

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02009/013794

発行日 平成22年9月24日 (2010. 9. 24)

(43) 国際公開日 平成21年1月29日 (2009. 1. 29)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006. 01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006. 01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 7
A 6 1 P 5/48 (2006. 01)	A 6 1 P 5/48	
A 6 1 P 5/50 (2006. 01)	A 6 1 P 5/50	
A 6 1 P 3/10 (2006. 01)	A 6 1 P 3/10	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2009-524322 (P2009-524322)	(71) 出願人 509290762
(21) 国際出願番号 PCT/JP2007/064357	リッチランド・バイオ・メディカル株式会社
(22) 国際出願日 平成19年7月20日 (2007. 7. 20)	東京都世田谷区上野毛3丁目4番20号
(81) 指定国 AP (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), A E, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW	(74) 代理人 100116872 弁理士 藤田 和子
	(72) 発明者 豊島 秀男 東京都世田谷区上野毛3-4-20
	(72) 発明者 横尾 友隆 茨城県つくば市竹園3-24-1-513-502
	(72) 発明者 山田 信博 東京都杉並区荻窪1-33-9

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インスリン分泌誘導剤及び膵臓β細胞増加促進剤

(57) 【要約】

インスリン分泌誘導剤、インスリン分泌誘導組成物及びその製造方法、膵臓細胞増加促進剤、膵臓細胞増加促進組成物及びその製造方法、並びに遺伝子治療用ウイルスベクターを提供する。

本発明のインスリン分泌誘導剤及び膵臓細胞増加促進剤は、膜タンパク質 Tm4sf20 (Transmembrane 4 L six family member 20) をコードする DNA として公知の DNA などによりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドやそのフラグメントを有効成分とする。

[図1]



AA CEREBRUM  
BB HEART  
CC LUNG  
DD LIVER  
EE PANCREAS  
FF SPLEEN  
GG KIDNEY  
HH SMALL INTESTINE  
II WHITE ADIPOSE TISSUE  
JJ BROWN ADIPOSE TISSUE  
KK MUSCLE

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

次の ( a ) ~ ( c ) の少なくとも 1 つを有効成分とするインスリン分泌誘導剤；

( a ) 配列番号 1 又は配列番号 4 に記載の塩基配列を有する DNA によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

( b ) 配列番号 1 又は配列番号 4 に記載の塩基配列を有する DNA によりコードされるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び / 又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、インスリン分泌誘導作用を持つポリペプチド、

( c ) インスリン分泌誘導作用を持つ ( a ) 又は ( b ) のポリペプチドのフラグメント。

**【請求項 2】**

配列番号 4 に記載の塩基配列を有する DNA によりコードされるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び / 又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、インスリン分泌誘導作用を持つポリペプチドが、配列番号 7 に記載の塩基配列を有する DNA によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドである、請求項 1 記載のインスリン分泌誘導剤。

**【請求項 3】**

次の ( d ) ~ ( f ) の少なくとも 1 つを有効成分とするインスリン分泌誘導剤；

( d ) 配列番号 3 又は配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、

( e ) 配列番号 3 又は配列番号 6 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び / 又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、インスリン分泌誘導作用を持つポリペプチド、

( f ) インスリン分泌誘導作用を持つ ( d ) 又は ( e ) のポリペプチドのフラグメント。

**【請求項 4】**

配列番号 6 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び / 又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、インスリン分泌誘導作用を持つポリペプチドが、配列番号 9 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドである、請求項 3 記載のインスリン分泌誘導剤。

**【請求項 5】**

インスリン分泌誘導作用を持つ ( d ) 又は ( e ) のポリペプチドのフラグメントが、配列番号 10、配列番号 11、又は配列番号 12 に記載のアミノ酸配列を少なくとも含むポリペプチドである、請求項 3 記載のインスリン分泌誘導剤。

**【請求項 6】**

インスリン分泌誘導剤の製造のための、次の ( a ) ~ ( c ) の少なくとも 1 つの使用；

( a ) 配列番号 1 又は配列番号 4 に記載の塩基配列を有する DNA によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

( b ) 配列番号 1 又は配列番号 4 に記載の塩基配列を有する DNA によりコードされるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び / 又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、インスリン分泌誘導作用を持つポリペプチド、

( c ) インスリン分泌誘導作用を持つ ( a ) 又は ( b ) のポリペプチドのフラグメント。

**【請求項 7】**

インスリン分泌誘導剤の製造のための、次の ( d ) ~ ( f ) の少なくとも 1 つの使用；

( d ) 配列番号 3 又は配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、

( e ) 配列番号 3 又は配列番号 6 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び / 又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、インスリン分泌誘導作用を持つポリペプチド、

( f ) インスリン分泌誘導作用を持つ ( d ) 又は ( e ) のポリペプチドのフラグメント。

**【請求項 8】**

配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号 9 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を少なくとも含むポリペプチド、配列番号 11 に記載の

10

20

30

40

50

アミノ酸配列を少なくとも含むポリペプチド、配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列を少なくとも含むポリペプチド、の少なくとも 1 つを有効成分として含有するインスリン分泌誘導組成物。

【請求項 9】

配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7 の少なくとも 1 つに記載の塩基配列を有する DNA 又はこれらの DNA とストリンジентな条件下でハイブリダイズする DNA を外来遺伝子として培養可能な細胞に組み込み、当該細胞を培養して遺伝子発現させるインスリン分泌誘導組成物の製造方法。

【請求項 10】

外来遺伝子の発現が可能なウイルスベクターに外来遺伝子として配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7 の少なくとも 1 つに記載の塩基配列を有する DNA 又はこれらの DNA とストリンジентな条件下でハイブリダイズする DNA を組み込んでなる、遺伝子治療によりインスリン分泌誘導を行うためのウイルスベクター。

10

【請求項 11】

アデノウイルスベクターである請求項 10 記載のウイルスベクター。

【請求項 12】

次の (a) ~ (c) の少なくとも 1 つを有効成分とする膵臓 細胞増加促進剤；

(a) 配列番号 1 又は配列番号 4 に記載の塩基配列を有する DNA によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) 配列番号 1 又は配列番号 4 に記載の塩基配列を有する DNA によりコードされるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び / 又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、膵臓 細胞増加促進作用を持つポリペプチド、

20

(c) 膵臓 細胞増加促進作用を持つ (a) 又は (b) のポリペプチドのフラグメント。

【請求項 13】

配列番号 4 に記載の塩基配列を有する DNA によりコードされるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び / 又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、膵臓 細胞増加促進作用を持つポリペプチドが、配列番号 7 に記載の塩基配列を有する DNA によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドである、請求項 12 記載の膵臓 細胞増加促進剤。

【請求項 14】

30

次の (d) ~ (f) の少なくとも 1 つを有効成分とする膵臓 細胞増加促進剤；

(d) 配列番号 3 又は配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(e) 配列番号 3 又は配列番号 6 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び / 又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、膵臓 細胞増加促進作用を持つポリペプチド、

(f) 膵臓 細胞増加促進作用を持つ (d) 又は (e) のポリペプチドのフラグメント。

【請求項 15】

配列番号 6 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び / 又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、膵臓 細胞増加促進作用を持つポリペプチドが、配列番号 9 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドである、請求項 14 記載の膵臓 細胞増加促進剤。

40

【請求項 16】

膵臓 細胞増加促進作用を持つ (d) 又は (e) のポリペプチドのフラグメントが、配列番号 10、配列番号 11、又は配列番号 12 に記載のアミノ酸配列を少なくとも含むポリペプチドである、請求項 14 記載の膵臓 細胞増加促進剤。

【請求項 17】

膵臓 細胞増加促進剤の製造のための、次の (a) ~ (c) の少なくとも 1 つの使用；

(a) 配列番号 1 又は配列番号 4 に記載の塩基配列を有する DNA によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) 配列番号 1 又は配列番号 4 に記載の塩基配列を有する DNA によりコードされるア

50

ミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及びノ又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、膵臓細胞増加促進作用を持つポリペプチド、

(c) 膵臓細胞増加促進作用を持つ(a)又は(b)のポリペプチドのフラグメント。

【請求項18】

膵臓細胞増加促進剤の製造のための、次の(d)~(f)の少なくとも1つの使用；

(d) 配列番号3又は配列番号6に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(e) 配列番号3又は配列番号6に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及びノ又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、膵臓細胞増加促進作用を持つポリペプチド、

(f) 膵臓細胞増加促進作用を持つ(d)又は(e)のポリペプチドのフラグメント。

【請求項19】

配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号6に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号9に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号10に記載のアミノ酸配列を少なくとも含むポリペプチド、配列番号11に記載のアミノ酸配列を少なくとも含むポリペプチド、配列番号12に記載のアミノ酸配列を少なくとも含むポリペプチド、の少なくとも1つを有効成分として含有する膵臓細胞増加促進組成物。

【請求項20】

配列番号1、配列番号4、配列番号7の少なくとも1つに記載の塩基配列を有するDNA又はこれらのDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズするDNAを外来遺伝子として培養可能な細胞に組み込み、当該細胞を培養して遺伝子発現させる膵臓細胞増加促進組成物の製造方法。

【請求項21】

外来遺伝子の発現が可能なウイルスベクターに外来遺伝子として配列番号1、配列番号4、配列番号7の少なくとも1つに記載の塩基配列を有するDNA又はこれらのDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズするDNAを組み込んでなる、遺伝子治療により膵臓細胞の増加を促進するためのウイルスベクター。

【請求項22】

アデノウイルスベクターである請求項21記載のウイルスベクター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、糖尿病をはじめとする種々の疾患の治療に有効なインスリン分泌誘導剤、インスリン分泌誘導組成物及びその製造方法、膵臓細胞増加促進剤、膵臓細胞増加促進組成物及びその製造方法、並びに遺伝子治療用ウイルスベクターに関する。

【背景技術】

【0002】

近年、消化管は、食事の栄養分を吸収するだけでなく消化管ホルモンを産生する内分泌器官として注目されており、胃で産生されるグレリンの他、小腸から分泌されるグルカゴン様ペプチド-1 (Glucagon-like peptide-1: GLP-1) や胃酸分泌抑制ポリペプチド (Gastric inhibitory polypeptide: GIP) などが既にクローニングされている。グレリンは摂食亢進作用を有し、エネルギー代謝と関連がある。GLP-1やGIPはインクレチンと称され、食事負荷により膵臓細胞に働き、インスリン分泌を誘導する。また、GIPは脂肪組織でも発現しており、GIPレセプターのノックアウトマウスは高脂肪負荷食を与えても体重が増加しないことから、肥満との関連も示唆されている。

【0003】

このように、消化管ホルモンはエネルギー代謝や摂食行動などに関わっており、その機能の解明により、糖尿病をはじめとする種々の疾患の治療方法が開発されるに至っている。しかしながら、消化管ホルモンの全容は未だ明らかにされておらず、不明な部分も多い

10

20

30

40

50

。

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0004】

そこで本発明は、これまでに知られていない消化管由来のポリペプチドをコードする遺伝子の探索を行い、見出された遺伝子をもとに新たな医薬用途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】

## 【0005】

本発明者らは、上記の点に鑑みて鋭意研究を重ねた結果、SST法 (Signal Sequence Trap法: Nat Biotechnol. 1999 May; 17(5): 487-90. A signal sequence trap based on a constitutively active cytokine receptor. Kojima T, Kitamura T.) を採用してマウスの腸管から単離したcDNA断片をもとに特定したクローンCF266 (mCF266) が、腸管において特異的に発現していること、このmCF266をトランスフェクトした細胞の培養上清にはインスリン分泌誘導作用があること、アデノウイルスベクターを使用した強制発現系において、mCF266が*in vivo*でインスリン分泌誘導作用を示すことなどを見出した。さらに、本発明者らは、mCF266に対応するヒトCF266 (hCF266) によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドのフラグメントである合成ポリペプチドについても、同様の作用を示すことを見出した。

また、本発明者らは、アデノウイルスベクターを使用した強制発現系において、hCF266が*in vivo*で膵臓細胞増加促進作用を示すこと、mCF266のトランスジェニックマウスにおいて膵臓細胞の増加が促進されることなどを見出した。さらに、本発明者らは、hCF266によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドのフラグメントである合成ポリペプチドについても、同様の作用を示すことを見出した。なお、膵臓細胞の増加が促進される要因としては、膵臓細胞の増殖促進、膵臓細胞の破壊抑制のいずれもが考えられるが、本明細書ではその両者を合わせて「膵臓細胞増加促進」と称する。

本発明は、このような知見に基づいて完成されたものである。

## 【0006】

本発明のインスリン分泌誘導剤は、次の(a)~(c)の少なくとも1つを有効成分とすることを特徴とする；

(a) 配列番号1又は配列番号4に記載の塩基配列を有するDNAによりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) 配列番号1又は配列番号4に記載の塩基配列を有するDNAによりコードされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び/又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、インスリン分泌誘導作用を持つポリペプチド、

(c) インスリン分泌誘導作用を持つ(a)又は(b)のポリペプチドのフラグメント。

## 【0007】

また、本発明のインスリン分泌誘導剤は、配列番号4に記載の塩基配列を有するDNAによりコードされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び/又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、インスリン分泌誘導作用を持つポリペプチドが、配列番号7に記載の塩基配列を有するDNAによりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドであることを特徴とする。

## 【0008】

また、本発明のインスリン分泌誘導剤は、次の(d)~(f)の少なくとも1つを有効成分とすることを特徴とする；

(d) 配列番号3又は配列番号6に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(e) 配列番号3又は配列番号6に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ

10

20

30

40

50

酸が置換、欠失、及び/又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、インスリン分泌誘導作用を持つポリペプチド、

(f) インスリン分泌誘導作用を持つ(d)又は(e)のポリペプチドのフラグメント。  
【0009】

また、本発明のインスリン分泌誘導剤は、配列番号6に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び/又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、インスリン分泌誘導作用を持つポリペプチドが、配列番号9に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドであることを特徴とする。

【0010】

また、本発明のインスリン分泌誘導剤は、インスリン分泌誘導作用を持つ(d)又は(e)のポリペプチドのフラグメントが、配列番号10、配列番号11、又は配列番号12に記載のアミノ酸配列を少なくとも含むポリペプチドであることを特徴とする。

10

【0011】

また、本発明は、インスリン分泌誘導剤の製造のための、次の(a)~(c)の少なくとも1つの使用を提供する；

(a) 配列番号1又は配列番号4に記載の塩基配列を有するDNAによりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) 配列番号1又は配列番号4に記載の塩基配列を有するDNAによりコードされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び/又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、インスリン分泌誘導作用を持つポリペプチド、

20

(c) インスリン分泌誘導作用を持つ(a)又は(b)のポリペプチドのフラグメント。

【0012】

また、本発明は、インスリン分泌誘導剤の製造のための、次の(d)~(f)の少なくとも1つの使用を提供する；

(d) 配列番号3又は配列番号6に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(e) 配列番号3又は配列番号6に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び/又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、インスリン分泌誘導作用を持つポリペプチド、

(f) インスリン分泌誘導作用を持つ(d)又は(e)のポリペプチドのフラグメント。

【0013】

また、本発明のインスリン分泌誘導組成物は、配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号6に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号9に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号10に記載のアミノ酸配列を少なくとも含むポリペプチド、配列番号11に記載のアミノ酸配列を少なくとも含むポリペプチド、配列番号12に記載のアミノ酸配列を少なくとも含むポリペプチド、の少なくとも1つを有効成分として含有することを特徴とする。

30

【0014】

また、本発明のインスリン分泌誘導組成物の製造方法は、配列番号1、配列番号4、配列番号7の少なくとも1つに記載の塩基配列を有するDNA又はこれらのDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズするDNAを外来遺伝子として培養可能な細胞に組み込み、当該細胞を培養して遺伝子発現させることを特徴とする。

40

【0015】

また、本発明の遺伝子治療によりインスリン分泌誘導を行うためのウイルスベクターは、外来遺伝子の発現が可能なウイルスベクターに外来遺伝子として配列番号1、配列番号4、配列番号7の少なくとも1つに記載の塩基配列を有するDNA又はこれらのDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズするDNAを組み込んでなることを特徴とする。

【0016】

また、本発明の遺伝子治療によりインスリン分泌誘導を行うためのウイルスベクターは、アデノウイルスベクターであることを特徴とする。

50

## 【 0 0 1 7 】

本発明の膵臓 細胞増加促進剤は、次の ( a ) ~ ( c ) の少なくとも 1 つを有効成分とすることを特徴とする；

( a ) 配列番号 1 又は配列番号 4 に記載の塩基配列を有する D N A によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

( b ) 配列番号 1 又は配列番号 4 に記載の塩基配列を有する D N A によりコードされるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び / 又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、膵臓 細胞増加促進作用を持つポリペプチド、

( c ) 膵臓 細胞増加促進作用を持つ ( a ) 又は ( b ) のポリペプチドのフラグメント。

## 【 0 0 1 8 】

また、本発明の膵臓 細胞増加促進剤は、配列番号 4 に記載の塩基配列を有する D N A によりコードされるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び / 又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、膵臓 細胞増加促進作用を持つポリペプチドが、配列番号 7 に記載の塩基配列を有する D N A によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドであることを特徴とする。

## 【 0 0 1 9 】

また、本発明の膵臓 細胞増加促進剤は、次の ( d ) ~ ( f ) の少なくとも 1 つを有効成分とすることを特徴とする；

( d ) 配列番号 3 又は配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、

( e ) 配列番号 3 又は配列番号 6 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び / 又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、膵臓 細胞増加促進作用を持つポリペプチド、

( f ) 膵臓 細胞増加促進作用を持つ ( d ) 又は ( e ) のポリペプチドのフラグメント。

## 【 0 0 2 0 】

また、本発明の膵臓 細胞増加促進剤は、配列番号 6 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び / 又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、膵臓 細胞増加促進作用を持つポリペプチドが、配列番号 9 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドであることを特徴とする。

## 【 0 0 2 1 】

また、本発明の膵臓 細胞増加促進剤は、膵臓 細胞増加促進作用を持つ ( d ) 又は ( e ) のポリペプチドのフラグメントが、配列番号 1 0、配列番号 1 1、又は配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列を少なくとも含むポリペプチドであることを特徴とする。

## 【 0 0 2 2 】

また、本発明は、膵臓 細胞増加促進剤の製造のための、次の ( a ) ~ ( c ) の少なくとも 1 つの使用を提供する；

( a ) 配列番号 1 又は配列番号 4 に記載の塩基配列を有する D N A によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

( b ) 配列番号 1 又は配列番号 4 に記載の塩基配列を有する D N A によりコードされるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び / 又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、膵臓 細胞増加促進作用を持つポリペプチド、

( c ) 膵臓 細胞増加促進作用を持つ ( a ) 又は ( b ) のポリペプチドのフラグメント。

## 【 0 0 2 3 】

また、本発明は、膵臓 細胞増加促進剤の製造のための、次の ( d ) ~ ( f ) の少なくとも 1 つの使用を提供する；

( d ) 配列番号 3 又は配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、

( e ) 配列番号 3 又は配列番号 6 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び / 又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、膵臓 細胞増加促進作用を持つポリペプチド、

( f ) 膵臓 細胞増加促進作用を持つ ( d ) 又は ( e ) のポリペプチドのフラグメント。

## 【 0 0 2 4 】

10

20

30

40

50

また、本発明の膵臓 細胞増加促進組成物は、配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号 9 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を少なくとも含むポリペプチド、配列番号 11 に記載のアミノ酸配列を少なくとも含むポリペプチド、配列番号 12 に記載のアミノ酸配列を少なくとも含むポリペプチド、の少なくとも 1 つを有効成分として含有することを特徴とする。

【0025】

また、本発明の膵臓 細胞増加促進組成物の製造方法は、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7 の少なくとも 1 つに記載の塩基配列を有する DNA 又はこれらの DNA とストリンジентな条件下でハイブリダイズする DNA を外来遺伝子として培養可能な細胞に組み込み、当該細胞を培養して遺伝子発現させることを特徴とする。

10

【0026】

また、本発明の遺伝子治療により膵臓 細胞の増加を促進するためのウイルスベクターは、外来遺伝子の発現が可能なウイルスベクターに外来遺伝子として配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7 の少なくとも 1 つに記載の塩基配列を有する DNA 又はこれらの DNA とストリンジентな条件下でハイブリダイズする DNA を組み込んでなることを特徴とする。

【0027】

また、本発明の遺伝子治療により膵臓 細胞の増加を促進するためのウイルスベクターは、アデノウイルスベクターであることを特徴とする。

20

【発明の効果】

【0028】

本発明によれば、糖尿病をはじめとする種々の疾患の治療に有効なインスリン分泌誘導剤、インスリン分泌誘導組成物及びその製造方法、膵臓 細胞増加促進剤、膵臓 細胞増加促進組成物及びその製造方法、並びに遺伝子治療用ウイルスベクターを提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図 1】 m C F 2 6 6 の部位別発現分布を示すノザンプロットの結果である。

【図 2】 C F 2 6 6 トランスフェクション細胞の培養上清による、マウス膵臓 細胞由来培養細胞株に対するインスリン分泌誘導作用を示すグラフである。

30

【図 3】 m C F 2 6 6 を発現するアデノウイルスベクターによる、2 型糖尿病モデルマウスに対するインスリン分泌誘導作用を示すグラフである。

【図 4】 h C F 2 6 6 ( 2 7 V ) によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドのフラグメントによる、マウス膵臓ランゲルハンス氏島細胞に対するインスリン分泌誘導作用を示すグラフである。

【図 5】 h C F 2 6 6 ( 2 7 V ) を発現するアデノウイルスベクターによる、1 型糖尿病モデルマウスに対する血糖値低下作用を示すグラフである。

【図 6】 h C F 2 6 6 ( 2 7 V ) を発現するアデノウイルスベクターによる、1 型糖尿病モデルマウスに対する膵臓 細胞増加促進作用を示すグラフである。

40

【図 7】 トランスジェニックマウスにおける m C F 2 6 6 の膵臓 細胞増加促進作用を示すグラフである。

【図 8】 h C F 2 6 6 ( 2 7 V ) によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドのフラグメントによる、1 型糖尿病モデルマウスに対する膵臓 細胞増加促進作用を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0030】

本発明のインスリン分泌誘導剤は、次の ( a ) ~ ( c ) の少なくとも 1 つを有効成分とすることを特徴とするものである；

( a ) 配列番号 1 又は配列番号 4 に記載の塩基配列を有する DNA によりコードされるア

50



ミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) 配列番号1又は配列番号4に記載の塩基配列を有するDNAによりコードされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び/又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、インスリン分泌誘導作用を持つポリペプチド、

(c) インスリン分泌誘導作用を持つ(a)又は(b)のポリペプチドのフラグメント。

【0031】

また、本発明の膵臓細胞増加促進剤は、次の(a)~(c)の少なくとも1つを有効成分とすることを特徴とするものである；

(a) 配列番号1又は配列番号4に記載の塩基配列を有するDNAによりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) 配列番号1又は配列番号4に記載の塩基配列を有するDNAによりコードされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び/又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、膵臓細胞増加促進作用を持つポリペプチド、

(c) 膵臓細胞増加促進作用を持つ(a)又は(b)のポリペプチドのフラグメント。

【0032】

本発明者がマウスの腸管から取得したmCF266は、配列番号1に記載の塩基配列を有するDNAであるが、このDNAはマウスの筋肉に発現している膜タンパク質Tm4sf20(Transmembrane 4 Six family member 20)をコードするDNAとして公知の全長1505bpのものである(NCBI:LOCUS NM\_025453)。mCF266のCDSは41..721であり、配列番号3に記載の226個のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードしている(配列番号2参照)。しかしながら、このポリペプチドがインスリン分泌誘導作用及び膵臓細胞増加促進作用を持つことについての報告は、これまでのところ存在しない。

【0033】

また、本発明者らは、mCF266に対応するヒトCF266(hCF266)についてもmCF266と同様の作用を有することを確認している。hCF266は配列番号4に記載の塩基配列を有するDNAであり、ヒトTM4SF20をコードするDNAとして公知の全長2308bpのものである(NCBI:LOCUS NM\_024795)。hCF266のCDSは38..727であり、配列番号6に記載の229個のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードしている(配列番号5参照)。しかしながら、このポリペプチドがインスリン分泌誘導作用及び膵臓細胞増加促進作用を持つことについての報告もまた、これまでのところ存在しない。

【0034】

本発明のインスリン分泌誘導剤及び膵臓細胞増加促進剤は、このような配列番号1又は配列番号4に記載の塩基配列を有するDNAによりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドを有効成分とすることができる。

【0035】

また、本発明のインスリン分泌誘導剤及び膵臓細胞増加促進剤は、インスリン分泌誘導作用及び膵臓細胞増加促進作用が維持されている限り、上述のポリペプチドのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び/又は付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを有効成分とすることもできる。あるアミノ酸配列に対する1又は数個のアミノ酸の置換、欠失、及び/又は付加により修飾されたアミノ酸配列を有するポリペプチドがその生物学的活性を維持することは既に知られている(Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadié-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。

【0036】

10

20

30

40

50

なお、1若しくは数個のアミノ酸を他のアミノ酸に置換する場合には、置換前後でアミノ酸側鎖の性質が保存されていることが望ましい。アミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸(A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性アミノ酸(R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸(G、A、V、L、I、P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸(S、T、Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸(C、M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸(D、N、E、Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸(R、K、H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸(H、F、Y、W)が挙げられる(括弧内はいずれもアミノ酸の一文字表記を表す)。

【0037】

具体的に、配列番号4に記載の塩基配列を有するDNAによりコードされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び/又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、インスリン分泌誘導作用及び膵臓細胞増加促進作用を持つポリペプチドとしては、例えば、hCF266の一塩基多型(SNPs)に基づく配列番号7に記載の塩基配列を有するDNAによりコードされる配列番号9に記載の229個のアミノ酸配列を有するポリペプチドが挙げられる(配列番号8参照)。配列番号6に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドと、配列番号9に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドとの相違は、前者は27番目のアミノ酸がバリン(hCF266(27V))であるのに対して、後者はアラニン(hCF266(27A))であることである。

10

【0038】

また、本発明のインスリン分泌誘導剤及び膵臓細胞増加促進剤は、インスリン分泌誘導作用及び膵臓細胞増加促進作用が維持されている限り、上述のポリペプチドのフラグメントを有効成分とすることもできる。

20

【0039】

具体的に、インスリン分泌誘導作用及び膵臓細胞増加促進作用を持つポリペプチドのフラグメントとしては、例えば、配列番号6に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドの98~116番目に相当する19個のアミノ酸配列ALYCM LISIQA L L K G P L M C(配列番号10参照)を少なくとも含むポリペプチド、同78~96番目に相当する19個のアミノ酸配列CNNRTGMFLSSLSVITVI(配列番号11参照)を少なくとも含むポリペプチド、同161~179番目に相当する19個のアミノ酸配列TSNDTMA SGWRASSFHFD S(配列番号12参照)を少なくとも含むポリペプチドが挙げられる。

30

【0040】

本発明のインスリン分泌誘導剤及び膵臓細胞増加促進剤の有効成分となるポリペプチドやそのフラグメントは、化学合成してもよいが、遺伝子工学的に取得することもできる。例えば、配列番号1や配列番号4や配列番号7に記載の塩基配列を有するDNA又はこれらのDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを外来遺伝子として培養可能な宿主細胞に組み込み、当該細胞を培養して遺伝子発現させることで、その培養上清から得ることができる。

宿主細胞としては、細菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞など、公知の細胞を適宜使用することができる。動物細胞としては、HEK293細胞、HEK293T細胞、CHO-K1細胞、COS細胞などが挙げられる。

40

【0041】

ここで「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA」とは、対象とするDNAをプローブとして使用し、コロニーハイブリダイゼーション法、ブランクハイブリダイゼーション法、サザンロットハイブリダイゼーション法などを採用することにより取得できるDNAを意味する。例えば、コロニーやブランク由来のDNAを固定化したフィルタを使用し、0.7~1.0M塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2×SSC溶液(1×SSCの組成:150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウム)を使用し、65℃条件下でフィルタを洗浄することにより同定できるDNAなどが挙げられる(必要であればMolecular Cloning

50

g: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989.などを参照のこと)。ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列の、プローブとして使用するDNAの塩基配列との相同性は、80%以上が好ましく、90%以上がより好ましく、93%以上がさらに好ましく、95%以上が特に好ましく、98%以上が最も好ましい。

【0042】

これらのポリペプチドやそのフラグメントの分離・精製は、例えば、イオン交換樹脂、分配クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなど、ペプチド化学において通常使用される方法によって行うことができる。

10

【0043】

本発明のインスリン分泌誘導剤及び膵臓細胞増加促進剤は、注射剤（皮下、皮内、筋肉内、静脈内、腹腔内など）として、経皮、経粘膜、経鼻などの投与に適した剤型として、あるいは経口投与に適した剤型（錠剤、カプセル剤、顆粒剤、液剤、懸濁剤など）として、投与することが可能である。また、本発明のインスリン分泌誘導剤及び膵臓細胞増加促進剤には、その投与方法や剤型に応じて必要により、懸濁化剤、溶解補助剤、安定化剤、等張化剤、保存剤、吸着防止剤、界面活性剤、希釈剤、賦形剤、pH調整剤、酸化防止剤などを適宜添加することができる。その用法用量は患者の性別、年齢、体重、病態などによって適宜決定すればよい。

【0044】

20

例えば、その有効成分となるポリペプチドやそのフラグメントを必要に応じて薬学的に許容される塩酸塩などの無機酸塩、酢酸塩などの有機酸塩、ナトリウム塩などのアルカリ金属塩などに変換し、滅菌した上で、凍結乾燥品として製剤化しておくことができる。使用時には、生理食塩水などに溶解して注射剤の形態で静脈内投与することで、インスリン分泌の誘導及び膵臓細胞の増加促進が可能となる。

【0045】

なお、本発明のインスリン分泌誘導剤及び膵臓細胞増加促進剤の有効成分となるポリペプチドやそのフラグメントは、高度に精製された純品を単独で使用してもよいし、複数種類を混合して使用してもよく、種々のインスリン分泌誘導組成物、膵臓細胞増加促進組成物の形態で使用することができる。

30

【0046】

また、本発明の遺伝子治療によりインスリン分泌誘導を行うためのウイルスベクター、及び膵臓細胞の増加を促進するためのウイルスベクターは、外来遺伝子の発現が可能なウイルスベクターに外来遺伝子として配列番号1、配列番号4、配列番号7のいずれかに記載の塩基配列を有するDNA又はこれらのDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを組み込んでなることを特徴とするものである。ウイルスベクターの具体例としては、配列番号1、配列番号4、配列番号7のいずれかに記載の塩基配列を有するDNAをCAGプロモーターなどに連結して構築したアデノウイルスベクターなどが挙げられる。このようなウイルスベクターは、例えば静脈内投与することで、インスリン分泌の誘導及び膵臓細胞の増加促進が可能となる。

40

【0047】

本発明のインスリン分泌誘導剤、インスリン分泌誘導組成物、あるいは遺伝子治療によりインスリン分泌誘導を行うためのウイルスベクターは、体内において優れたインスリン分泌誘導作用を示すため、インスリンの分泌能低下を伴う疾患、特に2型糖尿病の治療に有効である。換言すれば、これらのインスリン分泌誘導剤、インスリン分泌誘導組成物、あるいは遺伝子治療によりインスリン分泌誘導を行うためのウイルスベクターを用いることにより、インスリンの分泌能低下を伴う疾患、特に2型糖尿病の治療方法を提供することができる。

【0048】

また、本発明の膵臓細胞増加促進剤、膵臓細胞増加促進組成物、あるいは遺伝子治

50

療により膵臓 細胞の増加を促進するためのウイルスベクターは、体内において優れた膵臓 細胞増加促進作用を示すため、膵臓 細胞の減少又は死滅を伴う疾患、特に1型糖尿病の治療に有効である。換言すれば、これらの膵臓 細胞増加促進剤、膵臓 細胞増加促進組成物、あるいは遺伝子治療により膵臓 細胞の増加を促進するためのウイルスベクターを用いることにより、膵臓 細胞の減少又は死滅を伴う疾患、特に1型糖尿病の治療方法を提供することができる。

#### 【実施例】

##### 【0049】

以下、本発明を実施例によって詳細に説明するが、本発明は以下の記載によって何ら限定して解釈されるものではない。

##### 【0050】

<参考例1：mCF266の部位別発現分布>

参考例1では、SST法を採用してマウスの腸管から取得したmCF266のmRNAの部位別発現分布をノザンプロット法により検討した。

##### 【0051】

まず、マウスから各臓器・組織（大脳、心臓、肺、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、小腸、白色脂肪組織、褐色脂肪組織、筋肉）を摘出し、TRIzol (invitrogen)を用いて添付の説明書に従ってtotal RNAを抽出した。次に、定法に従い10µg/レーンとなるようにメンブレンを作製し、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ を使用して標識したmCF266のcDNA (mRNAクローン)をプローブにしてハイブリダイズさせた。その結果を図1に示す。図1から明らかなように、mCF266は小腸において特異的に発現している。

##### 【0052】

<実施例1：CF266トランスフェクション細胞の培養上清によるマウス膵臓 細胞由来培養細胞株MIN6細胞に対する作用>

実施例1では、CF266をトランスフェクトした胎児腎臓上皮細胞由来細胞株HEK293T細胞の培養上清によるMIN6細胞に対する作用を確認した。

##### 【0053】

まず、5% FCS及び抗生物質（ペニシリン100U/mL、ストレプトマイシン10mg/mL）を添加したDMEM培地で継代培養したHEK293T細胞を10cmディッシュに $1 \times 10^6$ 個撒いた。その翌日、FuGENE6 (Roche)を使用してmCF266の発現ベクター (pCAGGS-mCF266)をHEK293T細胞にトランスフェクトし、mCF266を強制発現させた。その24時間後に培地をOpti-MEM培地に交換し、さらにその24時間後に培養上清を回収した。

##### 【0054】

次に、15% FCS、抗生物質（ペニシリン100U/mL、ストレプトマイシン10mg/mL）、及び2-メルカプトエタノールを添加したDMEM培地（高グルコース；Invitrogen）で継代培養したMIN6細胞を24穴プレートに $3 \times 10^5$ 個/ウェル撒いた。その翌日、KRBH緩衝液（2.8mMグルコース）を0.5mL/ウェル添加して30分間前培養した後、上記の培養上清とKRBH緩衝液との混合液（1：1（v/v））を0.5mL/ウェル添加して1時間刺激を行い、MIN6細胞のグルコース応答性のインスリン分泌（GIS）を測定した。測定は培養液中のインスリンをELISA法（シバヤギのレビスインスリンキットを使用：以下同じ）で測定することで行った。なお、インスリン値はMIN6細胞の総タンパク質量で正規化した。

##### 【0055】

同様に、ヒト腸管cDNAライブラリー（BD Biosciences）からクローニングした配列番号4に記載の塩基配列を有するDNA（hCF266（27V））、及びDNA（hCF266（27V））に対して公知の方法で変異導入することで取得した配列番号7に記載の塩基配列を有するDNA（hCF266（27A））のそれぞれの発現ベクターをHEK293T細胞にトランスフェクトし、それぞれを強制発現させた。そ

10

20

30

40

50

して、その培養上清を用いて、上記と同様にしてM I N 6細胞のグルコース応答性のインスリン分泌 ( G S I S ) を測定した。

【 0 0 5 6 】

その結果を図 2 に示す。図中、「 M o c k 」は、上記と同様の方法で空ベクター ( p C A G G S ) を H E K 2 9 3 T 細胞にトランスフェクトして得た培養上清を添加した場合の結果を示す。図 2 から明らかなように、C F 2 6 6 を強制発現させた細胞の培養上清は、M I N 6 細胞に対してグルコース応答性のインスリン分泌を誘導し、その作用はとりわけ h C F 2 6 6 ( 2 7 V ) を強制発現させた場合が優れていた。

【 0 0 5 7 】

< 実施例 2 : 2 型糖尿病モデル K K / A y マウスに対する m C F 2 6 6 の作用 >

実施例 2 では、m C F 2 6 6 を発現するアデノウイルスベクターを用いて、2 型糖尿病モデルマウスである K K / A y マウスに対する m C F 2 6 6 の作用を確認した。

【 0 0 5 8 】

まず、高脂肪高シヨ糖負荷食を与えた 1 8 週齢の K K / A y マウス ( 体重約 4 7 ~ 5 1 g ) に対して、C A G プロモーターに m C F 2 6 6 を連結して構築したアデノウイルスベクター ( I n v i t r o g e n の商品名 V i r a P o w e r を使用して作製 ) を  $5 \times 10^9$  P F U の濃度で尾静脈から静脈内投与した。その 4 日後、静脈内糖負荷試験 ( i . v . G T T ) を行い、経時的に採血し、血清中の血糖値、インスリン値を測定した。

【 0 0 5 9 】

その結果を図 3 に示す。図中、「 A d G F P 」は、m C F 2 6 6 の代わりに G F P をコードする D N A を連結して構築したアデノウイルスベクターを用いた場合の結果を示す。図 3 から明らかなように、2 型糖尿病モデルマウスの体内で m C F 2 6 6 を発現させると、対照として G F P を発現させた場合と比較して、血糖値はやや低い傾向が見られるに過ぎなかったが ( 図中 ( a ) )、インスリン値は有意に高くなっていた ( 図中 ( b ) )。したがって、m C F 2 6 6 の発現はインスリンの分泌を誘導することが分かった。

【 0 0 6 0 】

< 実施例 3 : h C F 2 6 6 ( 2 7 V ) トランスフェクション細胞の培養上清に含まれるポリペプチドによるマウス膵臓ランゲルハンス氏島細胞に対する作用 >

実施例 3 では、h C F 2 6 6 ( 2 7 V ) をトランスフェクトした H E K 2 9 3 T 細胞の培養上清に含まれるポリペプチドを化学合成し、合成したポリペプチドによるマウス膵臓ランゲルハンス氏島細胞に対する作用を確認した。

【 0 0 6 1 】

まず、実施例 1 と同様の方法により、h C F 2 6 6 ( 2 7 V ) の発現ベクターを H E K 2 9 3 T 細胞にトランスフェクトして h C F 2 6 6 ( 2 7 V ) を強制発現させ、培養上清を回収した。そして、陰イオン交換カラム ( P O R O S H Q カラム ; A B I ) を使用して、回収した培養上清を分画した。

【 0 0 6 2 】

次に、C 5 7 B L / 6 マウスから単離した膵臓ランゲルハンス氏島細胞を 2 4 穴プレートに 1 0 i s l e t s / ウェル撒き、R P M I 1 6 4 0 培地 ( 1 0 % F C S ; I n v i t r o g e n ) 中で 2 時間培養した後、K R B H 緩衝液 ( 2 . 8 m M グルコース又は 2 0 m M グルコース ) を 0 . 5 m L / ウェルとなるように添加して 3 0 分間前培養した。そして、上記の培養上清画分と K R B H 緩衝液との混合液 ( 1 : 1 ( v / v ) ) を 0 . 5 m L / ウェル添加して 1 時間刺激を行い、マウス膵臓ランゲルハンス氏島細胞のグルコース応答性のインスリン分泌 ( G S I S ) を測定した。測定は培養液中のインスリンを E L I S A 法で測定することで行った。さらに、インスリン分泌誘導活性が認められた画分を質量分析装置 ( T O F - M A S ) で解析し、特異的に見られたピークの質量から予測された 1 9 個のアミノ酸配列を有する 3 種類のポリペプチド、すなわち、A L Y C M L I S I Q A L L K G P L M C ( ポリペプチド A : 配列番号 1 0 )、C N N R T G M F L S S L F S V I T V I ( ポリペプチド B : 配列番号 1 1 )、T S N D T M A S G W R A S S F H F D S ( ポリペプチド C : 配列番号 1 2 ) を化学合成した。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 3 】

続いて、これら3種類のポリペプチドA～CのそれぞれをKRBH緩衝液に10nMの濃度で溶解した溶液を、上記と同様の方法で30分間前培養したマウス膵臓ランゲルハンス氏島細胞に0.5mL/ウェル添加して30分間刺激を行い、上記と同様の方法でマウス膵臓ランゲルハンス氏島細胞のグルコース応答性のインスリン分泌を測定した。なお、インスリン値はマウス膵臓ランゲルハンス氏島細胞の総DNA量で正規化した。

## 【 0 0 6 4 】

その結果を図4に示す。図中、「Cont.」は、KRBH緩衝液のみを添加して刺激を行ったこと以外は上記と同様の方法で実験を行った場合の結果を示す。また、「hCF266(27V)」は、hCF266(27V)をトランスフェクトしたHEK293T細胞の培養上清とKRBH緩衝液との混合液(1:1(v/v))を添加して刺激を行ったこと以外は上記と同様の方法で実験を行った場合の結果を示す。また、「GLP-1」は、ヒトGLP-1(ペプチド研究所)をKRBH緩衝液に10nMの濃度で溶解した溶液を添加して刺激を行ったこと以外は上記と同様の方法で実験を行った場合の結果を示す。図4から明らかなように、3種類のポリペプチドA～Cは、マウス膵臓ランゲルハンス氏島細胞に対してグルコース応答性のインスリン分泌を誘導することが分かった。

10

## 【 0 0 6 5 】

<実施例4：1型糖尿病モデルSTZマウスに対するhCF266(27V)の作用>

実施例4では、hCF266(27V)を発現するアデノウイルスベクターを用いて、1型糖尿病モデルマウスであるSTZマウスに対するhCF266(27V)の作用を確認した。

20

## 【 0 0 6 6 】

まず、7週齢のC57BL/6マウス(体重約18～20g)を0日目から18時間絶食させた後、生理食塩水に溶解したストレプトゾシン(100mg/kg体重)を腹腔内投与し、すぐに自由摂食とした。さらに、翌日から18時間絶食し、2日目に再度同量のストレプトゾシンを腹腔内投与して、すぐに自由摂食とした。7日目に血清中の血糖値を測定し、空腹時血糖値が150mg/dL以上であるものを糖尿病と判定し、以後の実験に用いた。その同日に、糖尿病と判定されたSTZマウスに対して、CAGプロモーターにhCF266(27V)を連結して構築したアデノウイルスベクター(Invitrogenの商品名Virapowerを使用して作製)を、 $1 \times 10^9$  PFUの濃度で尾静脈から静脈内投与した。そして12日目に、経口糖負荷試験(OGTT)を行い、経時的に採血し、血清中の血糖値を測定した。

30

## 【 0 0 6 7 】

その結果を図5に示す。図中、「Ad(-)」は、外来遺伝子を組み込んでいないアデノウイルスベクターを用いた場合の結果を示す。また、「Ad GFP」は、hCF266(27V)の代わりにGFPをコードするDNAを連結して構築したアデノウイルスベクターを用いた場合の結果を示す。図5から明らかなように、1型糖尿病モデルマウスの体内でhCF266(27V)を発現させると、対照としてGFPを発現させた場合、あるいは何も発現させていない場合と比較して、血糖値は有意に低くなっていた。したがって、hCF266(27V)の発現は血糖値の上昇を抑えることが分かった。

40

## 【 0 0 6 8 】

次に、これらのSTZマウスの膵臓を摘出し、組織をパラホルムアルデヒドで固定した後、筑波大学組織標本作製室に依頼してパラフィン包埋切片を作製した。その切片を脱パラフィンした後、0.1% Triton X-100を用いて室温で30分間、抗原賦活化を行い、5%スキムミルクを用いて室温で1時間、ブロッキングを行った。ブロッキング後、ポリクローナル抗インスリン・モルモット抗体(Dacco)及びポリクローナル抗グルカゴン・ウサギ抗体(Dacco)を用いて4℃で一晩、1次抗体反応を行い、0.1% Tween 20含有トリス緩衝生理食塩水(TBST)で切片を洗浄した。さらに、ポリクローナルヒツジ抗モルモットIgG結合FITC抗体(Dacco)及びポリクローナルヤギ抗ウサギIgG結合Cy3抗体(Dacco)を用いて室温で1時間、暗室で2次抗体

50

反応を行い、T B S Tで切片を洗浄した。その後、蛍光退色防止剤（V E C T A S H I L D M o u n t i n g M e d i u m ; V e c t o r）でマウントし、蛍光顕微鏡（B Z - 8 0 0 0 ; K E Y E N C E）で観察して、細胞と細胞との面積比（細胞 / 細胞）を測定した。

【0069】

その結果を図6に示す。図6から明らかなように、1型糖尿病モデルマウスの体内でh C F 2 6 6（27V）を発現させると、対照としてG F Pを発現させた場合、あるいは何も発現させていない場合と比較して、細胞と細胞との面積比（細胞 / 細胞）は有意に上昇していた。したがって、h C F 2 6 6（27V）の発現は細胞の増加を促進することが分かった。

10

【0070】

<実施例5：トランスジェニックマウスにおけるm C F 2 6 6の作用>

実施例5では、トランスジェニックマウスにおけるm C F 2 6 6の作用を確認した。

【0071】

まず、C A Gプロモーターにm C F 2 6 6を連結して構築したm C F 2 6 6の発現ベクター（p C A G G S - m C F 2 6 6）を直鎖化し、筑波大学生命科学動物資源センターに依頼してトランスジェニックマウスを作製した。なお、導入遺伝子はP C R法及びサザンプロット法で確認し、C 5 7 B L / 6マウスと5世代交配を行った。

【0072】

次に、これらのトランスジェニックマウスの膵臓を摘出し、組織をパラホルムアルデヒドで固定した後、筑波大学組織標本作製室に依頼してパラフィン包埋切片を作製した。その切片を脱パラフィンした後、0.1% T r i t o n X - 1 0 0を用いて室温で30分間、抗原賦活化を行い、5%スキムミルクを用いて室温で1時間、ブロッキングを行った。ブロッキング後、ポリクローナル抗インスリン・モルモット抗体（D a c o）及びポリクローナル抗グルカゴン・ウサギ抗体（D a c o）を用いて4℃で一晩、1次抗体反応を行い、0.1% T w e e n 2 0含有トリス緩衝生理食塩水（T B S T）で切片を洗浄した。さらに、ポリクローナルヒツジ抗モルモットI g G結合F I T C抗体（D a c o）及びポリクローナルヤギ抗ウサギI g G結合C y 3抗体（D a c o）を用いて室温で1時間、暗室で2次抗体反応を行い、T B S Tで切片を洗浄した。その後、蛍光退色防止剤（V E C T A S H I L D M o u n t i n g M e d i u m ; V e c t o r）でマウントし、蛍光顕微鏡（B Z - 8 0 0 0 ; K E Y E N C E）で観察して、切片上の膵臓面積あたりのインスリンが染まるランゲルハンス氏島細胞の面積及び数を測定した。なお、ランゲルハンス氏島細胞の数は、野生型のマウスの場合が1となるように正規化した。

20

30

【0073】

その結果を図7に示す。図中、「W T」は、野生型のマウスを用いた場合の結果を示す。図7から明らかなように、ヘテロ型（+ / -）、ホモ型（+ / +）となるに従い、野生型と比べて細胞の面積（図中（a））、数（図中（b））が顕著に増えていた。したがって、m C F 2 6 6の発現は細胞の増加を促進することが分かった。

【0074】

<実施例6：h C F 2 6 6（27V）トランスフェクション細胞の培養上清に含まれるポリペプチドによる1型糖尿病モデルS T Zマウスに対する作用>

40

実施例6では、実施例3と同様にして化学合成したポリペプチドA～Cによる1型糖尿病モデルS T Zマウスに対する作用を確認した。

【0075】

まず、7週齢のC 5 7 B L / 6マウス（体重約18～20g）を0日目から18時間絶食させた後、生理食塩水に溶解したストレプトゾシン（100mg / kg体重）を腹腔内投与し、すぐに自由摂食とした。さらに、翌日から18時間絶食し、2日目に再度同量のストレプトゾシンを腹腔内投与して、すぐに自由摂食とした。7日目に血清中の血糖値を測定し、空腹時血糖値が150mg / d L以上であるものを糖尿病と判定し、以後の実験に用いた。糖尿病と判定されたS T Zマウスに対して、7日目から8週間に亘って、生理

50

食塩水に溶解したポリペプチドA～C(25nmol/kg体重)を1日2回、腹腔内投与し続けた。

【0076】

次に、これらのSTZマウスの膵臓を摘出し、組織をパラホルムアルデヒドで固定した後、筑波大学組織標本作製室に依頼してパラフィン包埋切片を作製した。その切片を脱パラフィンした後、0.1%TritonX-100を用いて室温で30分間、抗原賦活化を行い、5%スキムミルクを用いて室温で1時間、ブロッキングを行った。ブロッキング後、ポリクローナル抗インスリン・モルモット抗体(Dacco)及びポリクローナル抗グルカゴン・ウサギ抗体(Dacco)を用いて4℃で一晩、1次抗体反応を行い、0.1%Tween20含有トリス緩衝生理食塩水(TBST)で切片を洗浄した。さらに、ポリクローナルヒツジ抗モルモットIgG結合FITC抗体(Dacco)及びポリクローナルヤギ抗ウサギIgG結合Cy3抗体(Dacco)を用いて室温で1時間、暗室で2次抗体反応を行い、TBSTで切片を洗浄した。その後、蛍光退色防止剤(VECTASHIELD Mounting Medium; Vector)でマウントし、蛍光顕微鏡(BZ-8000; KEYENCE)で観察して、 $\beta$ 細胞と $\delta$ 細胞との面積比( $\beta$ 細胞/ $\delta$ 細胞)を測定した。

10

【0077】

その結果を図8に示す。図中、「Cont.」は、ポリペプチドA～Cを含まない生理食塩水を用いたこと以外は上記と同様の方法で実験を行った場合の結果を示す。図8から明らかなように、ポリペプチドA～Cを投与したマウスでは、 $\beta$ 細胞と $\delta$ 細胞との面積比( $\beta$ 細胞/ $\delta$ 細胞)は有意に上昇しており、その効果はとりわけポリペプチドAを投与した場合が優れていた。

20

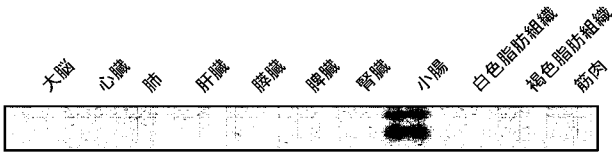
【産業上の利用可能性】

【0078】

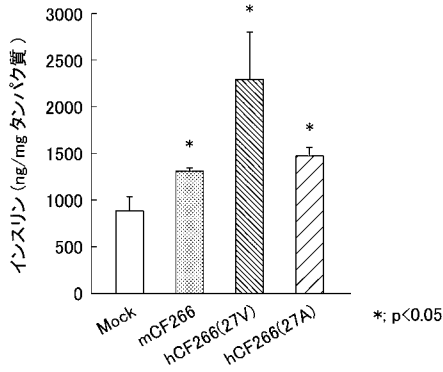
本発明は、糖尿病をはじめとする種々の疾患の治療に有効なインスリン分泌誘導剤、インスリン分泌誘導組成物及びその製造方法、膵臓細胞増加促進剤、膵臓細胞増加促進組成物及びその製造方法、並びに遺伝子治療用ウイルスベクターを提供することができる点において、産業上の利用可能性を有する。



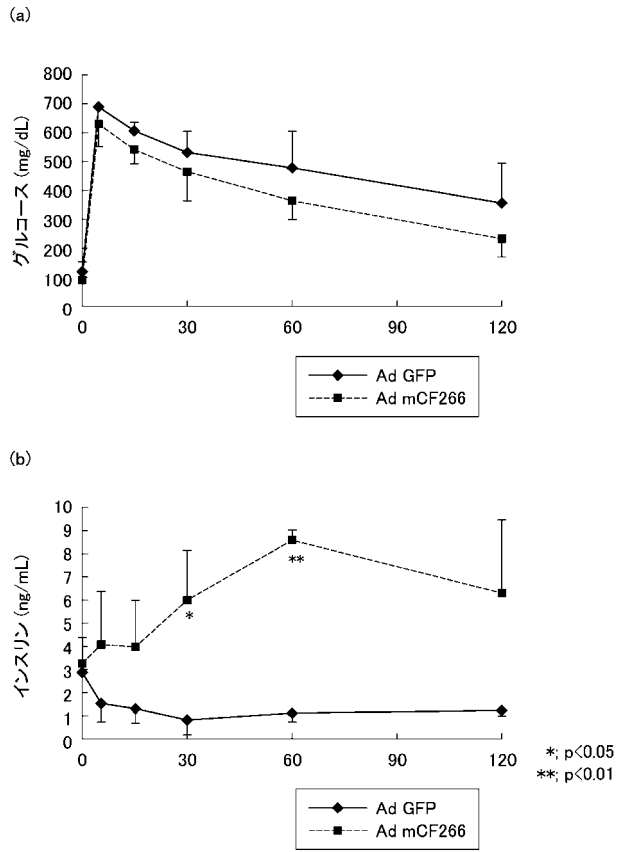
【 図 1 】



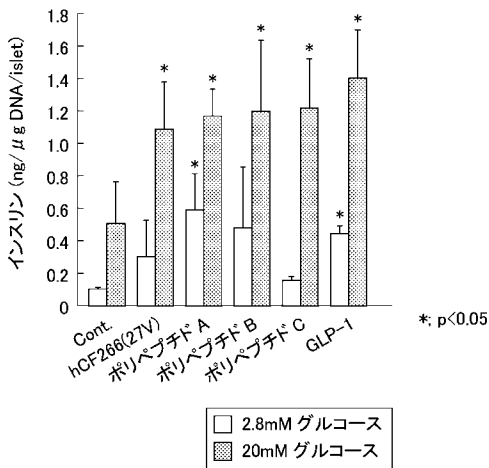
【 図 2 】



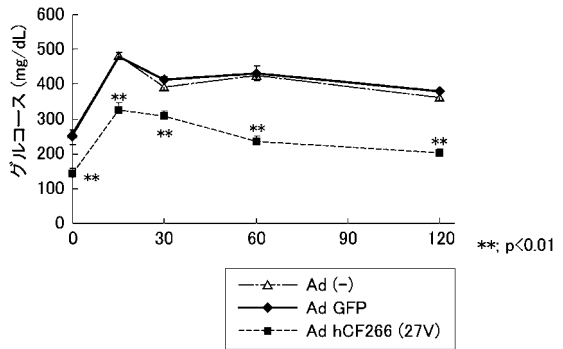
【 図 3 】



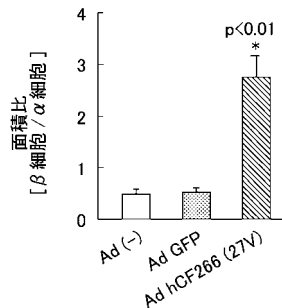
【 図 4 】



【 図 5 】

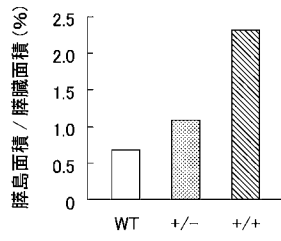


【 図 6 】

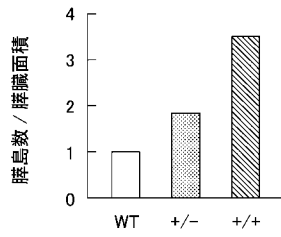


【 図 7 】

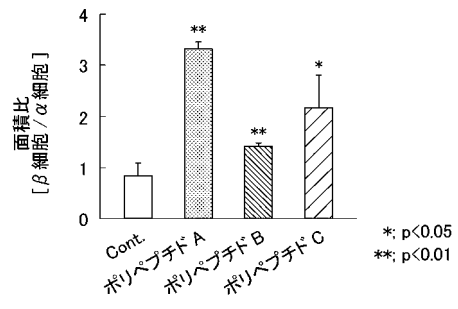
(a)



(b)



【 図 8 】



【 配列表 】

2009013794000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2007/064357
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> A61K38/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P5/48(2006.01)i, A61P5/50(2006.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K38/00, A61K48/00, A61P3/10, A61P5/48, A61P5/50  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2007 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, JMEDPlus (JDream2), JSTPlus (JDream2)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	Tomotaka YOKOO et al., "2-gata Tonyobyō ni okeru Shinki Chiryōyaku no Kaihatsu ni Kansuru Kenkyū", Choju Kagaku Sogo Kenkyū Suishin Jigyo Kenkyū Hokokushu, Heisei 17 Nendo, (2006 Nen), pages 361 to 364, refer to page 363 to 364 '(3)Seika'	1-11/12-22
X/A	Hideo TOYOSHIMA et al., "Shinki Shokakan Tokuiteki Bunpitsu Tanpaku Idenshi CF266 no Dotei to Kaiseki", Folia endocrinologica Japonica, 20 April, 2007 (20.04.07), Vol.83, No.1, page 103, refer to the summary described in the lowest part of the left column	1-11/12-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 02 August, 2007 (02.08.07)		Date of mailing of the international search report 14 August, 2007 (14.08.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/064357

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	Hideo TOYOSHIMA et al., "Insulin Bunpitsu Shigeki Sayo o Motsu Shinki Shokakan Tokuiteki Bunpitsu Tanpaku CF266 no Kino Kaiseki", The Journal of the Japan Diabetic Society, 25 April, 2007 (25.04.07), Vol.50 (Supplement 1), page S284, refer to the summary described in the lowest part of the left column	1-11/12-22
A	STRAUSBERG, R.L. et al, Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences, Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, Vol.99, No.26, p.16899-903 Website <a href="http://mgc.nci.nih.gov">http://mgc.nci.nih.gov</a> , refer to 'TM4SF20'	1-22

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 6 4 3 5 7	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K38/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P5/48(2006.01)i, A61P5/50(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K38/00, A61K48/00, A61P3/10, A61P5/48, A61P5/50			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2007年 日本国実用新案登録公報 1996-2007年 日本国登録実用新案公報 1994-2007年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS (STN), Caplus (STN), MEDLINE (STN), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, JMEDPlus (JDream2), JSTPlus (JDream2)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X/A	横尾友隆他、「2型糖尿病における新規治療薬の開発に関する研究」、長寿科学総合研究推進事業研究報告集 平成17年度、(2006年)、第361-364ページ 第363から第364ページ「③成果」参照	1-11/12-22	
X/A	豊島秀男他、「新規消化管特異的分泌タンパク遺伝子CF266の同定と解析」、日本内分泌学会雑誌、(2007年4月20日)、第83巻、第1号、第103ページ 左欄一番下の要約部分参照	1-11/12-22	
☞ C欄の続きにも文献が列挙されている。		☞ パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 02.08.2007		国際調査報告の発送日 14.08.2007	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 佐久 敬	4C 3037
		電話番号 03-3581-1101 内線	3452

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (2005年4月)

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2007/064357
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	豊島秀男他、「インスリン分泌刺激作用を持つ新規消化管特異的分泌タンパク CF266 の機能解析」、糖尿病、(2007年4月25日)、第50巻 (Supplement 1)、第 S284 ページ 左欄一番下の要約部分参照	1-11/12-22
A	STRAUSBERG, R.L. et al, Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences, Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, Vol.99, No.26, p.16899-903 ウェブサイト <a href="http://mgc.nci.nih.gov">http://mgc.nci.nih.gov</a> で「TM4SF20」参照	1-22

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
A 6 1 K 35/76 (2006.01) A 6 1 K 35/76

Fターム(参考) 4C084 AA01 AA02 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 BA44 CA53 NA14  
ZA702 ZC022 ZC352  
4C087 AA01 AA02 BC83 ZC03 ZC35 ZC41

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。