から、まず数百～数千塩基程度の長さの一次転写物(pri-miRNA)として転写され、次いで、プロセッシングを受け、約60～70塩基程度のヘアピン構造を有するpre-miRNAとなる。その後、核から細胞質内に移り、更にプロセッシングを受けて、20～25塩基程度の二本鎖の成熟miRNAとなる。成熟miRNAは、そのうちの一本鎖がRISCと呼ばれるタンパク質と複合体を形成し、標的遺伝子のmRNAに作用することで、標的遺伝子の翻訳を阻害する働きをすることが知られている。

【0019】

前記アンチセンスRNA又はアンチセンスDNAは、前記elk1遺伝子、dbi遺伝子及びmap4k4遺伝子のうちいずれかの遺伝子から転写されるmRNAと相補的な塩基配列を有するRNA又はDNAである。

10

【0020】

前記核酸鎖は、目的に応じて適宜修飾を施していてもよい。例えば、核酸分解酵素(ヌクレアーゼ)に対する耐性を付与し、培養液中や生体中における安定性を向上させる等の目的から、前記核酸鎖に、2'-O-methyl化修飾や、ホスホロチオエート化(S化)修飾、LNA(Locked Nucleic Acid)修飾等を施すことができる。また、例えば、細胞への導入効率を高める等の目的から、前記核酸鎖の末端に、ナノ粒子、コレステロール、細胞膜通過ペプチド等の修飾を施すこともできる。なお、前記核酸鎖にこのような修飾を施す方法としては、特に制限はなく、従来公知の手法を適宜利用することができる。

20

前記核酸鎖は、1種類単独で使用してもよく、2種以上を併用してもよい。

前記骨芽細胞分化促進剤中の、前記有効成分(核酸鎖)の含有量としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。また、前記骨芽細胞分化促進剤は、前記有効成分(核酸鎖)そのものであってもよい。

【0021】

前記核酸鎖は、既存のDNA/RNA自動合成装置等を利用して化学的に合成することができる。また、市販品を入手することもできるし、各核酸鎖の合成受託会社に合成を依頼することにより入手することもできる。また、各核酸鎖の発現ベクターを構築し、前記発現ベクターを細胞内に導入することにより、細胞内の反応を利用して前記核酸鎖を作製することもできる。

30

特に前記核酸鎖がsiRNAの場合には、所望のセンス鎖とアンチセンス鎖とに相当する18～29塩基長の一本鎖RNAを、それぞれ既存のDNA/RNA自動合成装置等を利用して化学的に合成し、それらをアニーリングすることにより作製することができる。

【0022】

前記核酸鎖が、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を促進するか否かは、例えば、前記核酸鎖を、哺乳動物の間葉系幹細胞に導入したときに、前記核酸鎖を導入しない細胞(コントロール)と比べて、細胞内のALP(アルカリフォスファターゼ)タンパク質の活性が亢進されたか否かを検討することによって確認することができる。

前記導入方法としては、特に制限はなく、公知の手法の中から目的に応じて適宜選択することができる。例えば、トランスフェクション試薬を用いる方法、エレクトロポレーションによる方法、磁気粒子を用いる方法、ウイルス感染を利用する方法などが挙げられる。

40

【0023】

<その他の成分>

前記その他の成分としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、前記有効成分を所望の濃度に希釈等するための、水、各種緩衝液などが挙げられる。

また、前記その他の成分としては、間葉系幹細胞に前記有効成分を導入するための、導入用試薬なども挙げられる。前記導入用試薬としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、例えば、Lipofectamin 2000(Invitrogen社)などが挙げられる。

50

前記骨芽細胞分化促進剤中の、前記その他の成分の含有量としても、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

【0024】

前記骨芽細胞分化促進剤の使用方法としては、特に制限はなく、例えば、前記骨芽細胞分化促進剤を間葉系幹細胞に導入することにより使用することができる。前記骨芽細胞分化促進剤の間葉系幹細胞への導入方法としては、特に制限はなく、例えば、従来公知の核酸導入方法を適宜利用することができる。

【0025】

前記間葉系幹細胞の入手方法としても、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、例えば、個体の骨髄等から単離することにより得ることもできるし、或いは、既にクローン化された間葉系幹細胞として各種機関から入手することもできる。このような既にクローン化された間葉系幹細胞としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、例えば、マウスの細胞として、マウスST2細胞、マウスNRG細胞、マウスDFAT-D1細胞などが挙げられる。前記マウスST2細胞及び前記マウスNRG細胞は、それぞれ独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター(BRC)から入手可能である。

10

【0026】

前記骨芽細胞分化促進剤によれば、elk1遺伝子、dbi遺伝子、map4k4遺伝子のうち少なくとも1つの遺伝子の、発現を抑制する核酸鎖を有効成分として含むので、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を好適に促進することができ、特に、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を好適に促進しつつ、脂肪細胞への分化を好適に抑制することができる。

20

したがって、前記骨芽細胞分化促進剤は、例えば、間葉系幹細胞、骨芽細胞、脂肪細胞の分化機構を研究するための試薬として、更には、後述する本発明の骨形成促進剤、骨粗鬆症の治療薬、抗肥満薬として、好適に利用可能である。

【0027】

(骨芽細胞分化抑制剤)

本発明の骨芽細胞分化抑制剤は、osbp12遺伝子、rab7遺伝子、vdp遺伝子のうち少なくとも1つの遺伝子の、発現を抑制する核酸鎖を有効成分として含み、更に必要に応じてその他の成分を含有してなる。

30

【0028】

<有効成分>

- osbp12遺伝子、rab7遺伝子、vdp遺伝子 -

前記骨芽細胞分化抑制剤における前記osbp12遺伝子、前記rab7遺伝子、前記vdp遺伝子は、それぞれ、線虫の遺伝子F14H8.1、W03C9.3、K09B11.9のホモログ遺伝子である。前記F14H8.1、前記W03C9.3、前記K09B11.9の各遺伝子は、線虫において脂肪の蓄積に關与することが知られている。しかしながら、哺乳動物の間葉系幹細胞において、前記osbp12遺伝子、前記rab7遺伝子、前記vdp遺伝子の発現を抑制した場合に、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化が抑制されること、特に、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化が抑制されつつ、間葉系幹細胞から脂肪細胞への分化が抑制されることは、従来全く知られていない。

40

【0029】

前記osbp12遺伝子、前記rab7遺伝子、前記vdp遺伝子の塩基配列は、例えば、ヒト、マウスにおいて公知であり、その配列はGeneBank(NCBI)などの公共のデータベースを通じて容易に入手することができる(例えば、ヒトosbp12遺伝子: NCBI accession number NM_014835、ヒトrab7遺伝子: NCBI accession number NM_004637、ヒトvdp遺伝子: NCBI accession number NM_003715)。また、公共データベースにその配列が登録されていない哺乳動物の場合には、常法により、配列が既知の哺乳動物の遺伝子との相同性を利用して、osbp12遺伝子、rab7遺

50

伝子、v d p 遺伝子をクローニングし、配列を決定することができる。

【 0 0 3 0 】

- 発現を抑制する核酸鎖 -

前記発現を抑制するための核酸鎖については、標的とする塩基配列が、o s b p 1 2 遺伝子、r a b 7 遺伝子、v d p 遺伝子のうち少なくとも1つの遺伝子の塩基配列であること以外は、前記骨芽細胞分化促進剤の項目で説明したものと同様である。

【 0 0 3 1 】

前記核酸鎖が、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を抑制するか否かは、例えば、前記核酸鎖を、哺乳動物の間葉系幹細胞に導入したときに、前記核酸鎖を導入しない細胞（コントロール）と比べて、細胞内のA L P（アルカリフォスファターゼ）タンパク質の活性が減少したか否かを検討することによって確認することができる。

前記導入方法としては、特に制限はなく、公知の手法の中から目的に応じて適宜選択することができ、例えば、トランスフェクション試薬を用いる方法、エレクトロポレーションによる方法、磁気粒子を用いる方法、ウイルス感染を利用する方法などが挙げられる。

【 0 0 3 2 】

< その他の成分 >

前記その他の成分については、前記骨芽細胞分化促進剤の項目で説明したものと同様である。

【 0 0 3 3 】

前記骨芽細胞分化抑制剤の使用法、及び適用対象となる間葉系幹細胞については、前記骨芽細胞分化促進剤の項目で説明したものと同様である。

【 0 0 3 4 】

前記骨芽細胞分化抑制剤によれば、o s b p 1 2 遺伝子、r a b 7 遺伝子、v d p 遺伝子のうち少なくとも1つの遺伝子の、発現を抑制する核酸鎖を有効成分として含むので、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を好適に抑制することができ、特に、間葉系幹細胞から骨芽細胞の分化を好適に抑制しつつ、脂肪細胞への分化を好適に抑制することができる。

したがって、前記骨芽細胞分化抑制剤は、例えば、間葉系幹細胞、骨芽細胞、脂肪細胞の分化機構を研究するための試薬として好適に利用可能である。

【 0 0 3 5 】

（骨形成促進剤、骨粗鬆症の治療薬、抗肥満薬）

本発明の骨形成促進剤、骨粗鬆症の治療薬及び抗肥満薬は、前記した本発明の骨芽細胞分化促進剤を含有し、更に必要に応じてその他の成分を含有してなる。

【 0 0 3 6 】

< 骨芽細胞分化促進剤 >

前記骨芽細胞分化促進剤としては、前記した本発明の骨芽細胞分化促進剤の項目に記載した通りである。

前記骨形成促進剤、前記骨粗鬆症の治療薬、前記抗肥満薬における、前記骨芽細胞分化促進剤の含有量としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。また、前記骨形成促進剤、前記骨粗鬆症の治療薬及び前記抗肥満薬は、前記骨芽細胞分化促進剤そのものであってもよい。

【 0 0 3 7 】

< その他の成分 >

前記その他の成分としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、医薬的に許容され得る担体などが挙げられる。前記担体としても、特に制限はなく、例えば、前記骨形成促進剤、前記骨粗鬆症の治療薬及び前記抗肥満薬の剤型等に応じて適宜選択することができる。また、前記骨形成促進剤、前記骨粗鬆症の治療薬及び前記抗肥満薬中の前記その他の成分の含有量としても、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

【 0 0 3 8 】

10

20

30

40

50

前記骨形成促進剤、前記骨粗鬆症の治療薬及び前記抗肥満薬の剤型としては、特に制限はなく、例えば、後述するような所望の投与方法に応じて適宜選択することができ、例えば、経口固形剤（錠剤、被覆錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤等）、経口服液剤（内服液剤、シロップ剤、エリキシル剤等）、注射剤（溶液、懸濁液、用事溶解用固形剤等）、軟膏剤、貼付剤、ゲル剤、クリーム剤、外用散剤、スプレー剤、吸入散剤などが挙げられる。

【0039】

前記経口固形剤としては、例えば、前記骨芽細胞分化促進剤に、賦形剤、更には必要に応じて結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味・矯臭剤等の添加剤を加え、常法により製造することができる。

前記賦形剤としては、例えば、乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、微結晶セルロース、珪酸などが挙げられる。前記結合剤としては、例えば、水、エタノール、プロパノール、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン液、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、メチルセルロース、エチルセルロース、シェラック、リン酸カルシウム、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。前記崩壊剤としては、例えば、乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、乳糖などが挙げられる。前記滑沢剤としては、例えば、精製タルク、ステアリン酸塩、ホウ砂、ポリエチレングリコールなどが挙げられる。前記着色剤としては、例えば、酸化チタン、酸化鉄などが挙げられる。前記矯味・矯臭剤としては、例えば、白糖、橙皮、クエン酸、酒石酸などが挙げられる。

10

20

【0040】

前記経口服液剤としては、例えば、前記骨芽細胞分化促進剤に、矯味・矯臭剤、緩衝剤、安定化剤等の添加剤を加え、常法により製造することができる。

前記矯味・矯臭剤としては、例えば、白糖、橙皮、クエン酸、酒石酸などが挙げられる。前記緩衝剤としては、例えば、クエン酸ナトリウムなどが挙げられる。前記安定化剤としては、例えば、トラガント、アラビアゴム、ゼラチンなどが挙げられる。

【0041】

前記注射剤としては、例えば、前記骨芽細胞分化促進剤に、pH調節剤、緩衝剤、安定化剤、等張化剤、局所麻酔剤等を添加し、常法により皮下用、筋肉内用、静脈内用等の注射剤を製造することができる。

30

前記pH調節剤及び前記緩衝剤としては、例えば、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウムなどが挙げられる。前記安定化剤としては、例えば、ピロ亜硫酸ナトリウム、EDTA、チオグリコール酸、チオ乳酸などが挙げられる。前記等張化剤としては、例えば、塩化ナトリウム、ブドウ糖などが挙げられる。前記局所麻酔剤としては、例えば、塩酸プロカイン、塩酸リドカインなどが挙げられる。

【0042】

前記軟膏剤としては、例えば、前記骨芽細胞分化促進剤に、公知の基剤、安定剤、湿潤剤、保存剤等を配合し、常法により混合し、製造することができる。

前記基剤としては、例えば、流動パラフィン、白色ワセリン、サラシミツロウ、オクチルドデシルアルコール、パラフィンなどが挙げられる。前記保存剤としては、例えば、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピルなどが挙げられる。

40

【0043】

前記貼付剤としては、例えば、公知の支持体に前記軟膏剤としてのクリーム剤、ゲル剤、ペースト剤等を、常法により塗布し、製造することができる。前記支持体としては、例えば、綿、スフ、化学繊維からなる織布、不織布、軟質塩化ビニル、ポリエチレン、ポリウレタン等のフィルム、発泡体シートなどが挙げられる。

【0044】

< 投与 >

前記骨形成促進剤は、含有される前記骨芽細胞分化促進剤の作用により、骨の形成を促

50

進することができ、特に、脂肪の蓄積を低減しつつ、骨の形成を促進することができるので、例えば、骨粗鬆症、骨形成不全、発達期における成長阻害などの予防乃至治療に好適である。

前記骨粗鬆症の治療薬は、含有される前記骨芽細胞分化促進剤の作用により、骨の形成を促進することができ、特に、脂肪の蓄積を低減しつつ、骨の形成を促進することができるので、骨粗鬆症の予防乃至治療に好適である。骨粗鬆症の中でも、特に、老人性骨粗鬆症の予防乃至治療に好適である。

前記抗肥満薬は、含有される前記骨芽細胞分化促進剤の作用により、骨の形成を促進しつつ、脂肪の蓄積を低減することができるので、例えば、肥満、糖尿病、高脂血症、高血圧、メタボリック症候群などの予防乃至治療に好適である。

10

【0045】

前記骨形成促進剤、前記骨粗鬆症の治療薬及び前記抗肥満薬の投与対象動物としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウシ、ブタ、サル、イヌ、ネコなどが挙げられるが、これらの中でも、ヒトが特に好ましい。

【0046】

前記骨形成促進剤、前記骨粗鬆症の治療薬及び前記抗肥満薬の投与方法としては、特に制限はなく、例えば、前記骨形成促進剤、前記骨粗鬆症の治療薬及び前記抗肥満薬の剤型、疾患の種類、患者の状態等に応じて、局所投与、全身投与のいずれかを選択することができる。例えば、局所投与においては、前記骨形成促進剤、前記骨粗鬆症の治療薬及び前記抗肥満薬を、所望の部位に直接注入することにより投与することができる。前記注入には、注射等の従来公知の手法を適宜利用することができる。また、全身投与（例えば、経口投与、腹腔内投与、血液中への投与等）においては、前記骨形成促進剤、前記骨粗鬆症の治療薬及び前記抗肥満薬の有効成分（核酸鎖）が所望の部位まで安定に、かつ効率良く送達されるよう、従来公知の薬剤送達技術を適宜応用することが好ましい。

20

【0047】

前記骨形成促進剤、前記骨粗鬆症の治療薬及び前記抗肥満薬の投与量としては、特に制限はなく、投与対象である患者の年齢、体重、所望の効果の程度等に応じて適宜選択することができるが、例えば、成人への1日の投与あたり、有効成分（核酸鎖）の量として、1～100mgが好ましい。

30

また、前記骨形成促進剤、前記骨粗鬆症の治療薬及び前記抗肥満薬の投与回数としても、特に制限はなく、投与対象である患者の年齢、体重、所望の効果の程度等に応じて、適宜選択することができる。

【0048】

前記骨形成促進剤、前記骨粗鬆症の治療薬及び前記抗肥満薬の投与時期としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、前記疾患に対して、予防的に投与されてもよいし、治療的に投与されてもよい。中でも、前記骨形成促進剤、前記骨粗鬆症の治療薬及び前記抗肥満薬は、骨形成作用に優れ、かつ、脂肪蓄積抑制作用に優れることから、前記骨形成促進剤、前記骨粗鬆症の治療薬及び前記抗肥満薬は、前記疾患の出来る限り早期の段階に投与されることが望ましいと考えられる。

40

【0049】

（第1のスクリーニング方法）

本発明の第1のスクリーニング方法は、骨芽細胞への分化を促進し、かつ、脂肪細胞への分化を抑制する作用を有する物質のスクリーニング方法であって、e1k1遺伝子、dbi遺伝子及びmap4k4遺伝子のうち少なくとも1つの遺伝子の、発現の抑制を指標とすることを特徴とする。

【0050】

前記第1のスクリーニング方法としては、例えば、(a)間葉系幹細胞に被験物質を投与する工程、(b)被験物質を投与された間葉系幹細胞、及び、被験物質を投与されない間葉系幹細胞における、e1k1遺伝子、dbi遺伝子及びmap4k4遺伝子のうち少

50

なくとも1つの遺伝子の、発現量を測定する工程、(c)被験物質を投与されない間葉系幹細胞に比べ、被験物質を投与された間葉系幹細胞の方で、e l k 1 遺伝子、d b i 遺伝子及びm a p 4 k 4 遺伝子のうち少なくとも1つの遺伝子の発現量が抑制されている場合に、その被験物質を選択する工程、を含む方法などが挙げられる。

【0051】

- (a) 工程 -

前記(a)工程における被験物質としては、特に制限はなく、各種候補物質の中から、目的に応じて適宜選択することができる。前記被験物質の投与方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択ことができ、例えば、細胞へのトランスフェクション、実験動物の組織への投与などが挙げられる。

10

【0052】

- (b) 工程 -

前記(b)工程における、e l k 1 遺伝子、d b i 遺伝子及びm a p 4 k 4 遺伝子のうち少なくとも1つの遺伝子の、発現量を測定する方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択ことができ、例えば、mRNAレベルの発現量の測定、タンパクレベルの発現量の測定、などが挙げられる。mRNAレベルの発現量の評価方法及びタンパクレベルの発現量の測定方法は、公知の方法の中から、目的に応じて適宜選択ことができ、例えば、mRNAに特異的に結合するプローブ、プライマーを利用する方法、タンパク質に特異的に結合する抗体を利用する方法などが挙げられる。

20

【0053】

- (c) 工程 -

前記(c)工程において、被験物質を投与されない間葉系幹細胞に比べ、被験物質を投与された間葉系幹細胞の方で、e l k 1 遺伝子、d b i 遺伝子及びm a p 4 k 4 遺伝子のうち少なくとも1つの遺伝子の発現量が抑制されている場合には、前記被験物質が骨芽細胞の分化を促進し、かつ、脂肪細胞の分化を抑制する物質として、選択することができる。

なお、発現量の比較を行う場合には、前記e l k 1 遺伝子、前記d b i 遺伝子及び前記m a p 4 k 4 遺伝子のうち、いずれかの遺伝子の発現量のみを比較してもよく、2つ以上の遺伝子の発現量を組合せて比較してもよい。

【0054】

30

(第2のスクリーニング方法)

本発明の第2のスクリーニング方法は、骨芽細胞への分化を抑制し、かつ、脂肪細胞への分化を抑制する作用を有する物質のスクリーニング方法であって、o s b p 1 2 遺伝子、r a b 7 遺伝子及びv d p 遺伝子のうち少なくとも1つの遺伝子の、発現の抑制を指標とすることを特徴とする。

【0055】

前記第2のスクリーニング方法としては、例えば、(a)間葉系幹細胞に被験物質を投与する工程、(b)被験物質を投与された間葉系幹細胞、及び、被験物質を投与されない間葉系幹細胞における、o s b p 1 2 遺伝子、r a b 7 遺伝子及びv d p 遺伝子のうち少なくとも1つの遺伝子の、発現量を測定する工程、(c)被験物質を投与されない間葉系幹細胞に比べ、被験物質を投与された間葉系幹細胞の方で、o s b p 1 2 遺伝子、r a b 7 遺伝子及びv d p 遺伝子のうち少なくとも1つの遺伝子の発現量が抑制されている場合に、その被験物質を選択する工程、を含む方法などが挙げられる。

40

【0056】

- (a) 工程 -

前記(a)工程における被験物質としては、特に制限はなく、各種候補物質の中から、目的に応じて適宜選択することができる。前記被験物質の投与方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択ことができ、例えば、細胞内へのトランスフェクション、実験動物の組織への投与などが挙げられる。

【0057】

50

- (b) 工程 -

前記 (b) 工程における、*osbp12* 遺伝子、*rab7* 遺伝子及び *vdp* 遺伝子のうち少なくとも 1 つの遺伝子の、発現量を測定する方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、*mRNA* レベルの発現量の測定、タンパクレベルの発現量の測定、などが挙げられる。*mRNA* レベルの発現量の評価方法及びタンパクレベルの発現量の測定方法は、公知の方法の中から、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、*mRNA* に特異的に結合するプローブ、プライマーを利用する方法、タンパク質に特異的に結合する抗体を利用する方法などが挙げられる。

【 0 0 5 8 】

- (c) 工程 -

前記 (c) 工程において、被験物質を投与されない間葉系幹細胞に比べ、被験物質を投与された間葉系幹細胞の方で、*osbp12* 遺伝子、*rab7* 遺伝子及び *vdp* 遺伝子のうち少なくとも 1 つの遺伝子の発現量が抑制されている場合には、前記被験物質が間葉系幹細胞から骨芽細胞の分化を抑制し、かつ、脂肪細胞の分化を抑制する物質として、選択することができる。

なお、発現量の比較を行う場合には、前記 *osbp12* 遺伝子、前記 *rab7* 遺伝子及び前記 *vdp* 遺伝子のうち、いずれかの遺伝子の発現量のみを比較してもよく、2 つ以上の遺伝子の発現量を組合せて比較してもよい。

【 実施例 】

【 0 0 5 9 】

以下に本発明の実施例を説明するが、本発明は、これらの実施例に何ら限定されるものではない。

【 0 0 6 0 】

下記実施例 1 及び 2 は、線虫のマウスホモログ遺伝子が、間葉系幹細胞から脂肪細胞への分化を抑制すると同時に、骨芽細胞への分化を促進又は抑制することを示した実施例である。

【 0 0 6 1 】

< 実施例 1 >

- 脂肪細胞分化誘導 -

- - *siRNA* の調製及び細胞への添加 - -

elk1 遺伝子、*dbi* 遺伝子、*map4k4* 遺伝子、*osbp12* 遺伝子、*rab7* 遺伝子及び *vdp* 遺伝子の発現を抑制する二本鎖 *RNA* とネガティブコントロールは、*Ambion* (*Austin*、テキサス州) 及び *QIAGEN* でそれぞれ購入した。

前記二本鎖 *RNA* 約 150 ng とトリポフェクトアミン 2000 試薬 (*Invitrogen*) 2 μ l を添付のプロトコールに従い混和して調製した。

【 0 0 6 2 】

細胞株として、マウス脂肪細胞由来の前駆脂肪細胞株 (本発明において、「間葉系幹細胞」に相当する。) である、*DFA T - D 1* 細胞 (日本大学・加野浩一郎博士より譲渡いただいた。) を用いた。*DFA T - D 1* 細胞は、10% *FBS* を含有する *DMEM* 培地で 37、 CO_2 濃度 5% の条件下で 1 日間培養し、300,000 個 / ml の濃度で 24 ウェルプレートに播種した。上記二本鎖 *RNA* を含有する混和した溶液を 1 ウェルあたり最終濃度 20 nM となるように添加した。4 時間後に培養液を脂肪細胞分化誘導培地として調製した 10% *FBS*、0.5 mM 3 - イソブチル - 1 - メチルキサンチン、0.25 μ M デキサメタゾン、5 μ g / ml インスリン、及び 1 μ M *rosiglitazone* を含有する *DMEM* 培地に交換した。脂肪細胞分化誘導培地に交換した日を 0 日目とした。

【 0 0 6 3 】

- - 脂肪細胞への分化誘導及び遺伝子発現量の測定 - -

脂肪細胞分化誘導培地に交換して 37、5% CO_2 濃度の条件下で 2 日間培養した後、0.1% トリプシン溶液を用いて *DFA T - D 1* 細胞を回収し、*total RNA* を R

10

20

30

40

50

Neasyカラム(Qiagen、ドイツ)に添付のプロトコールに従い抽出した。抽出したtotal RNAを逆転写酵素により1st strand cDNAを合成し、得られた1st strand cDNAを鋳型としてRT-PCRを行い、遺伝子発現量を測定した。遺伝子発現量の測定は、逆転写産物をテンプレートとしてMx3000P(Stratagene、La Jolla、カリフォルニア州)とPower SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems、Foster City、カリフォルニア州)を用いて添付のプロトコールに従った。

【0064】

- Nile Redによる脂肪染色 - -

脂肪細胞への分化誘導を確認するために、上記と同様に、脂肪細胞分化誘導培地に交換して37、5%CO₂濃度の条件下で4日間培養したDFAT-D1細胞をNile Redを用いて細胞内に蓄積した脂肪を染色した。

まず、4日間培養したDFAT-D1細胞を回収し、PBSで3回洗浄した後、10%ホルマリンを含有するリン酸緩衝液で固定し、1時間室温に放置した。Nile Redをアセトンに溶解し、最終的に1g/mlとなるようにPBSで調製したものを固定したDFAT-D1細胞に加えて、室温で10分間培養した。その後、蛍光顕微鏡により蛍光強度脂肪蓄積の増減を確認すると共に、Nile Redの発光量を、Wallac 1420 Multilabel counter(PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Turku, Finland)で測定した(excitation 485nm; emission 535nm)。結果を図1に示す。

なお、図1中、「NC」は、ネガティブコントロール、すなわち影響がないことがわかっている対照区を表す。

【0065】

<実施例2>

- 骨芽細胞分化誘導 -

- siRNAの調製及び細胞への添加 - -

実施例1と同様の方法によりsiRNAの調製を行った。更に、脂肪細胞分化誘導と同様に、細胞株としてDFAT-D1を用いた。DFAT-D1細胞は、10%FBSを含有するDMEM培地で、37、CO₂濃度5%の条件下で培養した。上記二本鎖RNAを含有する混和した溶液を20nMとなるようにDFAT-D1細胞の培養液に直接加えた。4時間後に培養液を骨芽細胞分化誘導培地として調製した10%FBS、及び100ng/mlのBMP4を含有するDMEM培地に交換した。骨芽細胞分化誘導培地に交換した日を0日目とした。

【0066】

- 骨芽細胞への分化誘導及び遺伝子発現量の測定 - -

骨芽細胞分化誘導培地に交換して37、5%CO₂濃度の条件下で1日間培養した後、0.1%トリプシン溶液を用いてDFAT-D1細胞を回収し、上記と同様にtotal RNAを抽出した後2本鎖cDNAを得て遺伝子発現量の測定を行った。遺伝子発現量の測定は、1.1と同様に、逆転写産物をテンプレートとしてMx3000P(Stratagene、La Jolla、カリフォルニア州)とPower SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems、Foster City、カリフォルニア州)を用いて添付のプロトコールに従った。

【0067】

- アルカリフォスファターゼ染色 - -

骨芽細胞への分化誘導を確認するために、上記と同様に、骨芽細胞分化誘導培地に交換して37、5%CO₂濃度の条件下で6日間培養したDFAT-D1細胞をアルカリフォスファターゼ染色法により分析した。

DFAT-D1細胞をPBSで3回洗浄した後、10%ホルマリン溶液を細胞に加えて

10

20

30

40

50

室温で20分間放置し、アセトンとエタノールを等量含んだ溶液で1分間固定し、PBSで洗浄した。DFAT-D1細胞を固定した。

次いで、アルカリフォスファターゼ染色溶液として、1mgのNaphthol AS-MX (Sigma、セントルイス ミズリー州)を50 μ lのN,N-ジメチルホルムアミド (和光純薬、日本)に溶解し、2mMのMgCl₂を含有する10mlの0.1M Tris-HCl緩衝液 (pH 8.5)に溶解させて、さらに、6mgのFast blue BB salt (Sigma、セントルイス ミズリー州)を加えて、45 μ mのフィルターで濾過したものを、固定したDFAT-D1細胞に加えて、37℃で20分間培養した。その後、光学顕微鏡を用いて染色された領域を観察し、骨芽細胞蓄積の増減を確認した。

10

一方で、上記固定したDFAT-D1細胞について、pNPP solutionを加えて30分間室温で培養し、分光光度計を用いて加水分解されたpNPPを測定した (波長405nm)。結果を図2に示す。

なお、図2中、「NC」は、ネガティブコントロール、すなわち影響がないことがわかっている対照区を表す。

【産業上の利用可能性】

【0068】

本発明の骨芽細胞分化促進剤及び抑制剤は、間葉系幹細胞、骨芽細胞、脂肪細胞の分化機構を研究するための試薬として好適に利用できる。更に、本発明の骨芽細胞分化促進剤は、骨形成促進剤、骨粗鬆症の治療薬、抗肥満薬として好適に利用できる。

20

また、本発明のスクリーニング方法により探索される物質は、間葉系幹細胞、骨芽細胞、脂肪細胞の分化機構を研究するための試薬、医薬などとして利用できる。

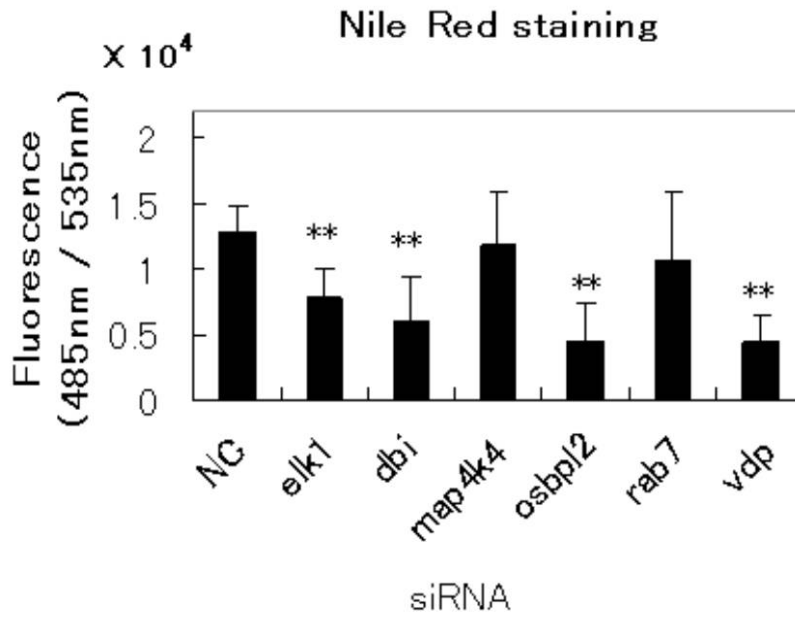
【図面の簡単な説明】

【0069】

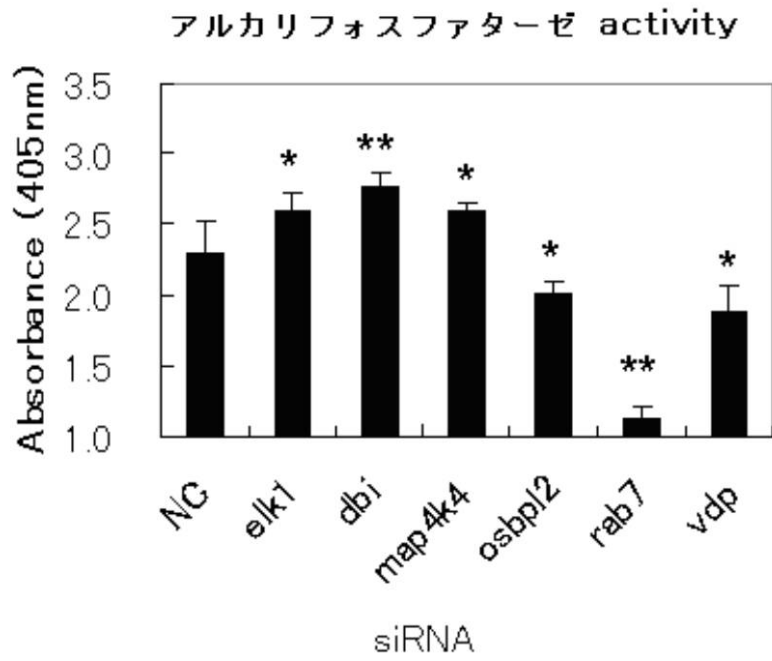
【図1】図1は、実施例1の結果を示す図である。

【図2】図2は、実施例2の結果を示す図である。

【 図 1 】



【 図 2 】



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 33/50 (2006.01) G 0 1 N 33/50 Z

(72)発明者 八木 研

埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷 3 8 学校法人埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター内

(72)発明者 二階堂 愛

埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷 3 8 学校法人埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター内

Fターム(参考) 2G045 AA40 BA13 BB20 BB50 CB01 DA14

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA70 ZA96 ZA97