

(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2018-520212

(P2018-520212A)

(43) 公表日 平成30年7月26日(2018.7.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 C 0 8 6
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 7
A 6 1 P 1/14 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 65 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-515354 (P2018-515354)	(71) 出願人	517423431 オスペダーレ・サン・ラッファエーレ・エ ッセエッレエッレ
(86) (22) 出願日	平成28年6月6日 (2016.6.6)		イタリア・ミラノ・20132・ミラノ・ ヴィア・オルジェティナ・60
(85) 翻訳文提出日	平成30年2月2日 (2018.2.2)	(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/062790	(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(87) 国際公開番号	W02016/193496	(74) 代理人	100133400 弁理士 阿部 達彦
(87) 国際公開日	平成28年12月8日 (2016.12.8)		
(31) 優先権主張番号	15170679.3		
(32) 優先日	平成27年6月4日 (2015.6.4)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 IGFBP3及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、IGFBP3のインヒビター、並びに腸の疾患、特に糖尿病性腸疾患(diabetic enteropathy)又は炎症性腸疾患(inflammatory bowel disease)の治療及び/又は予防のためのその使用に関する。また、本発明は、IGFBP3、並びに腸の疾患、特に糖尿病性腸疾患又は炎症性腸疾患の診断、予測のためのその使用にも関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

腸の障害の治療及び/又は予防における使用のためのIGFBP3のインヒビター。

【請求項 2】

IGFBP3とその受容体TMEM219との相互作用を阻害若しくはブロックする、又はIGFBP3とIGF-1との相互作用を阻害若しくはブロックする、又はIGFBP3の機能を阻害若しくはブロックする、請求項1に記載のインヒビター。

【請求項 3】

a)ポリペプチド、

b)前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、或いはIGFBP3とその受容体TMEM219との相互作用を阻害若しくはブロックすることができる、又はIGFBP3とIGF-1との相互作用を阻害若しくはブロックすることができる、又はIGFBP3の発現及び/若しくは機能を阻害若しくはブロックすることができるポリヌクレオチド、

c)前記ポリヌクレオチドを含む又は発現するベクター、

d)前記ポリペプチド又は前記ポリヌクレオチドを発現する、遺伝子工学的に作出された宿主細胞、

e)小分子、

f)ペプチド、タンパク質、抗体、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、アンチセンス発現ベクター又は組換えウイルス、或いはIGFBP3とその受容体TMEM219との相互作用を阻害若しくはブロックすることができる、又はIGFBP3とIGF-1との相互作用を阻害若しくはブロックすることができる任意のその他の因子

からなる群から選択される、請求項1又は2に記載のインヒビター。

【請求項 4】

受容体TMEM219又はその断片である、請求項1から3のいずれか一項に記載のインヒビター。

【請求項 5】

TMEM219の断片が、TMEM219の細胞外ドメインを含む断片である、請求項4に記載のインヒビター。

【請求項 6】

ecto-TMEM219である、請求項4又は5に記載のインヒビター。

【請求項 7】

抗体であり、好ましくはIGFBP3遮断抗体であり、好ましくはTMEM219遮断抗体であり、好ましくはIGF-1遮断抗体である、請求項1から3のいずれか一項に記載のインヒビター。

【請求項 8】

前記腸の障害が、吸収障害症候群、過敏性腸疾患、炎症性腸疾患、セリアック病、悪液質、糖尿病性腸疾患からなる群から選択される、請求項1から7のいずれか一項に記載のインヒビター。

【請求項 9】

前記腸の障害が、糖尿病性腸疾患又は炎症性腸疾患である、請求項8に記載のインヒビター。

【請求項 10】

請求項1から9のいずれか一項に記載のインヒビター、及び薬学的に許容される担体を含む、腸の障害の治療及び/又は予防における使用のための医薬組成物。

【請求項 11】

治療剤を更に含み、前記治療剤が、好ましくは抗糖尿病剤、鎮痛剤、抗炎症剤、コルチコステロイド、免疫抑制治療、TNF-遮断薬、抗生物質、プロバイオティック、インテグリンインヒビター、下痢用の薬物、インスリン療法、アンジオテンシン変換酵素インヒビター、アンジオテンシンII受容体遮断薬、抗凝固及び抗血小板凝集剤、コレステロール降下薬、血圧降下剤、抗糖尿病剤、DPP-4インヒビター、GLP-1受容体作動薬、SGLT2イン

10

20

30

40

50

ヒビター、インテグリンインヒビター、又は腸の障害のための任意のその他の治療である、請求項10に記載の医薬組成物。

【請求項12】

前記治療剤が、アミノサリチル誘導体(メサラジン、スルファサラジン)、アゾチオプリン、メルカプトプリン、メトトレキサート、シクロスポリン、ミコフェノール酸モフェチル、ナタリズマブ、ベドリズマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブ、ゴリムマブ、メトロニダゾール、シプロフロキサシン、インスリン療法(任意の形態)、プラムリンチド、アスピリン、メトホルミン、スルホニルウレア剤(グリブリド、グリピジド及びグリメピリド)、メグリチニド、レパグリニド、ナテグリニド、チアゾリジンジオン(ロシグリタゾン及びピオグリタゾン)、シタグリブチン、サキサグリブチン、リナグリブチン、エキセナチド、リラグルチド、カナグリフロジン、ダパグリフロジンからなる群から選択される、請求項11に記載の医薬組成物。

10

【請求項13】

対象の腸の障害の診断のための方法であって、

a) 対象から得た生体試料中のタンパク質IGFBP3の量、又は前記タンパク質をコードするポリヌクレオチドの量を測定する工程、

b) タンパク質IGFBP3の測定した量、又は前記タンパク質をコードするポリヌクレオチドの測定した量を対照の量と比較する工程であって、前記測定した量が前記対照の量より高い場合は、前記対象は前記腸の障害を有すると診断される、工程を含む方法。

20

【請求項14】

IGFBP3の量が、抗体により測定される、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記生体試料が、血清、尿、細胞培養物上清からなる群から選択される、請求項13又は14に記載の方法。

【請求項16】

前記腸の障害が、吸収障害症候群、過敏性腸疾患、炎症性腸疾患、悪液質、糖尿病性腸疾患からなる群から選択される、請求項13から15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記腸の障害が、糖尿病性腸疾患又は炎症性腸疾患である、請求項16に記載の方法。

30

【請求項18】

タンパク質IGFBP3の量を測定する手段、及び/又は前記タンパク質をコードするポリヌクレオチドの量を測定する手段、及び任意選択で対照手段を含む、腸の障害の診断のためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、IGFBP3のインヒビター、並びに腸の疾患、特に糖尿病性腸疾患又は炎症性腸疾患の治療及び/又は予防のためのその使用に関する。

【0002】

また、本発明は、IGFBP3、並びに腸の疾患、特に糖尿病性腸疾患又は炎症性腸疾患の診断、予測のためのその使用にも関する。

40

【背景技術】

【0003】

胃不全麻痺、腹部膨満、過敏性腸症候群、及び便失禁からなる胃腸の障害は、1型糖尿病(T1D)の個体において一般的である(1993)。実際、遷延性T1Dを有する個体は、末期腎疾患(ESRD)を含むいくつかの糖尿病合併症に一般的に罹患するが(1993;Atkinsonら、2013;Fiorinaら、2001)、その最大80%が腸症状を示す。糖尿病性腸疾患(DE)として知られているこのような胃腸症状が存在すると、生活の質が有意に低下し(1993;Atkinsonら、2013;Camilleri、2007;Talleyら、2001)、またその病因もほとんど不明である(Feldman及びSchill

50

er、1983)。前臨床試験により、糖尿病の齧歯類において腸粘膜形態の顕著な乱れが明らかとなり(Domenechら、2011;Zhaoら、2003)、T1Dでは腸のホメオスタシスが変化し得ることが示唆される;但し、ヒトでは入手可能なデータはほとんど存在しない。腸上皮は、腸幹細胞(intestinal stem cell)及びそのニッチにより維持され、生理学的ストレス及び環境被害に反応する(Barker、2014;Medema及びVermeulen、2011)。大腸の陰窩基底部に位置し、マーカーの中でもとりわけエフリンB受容体2(EphB2)、ロイシンリッチ反復領域を含有するGタンパク質共役型レセプター5(leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5)(LGR5)、h-TERT、及びアルデヒドデヒドロゲナーゼ(Aldh)を発現する結腸幹細胞(CoSC)(Carlone及びBreault、2012;Carpentinoら、2009;Jungら、2011;Sato及びClevers、2013)は、局所的微環境と共にCoSCニッチを構成する(van der Flier及びClevers、2009;Zekiら、2011)。最近の試験では、腸のホメオスタシスの多くの特徴を取り戻し、また自己再生性の正常で大型の陰窩オルガノイドをin vitroで生成する条件、又はいわゆる「ミニ・ガット(mini-gut)」を確立した(Sato及びClevers、2013)。全身的因子、例えば循環性ホルモン等が、CoSCの制御に役立っているかどうかについてはまだ立証されていない(Stange及びClevers、2013)。

10

【0004】

胃腸の障害、特に糖尿病性腸疾患の治療には、下痢、腹痛、便秘、及び消化不良のための対処療法薬(symptomatic drug)及び緩和薬物治療が含まれる。糖尿病性腸疾患で利用可能な特別な療法は、今日まで存在しない。

【0005】

胃腸の障害、特に糖尿病性腸疾患の診断には、結腸内視鏡検査、胃内視鏡検査、肛門直腸内圧測定、食道内圧測定、及び糞便試料分析、末梢がんマーカー(すなわち、CEA、Ca 19.9、 α -フェトプロテイン、Ca125)、及びセリアックマーカー(celiac marker)の評価が含まれる。上記方法のいずれも、糖尿病性腸疾患について診断を提供する能力を有さない。

20

【0006】

国際公開第2011133886号及び同第2007024715号は、IGFBP3結合抗体型の治療複合物について開示する。

【0007】

国際公開第0187238号は、特に結腸がん治療用として治療上有効なTMEM219を含む、抗がん医薬組成物に関する。

30

【0008】

国際公開第2014089262号は、慢性炎症性(肥満)障害(特に、炎症性の腸疾患、例えばUC及びクローン病及び結腸がん等)に関する診断マーカーとしてのIGFBP3の使用について開示する。

【0009】

米国特許第6066464号は、紙である固体支持体上でIGFBP3を検出するための免疫測定法に関する。

【0010】

国際公開第2013152989号は、結腸直腸がんに関するバイオマーカーとしてのIGFBP3の使用に関する。

40

【0011】

国際公開第0153837号は、腫瘍マーカーの組み合わせ及びIGF軸(IGF axis)の少なくとも1つの成分を測定する工程を含む、疾患状態をモニタリング又は診断する方法について開示する。IGFBP3が、結腸腫瘍のマーカーとして提案される。

【0012】

したがって、胃腸障害、特に糖尿病性腸疾患の代替的治療及び診断法に対する必要性が存在する。

【先行技術文献】

【特許文献】

50

【 0 0 1 3 】

- 【特許文献1】国際公開第2011133886号
- 【特許文献2】国際公開第2007024715号
- 【特許文献3】国際公開第0187238号
- 【特許文献4】国際公開第2014089262号
- 【特許文献5】米国特許第6066464号
- 【特許文献6】国際公開第2013152989号
- 【特許文献7】国際公開第0153837号
- 【特許文献8】米国特許第3,773,919号
- 【非特許文献】

10

【 0 0 1 4 】

- 【非特許文献1】Remington's Pharmaceutical Sciences、第16版、Osol、A. 編(1980)
- 【非特許文献2】Remington's Pharmaceutical Sciences、第20版、2000、Marck Publishing Company社、Easton、Pennsylvaniaのパート5
- 【発明の概要】
- 【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 5 】

結腸上皮及び結腸幹細胞(CoSC)のホメオスタシスを制御するために、全身的要因が役立っているかどうか、なおも不明確なままである。本発明者らは、循環性の「ホルモン性」ダイアドが、CoSCを制御し、また遷延性1型糖尿病(T1D)において破壊され、糖尿病性腸疾患(DE)を引き起こすものと仮定する。遷延性T1Dを有する個体は、腸粘膜及びCoSCの異常を示し、*in vitro*でのミニ・ガットを生成することができなかった。血清プロテオミクスプロファイリングにより、高血糖が媒介するIGFBP3の肝臓放出量増加のエビデンスにより、遷延性T1Dの個体において、インスリン様増殖因子1(IGF-1)及びその結合タンパク質-3(IGFBP3)の循環レベルが変化していることが判明した。IGFBP3は、TMEM219依存性/カスパーゼ媒介型IGF-1非依存性の効果により、*in vitro*でのミニ・ガットの増殖を阻止し、また前臨床モデルでは、*in vivo*においてCoSCを破壊した。遷延性T1Dにおける腎臓移植による正常血糖修復、及び糖尿病マウスにおけるecto-TMEM219組換えタンパク質による治療では、IGF-1/IGFBP3の循環レベルが適切なレベルに修復することにより、CoSCが再構築された。末梢IGF-1/IGFBP3ダイアドは、CoSCを制御するが、またDEでは機能不全状態にある。

20

30

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 6 】

本明細書では、本発明者らは、遷延性T1D及びDEを有する個体では、CoSCが変化しており、またIGFBP3レベルの増加を示すことを実証する。DEの前臨床モデルにおいてIGFBP3を投与すると、循環性IGF-1が消失することにより、及びCoSCに対してTMEM219依存性/カスパーゼ媒介型の毒性効果を発揮することにより、CoSC再生特性、並びに*in vitro*及び*in vivo*での粘膜形態が変化する。更に、炎症性腸疾患を有する患者において、IGFBP3/IGF-1比に変化が見出された。IGFBP3受容体(TMEM219)の細胞外ドメインに基づく新規ecto-TMEM219組換えタンパク質を生成した。ecto-TMEM219は、末梢IGFBP3を消失させ、末梢IGFBP3がIGFBP3受容体であるTMEM219に結合するのを阻止する。したがって、そのようなecto-TMEM219組換えタンパク質を用いて、CoSC上で発現するIGFBP3を標的とすれば、*in vitro*及び*in vivo*でのIGFBP3の有害効果が抑制される。

40

【 0 0 1 7 】

腸の障害として、糖尿病性腸疾患、炎症性腸疾患、過敏性腸疾患、及びセリアック病が挙げられる。

【 0 0 1 8 】

糖尿病性腸疾患を有する個体において報告された症状は、その他の腸の障害で報告された症状と類似しており、したがって様々な結腸直腸疾患における腸幹細胞(ISC)の役割がいくつかの研究において調査されてきた(下記のTable 1-A(表1))。

【 0 0 1 9 】

50

【表 1】

Table I-A (表1) :腸幹細胞(ISC)及び胃腸障害

GI障害のタイプ	ISCの役割	主要な所見	参考資料
炎症性腸疾患(IBD)	ISC分化の欠陥	パネート細胞及びゴブレット細胞の発生障害が抗菌性粘膜バリアの欠陥を引き起こす	1,2
セリアック病(CD)	ISCの枯渇	ISCは粘膜の治癒及び臨床的寛解に有利に働く；ISCのシグナリング変化及びISCの欠乏はCDに有利に働く	3,4
ヘリコバクター・ピロリ(HP)胃炎	ISCの操作、ISCのコロニー形成	HPはコロニーを形成し、そして胃ISCの代謝回転を変化させ、腺肥大に有利に働く	5
前がん状態(腺腫、慢性潰瘍性大腸炎、ポリポシス)	過剰なISC集団	前がん状態では、ISCの分化及び代謝回転が抑制されており、ISC数の増加を引き起こす	6
糖尿病性腸疾患(DE)	ISCの枯渇 ISCの破綻	IGFBP3は、DEにおけるISCアポトーシスを媒介する	7

略号: GI、胃腸の；ISC、腸幹細胞；IBD、炎症性腸疾患；CC、結腸直腸がん；CD、セリアック病；HP、ヘリコバクター・ピロリ(*Helicobacter pylori*)；DE、糖尿病性腸疾患。

参考資料: 1. Gersemann Mら、2011年；17:3198~203頁；2. Schonhoff SEら、2004年；3. Piscaglia ACら、2015年；4. Senger Sら、2015年；5. Bartfeld Sら、2015年；6. Boman BMら、2008年；7. D'Addio Fら、2015年。

【0020】

ISC制御、並びに陰窩及び上皮の自己再生特性における変化は、IBD¹⁰、結腸前がん状態¹¹、及び結腸直腸がん⁴で記載されている。最近、ISCが、活動性のセリアック病(CD)で枯渇している可能性があり、したがって絨毛の消失を説明し得る腸上皮コンパートメント(intestinal epithelial compartment)の再生障害を引き起こす可能性があることも示唆された⁵。IGFBP3が、IGFBP3受容体であるTMEM219との結合を通じて、結腸陰窩に所在するISCの特定のサブセットである結腸幹細胞(CoSC)を標的とすること、したがって糖尿病性腸疾患の発現を媒介することが実証されていることを考慮すれば、この有害な効果は、上記したようなその他の腸の障害においてもCoSCに対して発揮され得る、ということが論じられる。したがって、TMEM219/IGFBP3軸(TMEM219/IGFBP3 axis)の阻害は、ISC又はCoSCの異常調節に由来し得るあらゆる腸の障害において、IGFBP3が媒介する有害な効果からCoSC及びISCを保護する戦略となり得る。

【0021】

したがって、本発明は、腸の障害の治療及び/又は予防における使用のためのIGFBP3のインヒビターを提供する。

【0022】

好ましくは、インヒビターは、IGFBP3/TMEM219軸(IGFBP3/TMEM219 axis)のインヒビターである。

【0023】

好ましくは、前記インヒビターは、IGFBP3とその受容体TMEM219(IGFBP3受容体とも呼ば

10

20

30

40

50

れる)との相互作用を阻害若しくはブロックする、又は前記インヒビターは、IGFBP3とIGF-1との相互作用を阻害若しくはブロックする、又は前記インヒビターは、IGFBP3の機能を阻害若しくはブロックする。

【0024】

好ましくは、前記インヒビターは、

a)ポリペプチド、

b)前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、或いはIGFBP3とその受容体TMEM219との相互作用を阻害若しくはブロックすることができる、又はIGFBP3とIGF-1との相互作用を阻害若しくはブロックすることができる、又はIGFBP3の発現及び/若しくは機能を阻害若しくはブロックすることができるポリヌクレオチド、

c)前記ポリヌクレオチドを含む又は発現するベクター、

d)前記ポリペプチド又は前記ポリヌクレオチドを発現する、遺伝子工学的に作出された宿主細胞、

e)小分子、

f)ペプチド、タンパク質、抗体、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、アンチセンス発現ベクター又は組換えウイルス、或いはIGFBP3とその受容体TMEM219との相互作用を阻害若しくはブロックすることができる、又はIGFBP3とIGF-1との相互作用を阻害若しくはブロックすることができる、又はIGFBP3の発現及び/若しくは機能を阻害若しくはブロックすることができる任意のその他の因子

からなる群から選択される。

【0025】

なおも好ましくは、前記インヒビターは、受容体TMEM219又はその断片である。好ましくは、TMEM219の断片は、TMEM219の細胞外ドメインの断片である。

【0026】

好ましい実施形態では、インヒビターは、ecto-TMEM219である。

【0027】

インヒビターは、IGFBP3を含む融合タンパク質であり得る。

【0028】

好ましい実施形態では、インヒビターは、抗体であり、好ましくはIGFBP3遮断抗体であり、好ましくはTMEM219遮断抗体であり、好ましくはIGF-1遮断抗体である。

【0029】

好ましい実施形態では、腸の障害は、吸収障害症候群、セリアック病、過敏性腸症候群、炎症性腸疾患、悪液質、糖尿病性腸疾患からなる群から選択される。

【0030】

好ましくは、腸の障害は、糖尿病性腸疾患又は炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎及びクローン病)である。好ましくは、腸の障害は、セリアック病である。

【0031】

炎症性腸疾患(IBD)は、消化管の全部又は一部の慢性炎症と関係する。IBDとして、主に潰瘍性大腸炎及びクローン病が挙げられる。両者は、通常、重度の下痢、疼痛、疲労、及び体重減少と関係する。IBDは、衰弱性であり得、時に生命を脅かす合併症を引き起こす。潰瘍性大腸炎は、大腸(結腸)及び直腸の最内側表層に長期持続性の炎症及び糜爛(潰瘍)を引き起こす炎症性腸疾患である。クローン病は、消化管表層の炎症を引き起こすIBDである。クローン病では、炎症は、多くの場合、患部組織の深部まで弥漫する。炎症は、消化管の異なる部位、すなわち、大腸、小腸、又はその両方と関係し得る。

【0032】

セリアック病はグルテン過敏性腸疾患としても知られており、摂取されたグリアジンに対する免疫媒介性の炎症反応により引き起こされた上部消化器の慢性疾患である。グリアジンは、穀物、例えばコムギ、ライムギ、及びオオムギ等に見出されるタンパク質であるグルテンの成分である。そのような炎症反応は、腸粘膜に損傷を与え、消化不良及び吸収障害を引き起こす。更なる態様では、本発明は、上記で定義したようなインヒビター、及び

10

20

30

40

50

薬学的に許容される担体を含む、腸の障害の治療及び/又は予防における使用のための医薬組成物を提供する。

【0033】

更なる態様では、本発明は、対象の腸の障害の診断のための方法であって、

a)対象から得た生体試料中のタンパク質IGFBP3の量、又は前記タンパク質をコードするポリヌクレオチドの量を測定する工程、

b)タンパク質IGFBP3の測定した量、又は前記タンパク質をコードするポリヌクレオチドの測定した量を対照の量と比較する工程であって、前記測定した量が前記対照の量より高い場合は、前記対象は腸の障害を有すると診断される、工程、を含む方法を提供する。

10

【0034】

好ましくは、IGFBP3の量は、抗体により測定される。

【0035】

好ましくは、生体試料は、血清、尿、細胞培養物上清からなる群から選択される。

【0036】

なおも好ましくは、腸の障害は、吸収障害症候群、過敏性腸疾患、炎症性腸疾患、悪液質、糖尿病性腸疾患からなる群から選択される。

【0037】

いっそう好ましくは、腸の障害は、糖尿病性腸疾患である。

【0038】

更なる態様では、本発明は、タンパク質IGFBP3の量を測定する手段、及び/又は前記タンパク質をコードするポリヌクレオチドの量を測定する手段、及び任意選択で対照手段を含む、腸の障害の診断のためのキットを提供する。上記診断方法は、対象を治療する工程も含み得るが、特に治療は、本発明で定義するようなIGFBP3のインヒビター、又は腸の障害用の既存の治療、例えば抗炎症剤(例えば、メサラジン、スルファサラジン等のアミノサリチル誘導体)、コルチコステロイド、免疫抑制治療(アゾチオプリン、メルカプトプリン、メトトレキサート、シクロスポリン、ミコフェノール酸モフェチル、ナタリズマブ、ベドリズマブ)、TNF- α 遮断薬(インフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブ、ゴリムマブ)、抗生物質(例えば、メトロニダゾール及びシプロフロキサシン)、プロバイオティクス、インテグリンインヒビター等であり得る。

20

30

【0039】

本発明では、腸の障害は、胃腸障害、吸収障害症候群、糖尿病性腸疾患、悪液質、セリアック病、過敏性腸症候群、及び炎症性腸疾患を含む。本発明において、腸の障害には結腸直腸がんは含まれない。

【0040】

本発明では、「IGFBP3の機能を阻害又はブロックする」とは、CoSC及び結腸陰窩に対するIGFBP3のアポトーシス促進効果を停止させるために、循環性IGFBP3を消失させること、及び循環性IGFBP3がIGFBP3受容体であるTMEM219に結合するのを阻止することを意味する。そのような阻害又はブロックは、IGFBP3を含む融合タンパク質により達成され得る。IGFBP3の発現は、組織及び細胞上でのRT-PCR、組織及び細胞上でのウェスタンブロット、組織上での免疫組織化学の各手段により測定され得る。生体液中のIGFBP3レベルは、免疫標的式アッセイ及びプロテオーム分析により測定可能である。

40

【0041】

IGFBP3の機能は、RT-PCR、マイクロアレイを使用して、標的細胞上でのカスパーゼ8及び9の発現を検出する手段により、汎カスパーゼインヒビター、カスパーゼ8及び9インヒビターと共に標的細胞/構造を同時培養し、生存細胞/構造を測定することにより測定され得る。

【0042】

本発明では、「IGFBP3とIGF-1との相互作用を阻害又はブロックする」とは、遊離IGFBP3が遊離IGF-1に結合するのを阻止するために、遊離IGFBP3を循環から除去することを意味

50

する。

【0043】

IGFBP3とIGF-1との相互作用は、循環内のIGF-I遊離レベル及び/又は循環内のIGFBP3レベルを評価する手段により測定され得る。

【0044】

本発明では、「IGFBP3とその受容体TMEM219との相互作用を阻害又はブロックする」とは、循環性IGFBP3を消失させること、及び循環性IGFBP3がCoSC上で発現するTMEM219受容体に結合するのを阻止することを意味する。IGFBP3-TMEM219結合は、IGFBP3遮断抗体の使用によっても阻止できる。更に、TMEM219遮断抗体はTMEM219受容体に結合し、したがってIGFBP3が循環から出現したときに、受容体の利用を不可能にする。

10

【0045】

本発明では、IGFBP3/TMEM219軸(IGFBP3/TMEM219 axis)を阻害することとは、例えば循環からIGFBP3を消失させることにより、IGFBP3のTMEM219への結合をブロックすることを意味するが、またTMEM219のIGFBP3結合部位をブロックすること、TMEM219上のIGFBP3結合部位をブロックすることも意味する。そのようなブロックは、TMEM219の機能及び/又は発現及び/又はシグナリングを阻害することを更に意味し、これは、例えば特にsiRNA又はオリゴヌクレオチドを用いてTMEM219の発現を停止させることにより実現し得る。また、IGFBP3の機能及び/又は発現を阻害することも意味する。

【0046】

本発明によれば、TMEM219に結合するIGFBP3のインヒビターは、下記の分子のうちの1つであり得る：

20

- ・循環性IGFBP3を中和する可溶性Ecto-TMEM219(TMEM219の細胞外部分)；
- ・TMEM219ペプチド又はその細胞外部分に直接結合した免疫グロブリンFcドメインから構成され、循環性IGFBP3を消失させ、循環性IGFBP3が細胞上で発現するTMEM219に結合するのを阻止する、Fcに基づく融合タンパク質である融合タンパク質TMEM219-Ig；
- ・TMEM219結合部位を選択的にブロックする抗IGFBP3抗体；
- ・TMEM219受容体のIGFBP3結合部位を占有し、したがってIGFBP3の結合を阻止する抗TMEM219抗体(IGFBP3に対して拮抗的活性を有する)
- ・IGFBP3 mRNAに対して相補的なオリゴヌクレオチド。

【0047】

本発明のインヒビターは、受容体TMEM219(MGNQCAGHNLHLCLAHHPPLVCATLILLLLGLSGLGLGSFLLTHRTGLRSPDIPQDWVSFLRSFGQLTLCPRNGTVTGKWRGSHVVGLLTTLNFGDGPDRNKTRTFQATVLSQMGLKGS SAGQLVLI TARVTTERTAGTCLYFSAVPGILPSSQPPISCSSEEGAGNATLSPRMGEECVSVWSHEGLVLTKLLTSEELALCGSRLLVLGSLFLLFCGLLCCVTAMCFHPRRESHWSRTRL、配列番号1)又はその断片であり得る。

30

【0048】

特に、TMEM219の断片は、例えばIGFBP3がTMEM219に接近する、及び/又はそれに結合することをブロックする/阻止するように設計され、より小型の分子量を有し、ジスルフィド架橋を形成する5つのシステイン及び球形構造を含む。好ましくは、断片は、少なくともアミノ酸50個分の長さ、好ましくはアミノ酸100個分の長さ、なおも好ましくはアミノ酸120個分の長さ、いっそう好ましくはアミノ酸150個分の長さ、好ましくは少なくともアミノ酸160個分の長さである。

40

【0049】

好ましい実施形態では、断片は、少なくともアミノ酸162、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235個分の長さである。好ましくは、断片は、TMEM219の配列と少なくとも65%の同一性、好ましくはTMEM219の配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、又は99%の同一性を有する。

【0050】

好ましくは、TMEM219の断片は、TMEM219の細胞外ドメインの断片であり、特に断片は、配列：

THRTGLRSPDIPQDWVSFLRSFGQLTLCPRNGTVTGKWRGSHVVGLLTTLNFGDGPDRNKTRTFQATVLSQMGLKGS

50

GQLVLI TARVTTERTAGTCLYFSAVPGILPSSQPPISCSEEGAGNATLSPRMGEECVSVWSHEGLVLTKLLTSEELALCGSR (配列番号2)

を含む。

【0051】

好ましくは、TMEM219の断片は、TMEM219の細胞外ドメインであり、特に断片は、配列：SFLLTHRTGLRSPDIPQDWVSFLRSFGQLTLCPRNGTVTGKWRGSHVVGLLTTLNFGDGPDRNKTRTFQATVLSQMGLKGSSAGQLVLI TARVTTERTAGTCLYFSAVPGILPSSQPPISCSEEGAGNATLSPRMGEECVSVWSHEGLVLTKLLTSEELALCGSR (配列番号3)

を含む。

【0052】

好ましくは、TMEM219の断片は、THRTGLRSPDIPQDWVSFLRSFGQLTLCPRNGTVTGKWRGSHVVGLLTTLNFGDGPDRNKTRTFQATVLSQMGLKGSSAGQLVLI TARVTTERTAGTCLYFSAVPGILPSSQPPISCSEEGAGNATLSPRMGEECVSVWSHEGLVLTKLLTSEELALCGSR (配列番号2)

からなる。

【0053】

好ましくは、TMEM219の断片は、SFLLTHRTGLRSPDIPQDWVSFLRSFGQLTLCPRNGTVTGKWRGSHVVGLLTTLNFGDGPDRNKTRTFQATVLSQMGLKGSSAGQLVLI TARVTTERTAGTCLYFSAVPGILPSSQPPISCSEEGAGNATLSPRMGEECVSVWSHEGLVLTKLLTSEELALCGSR (配列番号3)

からなる。

【0054】

本発明では、TMEM219は、好ましくは真核生物TMEM219、好ましくは哺乳動物TMEM219、なお好ましくはヒトTMEM219である。

【0055】

IGFBP3とTMEM219との相互作用は、標的細胞に対するIGFBP3の効果を間接的に評価する手段(RT-PCRによるカスパーゼ8及び9発現の増加)、液相又は固相リガンド結合アッセイ(すなわち、免疫沈降法、RT-PCR、免疫測定法)、及び非放射性リガンド結合アッセイを用いて、IGFBP3-IGFBP3受容体(TMEM219)結合を直接評価する手段により測定され得る。

【0056】

本発明では、「遷延性T1D」とは、糖尿病合併症の発症と関連して、15年より長い1型糖尿病の病歴を意味する。

【0057】

本発明の好ましい態様では、インヒビターは、抗体、又はその合成若しくは組換え誘導体である。前記抗体は、好ましくはモノクローナル若しくはポリクローナル抗体、又はその合成若しくは組換え誘導体であり、より好ましくは、前記抗体は、ヒト化モノクローナル抗体である。

【0058】

好ましくは、前記ポリヌクレオチドは、RNA又はDNAであり、好ましくはsiRNA、shRNA、マイクロRNA、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0059】

好ましい実施形態では、上記ベクターは、プラスミド、ウイルス粒子、及びファージからなる群から選択される発現ベクターである。

【0060】

好ましくは、前記宿主細胞は、細菌細胞、真菌細胞、昆虫細胞、動物細胞、植物細胞からなる群から選択されるが、好ましくは動物細胞、より好ましくはヒト細胞である。

【0061】

好ましい実施形態では、これまでに定義したインヒビターは、(a)少なくとも1つの治療剤と併用され、(b)併用物又は併用調製物を定義する。治療剤は、抗糖尿病剤、鎮痛剤、下痢用の薬物、又は腸の障害、特に糖尿病性腸疾患用の任意のその他の治療であり得る。

10

20

30

40

50

治療剤の例として、任意の形態のインスリン療法; プラムリンチド; アンジオテンシン変換酵素インヒビター又はアンジオテンシンII受容体遮断薬(ARB); アスピリン、抗凝固及び抗血小板凝集剤; コレステロール降下薬; その他の血圧降下剤; メトホルミン等の経口抗糖尿病剤、スルホニルウレア剤(グリブリド、グリピジド及びグリメピリド)、メグリチニド(レパグリニド及びナテグリニド)、チアゾリジンジオン(ロシグリタゾン及びピオグリタゾン)、DPP-4インヒビター(シタグリブチン、サキサグリブチン及びリナグリブチン)、GLP-1受容体作動薬(エキセナチド及びリラグルチド)、SGLT2インヒビター(例えば、カナグリフロジン及びダパグリフロジン); 抗炎症剤(例えば、メサラジン、スルファサラジン等のアミノサリチル誘導体); コルチコステロイド; 免疫抑制治療(アゾチオプリン、メルカプトプリン、メトトレキサート、シクロスポリン、ミコフェノール酸モフェチル)インテグリンインヒビター(ナタリズマブ、ベドリズマブ); TNF- α 遮断薬(インフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブ、ゴリムマブ)、抗生物質(例えば、メトロニダゾール及びシプロフロキサシン); プロバイオティクスが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0062】

用語「併用物」及び「併用調製物」は、本明細書で使用される場合、これまでに定義したような併用パートナー(a)及び(b)は独立に、又は併用パートナー(a)及び(b)の量が異なる、異なる固定された組み合わせの使用により、すなわち同時に又は異なる時点において投与され得るという観点から、「キット部品」をも定義する。キット部品の一部は、次に、例えばキット部品の任意の一部について、同時又は時系列的に交互に、すなわち異なる時点において、及び等しい又は異なる時間間隔を置いて投与可能である。併用調製物において投与される、併用パートナー(a)の併用パートナー(b)に対する総量の比は、例えば、治療の対象となる患者部分集団のニーズ又は単一のニーズに対処するために変化し得る。

【0063】

併用療法は、腸の疾患の治療において予期せぬ改善をもたらす可能性がある。同時投与、連続投与、又は個別投与の場合、インヒビターと他方の治療剤が相乗的に相互作用して腸の疾患を抑える可能性がある。この予期せぬ相乗作用は、各化合物の必要用量の低下を可能にし、副作用の低下並びに化合物及び治療の臨床的有効性の増強をもたらす。1つ又は複数の成分の間の相乗的な相互作用を判断する場合、最適な効果の範囲及び効果に要する各成分の絶対的な用量範囲は、治療を必要とする患者に対して異なるw/w比の範囲及び異なる用量において成分を投与することにより確定的に測定され得る。ヒトでは、患者に対して臨床試験を実施する際の複雑性及びコストにより、相乗作用に関する一次モデルとしてこの形態の試験を利用することは非実用的なものとなる。しかし、1つの種において相乗作用が観察されれば、その他の種における効果についても予測可能であり、また相乗的効果を測定するための本明細書に記載するような動物モデルが存在し、そのような試験の結果は、薬物動態/薬力学的方法を適用することにより、その他の種で必要とされる有効用量、及び血漿濃度比の範囲、及び絶対用量、及び血漿濃度を予測するためにも利用可能である。腸の疾患モデルとヒトに見られた効果との間の立証された相関により、動物の相乗作用は、例えば、下記の実施例に記載するようなモデルにおいて実証され得ることが示唆される。

【0064】

上記医薬組成物は、好ましくは全身、口腔、局所的、好ましくは経直腸投与、又は局所的投与用である。

【0065】

対照手段は、これまでに定義したような化合物の量又は増加量をふさわしい対照と比較するのに利用可能である。ふさわしい対照は、例えば、正常な対象又は正常な集団に由来する既知の標準を参照して取得され得る。

【0066】

これまでに定義したような、少なくとも1つの化合物の量を測定する手段は、好ましくは少なくとも1つの抗体、その機能的類似体又は誘導体である。前記抗体、その機能的類似体又は誘導体は、前記化合物に対して特異的である。

【0067】

好ましい実施形態では、本発明のキットは、
-前記化合物に対して特異的な固相接着型の抗体と、
-リガンド特異的バイオマーカー複合体からなる検出手段と、
を含む。

【0068】

本発明によるキットは、通常の助剤、例えばバッファー、担体、マーカー等、及び/又は使用説明書を更に含み得る。

【0069】

ふさわしい対照は、健康な患者又は腸の疾患以外の障害に罹患した患者から採取された試料であり得る。

10

【0070】

腸の疾患の進行をモニターする方法又はキットの場合、疾患の進行がモニターされ、またふさわしい対照は、同一の対象から様々な時点において採取された、又は別の患者から採取された試料であり得、ふさわしい対照の量は、同一の対象から様々な時点において採取された、又は別の患者から採取された試料中で測定された同一のタンパク質又はポリヌクレオチドの量であり得る。

【0071】

治療的処置の有効性をモニターする方法又はキットの場合、ふさわしい対照は、療法開始前に同一の対象から採取された試料、又は療法の過程で様々な時点において採取された試料であり得、適正な対照の量は、療法開始前に同一の対象から採取された試料、又は療法の過程で様々な時点において採取された試料中で測定された、同一のタンパク質又はポリヌクレオチドの量であり得る。

20

【0072】

本発明では、「量を測定する」という表現は、各タンパク質及び/又はそのmRNA及び/又はそのDNAの量又は濃度又はレベルを測定すること、好ましくは半定量的又は定量的測定を意図し得る。タンパク質の測定は直接的又は間接的に実施可能である。直接的な測定は、タンパク質から直接得られ、また試料中に存在するタンパク質分子の数と直接関連付けられるシグナルに基づくバイオマーカーの量又は濃度の指標を意味する。強度シグナルと呼ばれることもあるこのシグナルは、例えば、バイオマーカーの化学的又は物理的特性の強度値を測定することにより取得可能である。間接的な測定には、二次成分(例えば、遺伝子発現産物とは異なる成分)から得られる測定、及び生物学的測定システム(例えば、細胞の応答、リガンド、「タグ」、又は酵素的反応生成物の測定)が含まれる。

30

【0073】

用語「量」とは、本説明で使用する場合、タンパク質及び/又はそのmRNA及び/又はそのDNAの絶対的又は相対的な量、及びそれと関連した、又はそれに起因し得る任意のその他の数値若しくはパラメーターを指すが、但しこれらに限定されない。そのような数値又はパラメーターは、直接測定により取得されるタンパク質の物理的又は化学的特性から得られるシグナルの強度値、例えば免疫測定法、質量分析法、又は核磁気共鳴法における強度値を含む。更に、これらの数値又はパラメーターには、間接測定、例えば本明細書に記載する測定システムのいずれかにより取得されたものが含まれる。試料中のmRNA及びDNAを測定する方法は、当技術分野において公知である。核酸レベルを測定するために、試験試料中の細胞は溶解され得、ライセート内の、又はライセートから精製若しくは半精製されたRNA内のmRNAレベルは、当業者にとってなじみ深い任意の多様な方法により測定可能である。そのような方法として、検出可能に標識されたDNA若しくはRNAプローブを使用するハイブリダイゼーションアッセイ(すなわち、ノーザンブロッティング)、又は該当するオリゴヌクレオチドプライマーを使用する定量的又は半定量的RT-PCR法が挙げられる。或いは、定量的又は半定量的in situハイブリダイゼーションアッセイが、例えば組織切片、又は未溶解の細胞懸濁物、及び検出可能に標識された(例えば、蛍光又は酵素標識された)DNA又はRNAプローブを使用して実施可能である。mRNAを定量する更なる方法として、RNA

40

50

保護アッセイ(RPA)、cDNA及びオリゴヌクレオチドマイクロアレイ、代表差異分析(representation difference analysis)(RDA)、ディファレンシャルディスプレイ、EST配列分析、及び遺伝子発現のシリアル分析(SAGE)が挙げられる。

【0074】

タンパク質IGFBP3の測定した量、又は前記タンパク質をコードするポリヌクレオチドの測定した量と、対照試料から得られた量との比較により、対象から単離された試料中の前記化合物の量が、より高い数値に対応する場合、該対象は、疾患を呈する、又は前記疾患が増悪するおそれがある。

【0075】

タンパク質IGFBP3の測定した量、又は前記タンパク質をコードするポリヌクレオチドの測定した量と対照試料から得られた量との比較により、対象から単離された試料中の前記化合物の量が、類似した数値又は低い数値に対応する場合には、該対象は、疾患に罹患していない、又は疾患が改善する可能性がそれぞれある。

【0076】

或いは、「検出」又は「量を測定すること」という表現には、分子の変化を測定することが意図されている。前記変化は、これまでに定義したような化合物の量の増加又は減少を反映し得る。タンパク質IGFBP3又は前記タンパク質をコードするポリヌクレオチドの増加は、疾患の増悪と相関し得る。タンパク質IGFBP3又は前記タンパク質をコードするポリヌクレオチドの減少は、疾患の改善又は対象の回復と相関し得る。

【0077】

「タンパク質IGFBP3」又は「IGFBP3」又は「TMEM219」という表現には、IGFBP3又はTMMのオーソログ若しくはホモログな遺伝子、その機能的突然変異体、機能的誘導体、機能的断片若しくは類似体、アイソフォームからエンコードされた対応するタンパク質も含まれるように意図されている。

【0078】

「遺伝子IGFBP3」又は「IGFBP3」又は「遺伝子TMEM219」又は「TMEM219」という表現には、対応するオーソログ若しくはホモログな遺伝子、その機能的突然変異体、機能的誘導体、機能的断片若しくは類似体、アイソフォームも含まれるように意図されている。

【0079】

本発明では、タンパク質の「機能的突然変異体」は、その配列内で1つ又は複数のアミノ酸を突然変異させることにより生成可能であり、且つ腸の疾患を治療するためにタンパク質の活性を維持する突然変異体である。実際、本発明のタンパク質は、必要であれば、例えばグリコシル化、ミリスチル化、アミド化、カルボキシル化、又はリン酸化により、*in vitro*及び/又は*in vivo*で修飾され得、並びに、例えば、当技術分野において公知の合成又は組換え技術により取得され得る。本発明のタンパク質、「IGFBP3」又は「TMEM219」は、当技術分野において公知の方法により、そのバイオアベイラビリティ又は半減期が増加するように修飾され得る。例えば、タンパク質は、ポリマーに結合し得る、ペグ化等され得る。

【0080】

本発明では、有効成分は、コロイド状の薬物送達システム(例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、及びナノカプセル)、又はマイクロエマルジョンにおいて、例えばコアセルベーション技術又は界面重合により調製したマイクロカプセル中、例えばヒドロキシメチルセルロース若しくはゼラチンマイクロカプセル、及びポリ(メチルメタクリレート)マイクロカプセル中にそれぞれ捕捉される場合もある。そのような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences、第16版、Osol, A. 編(1980)に開示されている。

【0081】

*in vivo*投与で使用される製剤は、無菌の状態でなければならない。これは滅菌濾過メンブレンを経由する濾過により容易に実現する。

【0082】

10

20

30

40

50

徐放性調製物が調製可能である。徐放性調製物の適当な例として、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透過性マトリックスが挙げられ、同マトリックスは成形品の形態、例えばフィルム、又はマイクロカプセルである。徐放性マトリックスの例として、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、又はポリ(ビニルアルコール))、ポリラクチド(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸及び[]エチル-L-グルタミン酸のコポリマー、非分解性のエチレン酢酸ビニル、分解性の乳酸-グリコール酸コポリマー、例えば乳酸-グリコール酸コポリマーと、ロイプロリドアセテートと、ポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸とから構成される注入型マイクロスフェア等が挙げられる。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸等のポリマーは、100日間にわたり分子の放出を可能にするが、特定のヒドロゲルは、タンパク質をより短期間放出する。カプセル化抗体が長期間身体内に留まる場合、抗体は、37 で湿気に曝露した結果、変性又は凝集する可能性があり、その結果生物活性が失われ、また免疫原性が変化するおそれがある。関係する機構に応じて安定化させるために、合理的な戦略が考案され得る。例えば、凝集機構が、チオジスルフィドの交換を通じた分子間S-S結合形成であることが発見された場合、安定化は、スルフヒドリル残基を修飾すること、酸性溶液から凍結乾燥すること、水分含量を制御すること、ふさわしい添加物を使用すること、及び特別なポリマーマトリックス組成物を開発することにより達成され得る。

10

【0083】

本発明では、「機能的」には、例えば腸の疾患の治療処置において、例えば「その活性を維持すること」が意図されている。

20

【0084】

用語「類似体」とは、タンパク質を参照しながら本明細書で使用される場合、ペプチドの1つ若しくは複数のアミノ酸残基がその他のアミノ酸残基と置換された、及び/又は1つ若しくは複数のアミノ酸残基がペプチドから欠損した、及び/又は1つ若しくは複数のアミノ酸残基がペプチドから欠損した、及び/又は1つ若しくは複数のアミノ酸残基がペプチドに付加した修飾型のペプチドを意味する。アミノ酸残基のそのような付加又は欠損は、ペプチドのN末端及び/又はペプチドのC末端において生じ得る。

【0085】

用語「誘導体」とは、タンパク質に関連して本明細書で使用される場合、少なくとも1つの置換基が、非修飾型ペプチド又はその類似体には存在しない、化学的に修飾されたペプチド又はその類似体、すなわち、共有結合的に修飾されたペプチドを意味する。代表的な修飾として、アミド、炭化水素、アルキル基、アシル基、エステル等が挙げられる。本明細書で使用される場合、用語「誘導体」は、例えば、IGFBP3と、又はIGFBP3のオーソログ若しくはホモログな遺伝子からエンコードされる対応する領域のアミノ酸配列と、少なくとも41%、好ましくは少なくとも41.5%、50%、54.9%、60%、61.2%、64.1%、65%、70%、又は75%、より好ましくは少なくとも85%、例えば少なくとも90%、及びなおいっそうより好ましくは少なくとも95%の同一性の割合(%)を有する、より長い又はより短いポリペプチドを指す。

30

【0086】

本明細書で使用される場合、「断片」とは、好ましくは少なくともアミノ酸10個分、より好ましくはアミノ酸少なくとも15個分、少なくとも17個分、又は少なくともアミノ酸20個分、なおいっそうより好ましくは少なくともアミノ酸25個分、又は少なくともアミノ酸37若しくは40個分、及びより好ましくは少なくともアミノ酸50、又は100、又は150又は200又は250又は300又は350又は400又は450又は500個分の長さを有するポリペプチドを指す。本発明によれば、組成物の「有効量」は、所望の生物学的効果、この場合腸の障害若しくは疾患の改善又は治療を実現するのに十分な量である。

40

【0087】

有効な用量は、レシピエントの年齢、性別、健康、及び体重、併用治療の種類、該当する場合、治療の頻度、及び所望の効果の性質に依存するものと理解される。本発明のインヒビター又は分子の有効用量の提示する範囲(例えば、1mg/kg ~ 1000mg/kg、特に全身的に

50

投与される)は、本発明を制限する意図を含まず、また好ましい用量範囲を表している。但し、好ましい用量は、過度の実験を行わなくても、当業者が理解し、決定可能なように、個々の対象に適合させることができる。

【0088】

本発明のオリゴヌクレオチドの投与は、公知の方法により実施され得るが、その場合、核酸がin vitro又はin vivoで所望の標的細胞に導入される。

【0089】

本発明の態様は、送達媒介物に含まれた核酸構築物を含む。送達媒介物は、ヌクレオチド配列を少なくとも1つの媒体から別の媒体に輸送可能にする実体である。送達媒介物は、核酸構築物内でエンコードされる配列を発現させるために、及び/又は構築物を細胞内に送達するために一般的に使用され得る。送達媒介物は、RNAに基づく媒介物、DNAに基づく媒介物/ベクター、脂質に基づく媒介物、ウイルスに基づく媒介物、及び細胞に基づく媒介物の群から選択される媒介物であり得ることは本発明の範囲に含まれる。そのような送達媒介物の例として、生分解性のポリマーマイクロスフェア、脂質に基づく製剤、例えばリポソーム担体等、構築物を金コロイド粒子上にコーティングしたものの、リポ多糖類、ポリペプチド、多糖類、ウイルス媒介物をペグ化したものが挙げられる。

10

【0090】

本発明の1つの実施形態では、送達媒介物としてウイルスを含み得るが、該ウイルスは、アデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、泡沫状ウイルス、サイトメガロウイルス、セムリキ森林ウイルス、ボックスウイルス、RNAウイルスベクター、及びDNAウイルスベクターから選択され得る。そのようなウイルスベクターは、当技術分野において周知されている。

20

【0091】

一般的に使用される遺伝子移入法として、リン酸カルシウム、DEAE-デキストラン、トランスフェクション、エレクトロポレーション、及び微量注射法、及びウイルス法が挙げられる。DNAを細胞に導入する別の技術として、カチオン性リポソームの使用が挙げられる。市販のカチオン性脂質製剤として、例えば、Tfx 50(Promega社)、又はLipofectamin 2000(Life Technologies社)が挙げられる。

【0092】

本発明の組成物は、溶液の形態、例えば、注射液、クリーム、軟膏、錠剤、懸濁物等であり得る。組成物は、任意の適する方法で、例えば、注射により、特に眼内注射により、口腔、局所、鼻腔、直腸への適用等により投与され得る。担体は、任意の適する医薬担体であり得る。好ましくは、RNA分子の標的細胞への進入効率を高める能力を有する担体を使用される。適するそのような担体の例として、リポソーム、特にカチオン性リポソームが挙げられる。

30

【0093】

本発明の組換え発現ベクターは、任意の適する組換え発現ベクターであり得るが、また任意の適する宿主を変換又はトランスフェクトするのに使用され得る。適するベクターとして、繁殖及び増殖用、又は発現用、又はその両方のために設計されたベクター、例えばプラスミド及びウイルス等が挙げられる。本発明の組換え発現ベクターは、標準的な組換えDNA法を使用して調製され得る。発現ベクターの構築物は、円形状又は直線状であり、原核生物又は真核生物の宿主細胞内で機能的な複製系を含むように調製され得る。複製系は、例えばColEI、2 μ プラスミド、SV40、ウシパピローマウイルス等に由来し得る。

40

【0094】

望ましくは、組換え発現ベクターは、宿主の種類(例えば、バクテリア、菌類、植物、又は動物)に固有の制御配列、例えば転写及び翻訳の開始及び終止コドン等を含み、組換え発現ベクターがDNAに基づくか又はRNAに基づくかを考慮しながら、同ベクターは該宿主に適宜導入される。組換え発現ベクターは、変換又はトランスフェクトされた宿主の選択を可能にする1つ又は複数のマーカー遺伝子を含み得る。マーカー遺伝子には、殺生剤耐性、例えば抗生物質、重金属等に対する耐性、原栄養性等を提供するための栄養要求性宿主にお

50

ける補完が含まれる。本発明の発現ベクターにとって適するマーカー遺伝子として、例えば、ネオマイシン/G418耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ヒスチジノール耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、及びアンピシリン耐性遺伝子が挙げられる。組換え発現ベクターは、PCYOX1インヒビター(その機能的部分及び機能的変異体を含む)をエンコードするヌクレオチド配列、又はRNAをエンコードするヌクレオチド配列に対して相補的な、若しくはそれとハイブリダイズするヌクレオチド配列に作動可能に結合した天然の又は規範的なプロモーターを含み得る。プロモーター、例えば強い、弱い、誘導可能な、組織特異的、及び発達特異的なプロモーターの選択は、当業者の通常技能の範囲内である。同様に、ヌクレオチド配列とプロモーターとの組み合わせも、当業者の技能の範囲内である。プロモーターは、非ウイルス性プロモーター又はウイルスプロモーター、例えば、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、SV40プロモーター、RSVプロモーター、及びマウス幹細胞ウイルスの長い末端反復配列(long-terminal repeat)に見出されるプロモーターであり得る。

10

【0095】

本発明の組換え発現ベクターは、一過性の発現、安定的な発現、又はその両方を目的として設計され得る。また、組換え発現ベクターは、構成的な発現又は誘導可能な発現を目的として作成され得る。上記IGFBP3組成物について、更なる材料並びに処理技術等が、参照として本明細書に組み込まれているRemington's Pharmaceutical Sciences、第20版、2000、Marck Publishing Company社、Easton、Pennsylvaniaのパート5に記載され得る。

20

【0096】

本発明の化合物は、徐放形態で、又は徐放薬物送達システムからも投与可能である。代表的な徐放材料の説明は、Remington's Pharmaceutical Sciencesの組込み材料にも見出すことができる。更に、医薬製剤は、医薬品技術分野において一般的に公知のプロセスを使用して調製可能である。

【0097】

本発明では、本発明の分子が別の治療剤と共に投与される場合、同時に又は連続して投与され得る。

【0098】

配列

IGFBP3のアミノ酸配列:

MQRARPTLWAAALTLVLLRGPVVARAGASSAGLGPVVRCEPCDARALAQCAPPPAVCAELVREPGCGCCLTCALSEGQPCG IYTERCGSGLRCQSPDEARPLQALLDGRGLCVNASAVSRLRAYLLPAPPAPGEPAPGNASEEEDRSAGSVESPSV SSTRVSDPKFHPLHSK I I I KKGHAKDSQRYKVDYESQSTDTQNFSSSESKRETEYGPCCRREMEDTLNHLKFLNLVSPRG VHI PNCDKKGFKYKQCRPSKGRKRGFCWCVDKYGQPLPGYTTKGGKEDVHCYSMQSK (配列番号4)

30

【0099】

IGFBP3のヌクレオチド配列:ホモサピエンスインスリン様増殖因子結合タンパク質3(IGFBP3)、第7染色体上のRefSeqGene、NCBI参照配列:NG_011508.1

【0100】

IGFBP3のmRNA配列:ホモサピエンスインスリン様増殖因子結合タンパク質3(IGFBP3)、転写物変異体1、mRNA、NCBI参照配列:NM_001013398.1

40

【0101】

TMEM219のアミノ酸配列:

MGNCQAGHNLHLCLAHHPPLVCATL I LLLLGLSGLGLGSFLLTHRTGLRSPD I PQDWVSFLRSFGQLTLCPRNGTVTGKWRGSHVVGLLTTLNFGDGPDRNKTRTFQATVLGSQMGLKGSAGQLVL I TARVTTERTAGTCLYFSAVPG I LPSSQPP I SCSEEGAGNATLSPRMGEECVSWSHEGLVLTKLLTSEELALCGSRLLVLGSFLLLF CGLLCCVTAMCFHPRRESHWSRTRL (配列番号1).

【0102】

TMEM219のヌクレオチド配列: TMEM219膜貫通タンパク質219 [ホモサピエンス(ヒト)]、遺伝子ID: 124446.

【0103】

50

TMEM219のmRNA配列:ホモサピエンス膜貫通タンパク質219 (TMEM219)、転写物変異体1、mRNA、NCBI参照配列: NM_001083613.1

【0104】

下記の図を参照しながら、本発明を非制限的な実施例を用いて説明する。

【図面の簡単な説明】

【0105】

【図1】遷延性T1Dにおける糖尿病性腸疾患は、腸粘膜の異常及び結腸幹細胞内の障害により特徴付けられることを示す図である。A、B、C。棒グラフは、健康な対象(CTRL)及び遷延性T1Dの個体(T1D+ESRD)におけるGSRS質問票の実施による下痢、腹痛、及び便秘のスコアを表す。グレー部分は、パラメーターの正常範囲を示す。D、E、F。棒グラフは、健康な対象(CTRL)及び遷延性T1Dの個体(T1D+ESRD)における肛門直腸内圧測定による肛門直腸括約筋収縮張力(anorectal sphincter contracting tone) (mmHg)、反射応答(ml)、及び切迫容積(urgency volume) (ml)の測定結果について報告する。グレー部分は、パラメーターの正常範囲を示す。CTRL N=20及びT1D+ESRDの個体n=60が評価に含まれた。G1~G2、I1~I2、K1~K2、M1~M2、O1~O2、Q1~Q2。健康な対象(CTRL)及び遷延性T1Dの個体(T1D+ESRD)から得られた生検試料におけるヘマトキシリン及びエオシン(H&E)組織学染色、免疫染色したMIB1⁺細胞、赤矢印が神経内分泌小胞(neuroendocrine vesicle)の局在場所及び存在を示す神経構造の超微細構造分析、免疫染色した5HT⁺、アルデヒドデヒドロゲナーゼ(Aldh)⁺細胞、及びEphB2⁺発現に関する代表的画像である。超微細構造分析のスケールバー: 2000nm。オリジナルの倍率: G1~G2では100x; I1~I2、K1~K2では400x; O1~O2では40x; Q1~Q2では200x。スケールバー80ミクロン。H、J、L、N、P、R。棒グラフは、CTRL及び遷延性T1Dの対象(T1D+ESRD)における、陰窩、MIB1⁺細胞、神経終末の神経内分泌小胞(神経終末1つにつき>3のNE小胞が検出されたケースの数)、5HT⁺細胞、Aldh⁺細胞、及びEphB2⁺発現(強度スコア0~5)の測定について報告する。CTRL N=20及びT1D+ESRDの個体n=60が評価に含まれた。別途報告がなければ、データは平均値±平均値の標準誤差(SEM)として表す。*p<0.01; **p<0.001; ***p<0.0001。略号: GSRS、胃腸症状評価尺度; CoSC、腸管幹細胞; T1D、1型糖尿病; ESRD、末期腎疾患; CTRL、健康な対象; H&E、ヘマトキシリン及びエオシン; MIB1、Ki67に対する抗体; EphB2、エフリンB受容体2; Aldh、アルデヒドデヒドロゲナーゼ; 5HT、セロトニン; NE、神経内分泌小胞。

10

20

【図2】遷延性T1Dにおける糖尿病性腸疾患は、CoSCの欠陥と関連することを示す図である。A、B。健康な対象(CTRL)及び遷延性T1Dの個体(T1D+ESRD)におけるEphB2^{low}、EphB2^{medium}、及びEphB2^{high}細胞の代表的フローサイトメトリー分析結果を表す(CTRL n=10及びT1D+ESRD n=10)。C、D、E。棒グラフは、新鮮分離した陰窩におけるEphB2^{high}、EphB2^{high}LGR5⁺、及びEphB2^{high}TERT⁺細胞のフローサイトメトリー分析結果を表す(CTRL n=10及びT1D+ESRD n=10)。F、G、H。棒グラフは、単離された腸陰窩上で、定量的RT-PCRによりCoSCマーカーであるEphB2、LGR5、h-TERTを測定し、その発現データを標準化したmRNA発現として表す。すべての試料は三重測定し、ハウスキーピング遺伝子ACTBの発現に対して標準化した(Ct)。I。散布図は、健康な対象(CTRL)n=10、及び遷延性T1Dの個体(T1D+ESRD)n=10の新鮮分離した腸陰窩について調べた、CoSCシグネチャーマーカー(signature marker)及び幹細胞トランスクリプトームプロファイリングを表す。J1~J2。遷延性T1Dの個体(T1D+ESRD)及び健康な対象(CTRL)のこれまでに単離した陰窩から取得し、in vitroで8日間培養したミニ・ガットの代表的な画像である。倍率10x。スケールバー50ミクロン。K。棒グラフは、CTRL n=10及びT1D+ESRDの個体n=10に由来する新鮮分離した腸陰窩を培養し、その8日目における全体に対するミニ・ガットの発生割合(%)を表す。L1~L4。健康な対象(CTRL)のこれまでに単離された陰窩から取得し、下記の条件で8日間培養したミニ・ガットの代表的な画像である:L1=正常(FBS)血清+正常グルコース(5mM); L2=T1D+ESRD血清+正常グルコース; L3=正常血清+高濃度グルコース(35mM); L4=T1D+ESRD血清+高濃度グルコース。倍率10x。スケールバー50ミクロン。M。棒グラフは、新鮮分離した腸陰窩を下記の条件で培養し、それに由来する培養の8日目における全体に対するミニ・ガットの発生割合(%)をグループ化して表す: 正常(FBS)血清+正常グルコース(5mM); T1D+ESRD血清+正常グルコース; 正常血清+高濃度

30

40

50

グルコース (35mM); T1D+ESRD血清+高濃度グルコース。異なる培養条件を比較することにより、各グループ(正常グルコース+正常血清、培地+高濃度グルコース、培地+遷延性T1D血清、高濃度グルコース+遷延性T1D血清)内で、統計的有意性を計算した。棒グラフ内の比較とは、正常血清+正常グルコースに対してすべての条件を比較することを指す。N。トランスクリプトームプロファイリングは、健康な対象から取得し、高濃度グルコース及び/又は遷延性T1D血清を含め/含めずに培養した、単離された陰窩におけるCoSCシグネチャーマーカーの発現を表す。1群当たり対象N=10を評価した。別途報告がなければ、データは平均値±平均値の標準誤差(SEM)として表す。* $p<0.01$; ** $p<0.001$; *** $p<0.0001$ 。略号: CoSC、結腸幹細胞; T1D、1型糖尿病; ESRD、末期腎疾患; CTRL、健康な対象; EphB2、エフリンB受容体2; LGR5、ロイシンリッチ反復領域を含有するGタンパク質共役型レセプター5; RT-PCR、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応; ACTB、ベータアクチン; FBS、ウシ胎仔血清。

【図3】循環性IGF-I及びIGFBP3は、遷延性T1Dにおいて変化していること、及びその*in vitro*での操作は、CoSC増殖及び自己再生に対して重要な効果を誘発することを示す図である。A。ヒートマップは、遷延性T1D(T1D+ESRD)におけるプロテオミクスプロファイルを、健康な対象(CTRL)と比較して表す。識別及び定量化したタンパク質の完全なデータセットについて、統計分析を実施した($p<0.01$)。有意に異なり発現しているタンパク質を、階層的クラスタリングを通じて更に分析した。CTRL $n=10$ 及びT1D+ESRDの個体 $n=10$ の血清を分析した。B。棒グラフは、非標的式プロテオーム分析から外挿された単一のタンパク質、インスリン様増殖因子結合タンパク質3(IGFBP3)に関するLFQ強度を表す。C1~C2。肝臓におけるIGFBP3発現の代表的な画像(倍率40×)である。IGFBP3は、健康な対象に由来する肝臓実質内では軽度且つ拡散的に発現するが(C1)、一方遷延性糖尿病の個体では、よりゾーン状の陽性を示す(C2)。D。棒グラフは、異なるグルコース濃度(35mM:高濃度グルコース; 20mM:中間濃度グルコース; 5mM:正常グルコース)で5日間培養した不死化ヒトヘパトーマ細胞系(HuH-7)の上清において、ELISAにより測定したIGFBP3レベルを表す。実験は三重測定であった。E。棒グラフは、健康な対象及び遷延性T1D(T1D+ESRD)の血清中でELISAにより測定した、インスリン様増殖因子1(IGF-I)レベルを表す。F。ウェスタンブロット分析(クロップドブロット)により、腸陰窩表面上でのIGF-IR及びTMEM219発現を確認した。WBによるIGF-IR総発現量の評価には、IGF-IRのタンパク質全体のサブユニットであるIGF-IRの検出が含まれる。CTRLから得た直腸粘膜生検試料上で実施した、TMEM219 *in situ*ハイブリダイゼーションの代表的な画像である(G1陰性対照、G2 TMEM219染色)。倍率20×。G1~G2。CTRLから得た直腸粘膜生検試料上で実施した、TMEM219 *in situ*ハイブリダイゼーションの代表的な画像である(G1陰性対照、G2 TMEM219染色)。倍率400×。H。棒グラフは、Ct法を使用して標準化した、TMEM219(IGFBP3受容体)のmRNA発現を表す。1群当たり対象N=5を評価した。I。棒グラフは、異なる条件において遷延性T1Dの個体から得た、全体に対するミニ・ガット発生割合(%)についてグループ化し、またIGF-I、IGFBP3、及び抗IGF-IRの効果を示す。P値は、ベースライン条件とIGF-Iの培養への添加との比較である。J。棒グラフは、健康な対象から単離し、IGFBP3及びIGF-I+IGFBP3の存在下で培養し、これを3回実施した陰窩におけるカスパーゼ8及び9の標準化したmRNA発現を表す。K。棒グラフは、健康な対象から取得し、汎カスパーゼインヒビター、カスパーゼ8、9、及び3の選択的インヒビター、並びにIGFBP3の存在下で培養したときの、その培養8日目における全体に対するミニ・ガット発生割合(%)についてグループ化する。アッセイは3回実施した。L。棒グラフは、健康な対象から取得し、異なる条件(正常グルコース+正常血清、高濃度グルコース+正常血清、T1D+ESRD血清+正常グルコース、T1D+ESRD血清+高濃度グルコース)で培養したときの、全体に対するミニ・ガット発生割合(%)についてグループ化し、またIGF-I、IGFBP3、及び抗IGF-IRの効果を示す。P値は、ベースライン条件(培地単独、培地+高濃度グルコース、培地+遷延性T1D血清、高濃度グルコース+遷延性T1D血清)の比較である。更なるP値を、下記の条件: 培地単独対培地+高濃度グルコース、対培地+高濃度グルコース+遷延性T1D血清との比較におけるミニ・ガット増殖の差異を比較するために計算した。アッセイは3回実施した。M。棒グラフは、健康な対象から取得し、8日間培養し、siRNAによりTMEM219の標的化に曝露し、最終的に、培地単独及び培地+高濃度グルコース+遷延性T

10

20

30

40

50

1D血清中で、TMEM219を発現する陰窩と比較したときの、全体に対するミニ・ガット発生割合(%)についてグループ化する。アッセイは3回実施した。別途報告がなければ、データは平均値±平均値の標準誤差(SEM)として表す。^{*}p<0.01; ^{**}p<0.001; ^{***}p<0.0001。略号: IGF-1、インスリン様増殖因子1; IGFBP3、インスリン様増殖因子結合タンパク質3; IGF-1R、インスリン様増殖因子1受容体; CoSC、結腸幹細胞; T1D、1型糖尿病; ESRD、末期腎疾患; CTRL、健康な対象; RT-PCR、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応; ACTB、ベータアクチン; LFQ、ラベルフリーの定量; SEM、平均値の標準誤差; siRNA、低分子干渉RNA; inhib、インヒビター。

【図4】末梢IGF-1/IGFBP3ダイアドの、単一細胞由来のin vitroミニ・ガット、及びカスパーゼカスケードに対する効果を示す図である。末梢IGF-1/IGFBP3ダイアドを操作すると、糖尿病性腸疾患の前臨床モデルにおいて、糖尿病性腸疾患の進行が変化するが、一方、膵腎同時移植(SPK)により遷延性T1Dを治療すると腸症状、運動性、及び形態が改善する。A。棒グラフは、健康な対象の陰窩から得た単一細胞をEphB2⁺選別し、その細胞内のTMEM219、LRP1、TGF- β 1及びII型の標準化したmRNA発現を表す。実験は3回実施した。B。棒グラフは、健康な対象の新鮮分離した陰窩から選別し、異なる条件(正常グルコース+正常血清、高濃度グルコース+正常血清、T1D+ESRD血清+正常グルコース、T1D+ESRD血清+高濃度グルコース)で培養したEphB2⁺細胞から得た単一細胞由来のミニ・ガットの発生割合(%) (全体に対する)を示し、またIGF-1及びIGFBP3の効果を示す。P値は、ベースライン条件との比較である。C、D。散布図は、健康な対象(CTRL)及び遷延性T1Dの個体(T1D+ESRD)の新鮮分離した腸陰窩を、IGFBP3及びIGF-1を含め/含めずに培養し、その腸陰窩において調べたアポトーシストランスクリプトームプロファイリングを表す。実験は三重測定であった。E。CoSC上での循環性IGF-1及びIGFBP3の効果を表す説明の案。F、G、I。折れ線グラフは、STZで治療した糖尿病性腸疾患発症B6マウス(B6+STZ)、naive B6(WT)、及びIGFBP3で治療したnaive B6(WT+IGFBP3)から、ベースライン時及び8週間後に採取した下部腸管切片において評価した陰窩の数(B)、陰窩の深度(C)、及び陰窩の幅(E)について報告する。WT: 野生型、STZ: ストレプトゾチシンで治療した。1群当たりマウスN=3を評価した。H1~H3。WT、糖尿病性腸疾患発症B6+STZマウス、及びIGFBP3で治療したnaive B6(WT+IGFBP3)のH&E切片上の腸陰窩に関する代表的な画像である。組織学倍率400 \times 。J。棒グラフは、STZで治療した糖尿病性腸疾患発症B6マウス、WT、及びIGFBP3で治療したnaive B6(WT+IGFBP3)の免疫染色切片内のAldh⁺細胞の数/mm²を表す。K1~K3。STZで治療した糖尿病性腸疾患発症B6マウス、WT、及びIGFBP3で治療したnaive B6(WT+IGFBP3)から採取した下部腸管の免疫染色切片におけるAldh⁺細胞の代表的な画像である。組織学倍率、400 \times 。L、N、P。棒グラフは、対象4群(CTRL n=20、SPK n=30、K+T1D n=、及びT1D+ESRD n=60)における、MIB1⁺細胞及びAldh⁺細胞の数、並びにEphB2⁺発現(強度スコア0~5)について報告する。M1~M2、O1~O2、Q1~Q2。フォローアップの8年目において、腎単独(K+T1D)移植又は膵腎同時(SPK)移植を受けたT1D+ESRDの直腸粘膜生検の免疫染色試料における、MIB1⁺細胞及びAldh⁺細胞の数、並びにEphB2⁺発現に関する代表的な画像である。組織学倍率は、M1~M2及びO1~O2につき400 \times 、Q1~Q2につき20 \times 。スケールバー80ミクロン。別途報告がなければ、データは平均値±平均値の標準誤差(SEM)として表す。^{*}p<0.01; ^{**}p<0.001; ^{***}p<0.0001。略号: WT、野生型; STZ、ストレプトゾチシンで治療した; B6、C57BL/6Jマウス; IGF-1、インスリン様増殖因子1; IGFBP3、インスリン様増殖因子結合タンパク質3; IGF-1R、インスリン様増殖因子1受容体; CoSC、結腸幹細胞; T1D、1型糖尿病; ESRD、末期腎疾患; CTRL、健康な対象; SPK、膵腎同時移植; K+T1D、1型糖尿病における腎単独移植; H&E、ヘマトキシリン及びエオシン; MIB1、Ki67に対する抗体; EphB2、エフリンB受容体2; Aldh、アルデヒドデヒドロゲナーゼ; SEM、平均値の標準誤差。

【図5】SPKにより遷延性T1Dを治療すると、CoSCが補充されること、並びに循環性IGF-1及びIGFBP3の修復を通じてCoSCシグネチャープロファイル及びミニ・ガットの発生が修復することを示す図である。A、B、C。棒グラフは、遷延性T1D(ベースライン)、フォローアップの8年目において膵腎同時(SPK)移植又は腎単独(K+T1D)移植を受けたT1D+ESRDから陰窩を単離し、その陰窩から得たEphB2^{hi+}、EphB2^{hi+}LGR5⁺、EphB2^{hi+}h-TERT⁺細胞のフローサ

10

20

30

40

50

イトメトリ分析の結果を表す。1群当たり対象N=10を評価した。D、E、F。棒グラフは、遷延性T1D(ベースライン)、フォローアップの8年目において脾腎同時(SPK)移植又は腎単独(K+T1D)移植を受けたT1D+ESRDから取得し、単離された腸陰窩において、定量的RT-PCRにより測定された腸管幹細胞マーカーEphB2、LGR5、h-TERTの標準化したmRNA発現を表す。すべての試料は三重測定し、Ct法を使用してハウスキーピング遺伝子ACTBの発現に対して標準化した。1群当たり対象N=10を評価した。G。ウェスタンブロット分析は、フォローアップの8年目において、4群から単離した腸陰窩におけるEphB2、LGR5、h-TERTの発現を表す。1群当たり対象N=5を評価した。H。棒グラフは、遷延性T1Dの個体(ベースライン)、フォローアップの8年目におけるSPK及びK+T1Dの対象から取得し、新鮮分離した腸陰窩の培養8日目における、全体に対するミニ・ガット発生割合(%)を表す。1群当たり対象N=10を評価した。I。ヒートマップは、CTRL、遷延性T1Dの個体(T1D+ESRD)、フォローアップの8年目におけるSPK及びK+T1Dの対象の腸陰窩を新鮮分離し、その腸陰窩において調べたCoSCシグネチャーマーカーのトランスクリプトームプロファイリングを表す。1群当たり対象N=10を評価した。J。棒グラフは、フォローアップの8年目における、対象4群の血清におけるELISAにより測定したIGF-Iレベルを表す。1群当たり対象N=10を評価した。K。棒グラフは、対象4群の血清において、ELISAにより測定したIGFBP3レベルを表す。1群当たり対象N=20を評価した。L、M。IGFBP3血清レベルとK+T1D(L)及びSPK(M)群の対象n=20におけるGSRS質問票(0~7)を使用して評価した腸症状との間の相関である。すべての群を比較する際には、ANOVA($p < 0.05$)を使用して分析を実施した。別途報告がなければ、データは平均値 \pm 平均値の標準誤差(SEM)として表す。 $^*p < 0.01$; $^{**}p < 0.001$; $^{***}p < 0.0001$ 。略号:CoSC、結腸幹細胞;T1D、1型糖尿病;ESRD、末期腎疾患;CTRL、健康な対象;SPK、脾腎同時移植;EphB2、エフリンB受容体2;LGR5、ロイシンリッチ反復領域を含有するGタンパク質共役型レセプター-5;RT-PCR、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応;ACTB、ベータアクチン;K+T1D、1型糖尿病における腎単独移植;IGF-I、インスリン様増殖因子1;IGFBP3、インスリン様増殖因子結合タンパク質3;SEM、平均値の標準誤差。

【図6】新規に生成した組換えタンパク質ecto-TMEM219(ecto-TMEM219)で治療すると、前臨床モデルにおいてIGFBP3が媒介するミニ・ガットの破壊が抑制され、またCoSCが保存されることを示す図である。A。棒グラフは、異なる条件で健康な対象から得た全体に対するミニ・ガットの発生割合(%)についてグループ化し、IGFBP3で治療したミニ・ガット及び高濃度グルコースに曝露したミニ・ガットにおける様々な濃度(IGFBP3と比較して1:2、1:1、及び2:1のモル比)でのecto-TMEM219の効果を示す。P値は、ベースライン条件との比較である。B。棒グラフは、健康な対象から単離し、IGFBP3及びecto-TMEM219+IGFBP3の存在下で培養し、これを3回実施した陰窩における、EphB2の標準化したmRNA発現を表す。C。D。棒グラフは、健康な対象から単離し、IGFBP3及びecto-TMEM219+IGFBP3の存在下で培養し、これを3回実施した陰窩におけるカスパーゼ8及び9の標準化したmRNA発現を表す。E、F、G。折れ線グラフは、STZで治療した糖尿病性腸疾患発症B6マウス(B6+STZ)、naive B6(WT)、及びecto-TMEM219で治療したSTZ-B6マウスから、ベースライン時及び8週間後に採取した下部腸管切片において評価した陰窩の数(E)、陰窩の深度(F)、及び陰窩の幅(G)について報告する。WT:野生型、STZ:ストレプトゾチシンで治療した。1群当たりマウスN=3を評価した。H。折れ線グラフは、STZで治療した糖尿病性腸疾患発症B6マウス(B6+STZ)、naive B6(WT)、及びecto-TMEM219で治療した糖尿病性腸疾患発症STZ治療B6マウスのベースライン時及び8週間後の体重について報告する。WT:野生型、STZ:ストレプトゾチシンで治療した。1群当たりマウスN=3を評価した。I。棒グラフは、naive B6マウス、STZで治療したB6マウスから、及び8週目にecto-TMEM219で治療したSTZ-B6マウスにおいて収集した腸試料から単離したEphB2⁺細胞のフローサイトメトリ分析結果を表す。J。naive B6マウス、STZで治療したB6マウスから、及び8週目にecto-TMEM219で治療したSTZ-B6マウスにおいて単離した陰窩から単離したEphB2⁺細胞の代表的なフローヒストグラムである。1群当たりマウスN=3~5を評価した。K。棒グラフは、naive B6マウス、STZで治療したB6マウスから、及び8週目にecto-TMEM219で治療したSTZ-B6マウスにおいて収集した腸試料におけるEphB2の標準化したmRNA発現を表す。L、M。棒グラフは、naive B6マウス、STZで治療

したB6マウスから、及び8週目にecto-TMEM219で治療したSTZ-B6マウスにおいて収集した腸試料におけるカスパーゼ8(K)及びカスパーゼ9(L)の標準化したmRNA発現を表す。N。棒グラフは、naive B6マウス(WT)、及びSTZで治療したB6マウス(B6+STZ)、及び8週目にecto-TMEM219で治療したB6+STZマウスにおいて測定したIGFBP3循環レベルを表す。別途報告がなければ、データは平均値±平均値の標準誤差(SEM)として表す。 $^*p<0.01$; $^{**}p<0.001$; $^{***}p<0.0001$ 。略号:WT、野生型;STZ、ストレプトゾチシンで治療した;B6、C57BL/6Jマウス;IGF-1、インスリン様増殖因子1;IGFBP3、インスリン様増殖因子結合タンパク質3;CoSC、結腸幹細胞;H&E、ヘマトキシリン及びエオシン;EphB2、エフリンB受容体2;SEM、平均値の標準誤差、T1D、1型糖尿病;ESRD、末期腎疾患;CTRL、健康な対象;RT-PCR、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応;ACTB、ベータアクチン。

10

【図7】CTRL、T1D、及びT1D+ESRDの個体の血清(A)及び尿(B)におけるIGFBP3レベルの評価を示す図である。(C)この試験において評価したコホートのすべての対象における血清IGFBP3レベルと尿中IGFBP3レベルとの間の相関である。(D~E)透析中のT1D+ESRDを有する対象(D)、及びeGFRが $>15\text{ml/min/m}^2$ であるT1Dを有する対象(E)における、IGFBP3血清レベルとMDRD式により計算したeGFRとの間の相関である。(F)この試験において評価したコホートのすべての対象における血清IGFBP3レベルと尿中IGFBP3レベルとの間の相関である。グレー部分は、IGFBP3の尿中及び血清レベルにおける正常範囲を示す。

【図8-1】遷延性T1Dの対象及び健康な対象におけるCoSCプロファイル、ミニ・ガットのin vitro生成、肝臓内でのIGFBP3の発現、及びCoSC上でのIGF-1Rの発現を示す図である。A~B。健康な対象(CTRL)及び遷延性T1Dの個体(T1D+ESRD)におけるPI⁺細胞ゲーティング戦略の代表的なフロードットプロットである。C。棒グラフは、新鮮分離した陰窩におけるPI⁺細胞のフローサイトメトリー分析結果を表す(CTRL n=10及びT1D+ESRD n=10)。D~E。健康な対象(CTRL)及び遷延性T1Dの個体(T1D+ESRD)におけるEphB2^{hi}LGR5⁺細胞(D)、及びEphB2⁺h-TERT⁺細胞の代表的なフロードットプロットである。F。ウェスタンブロット分析(クロップドプロット)により、遷延性T1Dの個体(T1D+ESRD)のin vitroで単離された腸陰窩におけるEphB2、LGR5、h-TERTの発現は低いことを確認する。完全長プロットを図5に示す。1群当たり対象N=5を評価した。G。散布図は、健康な対象(CTRL)及び遷延性T1Dの個体(T1D+ESRD)の新鮮分離した腸陰窩において調べた幹細胞トランスクリプトームプロファイリングを表す。表は、分析した遺伝子及び経路について要約する(表S1)。1群当たり対象N=10を評価した。H~I。健康な対象及び遷延性T1Dの個体から取得し、新鮮分離してDAPIで染色した陰窩の代表的な画像である。倍率20×。J。棒グラフは、健康な対象及び遷延性T1Dの個体から得た陰窩を播種して12時間経過したときのミニ・ガット形成効率(%)を表す。1群当たり対象N=10を評価した。K。棒グラフは、健康な対象及び遷延性T1Dの個体から得た肝臓試料における免疫組織化学評価の際のIGFBP3強度/拡散について算出した複合スコア(0~6)を表す。1群当たり対象N=3を評価した。L1~L6。肝臓内IGFBP3発現の代表的な画像である(倍率63×)。免疫蛍光検査法により、Hep Par-1⁺細胞及びIGFBP3発現の同時局在が確認されたが(L1~L3)、一方、IGFBP3細胞とCD163⁺細胞の間では同時局在は認められなかった(L4~L6)。M。棒グラフは、単離した腸陰窩上での定量的RT-PCRにより測定したIGF-1受容体(IGF-1R)の標準化したmRNA発現を表す。すべての試料は三重測定し、Ct法を使用してハウスキーピング遺伝子ACTBに対して標準化した。N1~N2。CTRL及びT1D+ESRDの個体から得た直腸粘膜試料上のIGF-1R⁺細胞の代表的な画像である。黒矢印は、陰窩基底部分における陽性細胞を示す。倍率200×。O1~O2。CTRL及びT1D+ESRDの個体から得た直腸粘膜生検試料上で実施したTMEM219 in situハイブリダイゼーションの代表的な画像である。倍率400×。別途報告がなければ、データは平均値±平均値の標準誤差(SEM)として表す。 $^*p<0.01$ 。略号:PI、ヨウ化プロピジウム;IGF-1、インスリン様増殖因子1;IGFBP3、インスリン様増殖因子結合タンパク質3;IGF-1R、インスリン様増殖因子1受容体;CoSC、結腸幹細胞;T1D、1型糖尿病;ESRD、末期腎疾患;CTRL、健康な対象;EphB2、エフリンB受容体2;LGR5、ロイシンリッチ反復領域を含有するGタンパク質共役型レセプター5;RT-PCR、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応;ACTB、ベータアクチン;SEM、平均値の標準誤差。

20

30

40

【図8-2】図8-1参照。

50

【図 8 - 3】図8-1参照。

【図 8 - 4】図8-1参照。

【図 8 - 5】図8-1参照。

【図 8 - 6】図8-1参照。

【図 9】IGF-1/IGFBP3で培養したミニ・ガット内でカスパーゼが発現し、またその他の循環因子の効果が存在しなければ、ミニ・ガット発生に対してIGFBP3は多大なアポトーシス促進効果を有することが確認されたことを示す図である。A。棒グラフは、T1D+ESRDを有する個体から単離し、IGFBP3、IGF-1+IGFBP3、及びIGF-1の存在下で培養し、これを3回実施した陰窩におけるカスパーゼ8の標準化したmRNA発現を表す。B。棒グラフは、T1D+ESRDを有する個体から単離し、IGFBP3、IGF-1+IGFBP3、及びIGF-1の存在下で培養し、これを3回実施した陰窩におけるカスパーゼ9の標準化したmRNA発現を表す。C、D。棒グラフは、健康な対象(C)及び遷延性T1Dの個体(D)から発生し、FBSを含む培地、及び健康な対象から得た血清「CTRL血清」を含む培地の存在下で培養したミニ・ガットの割合(%)についてグループ化する。アッセイは三重測定であった。E。棒グラフは、健康な対象から得られ、8日間培養し、siRNAによるTMEM219の標的化及び抗IGF-1Rに曝露したときの、全体に対するミニ・ガットの発生割合(%)についてグループ化し、最終的に培地単独及び培地+高濃度グルコース+遷延性T1Dの血清中のTMEM219発現陰窩と比較する。アッセイは3回実施した。F、G。棒グラフは、健康な対象(F)、及び遷延性T1Dの個体(G)から取得し、培地単独及びプロテオーム分析により識別された様々な分子の存在下で培養した、培養8日目のミニ・ガット発生割合(%)についてグループ化する(表S7)。アッセイは3回実施した。H。棒グラフは、健康な対象から取得し、インスリンを含め/含めずに、培地単独、培地+高濃度グルコース、培地+高濃度グルコースと遷延性T1D血清、IGF-1、IGFBP3の存在下で培養したミニ・ガットの割合(%)についてグループ化する。アッセイは3回実施した。別途報告がなければ、データは平均値±平均値の標準誤差(SEM)として表す。^{*}p<0.01; ^{**}p<0.001。略号: IGF-1、インスリン様増殖因子1; IGFBP3、インスリン様増殖因子結合タンパク質3; IGF-1R、インスリン様増殖因子1受容体; CoSC、結腸幹細胞; T1D、1型糖尿病; ESRD、末期腎疾患; CTRL、健康な対象; RT-PCR、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応; ACTB、ベータアクチン; SEM、平均値の標準誤差; siRNA、低分子干渉RNA; ALDOA、フルクトースビスホスフェートアルドラーゼA; RNASE、膵臓リボヌクレアーゼ; MASP、マンナン結合レクチンセリンプロテアーゼ1。

【図 10 - 1】IGF-1/IGFBP3ダイアドの単一細胞由来のミニ・ガット、幹細胞トランスクリプトームプロファイル、及びアポトーシス経路に対する効果を示す図である。A1~A3。健康な対象のこれまでに単離されたEphB2⁺選別細胞から取得し、培地単独、培地+IGFBP3、培地+35mMグルコース+遷延性T1Dの血清を用いて培養した、8日間in vitro培養した単一細胞由来のミニ・ガットの代表的な画像である。画像は、倍率10×で示す。スケールバー50ミクロン。B、C、D。棒グラフは、健康な対象から単離し、異なる条件で培養したEphB2⁺細胞をフロー選別し、その細胞から増殖させた単一細胞由来のミニ・ガット内におけるカスパーゼ8、カスパーゼ9、及びKi67の標準化したmRNA発現を表す。アッセイは3回実施した。E、F。散布図は、IGFBP3及びIGF-1を含め/含めずに培養した、健康な対象(CTRL)及び遷延性T1Dの個体(T1D+ESRD)の新鮮分離した腸陰窩において調べた幹細胞トランスクリプトームプロファイリングを表す。アッセイは3回実施した。G、H。散布図は、IGF-1を含め/含めずに培養した健康な対象(CTRL)及び遷延性T1Dの個体(T1D+ESRD)の新鮮分離した腸陰窩において調べたアポトーシストランスクリプトームプロファイリングを表す。表は、分析した遺伝子及び経路について要約する(表S3)。アッセイは3回実施した。I、J。棒グラフは、健康な対象(I)及び遷延性T1D(J)から取得し、次に培地単独、Fasリガンド(FasL)、過酸化水素(H₂O₂)、及び腫瘍壊死因子(TNF- α)の存在下で培養した陰窩から発生したミニ・ガットの割合(%)についてグループ化する。アッセイは3回実施した。別途報告がなければ、データは平均値±平均値の標準誤差(SEM)として表す。^{*}p<0.01; ^{**}p<0.001; ^{***}p<0.0001。略号: IGF-1、インスリン様増殖因子1; IGFBP3、インスリン様増殖因子結合タンパク質3; CoSC、結腸幹細胞; T1D、1型糖尿病; ESRD、末期腎疾患; CTRL、健康な対象; RT-PCR、

10

20

30

40

50

リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応;ACTB、ベータアクチン;SEM、平均値の標準誤差;FasL、Fasリガンド; H_2O_2 、過酸化水素;TNF- α 、腫瘍壊死因子。

【図10-2】図10-1参照。

【図11】糖尿病性腸疾患の前臨床モデルにおけるIGF-1/IGFBP3ダイアドの操作を示す図である。A。棒グラフは、naive B6マウス(WT)及びSTZで治療したB6マウス(B6+STZ)において測定したIGFBP3循環レベルを表す。B。棒グラフは、naive B6マウス(WT)及びSTZで治療したB6マウス(B6+STZ)において測定したIGF-1循環レベルを表す。C。棒グラフは、naive B6マウス(WT)及びSTZで治療したB6マウス(B6+STZ)において測定したインスリン血清レベルを表す。D、E、F:折れ線グラフは、ベースライン時及び8週間後に、STZで治療した糖尿病性腸疾患発症B6マウス(B6+STZ)、naive B6(WT)、及びIGFBP3で治療したSTZ-B6マウス(B6+STZ+IGFBP3)又はIGF-1で治療したSTZ-B6マウス(B6+STZ+IGF-1)から採取した下部腸管切片上で評価した陰窩の数(D)、陰窩の深度(E)、及び陰窩の幅(F)について報告する。WT:野生型、STZ:ストレプトゾチシンで治療した。1群当たりマウスN=3を評価した。G。棒グラフは、STZで治療した糖尿病性腸疾患発症B6マウス、WT、及びIGFBP3で治療したSTZ-B6マウス(B6+STZ+IGFBP3)又はIGF-1で治療したSTZ-B6マウス(B6+STZ+IGF-1)の免疫染色切片におけるAldh⁺細胞/mm²の数を表す。H1~H2:IGFBP3で治療したSTZ-B6マウス(B6+STZ+IGFBP3)(H1)、又はIGF-1で治療したSTZ-B6マウス(B6+STZ+IGF-1)(H2)のH&E切片上における腸陰窩の代表的な画像である。組織学倍率、400x。I。折れ線グラフは、STZで治療した糖尿病性腸疾患発症B6マウス(B6+STZ)、naive B6(WT)、IGFBP3で治療した糖尿病性腸疾患発症STZ治療B6マウス(B6+STZ+IGFBP3)の体重について報告する。WT:野生型、STZ:ストレプトゾチシンで治療した。1群当たりマウスN=3を評価した。J。棒グラフは、naive B6マウス、STZで治療したB6マウスから、及びIGFBP3で治療したSTZ-B6マウス(B6+STZ+IGFBP3)において収集した腸試料中のEphB2⁺細胞のフローサイトメトリー分析結果を表す。K、L。棒グラフは、naive B6マウス、STZで治療したB6マウスから、及びIGFBP3で治療したSTZ-B6マウス(B6+STZ+IGFBP3)において収集した腸試料中でのEphB2(K)及びLGR5(L)の標準化したmRNA発現を表す。M、N。棒グラフは、naive B6マウス、STZで治療したB6マウスから、及びIGFBP3で治療したSTZ-B6マウス(B6+STZ+IGFBP3)において収集した腸試料中のカスパーゼ8(M)及びカスパーゼ9(N)の標準化したmRNA発現を表す。別途報告がなければ、データは平均値±平均値の標準誤差(SEM)として表す。*p<0.01; **p<0.001; ***p<0.0001。略号:WT、野生型;STZ、ストレプトゾチシンで治療した;B6、C57BL/6Jマウス;IGF-1、インスリン様増殖因子1;IGFBP3、インスリン様増殖因子結合タンパク質3;CoSC、結腸幹細胞;H&E、ヘマトキシリン及びエオシン;EphB2、エフリンB受容体2;Aldh、アルデヒドデヒドロゲナーゼ;SEM、平均値の標準誤差。

【図12】SPKにより遷延性T1Dを治療すれば、糖尿病性腸疾患が改善することを示す図である。A、B、C。棒グラフは、健康な対象(CTRL)、遷延性T1Dの個体(ベースライン)、膵腎同時(SPK)移植又は腎単独(K+T1D)移植を受けたT1D+ESRDにおけるGSRS質問票による腹痛、下痢、及び便秘のスコアを表す。グレー部分は、すべてのパラメーターの正常範囲を示す。統計は、平均値±SEMとして表す。D1~D2、E1~E2、G1~G2、J1~J2。フォローアップの8年目において膵腎同時(SPK)移植又は腎単独(K+T1D)移植を受けたT1D+ESRDから得た直腸粘膜生検試料上で実施した、神経構造(赤矢印は、神経内分泌小胞の局在場所及び存在を示す)、Schwann細胞(赤矢印は細胞質の乱れを示す)、及び5HT⁺細胞のヘマトキシリン及びエオシン(H&E)染色、及び超微細構造的分析の代表的な画像である。倍率400x。F、H、I、K。棒グラフは、電子顕微鏡検査法、5HT⁺細胞を使用して、CTRL、遷延性T1Dの個体(ベースライン)、8年フォローアップ期間に膵腎同時(SPK)移植又は腎単独(K+T1D)移植を受けたT1D+ESRDの直腸粘膜から得た生検試料上で実施した、神経内分泌小胞(神経終末1つにつき>3のNE小胞が検出されたケースの割合(%))、濃縮した核(picnotic nuclei)及び細胞質の乱れを有するシュワン細胞の割合(%)(陽性ケースの割合(%))の測定について報告する。統計は、平均値±SEMとして表す。CTRL N=20、SPK n=30、K+T1D n=30、及びT1D+ESRD n=60の対象を評価した。統計は、平均値±SEMとして表す。調べたすべてのパラメーターは、異なる群を比較したとき、以下のように統計的に有意に異なった:*p<0.01; **p<0.001; ***

10

20

30

40

50

$p < 0.0001$ 。1群当たり対象 $N=10$ を評価した。略号:GSRs、胃腸症状評価尺度;SPK、膵腎同時移植;K+T1D、1型糖尿病における腎単独移植;CTRL、健康な対象;T1D、1型糖尿病;ESRD、末期腎疾患;5HT、セロトニン;H&E、ヘマトキシリン及びエオシン;NGF、神経増殖因子;SEM、平均値の標準誤差;NE、神経内分泌小胞。

【図13】SPK群及びK+T1D群の糖尿病性腸疾患における結腸幹細胞、IGF-1R、及び循環性因子のプロテオミクスプロファイルの分析を示す図である。A1~A6。遷延性T1Dの個体、フォローアップの8年目において膵腎同時(SPK)移植又は腎単独(K+T1D)移植を受けたT1D+ESRDのこれまでに単離した陰窩から取得し、*in vitro*で8日間培養したミニ・ガットの代表的な画像である。画像は、倍率 $5\times$ 及び $10\times$ で示す。スケールバー $10\mu\text{m}$ 。B。散布図は、SPK個体の新鮮分離した腸陰窩について調べた幹細胞トランスクリプトームプロファイリングを表す。対象 $N=3$ を評価した。C。棒グラフは、定量的RT-PCRにより測定された健康な対象(CTRL)、遷延性T1Dの個体(T1D+ESRD)、SPK、及びK+T1Dの単離した陰窩上におけるIGF-1受容体(IGF-1R)の相対的発現レベルを表す。すべての試料は三重測定し、Ct法を使用してACTB相対的発現レベルに対して標準化した。結果は、平均値 \pm SEMとして表す。D。ヒートマップは、遷延性T1Dのプロテオミクスプロファイルを、CTRL及びフォローアップの8年目におけるSPKの対象と比較して表す。同定及び定量化したタンパク質の完全なデータセットについて統計分析を行った($p < 0.05$)。有意に異なり発現しているタンパク質について、階層的クラスタリングを通じて更に分析した。統計は、平均値 \pm SEMとして表す。1群当たり対象 $n=10$ の血清を評価した。調べたすべてのパラメーターは、異なる群を比較したとき、以下のように統計的に有意に異なった: $*p < 0.01$ 。略号:T1D、1型糖尿病;ESRD、末期腎疾患;CTRL、健康な対象;SPK、膵腎同時移植;K+T1D、1型糖尿病における腎単独移植;RT-PCR、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応;ACTB、ベータアクチン;IGF-1、インスリン様増殖因子1;IGFBP3、インスリン様増殖因子結合タンパク質3;IGF-1R、インスリン様増殖因子1受容体;SEM、平均値の標準誤差。

【図14】SPK群及びK+T1D群における腸症状と、インスリン、HbA1C、及び血中グルコースのレベルとの相関を示す図である。A、B。K+T1D群(A)及びSPK群(B)の対象 $n=20$ において、GSRs質問票を使用し、最高スコア(0~7)の項目を考慮して、インスリン血清レベルと腸症状との間の相関を評価した。すべての群を比較する際に、ANOVA($p < 0.05$)を使用して分析を行った。C。K+T1D群(A)及びSPK群(B)の対象 $n=20$ について、遊離インスリン法(Free-Insulin method)を使用してインスリン血清レベルを測定した。データは、平均値 \pm 平均値の標準誤差(SEM)として表す。D、E。K+T1D群(A)及びSPK群(B)の対象 $n=20$ において、GSRs質問票(0~7)を使用して、糖化ヘモグロビン(HbA1C)血清レベルと腸症状との間の相関を評価した。すべての群を比較する際に、ANOVA($p < 0.05$)を使用して分析を実施した。F、G。K+T1D群(A)及びSPK群(B)の対象 $n=20$ において、GSRs質問票(0~7)を使用して、血中グルコースレベル(糖血症)と腸症状との間の相関を評価した。すべての群を比較する際に、ANOVA($p < 0.05$)を使用して分析を実施した。略号:T1D、1型糖尿病;ESRD、末期腎疾患;CTRL、健康な対象;SPK、膵腎同時移植;K+T1D、1型糖尿病における腎単独移植;IGF-1、インスリン様増殖因子1;IGFBP3、インスリン様増殖因子結合タンパク質3。

【図15】異なる培養条件に曝露したミニ・ガットにおける細胞系列マーカーの発現を示す図である。A1~A4、B1~B4、C1~C4、D1~D4、E1~E4。健康な対象CTRL(A1~A4)、及びT1D+ESRDの個体(B1~B4)から単離した陰窩から取得し、IGFBP3(C1~C4)、 35mM グルコース(D1~D4)、及び 35mM グルコース+遷延性T1D血清(T1D+ESRD血清)+IGF-1(E1~E4)と共に培養したミニ・ガットにおけるサイトケラチン20(KRT20)、ビメンチン、シナプトフィシン、及びアルデヒドデヒドロゲナーゼ(ALDH)発現の代表的な画像である(倍率 $10\times$)。免疫蛍光検査法により、CTRL(A1~A4、B1~B4)と比較して、T1D+ESRDの個体から得たミニ・ガットでは、すべての系列マーカーの発現が低下しており、ALDHが最小発現マーカーであること(B4)を確認した。ALDH発現の減少は、IGFBP3で治療したミニ・ガットでも検出されたが(C4)、一方、高濃度グルコース及び遷延性T1D血清に曝露し、IGF-1で治療したミニ・ガットは、ALDH発現の明確な回復を示した。F。棒グラフは、定量的RT-PCRにより測定した、非幹細胞(EphB2⁺細胞)上でのTMEM219、KRT20、上皮細胞接着分子(EpCam)、及びクロモグラ

10

20

30

40

50

ニンA(CHGA)の発現を表す。すべての試料は三重測定し、また Ct法を使用してACTB相対的発現レベルに対して標準化した。結果は、平均値 \pm SEMとして表す。略号:T1D、1型糖尿病;ESRD、末期腎疾患;CTRL、健康な対象;IGF-1、インスリン様増殖因子1;IGFBP3、インスリン様増殖因子結合タンパク質3;IF、免疫蛍光検査法;KRT20、サイトケラチン20、ALDH、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、EpCam、上皮細胞接着分子;CHGA、クロモグラニンA;RT-PCR、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応;ACTB、ベータアクチン。

【図16】in vitroミニ・ガットアッセイで候補タンパク質を試験するための選択戦略を示す図である。フロー図は、in vitroミニ・ガットアッセイで試験されるプロテオミクスプロファイルに基づき、タンパク質候補を選択するのに使用される戦略を表す。

【図17】陰窩ドメイン定量基準を利用する、発生したミニ・ガットの分析を示す図である。A~P。棒グラフは、本論文全体を通じてすでに報告済みの異なる条件で検出可能な、少なくとも1つの陰窩ドメインを有するミニ・ガットの発生割合(%)についてグループ化する。

【図18】末梢IGFBP3レベルが、健康な対象と比較して、炎症性腸疾患を有する個体で増加していることを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【実施例1】

【0106】

材料及び方法

膵腎同時移植(SPK)の待機名簿に登録されている遷延性T1Dを有する個体(T1D+ESRD)60例が本試験に登録、年齢及び性別が一致した健康な対象(CTRL)20例と比較された。胃腸症状、腸の運動性、及び腸粘膜病理学の評価により、DEを定義した。CoSCを、CoSC特異的マーカーの発現に基づき(フローサイトメトリー、RT-PCR、ウェスタンブロット、トランスクリプトームプロファイリング)、精製した結腸陰窩上で識別した。CoSC自己再生特性を、in vitroでのミニ・ガット発生割合(%)の評価、及び異なる条件での細胞系統マーカー発現の特徴付けを行うことにより評価した(図15)。幅広い血清プロテオミクスを、CoSCを制御し得る循環性因子を検出するのに使用し、次に候補因子をin vitroミニ・ガットアッセイで試験した(図16)。方法の詳細及び統計分析を以下に記載する。本試験は、Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico Ospedale San Raffaele, Milano, Italy (Enteropathy-Pancreas Kidney Transplantation/01 Secchi/Fiorina)治験審査委員会により承認を受けた。

【0107】

患者及び治験デザイン

年齢(41~43歳)、性別、及びT1Dの期間(29.4 ± 1.8 年)が一致し、膵腎同時移植(SPK)の待機名簿に登録されているT1D+ESRDを有する個体60例が、本試験に登録した。腎機能正常及び糖代謝パラメーター正常で、年齢及び性別が一致した健康な対象(CTRL)20例についても試験した。T1D+ESRDの対象はすべて、本試験登録時に強化インスリン治療を受けていたが、一方CTRL群は薬物治療を一切受けていなかった。T1D+ESRDの対象はすべて、抗血小板療法(ASA)及び抗高血圧(アンジオテンシン変換酵素インヒビター)として同一の治療を受けていたが、一方、60例中40例が、本試験登録時にスタチンの投与を受けていた。炎症性腸疾患並びにセリアック病の明確な兆候を有する対象は登録しなかった。

【0108】

T1D+ESRDの個体は、移植時の巨視的外科的評価に従い、SPK(n=30)又はK+T1D(n=30)の移植を受けた後、8年間フォローアップされた(平均フォローアップ: 8.6 ± 1.1 年)。経口抗凝固剤を服用する個体は含まれなかった。SPKの個体はすべて、全フォローアップ期間においてインスリン非依存性であったが、K+T1Dの個体は、強化皮下インスリン療法を受けた。すべての対象は、試験登録前にインフォームドコンセントを提出した。ルーチン臨床フォローアップに含まれない試験は、該当する治験審査委員会の承認の対象とされた(Enteropathy-trapianto/01 Secchi/Fiorina)。

【0109】

10

20

30

40

50

移植及び免疫抑制

移植用の臓器を、「北イタリア移植」臓器調達コンソーシアム(NITp、Milan)を通じて死去したドナーから取得した。ATG(サイモグロブリン、IMTIX、SANGSTAT社)で誘発した後、シクロスポリン(100~250ng/mlのレベル)、又はFK506(10~15ng/mlのレベル)、ミコフェノール酸モフェチル(500~2000mg/日)、及びメチルプレドニゾロン(10mg/日)を使用して、免疫抑制を維持した。移植後3~6カ月以内にステロイドを中止した。T1D+ESRD群及びSPK群に含まれるすべての患者は、移植片血栓症又は瘻孔性の血栓を予防するために抗血小板療法(80%ASA及び20%チクロピジン)を受けた。代謝状態、腎機能、及び血圧について、登録期間中、以後移植後2年毎に検査した。推定糸球体濾過率(eGFR)を、腎疾患における食事の修正(Modification of Diet in Renal Disease)(MDRD)の式(Leveyら、1999)を使用して計算した。

10

【0110】

胃腸症状評価尺度(GSRS)

胃腸症状を、健康な対象、遷延性T1Dの個体(T1D+ESRD)、並びに移植後2、4、及び8年目のSPK群及びK+T1D群においてGSRS質問票により評価した。胃腸症状評価尺度(GSRS)は、説明担当者(descriptive anchor)が定義する7等級化されたリッカート尺度を有する15項目からなる質問票である(Svedlundら、1988)。質問票は、胃腸症状を幅広く評価するように設計されたインタビューに基づく評価尺度として当初構成されたが、自己実施型の質問票となるように後に修正された。スコアが高いほど、症状は重度となる:スケールは最小値1から最大値7の範囲である。個体が試験への参加を中止する場合、利用可能な最後の観察所見時の数値が分析に提出される。項目は、要因分析に基づいてあらかじめ識別された5つの次元:腹痛症候群(3項目)、還流症候群(2項目)、消化不良症候群(4項目)、下痢症候群(3項目)、及び便秘症候群(3項目)にグループ化され得る。

20

【0111】

肛門直腸内圧測定

肛門直腸内圧測定に関するデータは、7つの管腔、及びプローブの端部に緊結された4cmラテックスバルーンを備えたカスタム仕様の、先端開口式、直径14-Fr、PVCプローブ(Bioengineering Laboratories Plc.、Milan、イタリア)を使用して、健康な対象についてすでに入手可能であったが、そのデータを遷延性T1Dの個体(T1D+ESRD)について肛門直腸内圧測定を実施することにより取得されたデータと比較した(Carringtonら、2014;Remes-Trocheら、2010)。10分間の導入期間後に括約筋の長さを測定し、肛門圧力を休止状態で15分間記録した。次に肛門をできる限りしっかりと、できる限り長く、少なくとも20秒間引き締めるように対象に指示した。発明者らの試験では、下記の項目について評価した:静止時張力、収縮張力、反射応答、及び切迫応答。

30

【0112】

病理学、免疫組織化学、及び電子顕微鏡検査

健康な対象、ベースラインの遷延性T1Dの個体(T1D+ESRD)、並びに移植後2、4、及び8年目のSPK群及びK+T1D群において、Welch Allyn社のオプティックシグモイドスコープを使用して結腸直腸内視鏡手技を実施した。腸粘膜試料を緩衝化ホルマリン(4%w/vホルムアルデヒド及び0.05Mアセテートバッファー)内で固定し、パラフィンワックスでルーチン的に処理した。形態的な評価を行うために、各登録症例の厚さ3µmの切片を、ヘマトキシリン&エオシン(H&E)で染色した。免疫組織化学では、厚さ3µmの切片を、ポリL-リジンコーティングスライドにマウントし、脱パラフィン化し、等級化アルコールから水に通して水とさせた。切片を、650Wの電子レンジ内の0.01Mクエン酸バッファー、pH6中に10分間浸漬することにより、抗原回復を実施し、並びに切片を3%過酸化水素中に10分間浸漬することにより、内因性ペルオキシダーゼ活性阻害を実施した後、一次抗体と共に4℃で18~20時間インキュベーションを実施し、その後アビジン-ビオチン複合体手順が続いた(Hsuら、1981)。0.03%の3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロリドを使用して免疫反応を顕現させ、次に切片をハリスヘマトキシリンで対比染色した。下記の抗体を使用した:Ki67(モノクローナル、クローンMIB1、1:100希釈、Dako社、Carpinteria、CA、米国)、アルデヒ

40

50

ドデヒドロゲナーゼ(モノクロナール、クローン44/ALDH、1:1000稀釈、Transduction Laboratories社、Franklin Lakes、NJ、米国)、EphB2(モノクロナール、クローン48CT12.6.4、1:200稀釈、Lifespan Biosciences社、Seattle、WA、米国)、LGR5(モノクロナール、クローン2A2、1:100稀釈、Origene Technologies社、Rockville、MD、米国)、hTERT(モノクロナール、クローンY182、1:500稀釈、Millipore社、Billerica、MA、米国)、グリセンチン(ポリクロナール、1:1250稀釈、Milab社、Malmo、スウェーデン)、膵臓ポリペプチド(ポリクロナール、1:500稀釈、Peninsula社、Belmont、CA、米国)、PYY(ポリクロナール、1:1000稀釈、Biogenesis社、Bournemouth、英国)、セロトニン(モノクロナール、クローンYC5、1:50稀釈、Biogenesis社)、ソマトスタチン(ポリクロナール、1:550稀釈、Dako社)、IGF-1(ポリクロナール、1:500、Abcam社)、及びIGF-1R(ポリクロナール、1:100、Cell Signaling Technologies社)、(Fiorinaら、2003)。超微細構造試験では、0.05Mカゴジレートバッファー、pH7.3中2%パラホルムアルデヒドと2%グルタルアルデヒドの混合物中において試料を4で2時間固定した。試料を1%四酸化オスミウム中、室温で1時間事後固定化し、次に脱水し、エボン-アラルダイト中に包埋した。超薄切片をダイヤモンドナイフで切り出し、ホルムパールフィルムであらかじめコーティングした200メッシュニッケルグリッド上にマウントした。超薄切片を、酢酸ウランとReynoldのクエン酸鉛の水溶液で染色し、その後Philips Morgagni 268D電子顕微鏡で検査した。統計分析用として、神経内分泌小胞の数($n>3$ 及び $n<3$)に応じて、症例をグループ化した。陰窩の単離では、抗生物質の混合物を含有する試料内で組織を収集し、次のパラグラフの記載に従い処理した。EphB2の免疫染色強度を、1(EphB2陰性グラジエントから1視野1陰窩当たり数個の細胞が陽性)~5(すべての縦方向の陰窩において強度のEphB2グラジエント)として等級化した。抗IGFBP3一次抗体(ポリクロナール、1:50稀釈、Sigma Aldrich社)を、1型糖尿病を有する患者から得た肝臓生検において免疫組織化学的に試験した。病理学所見を有さない肝臓生検を対照として使用した。これらの組織試料はすべて、イタリア、ParmaのUniversity of Parma、Unit of Pathology of the Department of Biomedical、Biotechnological、and Translational Sciencesで保管されているファイルに由来した。免疫染色強度を、1(軽度)、2(中等度)、及び3(強度)として、一方、その拡散を1(限局性)、2(ゾーン状)、及び3(拡散性)として等級化した。

【0113】

免疫蛍光検査法

肝臓生検から得た免疫蛍光検査試料を、63×油浸対物レンズ(oil objective)を備えた共焦点システムを使用して観察した(Axiovert 200M倒立顕微鏡と共に組み込まれたLSM 510メタスキャンヘッド;Carl Zeiss社、Jena、ドイツ)。連続的で独立した光学経路を使用して、画像をマルチトラックモードで取得した。下記の一次抗体を使用した:ウサギIGFBP3(1:10、Sigma社)、マウスHep Par-1(1:20、モノクロナール、Dako社)、マウスCD163(1:100、クローンMRQ26、CellMarque社)。

【0114】

細胞系統マーカーの発現を評価するために、IGFBP3を含め/含めずに、遷延性T1D血清+高濃度グルコース(35mMグルコース)を含め/含めずに同時培養したミニ・ガット、及びT1D+ESRD個体の陰窩から得たミニ・ガットを、免疫蛍光分析用としてビメンチン、シトケラチン20(Cytocheratin 20)、アルデヒドドデヒドロゲナーゼ、及びシナプトフィシンで染色した(図15: A1~A4、B1~B4、C1~C4、D1~D4、E1~E4)。下記の一次抗体を使用した:マウスビメンチン(1:80、モノクロナール、クローン:V9、Dako社)、マウスアルデヒド(1:1000、モノクロナール、クローン:44、BD社)、マウスシトケラチン20(1:100、モノクロナール、クローン:Ks20.8、Dako社)、及びシナプトフィシン(1:100、モノクロナール、クローン:syn88、BioGenex社)。

【0115】

in situハイブリダイゼーション

標準手順に従い、ヒト結腸粘膜のパラフィン切片を脱パラフィン化し、再水和した。0.2M HClを使用して、室温で15分間切片を処理した後、切片をPBS中で3回洗浄し、プロテ

ナーゼK(PBS中30 µg/ml)中、37 °Cで15分間インキュベートした。プロテイナーゼK活性を中和するために、PBS中0.2%グリシンを1分間添加し、試料をPBS中で2回洗浄した。4% PFA中、室温で10分間事後固定化し、PBS中で3回洗浄した後、試料を1.5%トリエタノールアミン、0.15% HCl、及び0.6%無水酢酸を含有する水溶液中で5分間、2回インキュベートすることにより、ヒストンアセチル化を実現した。次いで試料を洗浄し、ハイブリダイゼーション溶液(50%ホルムアミド、5×SSC、pH4.5、2%ブロッキング試薬(Roche社)、0.05%CHAPS(Sigma社)、5mM EDTA、50 µg/mlヘパリン(Sigma社)、及び50 µg/ml酵母菌RNA)中、68 °Cで1時間事前ハイブリダイズした。TMEM219では、ジゴキシゲニン標識プローブを、ハイブリダイゼーション溶液で750ng/mlに希釈し、65 °Cで24時間インキュベートした。ハイブリダイゼーション後の洗浄を、50%ホルムアミド/2×SSC中、65 °Cで3×20分間実施した。切片をTBS-Tバッファー(0.1MトリスHCl、pH7.5、0.15M NaCl、0.1%ツイーン20)中でリンスし、ブロッキング溶液(0.5%ブロッキング試薬、TBS-T中10%ヒツジ血清)中、室温で30分間ブロックした。ヒツジ抗DIG抗体(Fab断片、Roche社)を、ブロッキング溶液で1/2000に希釈し、4 °C、オーバーナイトでインキュベートした。この後、TBS-T、次にNTMバッファー(0.1Mトリス、pH9.5、0.1M NaCl、0.05M MgCl₂)中で試料を洗浄し、NBT/BCIP溶液(Roche社)中で24時間展開させた。

10

【0116】

CoSCの特徴付け

陰窩の精製

筋肉層及び粘膜下組織を、新鮮なヒト直腸生検試料から慎重に除去し、粘膜を抗生物質(Normocin、[Invivogen社、San Diego、California 92121、米国]、ゲンタマイシン[Invitrogen社、Carlsbad、CA、米国]、及びファンギゾン[Invitrogen社])の混合物と共に、室温(RT)で15分間インキュベートした。次に、組織を小片に切断し、10mMジチオスレイトール(DTT)(Sigma社、St. Louis、MO 63103、米国)と共に、PBS中、RTで5分間、2~3回インキュベートした。次に試料をPBS中8mM EDTAに移し、4 °Cで60~75分間ゆっくりと回転させた。上清を新鮮なPBSに置換し、試料を激しく振盪させ、結腸陰窩に富んだ上清を得た。ウシ胎仔血清(FBS、Sigma社)を最終濃度5%となるように添加し、単一細胞を取り除くために、分画を40×gで2分間遠心分離した。この洗浄手順を、2mM GlutaMax(Invitrogen社)、10mM HEPES(Sigma社)、及び5% FBS(Sigma社)が補充されたAdvanced DMEM/F12(ADF、Gibco社)培地を用いて3回反復した。

20

30

【0117】

単離したヒト結腸陰窩200~300ユニットを、マトリゲル50 µlと混合し、すでに記載したように、事前加温した24ウェル培養皿上に播種した。固化(37 °Cで15~20分間)後、陰窩に、陰窩完全培養培地600 µlを積層した[Wnt3a順化培地、及びGlutamax、10mM HEPES、N-2[1×]、レチノイン酸を含まないB-27[1×]、10mMニコチンアミド、1mM N-アセチル-L-システイン、50ng/mlヒトEGF(Life Technologies社、Grand Island、NY)、1 µg/ml RSP01(Sino Biological社、Beijing、中国)、100ng/mlヒトノギン(Peprotech社、Rocky Hill、NJ、米国)、1 µg/mlガストリン(Sigma-Aldrich社、St. Louis、MO)、500nM LY2157299(Axon MedChem社、Groningen、オランダ)、10 µM SB202190(Sigma社)、及び0.01 µM PGE2(Sigma社)が補充されたAdvanced DMEM/F12(Life Technologies社、Grand Island、NY)50:50]。培地を一日おきに交換した。RockインヒビターY-27632(10 µM、Sigma社)を、最初の2~3日間、培養物に添加した。精製した陰窩を8日間直接培養した。CHGA、KRT20、及びEPCAM(Life Technologies社、Grand Island、NY)を試験することにより、ミニ・ガットにおいて、並びにEphB2⁺及びEphB2⁻選別後の単一細胞内において、RT-PCRを用いて腸細胞及び腸内分泌細胞に関する細胞系統マーカーを評価した。生検手順及び単離処理が、in vitro培養におけるミニ・ガット形成効率を損なったおそれがあるという懸念を除外するために、コロニー形成効率(%)を新鮮分離した陰窩上で評価した。DAPI染色を実施して、CTRL及びT1D+ESRDの対象から得た新鮮分離した陰窩内の核の数を確認した。発生したミニ・ガットを測定する、より定量的な基準を追加するために、少なくとも1つの陰窩ドメインを有する発生したミニ・ガットについても計測を行い、割合(%)を計算した(図17:A~P)。遷延性T1

40

50

D(T1D+ESRD)血清及びCTRL血清上で測定したインスリン及びグルコースレベルを下記の通り報告する:

グルコースレベル(T1D+ESRD対CTRL、 178 ± 47.5 対 90 ± 5.5 mg/dl、 $p=0.0001$);

インスリンレベル(T1D+ESRD対CTRL、 12.9 ± 4.6 対 5.8 ± 1.6 μ IU/ml、 $p=0.009$)。

【0118】

フローサイトメトリー

CoSCマーカーであるEphB2(APC抗ヒトEphB2抗体、R&D社、Minneapolis、MN)、及びLGR5(PE抗ヒトLGR5、Origene社、Rockville、MD)の発現を、フローサイトメトリーにより、CD45-及びCD11b-陽性細胞(V450抗ヒトCD45及びCD11b、BD Biosciences社、San Jose、CA)を除去して測定した。ヨウ化プロピジウム(PI)を添加して(10μ g/ml)、死亡した細胞を除去した。培養を目的として単一細胞懸濁物を取得するために、EphB2⁺細胞もフローサイトメトリーにより選別した。ヒト-tert(hTERT)の細胞内検出を、細胞の透過処理、及び一次抗ヒトhTERT抗体(GeneTex社、Irvine、CA)、その後DAPI抗ヤギ二次抗体(Life Technologies社)を用いた染色により実施した。分析に関して、細胞はすべて、その他の表面又は細胞内のマーカーの評価前にPI⁻として最初にゲート化されたものである。試料は、BD LSR-Fortessa上で測定し、FSC Express 3.0(DeNovo Software社、Los Angeles、CA、米国)により分析した。

10

【0119】

in vitroミニ・ガット生成試験

陰窩を、健康な対象の直腸生検試料から単離し、これまでの記載に従い培養して、ミニ・ガットを生成した。高血糖状態を生み出すために、異なる濃度(35mM:高濃度グルコース;5mM:正常グルコース)でグルコースを添加することにより培養培地を改変した。尿毒症の状態を模倣するために、ESRDを有する遷延性T1Dの個体から得たヒト尿毒症血清を陰窩に添加し、これを陰窩培養法のセクションで報告したように培養した。8日後、陰窩を収集し、形態、ミニ・ガットの増殖、腸シグネチャーマーカー(EphB2、LGR5、h-TERT)、IGF-1R、及びTMEM219(Life Technologies社)、及びカスパーゼ9(Life Technologies社)の発現について、RT-PCRを使用して検査した。IGFBP3の抗アポトーシス効果を確認するために、汎カスパーゼインヒビター(カスパーゼインヒビター-Z-VAD-FMK、20mM、Promega社、Madison、WI)、カスパーゼ8選択的インヒビター(Z-IETD-FMK、BD Pharmingen社)、カスパーゼ9選択的インヒビター(Z-LEHD-FMK、BD Pharmingen社)、カスパーゼ3インヒビター-Z-DEVD-FMK(BD Pharmingen社)を、ミニ・ガット内でin vitroで使用した。

20

30

【0120】

通常FBSの代わりに、健康な対象のヒト血清、すなわちCTRL血清を含有する陰窩培養培地を用いて、単離した陰窩を培養するために、10%CTRL血清中でL-Wnt3細胞を増殖させて順化培地を生成し、この順化培地は、これまでに記載したような陰窩培養培地を得るために、Advanced DMEM/F12培地に50:50で更に添加される(陰窩の精製を参照)。

【0121】

ミニ・ガット生成において、選別したEphB2⁺細胞の特性を評価するために、選別した細胞2000個を、マトリゲル50 μ lと混合し、事前加温した24ウェル培養皿上に播種した。マトリゲルの固化後(37 $^{\circ}$ Cで10~15分間)、細胞に「単一細胞増殖培地」(=陰窩培養完全培地+10M Rockインヒビター-Y-27623)を積層した。培地を新鮮な単一細胞増殖培地で一日おきに置換した。Rockインヒビターは、7~9日間、培養培地中に含めた。

40

【0122】

免疫プロットング

腸生検試料の総タンパク質を、Laemmliバッファー(62.5mmol/lトリス-HCl、pH6.8、20%グリセロール、2%SDS、5% β -メルカプトエタノール)中で抽出し、その濃度を測定した(Lowryら、1951)。総タンパク質35 μ gを7%SDS-PAGEゲル上で電気泳動し、ニトロセルロース(Schleicher & Schuell社、Dassel、ドイツ)にプロットングした。プロットを、次にボンソーSで染色した。メンブレンを、TBS(トリス[10mmol/l]、NaCl [150mmol/l])、0.1%ツイン-20、5%脱脂粉乳中、pH7.4、25 $^{\circ}$ Cで1時間ブロックし、1:200に希釈した200mg/mlの

50

ポリクロナール抗ヤギEphB2抗体、又はポリクロナール抗ヤギLGR5抗体(Santa Cruz Biotechnology社、Santa Cruz、CA、米国)、又はモノクロナールIGF-1R(Santa Cruz Biotechnology社)、及びポリクロナールTMEM219(R&D社、Minneapolis、MN)、或いは1:1000に希釈したモノクロナールマウス抗 α -アクチン抗体(Santa Cruz Biotechnology社)と共に、TBS-5%ミルク中、4℃で12時間インキュベートし、TBS-0.1%ツイーン-20で4回洗浄し、次に1:1000に希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヤギIgG二次抗体(又は α -アクチンに対するウサギ抗マウス)(Santa Cruz Biotechnology社)と共にTBS-5%ミルク中でインキュベートし、最終的にTBS-0.1%ツイーン-20で洗浄した。得られたバンドを、増感化学発光を使用して可視化した(SuperSignal;Pierce社、Rockford、IL、米国)。

【 0 1 2 3 】

10

腸陰窩増殖のライブ画像検査

CTRL、T1D+ESRD、及びSPKの個体の腸陰窩を精製及び培養することにより取得したミニ・ガットのライブ画像検査を、5%CO₂及び95%空気からなる加湿された事前混合ガス気体が注入され、また装置全体が37℃に設定されたチャンバーを有する環境制御(イタリア、Oko-Lab社製)を備えたZeiss Axiovert S100上で実施した。画像を20分間隔で72時間取得した。Time Lapse(Oko-Lab社、イタリア)を使用して画像を取得及び処理し、必要な場合には、画像編集を、Adobe Photoshop Elements 7.0を使用して実施した。

【 0 1 2 4 】

形態画像分析

ミニ・ガットの画像を、倒立顕微鏡Leica DH/RBにより、0、5、及び8日目に撮影し、Axio Vision AC Release 4.3を用いて取得した。図で報告した画像は、5日目、倍率10×でのミニ・ガットを表す。

20

【 0 1 2 5 】

トランスクリプトームプロファイリング

全RNAを、RNeasy Miniキット(Qiagen社、Valencia、CA)を使用して、オンカラムDNase I消化により、精製した腸陰窩懸濁物から単離した。次に、各試料から得た全RNA3 μ gを、RT2 First Strandキット(C-03;SABiosciences社、Frederick、MD)を使用して逆転写した。本発明者らは、ヒト幹細胞RT2プロファイラーPCRアレイ(PAHS-405Z)、ヒト幹細胞シグナリングPCRアレイ(PAHS-047Z)、及び下記の遺伝子を含むカスタムアレイ:AXIN2、OLFM4、BMI1、RNF43、CDCA7、SLC12A2、CDK6、SOX9、DKC1、ZNRF3、ETS2、EPHB2、FAM84A、LGR5、GPX2、ACTB(SABiosciences社)を使用した。プロファイラーPCRアレイは、SYBR GreenベースのリアルタイムPCRを使用して遺伝子パネルの発現を定量的に測定する(Kosinskiら、2007)。アポトーシスマーカー及び酸化ストレスマーカーのトランスクリプトームプロファイリングを評価するために、ヒトアポトーシスPCRアレイ(PAHS-012Z、SABiosciences社)、及びヒト酸化ストレスPCRアレイ(PAHS-065Z、SABiosciences社)を用いた。

30

【 0 1 2 6 】

qRT-PCR分析

Trizol試薬(Invitrogen社)を使用して、精製済みの腸陰窩からRNAを抽出し、TaqManアッセイ(Life Technologies社、Grand Island、NY)を使用して、製造業者の指示に従い、qRT-PCR分析を実施した。Ct法を使用して、標準化した発現数値を決定した。定量的逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)のデータをACTBの発現に対して標準化し、Ct値を計算した。統計分析では、一元ANOVAにより、患者毎に全細胞集団にわたり遺伝子発現を比較し、その後、目的とする集団とその他の全集団の間で多重比較するためにボンフェローニ事後検定(Bonferroni post-test)を行った。また、利用可能なソフトウェア、RT² Profiler PCR Array Data Analysis(Qiagen社)も使用して、統計分析を実施した。2群比較では、スチューデントのt検定を採用した。分析は、新鮮な陰窩では単離後、及び/又はミニ・ガットでは培養から8日後に、3回実施した。Table 1-B(表2)は、使用したプライマーの主要な特徴について報告する。

40

【 0 1 2 7 】

【表2】

Table I-B (表2) :プライマー

遺伝子記号	UniGene番号	Refseq受託番号	バンドサイズ(bp)	参照位置
LGR5	Hs.658889	NM_003667	91	1665
EPHB2	Hs.523329	NM_004442	68	2908
TERT	Hs.492203	NM_198253	106	1072
ACTB	Hs.520640	NM_001101	174	730
IGF-IR	Hs.643120	NM_000875.3	64	2248
TMEM219	Hs.460574	NM_001083613.1	60	726
KRT20	Hs.84905	NM_019010.2	75	974
CHGA	Hs.150793	NM_001275.3	115	521
Epcam	Hs.542050	NM_002354.2	95	784
LRP1	Hs.162757	NM_002332.2	64	656
TGFbR1	Hs.494622	NM_001130916.1	73	646
TGFbR2	Hs.604277	NM_001024847.2	70	1981
カスパーゼ8	Hs.599762	NM_001080124.1	124	648
カスパーゼ9	Hs.329502	NM_001229.4	143	1405

10

20

【0128】

ELISAアッセイ

対象のすべての群、並びに治療した及び未治療マウスのすべての群のプール血清/血漿について、IGF-I及びIGFBP3レベルを、製造業者の指示に従い、市販のELISAキットを使用して評価した(R&D社及びSigma社)。

【0129】

ヒト不死化ヘパトーマ細胞系HuH-7を、異なるグルコース濃度、すなわち5.5mM、20mM、及び35.5mMのDMEM/10%FBS中で5日間培養した。培養上清を収集し、IGFBP3 ELISAキット(Sigma社)を使用して、製造業者の指示に従いIGFBP3を評価した。収集した細胞をトリプシンにより分離し、血球計算機で計測した。

30

【0130】

アッセイ内及びアッセイ間変動係数(CV)が3.0%及び5.0%である微粒子酵素免疫測定法(Mercodia Iso-Insulin ELISA)を用いて、インスリンレベルをアッセイした。

【0131】

組換えタンパク質及び介入試験

組換えヒトIGF-I(Sigma社、I3769)、(IGF-I)、組換えヒトIGFBP3(Life Technologies社、10430H07H5)、(IGFBP3)、及び抗IGF-IR(Selleckchem社、Boston、OSI-906)を、単離から+2日目に陰窩培養物に添加した。IGFBP3(Reprokine社、Valley Cottage、NY)を、naive B6マウス及びSTZで治療したB6マウスに、0.3mg/マウス/日で15日間投与した;IGF-I(Reprokine社)及びecto-TMEM219を、STZで治療したB6マウスに、糖尿病が2週間経過した後に、5µg/マウス/日の用量で20日間、及び100µg/マウス/日の用量で15日間それぞれ、in vivoで投与した。

40

【0132】

その他の分子を、in vitroミニ・ガットアッセイで試験し、単離から+2日目に陰窩培養物に添加した:アディポネクチン(R&D社)、サイモシン 4(Abcam社)、C反応性タンパク質(Merck Millipore社)、シスタチンC(Cell Signaling Technologies社)、クロモグラニンA(Life Technologies社)、フルクトースビスホスフェートアルドラーゼ(Novoprotein社)、オステオポンチン(R&D社)、膵臓リボヌクレアーゼ(RNASE社、Novoprotein)、血清アミロイドAタンパク質(Abcam社)、マンナン結合レクチンセリンプロテアーゼ1(MASP1、Novoprotein社)、腫瘍壊死因子- (TNF-、R&D社)、FaSリガンド(FasL、R&D社)。過酸化水素(H2

50

02、50 μ M)も、ミニ・ガットアッセイで試験した。

【0133】

組換えヒトecto-TMEM219の生成

合成用発現宿主として大腸菌(*E. coli*)を使用して、組換えヒトecto-TMEM219を生成した。要するに、細胞外TMEM219の遺伝子配列を得た：

THRTGLRSPDIPQDWWSFLRSFGQLTLCPRNGTVTGKWRGSHVVGLLTTLNFGDGPDRNKTRTFQATVLSQMGLKGGSSA
GQLVLITARVTTERTAGTCLYFSAVPGILPSSQPPISCSEEGAGNATLSPRMGEECVSVWSHEGLVLTKLLTSEELALCG
SR (配列番号2)

【0134】

細胞外TMEM219のDNA配列を、*lac*プロモーターを含有するハイコピープラスミドにクローン化し、次にこのプラスミドを細菌の大腸菌に変換した。IPTG(ラクトース類似体)を添加すると、*lac*プロモーターが活性化され、細菌に細胞外TMEM219(ecto-TMEM219)を発現させる。SDS-PAGE及びウェスタンブロットを、90%よりも高純度を確認するのに使用した。新規に生成したタンパク質、組換えヒトecto-TMEM219の分子量は80kdaであった。

10

【0135】

健康な対象に由来する陰窩を、これまでの記載に従い単離、培養し、ecto-TMEM219を、使用したIGFBP3濃度と比較して(2:1、1:1及び1:2)、3つの濃度(260ng/ml、130ng/ml、及び75ng/ml)で培養物に添加し、適切な対照を濃度毎に用意した。培養から8日後、カスパーゼ8及び9の発現、CoSCSCシグネチャーマーカー(*EphB2*及び*LGR5*)の発現、発生したミニ・ガットの数を更に評価した。

20

【0136】

低分子干渉RNA

健康な対象から取得し、単離した陰窩を増殖させ、完全培地内、及びこれまでに記載したように、高濃度グルコース及び遷延性T1D血清を添加して改変した培養用培地内において、*in vitro*でミニ・ガットを生成させた(オンライン法内の*in vitro*ミニ・ガット生成試験を参照)。培養から72時間後、これにより陰窩の回復が可能になり、HiPerFectトランスフェクション試薬(Qiagen社)6 μ lを含む無血清培養培地100 μ l中の低分子干渉RNA (siRNA; Flexitube siRNA SI04381013, Qiagen社, Valencia, CA)750ngを室温でインキュベートして、トランスフェクション複合体の形成を可能にした。陰窩を、このトランスフェクション複合体と共に、その通常の増殖条件下で6時間インキュベートした。遺伝子発現停止分析を、正常なミニ・ガットの発生割合(%)を評価することにより、24、48、及び72時間において実施した。対照siRNAを、遺伝子発現停止の効果を確認するための陰性対照として使用した。

30

【0137】

プロテオーム分析

1群当たり患者10例から得たプール血清8 μ lを、ProteoPrep 20スピンカラム(Sigma社)を使用して枯渇させ、したがって20種類の高度に豊富なタンパク質の除去を可能にした。約99%の枯渇を実現するため、製造業者の指示に従い、手順を2回反復した。総タンパク質濃度を決定するために、Direct Detect IR分光光度計、及び標準としてBSAを使用して、回収した上清を分析した。プロテオーム分析用として十分なタンパク質を取得するために、各プール品に由来する32 μ lを、上記のように処理した。文献で報告されたように(Wisniewskiら、2009)、フィルター支援式試料調製(Filter Aided Sample Preparation)(FASP)プロトコールを使用して、各試料に由来する総タンパク質40 μ gを溶液中消化した。C18自家製チップカラム(C18 Emporeメンブレン、3M社)を使用して試料を脱塩し、キャピラリークロマトグラフィーシステム(EasyLC、Proxeon Biosystems社、Thermo Scientific社)に注入した。3 μ mのReproSil Pur 120 C18-AQを充填した自家製の25cm逆相スプレーイング溶融シリカキャピラリーカラム上で、ペプチド分離を実施した。溶離液A(2%v/v ACN、0.5%v/v酢酸を含む純水)と溶離液B(0.5%v/v酢酸と共に20%v/v ACNを含む純水)のグラジエントを使用して、分離を実現した(流速0.15 μ L/分)(230分間で10~35%B、5分間で35~50%B、及び30分間で50~70%B)。ナノエレクトロスプレーイオン源(Proxeon Biosystems社)を

40

50

備えたLTQ-オービトラップ質量分析装置(Thermo Scientific社、Waltham、MA)を使用して、マススペクトロメトリー分析を実施した。ロックマスオプションを用いてフルスキャン質量分析スペクトルを取得し、また分解能を60,000に設定した。試料毎の取得質量範囲は、 m/z 300~1750Daであった。最も強度の高い二重及び三重荷電したイオン10種類を選択し、ノーマライズした衝突エネルギー37%を使用して、イオントラップ内で断片化した。MS/MS用にすでに選択した標的イオンを、120秒間、動的に除外した。すべてのMS/MS試料について、Mascot(v.2.2.07、Matrix Science社、London、英国)サーチエンジンを使用して分析を行い、UniProt_Human Complete Proteome_cp_hum_2013_12をサーチした。トリプシン特異性、未切断部位2箇所許容、固定修飾としてシステインカルバミドメチル化、タンパク質のN末端アセチル化、及び可変修飾としてメチオニン酸化により、サーチを実施した。質量許容差を、前駆体イオン及び断片イオンについて、5ppm及び0.6Daにそれぞれ設定した。タンパク質を定量化するためには、生データをMaxQuantソフトウェア、バージョン1.3.0.5に負荷した(Coxら、2011)。ラベルフリーのタンパク質量は、前駆体の強度に基づいた。1%未満のFDR、1タンパク質当たり最低2個のペプチドについて、ペプチド及びタンパク質を許容した。実験をテクニカルトリPLICATEで実施した。プロテオーム分析により取得したタンパク質の完全なデータセット(Table 1-C) (表3)を、MeVソフトウェアV. 4_8_1を使用して、スチューデントのt検定により分析した。更に対照プール品対T1D-E SDRプール品で有意に異なった(p 値 <0.01)、47種類のタンパク質を、階層的クラスタリング分析に提出した。

10

【 0 1 3 8 】

20

【表 3 A】

Table I-C (表3)。プロテオミク分析により同定された定量化タンパク質のリスト。表は、プロテオミク分析により検出されたタンパク質の番号と名称の間の対応について報告し、図10ではヒートマップとして表されている。

オリジナルの列	タンパク質の名称
1	14-3-3タンパク質 ζ/δ
4	アクチン、細胞質1;アクチン、細胞質1、N末端処理;アクチン、細胞質2;アクチン、細胞質2、N末端処理
5	アディポネクチン
6	アフアミン
8	α -1-抗キモトリプシン; α -1-抗キモトリプシンHis-Pro欠損型
9	α -1-抗トリプシン; AAT由来の短いペプチド
12	α -2-HS-糖タンパク質; α -2-HS-糖タンパク質A鎖; α -2-HS-糖タンパク質B鎖
13	α -2-マクログロブリン
14	α -アクチニン-1
16	アンジオテンシノーゲン;アンジオテンシン-1;アンジオテンシン-2;アンジオテンシン-3
17	抗トロンビン-III
18	アポリポタンパク質A-I;トランケーションされたアポリポタンパク質A-I
20	アポリポタンパク質A-IV
21	アポリポタンパク質B-100;アポリポタンパク質B-48
22	アポリポタンパク質C-I;トランケーションされたアポリポタンパク質C-I
23	アポリポタンパク質C-II
24	アポリポタンパク質C-III
25	アポリポタンパク質C-IV
26	アポリポタンパク質D
28	アポリポタンパク質F
29	アポリポタンパク質L1
31	アポリポタンパク質(a)
34	アトラクチン
35	基底膜特異的ヘパラン硫酸プロテオグリカンコアタンパク質;エンドレペリン; LG3ペプチド
36	β -2-糖タンパク質1
37	β -2-ミクログロブリン; β -2-ミクログロブリン形態、p15.3
39	β -Ala-Hisジペプチダーゼ
42	C4b結合タンパク質 β 鎖
43	カドヘリン-1; E-Cad/CTF1; E-Cad/CTF2; E-Cad/CTF3
44	カドヘリン-13
45	カドヘリン-5
46	カルレチクリン
50	カルボキシペプチダーゼNサブユニット2
51	軟骨オリゴマー基質タンパク質
54	CD44抗原

10

20

30

40

【表3B】

57	セルロプラスミン	
59	クロモグラニン-A;バソスタチン-1;バソスタチン-2; EA-92; ES-43;パ ンクレアスタチン;SS-18; WA-8; WE-14; LF-19; AL-11; GV-19; GR- 44; ER-37	
60	クラスタリン;クラスタリンβ鎖;クラスタリンα鎖;クラスタリン	
62	凝固因子V;凝固因子V重鎖;凝固因子V軽鎖	
63	凝固因子X;因子X軽鎖;因子X重鎖;活性化因子Xa重鎖	
65	コフィリン-1	10
66	コラーゲンα-3(VI)鎖	
68	補体C1rサブコンポーネント;補体C1rサブコンポーネント重鎖;補体C1 rサブコンポーネント軽鎖	
71	補体C2;補体C2b断片;補体C2a断片"	
72	補体C3;補体C3β鎖;補体C3α鎖; C3aアナフィラトキシン;補体C3bα 鎖;補体C3cα鎖断片1;補体C3dg断片;補体C3g断片;補体C3d断片;補体C 3f断片;補体C3cα鎖断片2	
73	補体C4-A;補体C4β鎖;補体C4-Aα鎖; C4aアナフィラトキシン; C4b- A; C4d-A;補体C4γ鎖	
74	補体C4-B;補体C4β鎖;補体C4-Bα鎖; C4aアナフィラトキシン; C4b- B; C4d-B;補体C4γ鎖	20
75	補体C5;補体C5β鎖;補体C5α鎖; C5aアナフィラトキシン;補体C5α鎖	
76	補体コンポーネントC1q受容体	
77	補体コンポーネントC6	
78	補体コンポーネントC7	
84	補体因子D	
88	補体因子I;補体因子I重鎖;補体因子I軽鎖	
89	コルチコステロイド結合グロブリン	
90	C反応性タンパク質; C反応性タンパク質(1-205)	
91	シスタチン-C	
92	シスタチン-M	30
95	EGF含有フィブリン様細胞外マトリックスタンパク質1	
96	内皮タンパク質C受容体	
97	細胞外マトリックスタンパク質1	
98	細胞外過酸化ジスムターゼ[Cu-Zn]	
99	フェチュイン-B	
100	フィブリノゲンα鎖;フィブリノペプチドA;フィブリノゲンα鎖	
101	フィブリノゲンβ鎖;フィブリノペプチドB;フィブリノゲンβ鎖	
102	フィブリノゲンγ鎖	
103	フィブロネクチン;アナステリン; Ugl-Y1; Ugl-Y2; Ugl-Y3	
104	フィビュリン-1	40
105	フィコリン-3	
106	フルクトースビスホスフェートアルドラーゼA;フルクトースビスホス フェートアルドラーゼ	
107	ガレクチン-3結合タンパク質	
108	γ-グルタミルヒドロラーゼ	
109	ゲルソリン	

【表 3 C】

111	グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ	
112	ハプトグロビン;ハプトグロビン α 鎖;ハプトグロビン β 鎖	
117	ヘパリン補助因子2	
122	低酸素症上方制御タンパク質1	
123	Ig α -1 C鎖領域	
125	Ig γ -1 C鎖領域	
126	Ig γ -2 C鎖領域	
127	Ig γ -3 C鎖領域	10
129	Ig重鎖V-II SESS領域; Ig重鎖V-II OU領域	
130	Ig重鎖V-III BRO領域; Ig重鎖V-III TEI領域; Ig重鎖V-III BUT領域; Ig重鎖V-III WEA領域	
134	Ig重鎖V-III VH26領域	
135	Ig κ C鎖領域	
136	Ig κ V-I鎖EU領域; Ig κ V-I鎖CAR領域	
142	Ig κ V-III鎖WOL領域; Ig κ V-III鎖SIE領域; Ig κ V-III鎖Ti領域; Ig κ V-III鎖GOL領域	
144	Ig κ V-IV鎖Len領域	
145	Ig λ V-I鎖HA領域; Ig λ V-I鎖WAH領域; Ig λ V-II鎖MGC領域; I g λ V-II鎖WIN領域	20
146	Ig λ V-III鎖LOI領域	
148	Ig λ -2鎖C領域; Ig λ -3鎖C領域; Ig λ -6鎖C領域	
153	免疫グロブリン λ 様ポリペプチド5; Ig λ -1鎖C領域	
154	インスリン様増殖因子結合タンパク質2	
155	インスリン様増殖因子結合タンパク質3	
156	インスリン様増殖因子結合タンパク質6	
158	インター α トリプシンインヒビター重鎖H1	
159	インター α トリプシンインヒビター重鎖H2	
160	インター α トリプシンインヒビター重鎖H3	30
161	インター α トリプシンインヒビター重鎖H4; 70kDaインター α トリプ シンインヒビター重鎖H4; 35kDaインター α トリプシンインヒビター 重鎖H4	
164	ケラチン、I型細胞骨格10	
165	ケラチン、I型細胞骨格9	
166	ケラチン、II型細胞骨格1	
167	キノノーゲン-1;キノノーゲン-1重鎖; T-キニン;ブラジキニン;リシルブ ラジキニン;キノノーゲン-1軽鎖;低分子量増殖促進因子	
168	ロイシンリッチ α -2-糖タンパク質	
171	L-乳酸脱水素酵素B鎖; L-乳酸脱水素酵素	
174	ルミカン	40
175	リンパ管内皮ヒアルロン酸受容体1	
176	リゾチームC	
178	マンナン結合レクチンセリンプロテアーゼ1;マンナン結合レクチンセ リンプロテアーゼ1重鎖;マンナン結合レクチンセリンプロテアーゼ1軽 鎖	

【表3D】

180	単球分化抗原CD14;単球分化抗原CD14、尿形態;単球分化抗原CD14、 メンブレン結合形態	
181	マルチメリン-1;血小板糖タンパク質Ia*; 155kDa血小板マルチメリン	
183	ニューデシン	
185	神経細胞接着分子L1様タンパク質;処理化神経細胞接着分子L1様タン パク質	
187	オステオポンチン	
188	ペプチダーゼインヒビター-16	10
189	ペプチジルプロリルシス・トランスイソメラーゼA;ペプチジルプロリル シス・トランスイソメラーゼ	
192	ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質4	
194	色素上皮由来因子	
197	プラスミノゲン;プラスミン重鎖A;活性化ペプチド;アンギオスタチン ;プラスミン重鎖A、短尺型;プラスミン軽鎖B	
198	血小板塩基性タンパク質;結合組織活性化ペプチドIII; TC-2;結合組織 活性化ペプチドIII(1-81); β -トロンボグロブリン;好中球活性化ペプチ ド2(74);好中球活性化ペプチド2(73);好中球活性化ペプチド2; TC-1;好 中球活性化ペプチド2(1-66);好中球活性化ペプチド2(1-63)	20
199	血小板糖タンパク質Ib α 鎖;グリコカリシン	
200	プレキシンドメイン含有タンパク質2	
203	プロフィリン-1	
204	プロリンリッチ酸性タンパク質1	
205	プロパージン	
206	プロスタグランジン-H2 D-イソメラーゼ	
207	タンパク質AMBIP; α -1-ミクログロブリン;インター α トリプシンイン ヒビター軽鎖;トリプスタチン	
209	プロトロンビン;活性化ペプチド断片1;活性化ペプチド断片2;トロンビン 軽鎖;トロンビン重鎖	
212	受容体型チロシンタンパク質ホスファターゼ γ	30
213	レチノール結合タンパク質4;血漿レチノール結合タンパク質(1-182);血 漿レチノール結合タンパク質(1-181);血漿レチノール結合タンパク質(1 -179);血漿レチノール結合タンパク質(1-176)	
214	Rho GDP-解離抑制因子2	
215	膵臓リボヌクレアーゼ	
216	スカベンジャー受容体システインリッチ1型タンパク質M130;可溶性C D163"	
217	分泌型及び膜貫通タンパク質1	
221	セロトランスフェリン	
222	血清アルブミン	40
223	血清アミロイドAタンパク質	
225	血清アミロイドP-コンポーネント;血清アミロイドP-コンポーネント(1- 203)	
226	血清パラオキシナーゼ/アリアルエステラーゼ1	
228	SPARC様タンパク質1	
230	タリン-1	

【表 3 E】

232	テネイシン-X
233	テトラネクチン
234	トロンボスポンジン-1
235	トロンボスポンジン-4
236	サイモシン β -4;造血系制御ペプチド
237	チロキシン結合グロブリン
239	トランスゲリン-2
240	トランスゴルジネットワーク内在性膜タンパク質2
242	トロポミオシン α -4鎖
243	血管細胞接着タンパク質1
244	バソリン
245	ビンキュリン
247	ビタミンK依存性タンパク質C;ビタミンK依存性タンパク質C軽鎖;ビタミンK依存性タンパク質C重鎖;活性化ペプチド
248	ビタミンK依存性タンパク質S
249	ビタミンK依存性タンパク質Z
250	ビトロネクチン;ビトロネクチンV65サブユニット;ビトロネクチンV10サブユニット;ソマトメジン-B
251	フォンビルブランド因子;フォンビルブランド抗原2
254	Zn \cdot α -2-糖タンパク質
258	ビタミンD結合タンパク質
259	補体因子H
266	フィブリリン-1
267	マンナン結合レクチンセリンプロテアーゼ1
270	補体因子H関連タンパク質4

10

20

30

【 0 1 4 3 】

候補タンパク質を選択する戦略

遷延性T1Dの対象及び健康な対照者において個別に分離された46個の因子のうち、本発明者らは、両群を比較して、LFQ強度においてより有意な差異を有する因子($p > 0.005$)を最初に選択し、12因子を除外した(図16)。次に、本発明者らは、本分野においてすでに報告されている研究や公開資料をサーチすることにより、因子の変化が腸の障害及び/又は糖尿病の発症と関連し得るかどうか評価した。これにより、その他の12因子を除外することとなった。また、本発明者らは、リンパ球様コンパートメント(lymphoid compartment)と主に関連する因子も除外した($n=5$)。本発明者らは17個の因子に辿り着いた。本発明者らは、細胞膜タンパク質($n=4$)を除外し、ミニ・ガットアッセイにおいて残りの因子($n=13$)について試験することとした。2つの因子が、*in vitro*試験において利用不能であった。本発明者らは、合計 $n=11$ のタンパク質について試験した。

40

【 0 1 4 4 】

動物試験

C57BL/6(B6)マウスを、Jackson Laboratory社、Bar Harbor、Maineから取得した。ハーバード大学医学大学院の動物管理使用委員会より承認を受けた施設ガイドラインに従い、すべてのマウスを管理及び使用した。ストレプトゾトシン注射によりマウスを糖尿病にさせた(225mg/kg、*i.p.*投与;Sigma社)。糖尿病は、3回連続測定したときに血中グルコースレベルが >250 mg/dLであることとして定義した。糖尿病性腸疾患を以下の通り評価した:要するに、全腸を絶命させたマウスから取り出し、PBSでフラッシュした。次に、結腸の端

50

部を切断し、2つの部分に分割した。結腸組織の一方の部分をホルマリン中に直接浸漬した一方、他方の部分は縦方向に切開して管腔及び内部粘膜を露出させ、次にホルマリン中に浸漬した。次に、組織をパラフィン包埋し、H&E及び免疫染色用に処理した。更に、結腸組織も切断し、これまでの記載に従い、結腸幹細胞の単離を実施した(Merlos-Suarezら、2011)。要するに、結腸を2~4mmの小片に切断し、断片を氷冷PBS 30mL中で洗浄した。断片を事前加温した20mM EDTA-PBSを含有する50mlの試験管に移し、37℃で30分間インキュベートした。インキュベーション後、懸濁した組織を、冷却PBS 30mlを含有する試験管に移し、遠心分離した。陰窩を冷却DMEMF12 13ml中に再懸濁し、PBSで洗浄し、トリプシン/DNAse溶液5~10ml中、37℃で30分間消化した。次に、陰窩をDMEMF12/EDTA中で再懸濁し、40ミクロンストレーナー内で2回濾過し、洗浄した。最終的に、陰窩をフロー培地(DMEM+FBS+EDTA)中で再懸濁し、抗EphB2-APC(R&D社)、マウス抗CD45-PerCP、及びマウス抗CD11b-PE(BD Pharmingen社)について染色した。FACSCaliburアナライザーを使用して試料を測定し、データをFlowJoにより分析した。組織の一部について急速凍結も行い、下記のマーカーについてRT-PCR試験を実施するためにTryzol中で保管した：

【0145】

【表4】

遺伝子記号:	UniGene番号:	Refseq受託番号:	バンドサイズ(bp):	参照位置:
LGR5	Mm.42103	NM_010195.2	64	571
EPHB2	Mm.250981	NM_010142.2	85	1696
Casp8	Mm.336851	NM_001080126.1	96	1525
Casp9	Mm.88829	NM_001277932.1	68	377
GAPDH	Mm. 304088	NM_008084.2	107	75

【0146】

最終的に、血漿及び血清を収集して、IGF-1(IGF-1 ELISAキット、R&D社)、IGFBP3(IGFBP3 ELISAキット、R&D社)、及びインスリンレベル(Mercodia Mouse Insulin ELISAキット)の分析を実施した。糖尿病の発現及び持続性を確認するために、血中グルコースを週2回、8週間モニタリングした。

【0147】

統計分析

データは、平均値及び平均値の標準誤差(SEM)として提示し、コルモゴロフ-スミルノフ検定により正規分布について、及びルビーン検定により等分散性について検定した。差異の統計的有意性を、両側t-検定及び二乗(χ²)検定により検定した。二群間の有意性を、対応のない両側スチューデントのt検定により判定した。多重比較では、ボンフェローニ補正を伴うANOVA検定を採用した。すべてのデータをStatistical Package for the Social Science(SPSS(登録商標)、IBM(登録商標)、SPSS Inc.社、Chicago、IL)に入力し、分析した。GraphPad Prismバージョン5.0(GraphPad Software社、La Jolla、CA)を使用して、グラフを生成した。すべての検定を5%有意水準で実施した。

【0148】

結果

腸の機能障害及び臨床症状は、遷延性T1Dに存在する

本発明者らは、遷延性T1D及び末期腎疾患を有する個体(T1D+ESRD)の集団、並びに健康な対象(CTRL)において、腸の形態及び機能について最初に特徴付けを行った。重度の腸症状、例えば下痢、腹痛、及び便秘等は、胃腸症状評価尺度(GSRS)質問票を使用して評価したとき、T1D+ESRDの個体において明白であった(図1:A~C)。症状は、肛門直腸括約筋機能の異常と関連した(図1:D~F)。腸粘膜は、健康な対象と比較してT1D+ESRDを有する個体で変化しており、陰窩数の減少、粘膜固有層の歪み、及びゾーン状の硬化症を伴った(図1:G

1~G2、H)。Ki67(MIB1抗体)染色により評価される上皮細胞増殖の有意な低下(図1:I1~I2、J)、神経退化の兆候(図1:K1~K2、L)、及び腸の神経内分泌細胞におけるセロトニン発現低下(図1:M1~M2、N)が認められ、このような個体にDEが存在することを確認した。

【0149】

CoSCは、遷延性T1Dで変化した

結腸陰窩について特徴付けを行い、健康な対象と比較してT1D+ESRDの個体において、いずれも局所的幹細胞のマーカーであるEphB2⁺の発現、及びアルデヒドデヒドロゲナーゼ(Aldh)⁺免疫反応性細胞の数が有意に低下していることが判明した(Carpentinoら、2009; Jungら、2011)(図1:O1~O2、P、Q1~Q2、R)。FACS分析においてPI⁻細胞上でゲート化したとき(図8:A~C)、健康な対象と比較して、T1D+ESRDの個体から得た腸陰窩から単離したEphB2^{hi}、EphB2^{hi}+LGR5⁺、及びEphB2^{hi}-TERT⁺細胞の割合(%)が顕著に低下することが明白であり(図2:A~B、C~E、図8:D~E)、それはRT-PCR(図2:F~H)、及びウェスタンブロット(WB)分析(図8F)によって確認された。T1D+ESRDから得た陰窩のトランスクリプトームプロファイリングにより、CoSCを制御しているこれまでに知られた経路であるノッチ経路(Notch1及び2、JAG1、DII1、Sox1及び2)、Wnt経路(APC、FZD1、DKC1、ETS2、FAM84A、GPX2、RNF43)、及びBMP経路(BMP1、BMP2、BMP3)の各遺伝子の発現が、健康な対象のこれらの遺伝子の発現と比較してそれよりも低下していることが立証された(図8G及びTable 11(表5))。

【0150】

【表5】

Table II (表5)。CTRL対T1D+ESRDの新鮮分離した結腸陰窩におけるトランスクリプトームプロファイリングにより同定された上方及び下方制御型の幹細胞標的遺伝子のリスト(少なくとも $p < 0.05$)。

下方制御型の遺伝子			上方制御型の遺伝子
ACTC1	APC	CD44	DVL1
BTRC	SOX1	SOX2	WNT1
CCND2	FZD1	ADAR	
ACAN	ALPI	CD8A	
COL1A1	COL2A1	COL9A1	
BMP1	BMP2	BMP3	
CCNA2	CCNE1	CDC42	
CDK1			
CTNNA1	CXCL12	PAR6A	
CD3D	CD8B	MME	
CD4			
DLL1	HDAC2	NOTCH1	
DLL3	JAG1	NOTCH2	
DTX2	KAT2A	NUMB	
EP300			
FGF2	FGF3	FGFR1	
GDF3	ISL1	KRT15	
MSX1	MYOD1	T	
GJA1	GJB1	GJB2	
KAT8	RB1	h-TERT	
NCAM1	SIGMAR1	TUBB3	
ABCG2	ALDH1A1		
PDX1			
IGF-I			
DHH			
BGLAP			

10

20

30

【0151】

CoSCシグネチャー遺伝子の分析により、LGR5、EphB2(Graczら、2013;Merlos-Suarezら、2011)、h-TERT(Breaultら、2008)、及びその他の腸幹細胞マーカー遺伝子(Hughesら、2011;Munozら、2012;Ziskinら、2013)も、やはり健康な対象と比較して、T1D+ESRDにおいて有意に過少発現していたことが判明し(図2I)、DEを有する個体でCoSCが変化していることを確認した。

40

【0152】

ミニ・ガットを*in vitro*で生成させたとき、遷延性T1Dで変化している

CoSCの自己再生特性を評価するために、本発明者らは、*in vitro*ミニ・ガットアッセイを使用した。実際、T1D+ESRDの個体から単離し、*in vitro*で8日間培養した陰窩は、小型のスフェロイド状のミニ・ガットを形成したが、両群の生存率(図8:H~I)、及びミニ・ガット形成効率(図8J)は同等であったにもかかわらず、健康な対象と比較して増殖は不奏功であった(図2:J1、J2、K)。循環性因子及び高濃度グルコースのCoSCに対する効果の解明を始めるに当たり、本発明者らは、健康な対象から取得し、単離した腸陰窩を、遷延性T1

50

Dの個体から得た血清を含め/含めずに、高濃度グルコース中、*in vitro*で8日間培養した(図2:L1~L4、M)。高濃度グルコースは、完全に成熟したミニ・ガットの生成を部分的に防ぎ、CoSCの自己再生特性変化では、ミニ・ガットが虚脱したように見えるように、遷延性T1Dの個体の血清と相乗作用を示した(図2:L2~L4)。遺伝子発現の分析により、CoSCシグネチャーの変化も判明し(図2N)、したがって高血糖及び循環性因子は、協調的に作用して、遷延性T1DにおけるCoSC再建特性を変化させることが示唆される。

【0153】

血清の偏りのないプロテオミクスプロファイリングにより、遷延性T1DにおけるIGFBP3レベルの増加が判明した

腸作用性のホルモンとしての役割を果たし、またCoSCの制御において役割を演じ得る潜在的な循環性因子を識別するために、本発明者らは、偏りのないプロテオミクスアレイを使用して、健康な対象の血清プロテオームをT1D+ESRDの個体と比較した。健康な対象と比較して、T1D+ESRDの個体において、プロテオミクスプロファイルが明瞭であることが明白になり、検出されたタンパク質の50%超が、1つの群又は他方の群を区別する(図3A)。いくつかのタンパク質が糖尿病に関連し、またいくつかは、増殖因子若しくは幹細胞関連タンパク質であり、又はおそらくは腸機能に関与した(図3A)。特に、IGF-1結合タンパク質(IGFBP2及び3)レベルは、健康な対象と比較して遷延性T1Dの個体において検出可能であり、IGFBP3はほぼ5倍に高まった一方(図3B)、IGFBP1、4、5、及び6は、ほぼ検出不能な状態に留まった。興味深いことに、遷延性T1Dの個体の肝臓では、クッパー細胞ではなく肝細胞が、健康な対象と比較してそれよりも高いIGFBP3免疫組織化学的発現を示し(図3:C1~C2、図8:K、L1~L6)、IGFBP3の肝臓合成及び放出が増加していることを示唆する。高濃度グルコースに曝露したヒト不死化肝細胞の上清において、IGFBP3レベルの増加が検出され、これによりIGFBP3の肝臓放出に対する高濃度グルコースの効果が確認された(図3D)。最終的に、遊離IGF-1の血清レベルは、健康な対象と比較して、遷延性T1Dにおいて有意に低下していると思われ(図3E)、循環性IGF-1及びIGFBP3レベルが、遷延性T1Dで変化していることが示される。

【0154】

末梢IGFBP3及びIGF-1はCoSCを制御する

CoSC及び腸上皮増殖の制御における循環性IGF-1及びIGFBP3の役割を更に解明するために、本発明者らは、単離した陰窩上でのIGF-1R及びIGFBP3受容体(TMEM219)の発現を、RT-PCR及びWB(図3:F、H、図8M)を使用して実証し(図3:F、H、図8:M、N1~N2)、免疫染色によりCoSC上でのIGF-1Rの発現(図8:N1~N2)、及び*in situ*ハイブリダイゼーションにより、TMEM219の発現(図3:G1~G2)を確認した。CoSC上でのIGF-1及びIGFBP3の役割を機構的に確認するために、本発明者らは、プロテオミクスプロファイリングにより識別されたいくつかの分子の効果について、その*in vitro*ミニ・ガットアッセイで試験した。潜在的標的を選択する発明者らの戦略は、補足情報で報告されている。T1D+ESRDの個体から取得した腸試料から生成した重度に変化したミニ・ガットは、組換えヒトIGF-1(IGF-1)を培養培地に添加することにより救済されたが(図3I)、一方、組換えヒトIGFBP3(IGFBP3)を添加すると、その結果、IGF-1で認められた陽性効果の抑制が引き起こされ、ミニ・ガットの発生が減少し、虚脱し、歪んだオルガノイドの形成が高まった(図3I)。IGFBP3は、IGFBP3受容体(TMEM219)(Baxter、2013)を介してIGF-1に独立的に作用することが最近明らかにされたので(Williamsら、2007)、IGFBP3は、IGF-1に結合することによりCoSCに対してその効果を発揮するのか、又はCoSC上のTMEM219を直接標的とすることにより発揮するのか、そのいずれかを明確にすることが必要であった。健康な対象及び遷延性T1Dの個体から取得し、IGFBP3と共に培養したミニ・ガットにおいて、カスパーゼ8及び9の発現が増加していること(図3J、図9:A~B)、一方、汎カスパーゼインヒビター(Z-VAD-FMK)を添加すると、又はその他のカスパーゼカスケードインヒビター(カスパーゼ3インヒビター)ではなく、カスパーゼ8及び9の両方の選択的インヒビターを添加すると、IGFBP3効果が抑制されること(図3K)を実証することにより、本発明者らは、IGFBP3は、CoSCに対して直接的なアポトーシス促進効果を有することを最初に確認した。本発明者らは、次に、IGF-1を添加しても、健康

な対象から取得し、IGFBP3に曝露したミニ・ガットにおいて、その発生は救済されないこと(図3L)を実証し、IGFBP3は直接的及び間接的IGF-I機構の両方を通じて作用し得ることを確認した。興味深いことに、高濃度グルコースのみでは、ミニ・ガットの増殖を完全に破綻させることはできず、また抗IGF-IRは、健康な対象から形成されたミニ・ガットの増殖及び形態に悪影響を及ぼさなかった(図3L)。健康な対象から生成したが、高濃度グルコース及び遷延性T1Dの個体由来の血清と共に培養したミニ・ガットにIGF-Iを添加すると、ミニ・ガットの形態は救済されたが、一方、IGFBP3は、ミニ・ガット培養物に添加したとき、IGF-Iの陽性効果を抑制した(図3L)。興味深いことに、遷延性T1Dから得た陰窩を培養する際に、健康な対象「CTRL」の血清を使用すると、ミニ・ガットの発生/形態がほぼ修復され、循環性因子、特にIGF-I/IGFBP3ダイアドがCoSCを制御していることを示す(図9:C~D)。本発明者らは、次に健康な対象から得たミニ・ガットにおいて、siRNAを*in vitro*で使用することにより、TMEM219の発現を遺伝的に調節した。ミニ・ガット中のTMEM219をノックダウンさせると、遷延性T1Dの血清と共にIGFBP3及び高濃度グルコースを添加しても、ミニ・ガットの増殖及び自己再生する能力が保持された(図3M)。SiRNAによりTMEM219を、また遮断抗体によりIGF-IRを同時ブロックしても、健康な対象又は遷延性T1Dから得た血清を使用したにもかかわらず、ミニ・ガットの発生に対して、何らかの更なる有益な効果を引き起こすことはなかった(図9E)。

10

【0155】

遷延性T1Dの個体の血清プロテオームで変化していると思われるその他の循環性タンパク質を、*in vitro*ミニ・ガットアッセイにおいて試験したが、ミニ・ガット増殖に対して何らかの有意な効果を示さなかった(図9:F~G)。C-ペプチド及びインスリンは、そのレベルがT1Dで一般的に変化しており、またIGF-IRに結合することによりIGF-I/IGFBP3ダイアドを妨害する可能性があり(図9H)、それらについても試験したが、何らの効果も示さなかった。

20

【0156】

IGF-I/IGFBP3ダイアドは、CoSCも有効に標的とし、陰窩に限らないことを更に確認するために、本発明者らは、単一細胞由来のミニ・ガットに対するその効果について試験した。本発明者らは、単離した陰窩に由来するEphB2⁺細胞をフローソートし、またTMEM219はその表面上で高度に発現していることを立証した(図4A)。本発明者らは、次に単一細胞由来のミニ・ガットに関する*in vitro*アッセイにおいてEphB2⁺細胞を培養し、高濃度グルコース及び遷延性T1D血清に曝露し、並びにIGFBP3を添加すると、単一細胞由来のミニ・ガットの増殖が有意に抑制され、したがって陰窩由来のミニ・ガットに関するこれまでの観察で報告された主要な特徴が再現されたことを確認した(図4B、図10:A1~A3)。更に、カスパーゼ8及び9の発現は、IGFBP3で治療したミニ・ガット、並びに高濃度グルコース及び遷延性T1D血清に曝露したミニ・ガットにおいて上方制御されていたが、一方、増殖のマーカーであるKi67は、有意に過少発現していた(図10:B~D)。

30

【0157】

CoSCを制御している、これまでに公知の経路に対するIGF-I/IGFBP3ダイアドの効果

CoSCニッチ機能(すなわち、Wnt/Notch/BMP)に関与していることがこれまでに公知の経路に対するIGF-I/IGFBP3ダイアドの効果を確認するために、本発明者らは、ニッチ特異的遺伝子転写物の発現をその幹細胞トランスクリプトームプロファイルから得た。IGF-Iは、T1D+ESRDの陰窩から得たミニ・ガット上のWnt/Notchシグナリング経路と関連したいくつかの因子の発現を有意に修復するが(図10E、Table III(表6))、一方、健康な対象の陰窩又はT1D+ESRDの陰窩から得たミニ・ガットにおいては、Wnt/Notch/BMP遺伝子発現に対するIGFBP3の影響は不十分である(図10F、Table III(表6))。

40

【0158】

【表6】

Table III (表6)。CTRL及びT1D+ESRDから取得し、IGFBP3及びIGF-Iを含め/含めずに培養した結腸陰窩におけるトランスクリプトームプロファイリングにより同定された上方及び下方制御型の幹細胞標的遺伝子のリスト(少なくとも $p < 0.05$)。

	下方制御型の遺伝子	上方制御型の遺伝子
CTRL+ IGF-I 対 CTRL	CD44, CDH1, COL9A1	ACAN, COL2A1, DLL1, FGF2, FGF3, GDF3, GJA1, IGF-I, ISL1, MME, MSX1, NCAM1, NOTCH2, PDX1, SOX1, SOX2, h-TERT
CTRL+IGFBP3 対 CTRL	CD8B, COL9A1, RB1, SOX1, h-TERT	ASCL2, COL2A1, DHH, DLL1, DTX1, DVL1, FGF3, FGF4, FOXA2, FRAT1, GDF2, HSPA9, IGF1, KAT2A, MSX1, MYC, NEUROG2, S100B, WNT1
T1D+ESRD+ IGF-I 対 T1D+ESRD	ACTC1, CD3D, CD4, COL9A1, DTX1, FGFR1	ABCG2, ADAR, BMP1, BMP2, BTRC, CDC42, CTNNA1, CXCL12, DLL1, DTX2, GDF3, HDAC2, ISL1, JAG1, NOTCH1, NOTCH2, NUMB, PARD6A, PDX1, RB1, SIGMAR1, h-TERT
T1D+ESRD+ IGFBP3 対 T1D+ESRD	ABCG2, ALDH1A1, ALPI, CD3D, CD4, CD44, CD8A, CDC42, FGF2, FGFR1, JAG1, SIGMAR1, SOX1, TUBB3	ASCL2, KAT2A, MYC, NCAM1, NEUROG2, SOX2

略号: IGF-I、インスリン様増殖因子1; IGFBP3、インスリン様増殖因子結合タンパク質3、CTRL、健康な対象、T1D、1型糖尿病、ESRD、末期腎疾患。

【0159】

こうして、IGF-Iは、Wnt/Notch/BMPシグナリングに關与するいくつかの遺伝子の発現を維持するだけでなく、IGFBP3も、これまでに公知のその他の経路の重要な標的遺伝子の発現に重大な変化をもたらすことなく、CoSCに対して独立に作用することを確認する。

【0160】

CoSC内のアポトーシス経路に対するIGF/IGFBP3ダイアドの効果

ミニ・ガットに対するIGFBP3のカスパーゼ媒介型の効果を明確にするために実施した、広範にわたるトランスクリプトーム分析(図4:C~D、図10:G~H、Table IV(表7))では、健康な対象の陰窩から増殖させたミニ・ガットにIGFBP3を添加すると、それはカスパーゼ-カスケード活性化因子(カスパーゼ8及び9)、及びアポトーシス促進遺伝子の有意な上方制御と關連する一方、抗アポトーシス遺伝子Bcl2は下方制御されることが明らかになった(図4C)。

【0161】

10

20

30

40

【表7】

Table IV (表7)。CTRL対T1D+ESRDの新鮮分離した結腸陰窩、並びにIGFBP3及びIGF-Iと共に培養した結腸陰窩におけるトランスクリプトームプロファイリングにより同定された上方及び下方制御型のアポトーシス促進/抗アポトーシス標的遺伝子のリスト(少なくとも $p < 0.05$)。

	下方制御型の遺伝子	上方制御型の遺伝子
T1D+ESRD 対 CTRL	BCL2, NOL3, FAS	CASP1, CASP10, CASP14, CASP5, CASP6, CASP7, CASP8, CASP9, CD27, CRADD, FADD, FASLG, HRK, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF11B, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF25, TNFRSF9, TNFSF8, TRADD, TRAF3
CTRL+ IGF-I 対 CTRL	BNIPL3	CASP14, CASP5, CD27, CRADD, FASLG, TNFRSF25, TNFSF8, TRADD
CTRL+IGFBP3 対 CTRL	BAX, BCL2	CASP5, CASP8, CASP9, FAS, TNFRSF1B, TNFSF8, TRADD, TRAF3
T1D+ESRD+ IGF-I 対 T1D+ESRD	CASP1, CASP10, CASP5, CASP6, CASP7, CASP8, CASP9, CRADD, FADD, TNFRSF11B, TNFRSF9, TNFSF8, TRADD, TRAF3	BCL2
T1D+ESRD+ IGFBP3 対 T1D+ESRD	BAX, BCL2, NOL3, TNFRSF1B	CASP9, CD27

略号: IGF-I、インスリン様増殖因子1; IGFBP3、インスリン様増殖因子結合タンパク質3、CTRL、健康な対象、T1D、1型糖尿病、ESRD、末期腎疾患。

【0162】

興味深いことに、健康な対象と比較して、T1D+ESRDの陰窩から増殖させたミニ・ガットでは、抗アポトーシス遺伝子(Bcl2、Fas、No13)も有意に過少発現していたが、一方、カスパーゼ関連遺伝子(カスパーゼ1、5、7、8、9、14)の大部分は過剰発現していた(図10G)。更に、その他のアポトーシス促進経路に關与する遺伝子の発現は、T1D+ESRDのミニ・ガットにおいて不変であった(すなわち、Fasリガンド、FADD、TNF)、又は阻害されなかった(TRADD)。IGF-Iを添加すると反対の効果が認められた(図4D、図10H)。酸化ストレス標的遺伝子の発現に変化がないこと(Table V(表8))、及び酸化ストレス因子について何らかの効果が存在しないことから(図10:I~J)、主要なアポトーシス関連カスパーゼ媒介型のIGFBP3機構と、これにより循環性IGFBP3はCoSCを直接制御していることを確認した(図4E)。

【0163】

【表8】

Table V (表8)。CTRL対T1D+ESRDの新鮮分離した結腸陰窩、並びにIGFBP3及びIGF-Iと共に培養した結腸陰窩におけるトランスクリプトームプロファイリングにより同定された上方及び下方制御型の酸化ストレス標的遺伝子のリスト(少なくとも $p < 0.05$)。

	下方制御型の遺伝子	上方制御型の遺伝子
T1D+ESRD 対 CTRL	DUOX1, PRDX4, STK25, GS S	CYBB, GPX5, KRT1, MT3, N OX4, OXR1, PTGS1, SFTPD
CTRL+ IGF-I 対 CTRL	DUOX1, TXNRD	AOX1, FTH1, GPX7, GSS, KR T1, LPO, MPO, NCF1, NOS2, NOX4, OXR1, PTGS1, PTGS2, SCARA3, SFTPD, TPO, TTN
CTRL+IGFBP3 対 CTRL	NCF1, SOD3	AOX1, GPX5, GPX7, HSPA1A KRT1, MB, MPO, NOX5, OXR 1, PTGS1, SFTPD, TPO, TTN, TXNRD2, UCP2
T1D+ESRD+ IGF-I 対 T1D+ESRD	DUOX1, EPHX2, MB, MT3, NCF1, OXR1, PTGS1, SOD3, SRXN1	MPO, PRDX4, PRNP, STK25
T1D+ESRD+ IGFBP3 対 T1D+ESRD	CYBB, DUOX1, EPHX2 GPX3, GSTP1, HSPA1A MGST3, NCF1, NQO1, PRDX 6, RNF7, TXN	NOS2, STK25

略号: IGF-I、インスリン様増殖因子1; IGFBP3、インスリン様増殖因子結合タンパク質3、CTRL、健康な対象、T1D、1型糖尿病、ESRD、末期腎疾患。

【0164】

循環性IGF-I/IGFBP3ダイアドを操作すると、前臨床モデルにおいて、糖尿病性腸疾患経過が変化する

*in vivo*でのIGF-I/IGFBP3循環性因子の意義を更に実証するために、本発明者らは、DEの前臨床モデルにおいて、IGF-I及びIGFBP3投与の効果について試験した。糖尿病の化学的誘発(ストレプトゾトシン[STZ]を使用して)から8週間後に、C57BL/6(B6)マウスは、結腸直腸組織内の陰窩数減少を示し(図4F)、該陰窩は、70%を超えるケースで深度及び幅の増加(図4:G、H1~H2、I)、及びAldh⁺細胞数の減少(図4:J、K1~K2)を示した。興味深いことに、これらのマウスは、IGFBP3の血清レベルの増加、及び低レベルのIGF-Iを示し、マウスインスリンレベルは、naive B6と比較して、それよりも低かった(図11:A~C)。Naive B6マウスにIGFBP3を腹腔内(i.p.)投与すると、局所的陰窩数の減少を引き起こし(図4:F、H3)、大部分の陰窩は、深度及び幅の増加(図4:G、H3、I)を示し、また未治療マウスと比較してAldh⁺細胞は有意に低下した(図4:J、K3)。これらの特徴は、STZで治療したB6マウスにIGFBP3を投与することにより更に悪化し(図11:D~G、H1~H2)、体重減少(図11J)、CoSCの喪失(図11:J~L)、及びカスパーゼ8及び9発現の上方制御(図11:M~N)といったエビデンスを有する。STZで治療したB6マウスにIGF-Iをi.p.投与しても、部分的に粘膜形態を改善し、正常な陰窩の数を増加させるに過ぎず、異常のままであり(図11D)、またAldh⁺細胞数を部分的に修復するに過ぎない(図11:G、H1~H2)。

【0165】

膵腎同時移植(SPK)による遷延性T1Dの治療は、DEの臨床的及び形態的特徴を回復させる

10

20

30

40

50

遷延性T1Dに対する最良標準治療はSPKであり、安定な糖代謝制御、ほぼ正常化したリスク因子、及び生存延長を実現した(Table VI(表9))(Fiorinaら、2004;Fiorinaら、2005;Fiorinaら、2010;Secchiら、1998;Smetsら、1999)。

【0166】

【表9】

Table VI (表9)。SPKにおいて正常血糖及び正常腎機能の両方が修復すると、それは、K+T1Dと比較して、最長8年間のフォローアップにおいて、長期にわたり安定なグルコース/脂質代謝及び血圧制御と関連した(データは、フォローアップの8年目について示す)。

パラメーター	T1D+ESRD (n=60)	SPK (n=30)	K+T1D (n=30)	P値
eGFR (ml/分/1.73m ²)	<15	65.6±20.2*	61.8±25.2 [§]	*, [§] <0.0001
HbA1c (%)	8.4±1.5	5.4±0.3*	7.5±1.4 [§]	*<0.0001; [§] <0.001
EIR (UI)	37.4±2.3	0*	26.0±7.0 [§]	*<0.0001; [§] 0.001
TG (mg/dl)	162.5±92.7	90.4±23.0*	147.1±98.0 [§]	*0.01; [§] 0.04
Chol (mg/dl)	201.0±45.7	185±27.2	191.1±41.1	Ns
LDL (mg/dl)	116.3±40.3	119.5±34.0	97.8±2.1	Ns
HDL (mg/dl)	48.1±14.4	51.4±4.1	43.13±5.7	Ns
収縮期BP	146.3±18.7	133.1±14.2*	140.1±15.7 [§]	0.03; [§] 0.04
拡張期BP	83.7±8.3	79.1±9.2	78.3±9.2	Ns

略号: T1D、1型糖尿病; ESRD、末期腎疾患; SPK、腎臓同時移植; K+T1D、1型糖尿病における腎単独移植; eGFR、推定糸球体濾過率; HbA1c、糖化ヘモグロビン; EIR、外因性インスリン要求度; TG、トリグリセリド; Chol、総コレステロール; LDL、低密度リポタンパク質; HDL、高密度リポタンパク質; BP、血圧; UI、国際単位。

【0167】

しかし、T1D+ESRDを有する個体も、腎単独移植で治療されるが、糖尿病の状態は存続する(K+T1D)(Fiorinaら、2001)。胃腸症状の有意な改善は、移植を受けた個体からなる発明者らのコホートにおいて、SPK後長期にわたり明白であった一方、K+T1D群はベネフィットを一切報告せず(図12:A~C)、DEは可逆的であることを示唆する。

【0168】

SPKによる遷延性T1Dの治療は、腸粘膜の形態及び局所的自己再生特性を再構築する

腸粘膜試料の分析により、SPK群において上皮コンパートメントの構造の有意な回復、代償性の上皮過形成が示された(図12:D1~D2)。遷延性T1Dの治療に奏功したとき、正常な陰窩の組織学及び数の回復は、SPK群において明白であった一方、これらの特徴のいずれも、腎移植のみを受け、糖尿病の状態が存続した個体では明白ではなかった(図12:D1~D2)。上皮細胞の増殖(MIB1+細胞)は、SPK後、ベースライン及び各時点におけるK+T1Dと比較して長期にわたり増加し(図4:L、M1~M2)、腸の形態、上皮再生、及び神経の特徴はほぼ正常化した(図12:E1~E2、F、G1~G2、H~I、J1~J2、K)。これは、遷延性T1DをSPKによ

り治療すれば、腸上皮の修復及び自己再生特性の回復が促進されることを実証する。

【0169】

遷延性T1Dの治療は、CoSCの修復を促進する

遷延性T1DのSPKによる治療は、Aldh⁺細胞の増加(図4:N、O1~O2)、及び腸陰窩内でのEphB2⁺発現(図4:P、Q1~Q2)と関連し、また単離された腸陰窩内のEphB2^{hi+}、EphB2⁺hTERT⁺、及びEphB2^{hi+}LGR5⁺細胞の割合(%)を、ベースラインと比較してほぼ正常化させる(図5:A~C)。CoSCマーカー発現(図5:D~G)、及びSPKの個体から得たミニ・ガットの増殖/形態も、ほぼ正常化した(図5H、図13:A1~A6)。トランスクリプトーム分析により、SPKは、幹細胞及びCoSCマーカー、並びにCoSCの保存に関する経路の発現をほぼ修復させることが判明した(図5I、図13B、Table VII(表10))。

10

【0170】

【表10】

Table VII (表10)。T1D+ESRDの新鮮分離した結腸陰窩と比較したSPKにおけるトランスクリプトームプロファイリングこれにより同定された上方及び下方制御型の幹細胞標的遺伝子のリスト(少なくともp<0.05)。

下方制御型の遺伝子	上方制御型の遺伝子			
DVL1	ACTC1	APC	CCND2	
WNT1	BTRC	SOX1	SOX2	
	ACAN	COL1A1	COL2A1	
	BMP3			
	CCNE1	CDK1		
	CXCL2			
	CD8B	MME		
	DLL3	HDAC2	JAG1	
	DTX2			
	FGF2			
	GDF3	ISL1	MSX1	
	MYO1			
	GJA1			
	RB1	h-TERT		
	NCA1	SIGMAR1		
	PDX1	DHH	BGLA	P

20

30

略号: EGF、上皮細胞増殖因子; FGF、線維芽細胞増殖因子、BMP、骨形成タンパク質

【0171】

SPKにより遷延性T1Dを治療すれば、CoSCの修復が促進されると結論される。

40

【0172】

SPKによる遷延性T1Dの治療は、循環性IGF-I及びIGFBP3を修復する

幅広いプロテオーム分析及び標的を定めた免疫測定法により、IGF-IRの発現がほぼ再構築されたことと関連して(図13C)、SPK後に、IGFBP3及びIGF-Iの血清レベルがほぼ正常化したことが判明した(図5:J~K)。このような結果は、低レベルのIGF-I(図5J)及びIGF-IR発現(図13C)、並びにIGFBPプロファイルにおいて部分的な回復のみ(図13D)を示したK+T1D群では不明瞭であった。SPK群及びK+T1D群の両群における、IGFBP3血清レベルと腸症状との間の有意な相関により、但し後者でより明白であったが、IGFBP3レベルの修復は、糖尿病性腸疾患の改善と関連することを確認した(図5:L~M、図14:A~G)。SPKにより遷延性T1Dを治療すれば、循環性IGF-I/IGFBP3ダイアドのグルコース関連の修復により、糖尿病性

50

腸疾患が改善する。

【 0 1 7 3 】

Ecto-TMEM219組換えタンパク質は、*in vitro*でのIGFBP3が媒介するミニ・ガット破壊を抑制し、またDEのマウスモデルにおいて、*in vivo*でCoSCを保存する。

CoSCに対するIGFBP3が媒介する有害効果を更に実証するために、本発明者らは、TMEM219細胞外ドメインに基づき、組換えタンパク質を生成した(ecto-TMEM219)。Ecto-TMEM219(IGFBP3とのモル比2:1)をCTRLから得た陰窩に添加し、IGFBP3と共に培養すると、ミニ・ガットに対するIGFBP3のアポトーシス促進効果が抑制され、陰窩の再生特性が保持されてミニ・ガットが生成される(図6A)。IGFBP3及びecto-TMEM219と共に培養したミニ・ガットでは、CoSCシグネチャーマーカー、EphB2、及びLGR5の発現が有意に回復し、CoSCの保存における好ましい効果が強調され(図6B)、それは高濃度グルコースで培養したミニ・ガットでも確認された(図6A)。更に、RT-PCRによるカスパーゼ8及び9の分析により、IGFBP3で培養したミニ・ガットにecto-TMEM219を添加したとき、IGFBP3単独と比較して、カスパーゼ8及び9の発現の正味の減少を立証した(図6:C~D)。本発明者らは、次にSTZ-B6マウスをecto-TMEM219で治療し、粘膜形態の改善を認め、陰窩の数、深度、及び幅が回復した(図6:E、F、G)。Ecto-TMEM219の投与は、STZで治療したB6と比較して、マウス体重の増加と関連すると共に(図6H)、CoSCが有意に復活し(図6:I~K)、カスパーゼ8及び9の発現が減少し(図6:L~M)、循環性IGFBP3レベルが再構築された(図6N)。

10

【 0 1 7 4 】

考察

20

糖尿病性腸疾患は、生活の質の低下、栄養失調、及び吸収障害と関連するので、T1Dを有する個体における臨床的に意義のある合併症を代表する(Bytzerら、2002;Farajら、2007;Talleyら、2001)。特に、遷延性T1Dを有する個体(T1D+ESRD)では、腸の障害が高い頻度と重症度を伴い生じ(Canoら、2007;Wuら、2004)、体重減少及び悪液質を引き起こし(Pupimら、2005)、腸疾患は遷延性T1Dの重要な合併症であることを示す(Atkinsonら、2013;Pambiancoら、2006)。発明者らの結果は、遷延性T1Dを有する個体は重度の腸の障害を経験したこと(Table VIII(表11))、及びこれらの臨床状態は、腸管上皮細胞の増殖低下及び神経退化の兆候を伴う腸粘膜の変化と関連することを実証している。

【 0 1 7 5 】

【表 1 1】

Table VIII (表11)。CTRL及びSPKと比較した、T1D+ESRDの個体における糖尿病性腸疾患評価結果の概要。

結果		T1D+ESRD 対 CTRL	SPK 対 T1D+ESRD
代謝的評価	グルコース代謝	---	+++
	脂質代謝	--	+
	血圧制御	--	+
腸の症状	下痢	---	+++
	腹痛	---	+++
	便秘	---	++
肛門直腸内圧測定	静止時張力	=	=
	収縮張力	--	=
	反射応答	--	=
	切迫容積	--	++
粘膜上皮再生	増殖	---	+++
	分化	---	+++
神経再生	神経	---	+++
	シュワン細胞	---	+++
結腸幹細胞のターンオーバー	結腸幹細胞	---	+++
	陰窩の増殖	---	+++

任意単位: +++ (高度の改善); ++ (軽度の改善); + (若干の改善); = 改善無し; --- (重度の悪化); -- (軽度の悪化)、- (若干の悪化)。評価を以下の通り実施した: T1D+ESRD対CTRL、SPK対T1D+ESRD、K+T1D対SPK。略号: T1D、1型糖尿病; ESRD、末期腎疾患; CTRL、健康な対象; SPK、腎臓同時移植。

【0176】

類似した特徴が、T1D及びDEの齧歯類モデルでも報告されている (Domenechら、2011)。発明者らのデータは、初めて、DEをCoSCにおける欠陥に結びつけ、IGFBP3が腸上皮のホメオスタシスの維持において重要な役割を有することを示す。高血糖は、T1Dの顕著な特徴であるが、発明者らの *in vitro* 試験は、この特徴はDEを十分に説明することはできないこと、また循環性因子が重要な役割を演じている可能性があることを示唆する。プロテオーム分析により、IGF-1がCoSCのホメオスタシスに關与する腸疾患因子として同定された。本発明者らは、次にIGF-1及びIGFBP3はCoSCを制御していること、及びこの軸は遷延性T1Dにおいて非機能的であることを確認した。発明者らのデータは、IGF-1は、陰窩の増殖を促進し、またIGF-1Rを通じてCoSCを制御する循環性腸疾患因子として作用する一方、IGFBP3は、循環性IGF-1に結合しそのバイオアベイラビリティを低減させることにより、IGF-1シグナリングをブロックし得ることを示している。更に、最も重要なこととして、本発明者らは、CoSCがTMEM219 (IGFBP3受容体) を発現していることを実証したが、そのCoSCに対して、IGFBP3が、アポトーシス促進性のIGF-1とは独立した機構を通じて作用し、これによりミニ・ガット増殖の不具合を誘発することを、本発明者らは明らかにした。この後者の効果は、カスパーゼ8及び9媒介型であり、またTMEM219依存性である; 実際、CoSC上にIGFBP3受容体 (TMEM219) が存在しないと、高濃度グルコース関連のCoSC傷害は大幅に減少した。飢餓及び悪液質と共にT1Dは、内因性インスリンにより制御され、刺激を受ける肝臓IGF-1の放出低下に起因して (Le Roith、1997; Sridhar及びGoodwin、2009)、循環性IGF-1レベルが低いことにより特徴付けられる (Bondyら、1994; Giustinaら、2014)。より重要なこととして、高血糖は、IGFBP3の肝臓合成及び放出に対して直接的な効果を有すると思われ

た。したがって、IGFBP3は、高血糖期間中に腸管吸収能力を低下させる肝臓ホルモンとして作用し得る。興味深いことに、SPKは、本発明者らの仮説に対する概念証明をもたらし、またCoSCを制御する循環性因子の存在に関する本発明者らの所見を支持した。本発明者らは、その研究においてDEの臨床的及び機能的特徴の目覚ましい改善を認めたと、そのような改善はCoSCの補充、並びに循環性IGF-1及びIGFBP3の修復と関連して、発明者らの仮説を強化する。最後に、新規に生成したecto-TMEM219組換えタンパク質は、糖尿病マウスのDEをin vivoで改善し、またin vitroで正常に増殖するミニ・ガットの能力を修復し、したがってCoSCを制御する際、及び新規の潜在的治療戦略の道を開く際の、IGFBP3の役割が確認される。まとめとして、発明者らの研究は、高血糖と関連したIGFBP3が媒介するCoSCの破壊は、DEにおいて明白であることを示す。本発明者らは、循環性IGF-1/IGFBP3は、CoSCを制御するホルモン性のダイアドに相当し、特に長期にわたる真性糖尿病により引き起こされた腸の障害を有する個体のための新規治療標的を代表することを示唆する(Bondyら、1994;Bortvedt及びLund、2012;Boucherら、2010)。

10

【実施例2】

【0177】

材料及び方法

患者及び試験デザイン

年齢(41~43歳)、性別、及びT1Dの期間(29.4 ± 1.8 年)が一致しており、膵腎同時移植(SPK)の待機名簿に登録されているT1D+ESRDを有する個体60例が、本試験に登録した。10~20年間、1型糖尿病(T1D)に罹患していた対象20例も登録した。腎機能が正常であり、且つ糖代謝パラメーターも正常である、年齢及び性別が一致した健康な対象(CTRL)20例についても試験した。T1D+ESRDの対象はすべて、本試験登録時に強化インスリン治療を受けていたが、一方CTRL群は薬物治療を一切受けていなかった。T1D+ESRDの対象はすべて、抗血小板療法(ASA)及び抗高血圧(アンジオテンシン変換酵素インヒビター)として同一の治療を受けていたが、一方、60例中40例が、本試験登録時にスタチンの投与を受けていた。炎症性腸疾患並びにセリアック病の明確な兆候を有する対象は登録しなかった。

20

【0178】

T1D+ESRDの個体は、移植時の巨視的外科的評価に従い、SPK($n=30$)又はK+T1D($n=30$)の移植を受けた後、8年間フォローアップされた(平均フォローアップ: 8.6 ± 1.1 年)。経口抗凝固剤を服用する個体は含まれなかった。SPKの個体は、全フォローアップ期間において、すべてインスリン非依存性であったが、K+T1Dの個体は、強化皮下インスリン療法を受けた。すべての対象は、試験登録前にインフォームドコンセントを提出した。ルーチン臨床フォローアップに含まれない試験は、該当する試験審査委員会の承認の対象とされた(Enteropatia-trapianto/01 Secchi/Fiorina)。

30

【0179】

尿中及び血清中IGFBP3評価

遠心分離後、新鮮血3mlから血清を収集した。尿試料を、新鮮収集、遠心分離し、-80で保管した。すべての対象の群について、そのIGFBP3レベルを、市販のELISAキットを使用して、製造業者の指示に従い(R&D社)、血清及び尿の凍結試料中で評価した。

【0180】

統計分析

Prism Graphpadソフトウェアを使用して、相関分析及びグラフ化を実施した。相関分析には、評価した個体の尿中に対する血清中のIGFBP3レベル、推定糸球体濾過率(eGFR)に対するIGFBP3血清レベルの評価が含まれた。P値が <0.05 であったとき、統計的に有意とみなした。

40

【0181】

腎機能及び糖代謝パラメーターの測定

MDRDの式を、 $\text{ml}/\text{min}/\text{m}^2$ として推定糸球体濾過率(eGFR)を評価するのに使用した。血液検査には、試験に登録した全対象のクレアチニン、血中グルコース、糖化ヘモグロビンの評価が含まれ、CTRLと、T1Dの個体及び遷延性T1D(T1D+ESRD)を有する個体との比較に重点

50

が置かれた。

【0182】

結果

血清IGFBP3レベルは、尿中IGFBP3レベルと相関する

本試験に登録した全対象におけるIGFBP3の血清及び尿中レベルの分析により、CTRLと比較して、及びT1Dの個体と比較した場合には、その程度はより少ないものの、T1D+ESRDの対象では、IGFBP3の血清(図7A)及び尿中(図7B)レベルの両方において有意な増加を立証した。IGFBP3の尿中レベルと血清レベルとの間の有意な相関は、評価した全対象で認められた(図7C)。血清IGFBP3レベルが高くなるほど、これと相関して尿中IGFBP3レベルは高くなる。これが腎機能と関連する可能性を排除するために、IGFBP3血清レベルと腎機能(eGFR)との間の対比を実施した。IGFBP3血清レベルは、ESRDを有する対象(eGFR<15ml/min/m²)で有意に高かった(図7D)。但し、eGFRが>15ml/min/m²である対象はESRDによる影響を受けず、T1Dの有無及び病歴に関係なく、eGFRとIGFBP3血清レベルとの間で、何らかの統計的有意な相関を示さなかった(図7E)。CTRLにおけるIGFBP3の尿中レベル対血清レベルの相関を考慮し、25°~75°のパーセンタイル内でその平均値とメジアン値を比較すれば、発明者は、下記のように尿中IGFBP3の範囲を設定することができる：

<350pg/ml:正常レベル(健康な対象に認められるレベル)

350~500pg/ml:変化レベル(疾患歴が<5年のT1Dに認められるレベル)

>500pg/ml:腸疾患を示唆する(遷延性T1D、その他のT1D合併症を伴い、>5年のT1Dの病歴を有するT1Dの対象に認められるレベル)。

本発明者らは、尿中IGFBP3レベルの正常範囲(<350pg/ml)も、その血清IGFBP3レベルとの相関を考慮することにより、図7F中のグレー部分で示すように識別することができる。

【実施例3】

【0183】

長期(>5年)炎症性腸疾患(IBD)を有する個体5例が登録し、糖尿病試料の分析に関して上記した方法と同一の方法に従い、IGFBP3、IGF-1の末梢レベル、及びIGFBP3/IGF-1の比についてスクリーニングされた。

【0184】

IGFBP3はわずかに増加したが、IGF-1のレベルは著しく低下し、IGFBP3/IGF-1比が全体的に変化したことが見出された(図18)。したがって、炎症性腸疾患では、多量のIGFBP3が遊離した状態にあり、腸幹細胞に対してその毒性効果を発揮するのに利用可能である。

【0185】

したがって、IGFBP3のインヒビターも、炎症性腸疾患の治療及び/又は予防において有益である。

(参考文献)

10

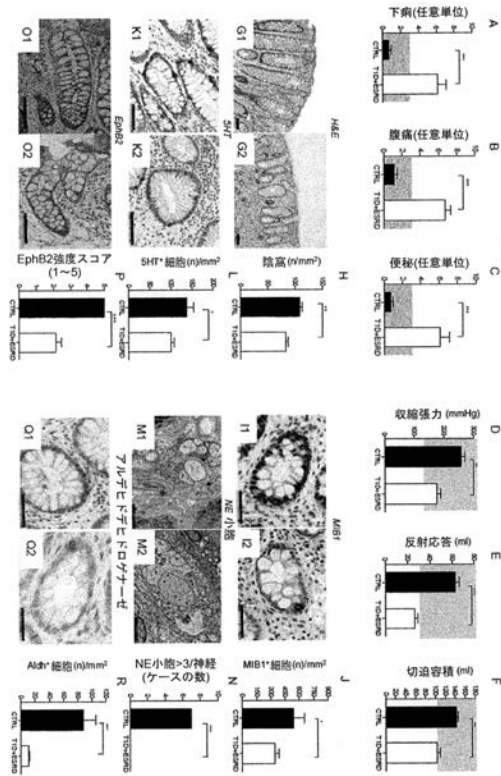
20

30

- The Diabetes Control and Complications Trial Res. Group (1993). *N Engl J Med* 329, 977-986.
- Atkinson, M.A. (2013). Type 1 diabetes. *Lancet* 383, 69-82.
- Barker, N. (2014). *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 19-33.
- Baxter, R.C. (2013). *J Cell Commun Signal* 7, 179-189.
- Bondy, C.A., et al., (1994). *Ann Intern Med* 120, 593-601.
- Bortvedt, S.F., and Lund, P.K. (2012). *Curr Opin Gastroenterol* 28, 89-98. 10
- Boucher, J., et al., (2010). *Sci Signal* 3, ra87.
- Breault, D.T., et al., (2008). *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 10420-10425.
- Bytzer, P., et al., (2002). *Am J Gastroenterol* 97, 604-611.
- Camilleri, M. (2007). Diabetic gastroparesis. *N Engl J Med* 356, 820-829.
- Cano, A.E., et al., (2007). *Am J Gastroenterol* 102, 1990-1997.
- Carlone, D.L., and Breault, D.T. (2012). *Cell Stem Cell* 10, 2-4.
- Carpentino, J.E., et al., (2009). *Cancer Res* 69, 8208-8215.
- Domenech, A., et al., (2011). *Int J Exp Pathol* 92, 400-412. 20
- Faraj, J., et al., (2007). *Diabet Med* 24, 1235-1239.
- Feldman, M., and Schiller, L.R. (1983). *Ann Intern Med* 98, 378-384.
- Fiorina, P., et al. (2004). *Diabetes* 53, 2291-2300.
- Fiorina, P., et al. (2001). *Diabetes* 50, 496-501.
- Fiorina, P., et al. (2005). *Diabetes Care* 28, 1303-1310.
- Folli, F., et al. (2010). *PLoS One* 5, e9923.
- Giustina, A., et al., (2014). *Acta Diabetol.*
- Gracz, A.D., et al., (2013). *Stem Cells* 31, 2024-2030.
- Hughes, K.R., Sablitzky, F., and Mahida, Y.R. (2011). *Inflamm Bowel Dis* 17, 213-220. 30
- Jung, P., et al. (2011). *Nat Med* 17, 1225-1227.
- Le Roith, D. (1997). *N Engl J Med* 336, 633-640.
- Medema, J.P., and Vermeulen, L. (2011). *Nature* 474, 318-326.
- Merlos-Suarez, A., et al. (2011). *Cell Stem Cell* 8, 511-524.
- Munoz, J., et al. (2012). *EMBO J* 31, 3079-3091.
- Pambianco, G., et al., (2006). *Diabetes* 55, 1463-1469.
- Pupim, L.B., et al., (2005). *Kidney Int* 68, 2368-2374.
- Sato, T., and Clevers, H. (2013). *Science* 340, 1190-1194. 40
- Secchi, A., et al., (1998). *Lancet* 352, 65; author reply 66.
- Smets, Y.F., et al., (1999). *Lancet* 353, 1915-1919.
- Sridhar, S.S., and Goodwin, P.J. (2009). *J Clin Oncol* 27, 165-167.
- Stange, D.E., and Clevers, H. (2013). *Stem Cells* 31, 2287-2295.

- Talley, N.J., et al., (2001). *Am J Gastroenterol* 96, 71-76.
- van der Flier, L.G., and Clevers, H. (2009). *Annual review of physiology* 71, 241-260.
- Williams, A.C., et al., (2007). *Cell Death Differ* 14, 137-145.
- Wu, M.J., et al., (2004). *Am J Kidney Dis* 44, 322-327.
- Zeki, S.S., et al., (2011). *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 8, 90-100.
- Zhao, J., Yang, J., and Gregersen, H. (2003). *Diabetologia* 46, 1688-1697.
- Ziskin, J.L., et al., (2013). *Gut* 62, 1012-1023. 10
- Levey, A.S., et al., (1999). *Annals of internal medicine* 130, 461-470.
- Svedlund, J., Sjodin, I., and Dotevall, G. (1988). *Digestive diseases and sciences* 33, 129-134.
- Carrington, E.V., et al. (2014). *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society.*
- Remes-Troche, J.M., et al., (2010). *Diseases of the colon and rectum* 53, 1047-1054.
- Hsu, S.M., Raine, L., and Fanger, H. (1981). *The j. of histochem. and cytochemistry* : 29, 577-580. 20
- Fiorina, P., et al. (2003). *Diabetes care* 26, 1129-1136.
- Lowry, O.H., et al., (1951). *The Journal of biological chemistry* 193, 265-275.
- Kosinski, C., et al. (2007). *PNAS* 104, 15418-15423.
- Wisniewski, J.R., et al., (2009). *Nature methods* 6, 359-362.
- Cox, J., et al., (2011). *Journal of proteome research* 10, 1794-1805.
- Merlos-Suarez, A., et al. (2011) *Cell Stem Cell* 8, 511-524.
- Gersemann M, Stange EF, Wehkamp J. *World journal of gastroenterology* 2011;17:3198-203. 30
- Schonhoff SE, Giel-Moloney M, Leiter AB. *Endocrinology* 2004;145:2639-44.
- Jung P, Sato T, Merlos-Suarez A, et al. *Nature medicine* 2011;17:1225-7.
- Merlos-Suarez A, Barriga FM, Jung P, et al. *Cell stem cell* 2011;8:511-24.
- Piscaglia AC, Rutella S, Laterza L, et al. *Journal of translational medicine* 2015;13:220.
- Senger S, Sapone A, Fiorentino MR, Mazzarella G, Lauwers GY, Fasano A. *PloS one* 2015;10:e0144634.
- Bartfeld S, Bayram T, van de Wetering M, et al. *Gastroenterology* 2015;148:126-36 e6.
- Boman BM, Huang E. *J. of clin. oncol.: official j. of the American Society of Clin. Oncol* 2008;26:2828-38. 40
- D'Addio F, La Rosa S, Maestroni A, et al. *Cell stem cell* 2015;17:486-98.
- D'Mello S, Trauernicht A, Ryan A, et al. *Inflammatory bowel diseases* 2012;18:236-45.
- Kundu P, Genander M, Straat K, et al. *Science translational medicine* 2015;7:281ra44.

【 図 1 】



【 図 2 】

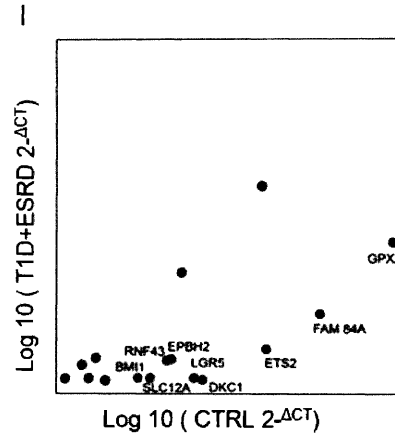
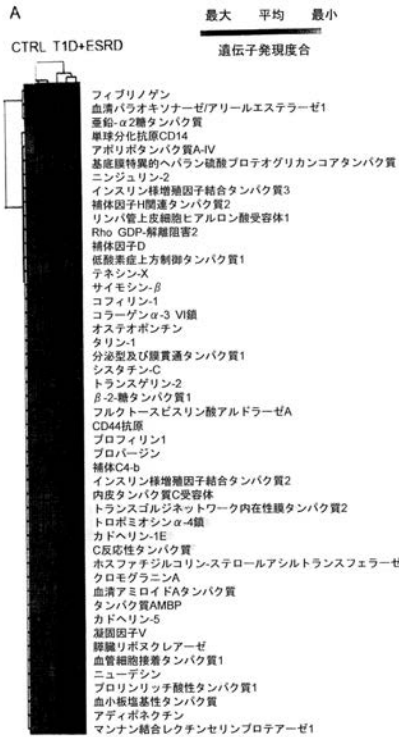
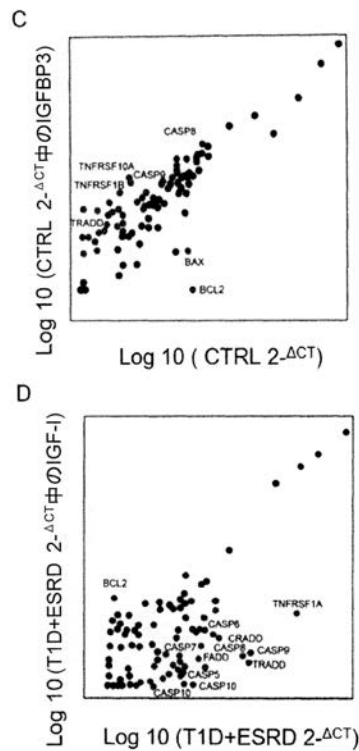


Fig. 2

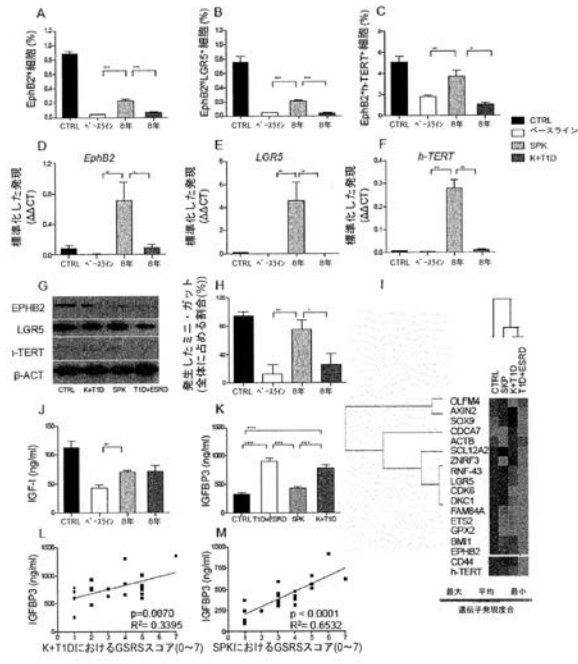
【 図 3 】



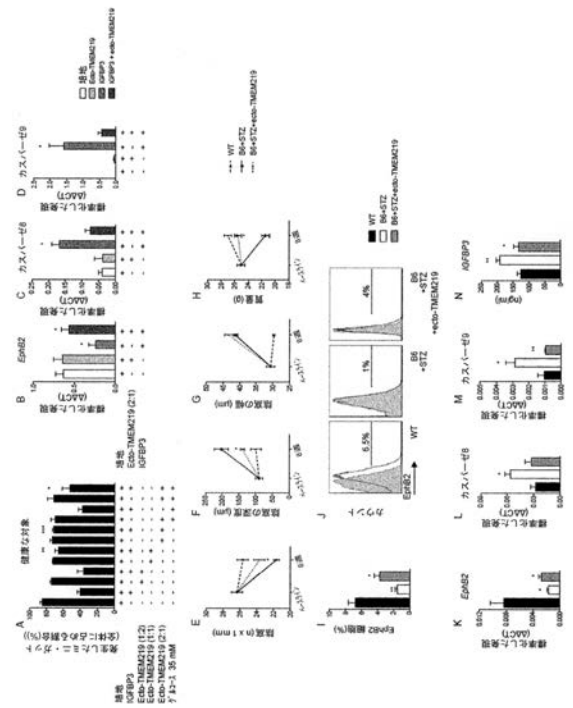
【 図 4 】



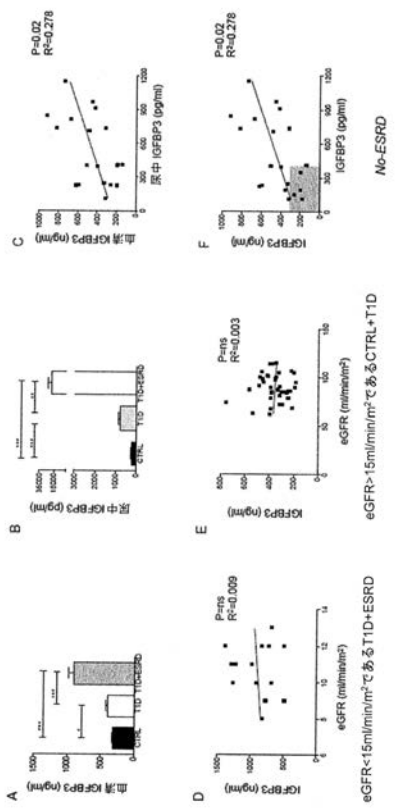
【 図 5 】



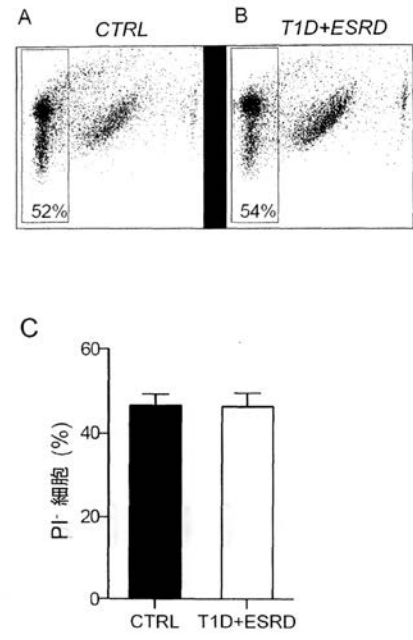
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 - 1 】



【 図 8 - 2 】

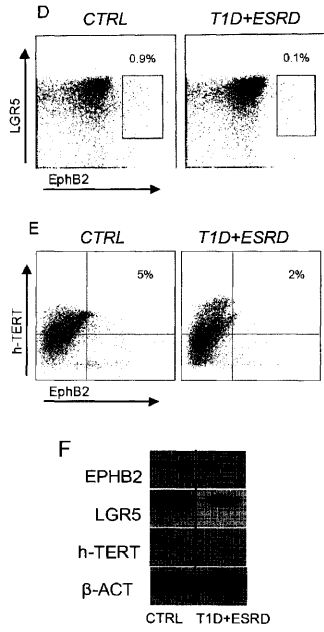


Fig. 8 (2/6)

【 図 8 - 3 】

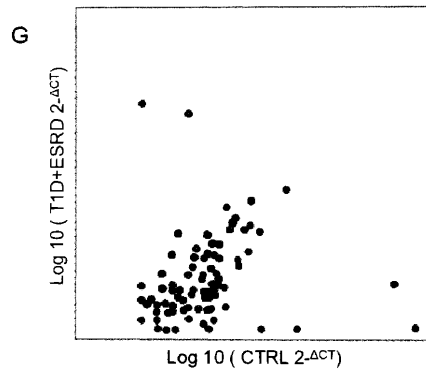
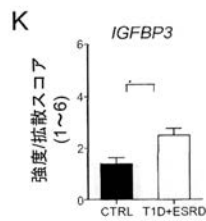
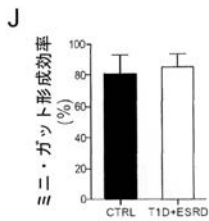
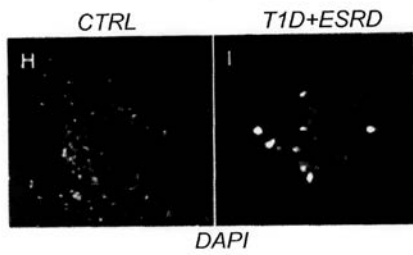
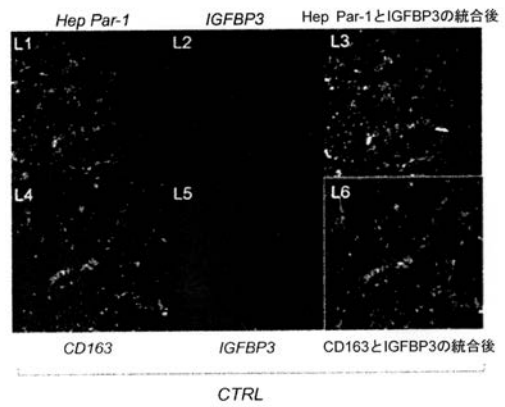


Fig. 8 (3/6)

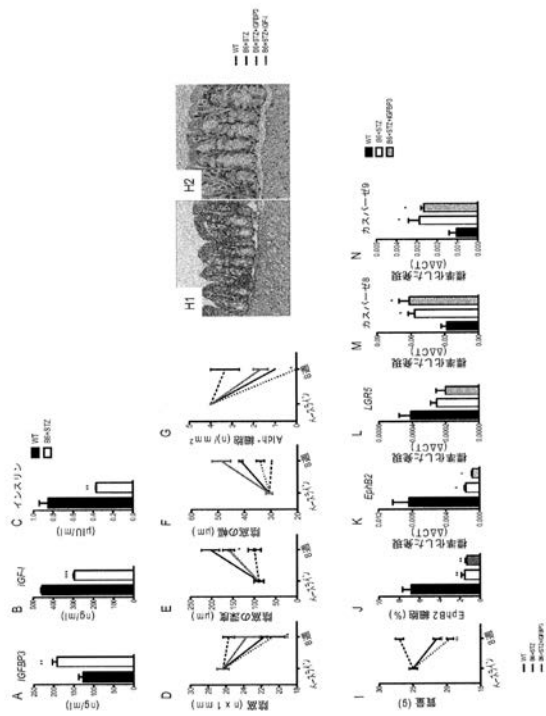
【 図 8 - 4 】



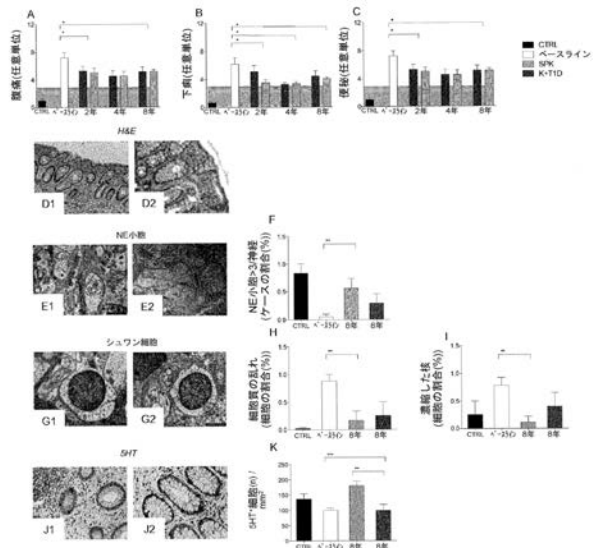
【 図 8 - 5 】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】

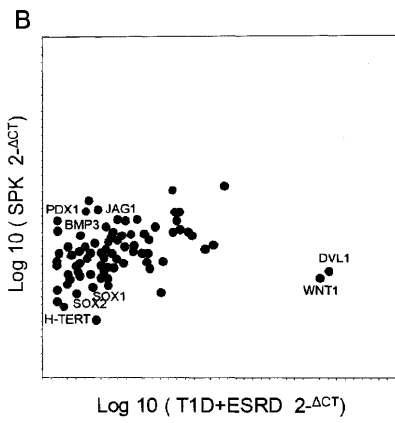
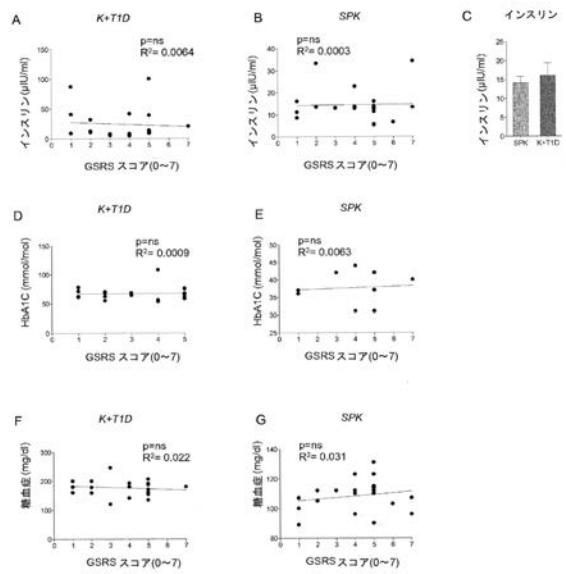
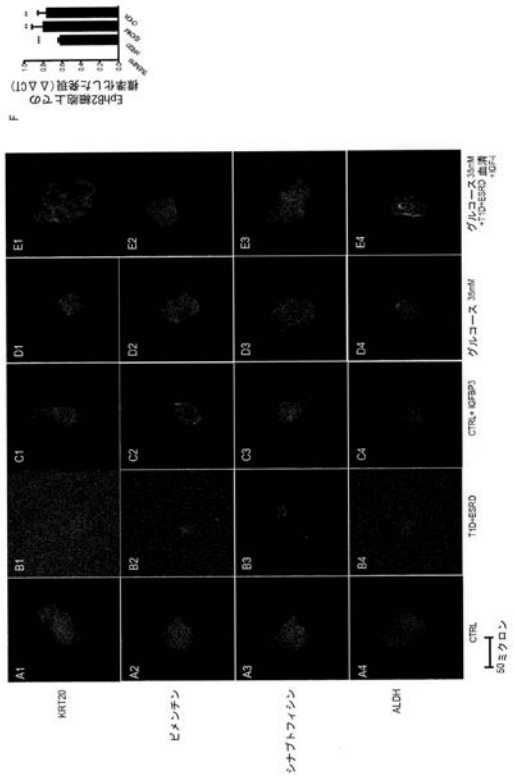


Fig. 13

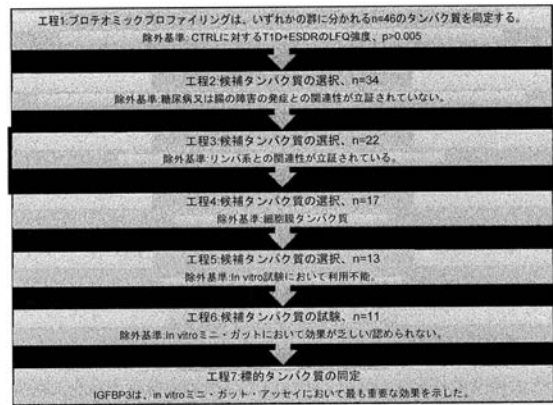
【 図 1 4 】



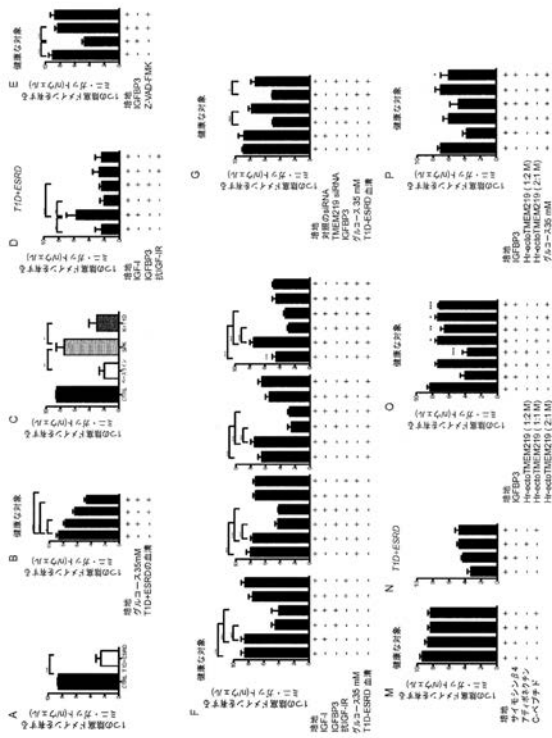
【 図 1 5 】



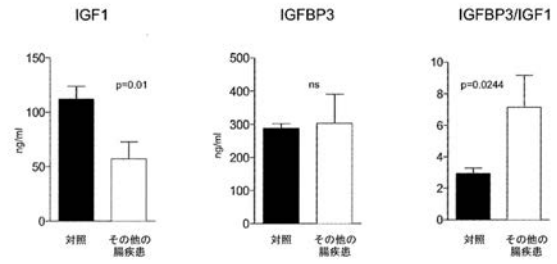
【 図 1 6 】



【 図 1 7 】



【 図 1 8 】



【配列表】

2018520212000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/062790

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	A61K38/17	A61K45/00 A61P1/00 A61K39/00
ADD.		
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)		
A61K A61P		
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 practicable, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ROBERT S. FLYNN ET AL: "Endogenous IGFBP-3 regulates excess collagen expression in intestinal smooth muscle cells of Crohn's disease strictures", INFLAMMATORY BOWEL DISEASES, vol. 17, no. 1, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 193-201, XP055301972, US ISSN: 1078-0998, DOI: 10.1002/ibd.21351 abstract	1-18
X	WO 2006/113880 A2 (UNIV COLUMBIA [US]; KIRMAN IRENA [US]; WHELAN RICHARD L [US]) 26 October 2006 (2006-10-26) claims	13-15, 18
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" 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
		"B" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
14 September 2016	26/09/2016	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Vandenbogaerde, Ann	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/062790

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SARAH F. BORTVEDT ET AL: "Insulin-like growth factor 1", CURRENT OPINION IN GASTROENTEROLOGY., vol. 28, no. 2, 1 March 2012 (2012-03-01), pages 89-98, XP055302399, GB ISSN: 0267-1379, DOI: 10.1097/MOG.0b013e32835004c6 cited in the application abstract -----	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/062790

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006113880 A2	26-10-2006	US 2009170133 A1 WO 2006113880 A2	02-07-2009 26-10-2006

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 P 1/12 (2006.01)	A 6 1 P 1/14	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 P 1/12	
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	A
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	H
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 38/16	
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 35/12	
	A 6 1 K 31/7088	
	G 0 1 N 33/53	D

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

(72)発明者 フランチェスカ・ダディオ
 イタリア・ミラノ・20132・ミラノ・ヴィア・オルジェティナ・60・オスベダール・サン・ラッファエーレ・エッセエツレエツレ内

(72)発明者 バオロ・フィオーリーナ
 イタリア・ミラノ・20132・ミラノ・ヴィア・オルジェティナ・60・オスベダール・サン・ラッファエーレ・エッセエツレエツレ内

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA13 AA17 AA19 AA20 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18
 NA05 NA14 ZA082 ZA422 ZA542 ZA661 ZA662 ZA732 ZB082 ZB112
 ZB322 ZC042 ZC202 ZC332 ZC352 ZC411 ZC412 ZC422 ZC751
 4C085 AA11 EE01
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA05 NA14 ZA66 ZA73 ZC41
 ZC75
 4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA05 NA14 ZA66 ZA73 ZC41 ZC75

專利名稱(譯)	IGFBP 3及其用途		
公開(公告)号	JP2018520212A	公開(公告)日	2018-07-26
申請号	JP2018515354	申請日	2016-06-06
[標]發明人	フランチェスカ・ダディオ パオロ・フィオーリーナ		
發明人	フランチェスカ・ダディオ パオロ・フィオーリーナ		
IPC分類号	A61K45/00 A61P1/00 A61P43/00 A61P1/04 A61P1/14 A61P1/12 A61K39/395 A61K38/16 A61K48/00 A61K35/76 A61K35/12 A61K31/7088 G01N33/53		
CPC分類号	A61K38/1709 A61K45/06 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/12 A61P1/14 A61P43/00 C07K16/18 C07K2317 /76 A61K39/395 G01N33/6872 G01N2800/06 A61K38/177 G01N33/6893 G01N2333/4745 G01N2800 /065		
FI分類号	A61K45/00 A61P1/00 A61P43/00.121 A61P43/00.111 A61P1/04 A61P1/14 A61P1/12 A61K39/395.A A61K39/395.H A61K38/16 A61K48/00 A61K35/76 A61K35/12 A61K31/7088 G01N33/53.D		
F-TERM分類号	4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/AA19 4C084/AA20 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084 /BA22 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZA082 4C084/ZA422 4C084 /ZA542 4C084/ZA661 4C084/ZA662 4C084/ZA732 4C084/ZB082 4C084/ZB112 4C084/ZB322 4C084 /ZC042 4C084/ZC202 4C084/ZC332 4C084/ZC352 4C084/ZC411 4C084/ZC412 4C084/ZC422 4C084 /ZC751 4C085/AA11 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA05 4C086/NA14 4C086/ZA66 4C086/ZA73 4C086/ZC41 4C086/ZC75 4C087/AA01 4C087 /AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/NA05 4C087/NA14 4C087/ZA66 4C087/ZA73 4C087/ZC41 4C087/ZC75		
代理人(譯)	村山彦 安倍晋三龍彦		
優先权	2015170679 2015-06-04 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(譯)
 本發明涉及IGFBP3抑制劑及其在治療和/或預防腸道疾病，特別是糖尿病性腸病或炎性腸病中的用途。本發明還涉及IGFBP3及其在診斷，預測腸道疾病，特別是糖尿病或炎性腸病中的用途。

(19) 日本國特許庁(JP)	(12) 公表特許公報(A)	(11) 特許出願公表番号 特表2018-520212 (P2018-520212A) (43) 公表日 平成30年7月26日(2018.7.26)
(5) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 C 0 8 6
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 7
A 6 1 P 1/14 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 65 頁) 最終頁に続く	
(2) 出願番号 特願2018-515354 (P2018-515354)	(7) 出願人 517423431	
(8) (22) 出願日 平成28年6月6日(2016.6.6)	オスベターレ・サン・ラファエーレ・エ	
(85) 翻訳文提出日 平成30年2月2日(2018.2.2)	ッセエツレエツレ	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2016/062790	イタリア・ミラノ・20132・ミラノ・	
(87) 国際公開番号 W02016/193496	ヴィア・オルジェティナ・60	
(87) 国際公開日 平成28年12月8日(2016.12.8)	(7) 代理人 100108453	
(3) 優先権主張番号 15170679.3	弁理士 村山 勇彦	
(32) 優先日 平成27年6月4日(2015.6.4)	(7) 代理人 100110364	
(33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)	弁理士 実広 信哉	
	(7) 代理人 100133400	
	弁理士 阿部 達彦	
		最終頁に続く
(5) 【発明の名称】 IGFBP3及びその使用		