

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7554048号  
(P7554048)

(45)発行日 令和6年9月19日(2024.9.19)

(24)登録日 令和6年9月10日(2024.9.10)

(51)国際特許分類	F I
A 6 1 K 38/48 (2006.01)	A 6 1 K 38/48
A 6 1 P 1/18 (2006.01)	A 6 1 P 1/18
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04

請求項の数 8 (全63頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2019-532043(P2019-532043)	(73)特許権者	518217305 タレンゲン インターナショナル リミテッド TALENGEN INTERNATIONAL LIMITED 中華人民共和国 999077 香港、ワ ンチャイ、ハーバー ロード 26、チャ イナ リソーシズ ビルディング、ルーム 2609
(86)(22)出願日	平成29年6月19日(2017.6.19)	(74)代理人	110002077 園田・小林弁理士法人
(65)公表番号	特表2020-502151(P2020-502151 A)	(72)発明者	リー, チーナン 中華人民共和国 518020 コアント ン, シエンチェン, ルオフー ディス トリクト, ティエンペイ サード ロード 最終頁に続く
(43)公表日	令和2年1月23日(2020.1.23)		
(86)国際出願番号	PCT/CN2017/089065		
(87)国際公開番号	WO2018/107705		
(87)国際公開日	平成30年6月21日(2018.6.21)		
審査請求日	令和2年6月18日(2020.6.18)		
審判番号	不服2022-11496(P2022-11496/J 1)		
審判請求日	令和4年7月25日(2022.7.25)		
(31)優先権主張番号	PCT/CN2016/110171		
(32)優先日	平成28年12月15日(2016.12.15)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 インスリン分泌を促進する方法

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

有効量のプラスミノーゲンを含む、糖尿病の対象におけるインスリン分泌を促進することにおける使用のための薬学的組成物であって、前記プラスミノーゲンが、Glu-プラスミノーゲン、Lys-プラスミノーゲン、及びそれらと90%以上のアミノ酸同一性を有する保存的置換バリアントからなる群から選択される、薬学的組成物。

## 【請求項2】

前記プラスミノーゲンはさらに糖尿病の対象におけるインスリンの発現を促進する、請求項1に記載の使用のための薬学的組成物。

## 【請求項3】

前記プラスミノーゲンは糖尿病の対象における食後のインスリン分泌を促進する、請求項1又は2に記載の使用のための薬学的組成物。

## 【請求項4】

有効量のプラスミノーゲンを含む、糖尿病の対象における食後のグルカゴン分泌を低下させることにおける使用のための薬学的組成物であって、前記プラスミノーゲンが、Glu-プラスミノーゲン、Lys-プラスミノーゲン、及びそれらと90%以上のアミノ酸同一性を有する保存的置換バリアントからなる群から選択される、薬学的組成物。

## 【請求項5】

前記プラスミノーゲンは、糖尿病の対象における血糖上昇の刺激に応答してインスリン分泌を促進することにより、血糖を正常または正常に近いレベルに戻す、請求項1～3の

いずれか 1 項に記載の使用のための薬学的組成物。

【請求項 6】

前記プラスミノーゲンは、前記インスリンの発現及び／または分泌を促進するとともに対象におけるグルカゴンの発現及び／または分泌を低下させることにより、対象における血糖を正常または正常に近いレベルに戻す、請求項 5 に記載の使用のための薬学的組成物。

【請求項 7】

有効量のプラスミノーゲンを含む、糖尿病の対象における血糖を減少させることにおける使用のための薬学的組成物であって、前記血糖は、血清ブドウ糖レベルと、血清フルクトサミンレベルと、血清糖化ヘモグロビンレベルのうちの一つ以上から選択される、薬学的組成物であって、前記プラスミノーゲンが、G 1 u - プラスミノーゲン、L y s - プラスミノーゲン、及びそれらと 90 % 以上のアミノ酸同一性を有する保存的置換バリアントからなる群から選択される、薬学的組成物。

10

【請求項 8】

前記血糖は血清ブドウ糖レベルである、請求項 7 に記載の使用のための薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、糖尿病被験者に有効量のプラスミノーゲンを投与することを含む、インスリン分泌を促進する方法に関するとともに、インスリン分泌を促進するための薬物にも関する。

20

【背景技術】

【0002】

糖尿病 (diabetes mellitus、DM) はよく見られる、遺伝的傾向のあるブドウ糖の代謝異常と内分泌障害性疾患であり、絶対性または相対性インスリンの分泌不足によって引き起こされる。2015年に全世界では 4.15 億の糖尿病患者があり、2040 年までに、糖尿病患者数は 6.42 億に達すると予想される [1]。糖尿病は人類の健康を深刻に害する重大な病気の一つである。

【0003】

糖尿病は主に糖代謝異常及び脂肪、タンパク質などの物質の代謝障害として表され、長期的に高血糖状態にあると、微小血管合併症、糖尿病腎症、糖尿病心筋症、糖尿病神経系病変、糖尿病に伴う皮膚病変、糖尿病合併感染などを含む深刻な糖尿病合併症を招いてしまう。その中で、糖尿病腎症及び糖尿病神経系病変は患者の生活の質に対する影響は巨大であり、害も深刻である。

30

【0004】

臨床的によく見られる糖尿病は、1型糖尿病 (type 1 diabetes、T1D M)、2型糖尿病 (type 2 diabetes、T2DM)、妊娠糖尿病、特殊型糖尿病の 4 種類に分けられる。その中で、T1DM と T2DM の患者は最も多く、妊娠糖尿病と特殊型糖尿病の患者は比較的に少ない。

【0005】

T1DM は遺伝的要因、環境要因 (例えば、ウイルス感染、糖尿病を引き起こす化学物質、飲食要因)、及び自己免疫要因に関係すると考えられる。研究によると、T1DM 関連の遺伝子部位は少なくとも 17 個あり、異なる染色体に位置している。環境要因については、T1DM の発症に影響がある環境要素は、ウイルス感染、糖尿病を引き起こす化学物質、及び飲食要素を含み、中ではウイルス要素が最も重要である。耳下腺炎、風疹ウイルス、巨大細胞ウイルスなどが T1DM の発症に関連していることは発見された。そのメカニズムは、ウイルスが臍島 細胞を直接に破壊し、ウイルスが臍島 細胞を損傷した後に自己免疫反応を刺激してさらに臍島 細胞を損傷することにある。糖尿病を引き起こす化学物質としては、アロキサン、ストレプトゾトシン (STZ)、ペンタミジンが挙げられ、これらは臍島 細胞に作用して臍島 細胞の破壊を招く。自己免疫要素は体液性免疫と細胞性免疫とを含む。体液性免疫は、患者の血液循環中に多種の抗臍島 細胞の自己抗

40

50

体が多く存在することとして表される。細胞性免疫は主に、H L A - D A 抗原の異常発現と、I L - 2 受容体と臍島細胞表面H L A - 1 類抗原の過剰発現とを臍島炎症性浸潤細胞と臍島 細胞の表面に観察でき、外周血のC D 4 + / C D 8 + の割合、及びI L - 1、T N F - 、I N F - のレベルが上昇することとして表される。これらの要因による病理的变化は臍島 細胞の破壊に集中し、体内的インスリンのレベルが絶対的に低下し、T 1 D Mを引き起こすので、T 1 D Mは自己免疫性疾患であると考えられている。

#### 【 0 0 0 6 】

T 2 D Mは多遺伝子遺伝性疾患であり、その発生は多源性であるとかんがえられ、その中では、環境要因と遺伝的要因が共に作用してインスリン抵抗を引き起こし、生体の抵抗機能によって同じレベル濃度のインスリンが正常レベルの機能を果たせなくなることとして表される。そして、生体は正常な血糖レベルに達するために、インスリンを「低い効率」で使用する状態を緩和するようにインスリンを過剰に分泌することになり、長期に亘って臍島 細胞に対する要求が高まり、最終的には臍島 細胞が「働きすぎ」て自己損傷になってしまい、インスリンの絶対的不足となる。

10

#### 【 0 0 0 7 】

##### D Mの発症メカニズム

D Mの発症メカニズムは複雑であり、主に家族の遺伝傾向、種族異質性、インスリン受容体の欠陥、インスリン受容体の基質による損傷、タンパク質チロシンホスファターゼ関連遺伝子の発現上昇、過度の免疫炎症性反応、脂質毒性、酸化ストレス、及びミトコンドリア損傷などと関連している [ 2 - 3 ] 。

20

#### 【 0 0 0 8 】

##### 1 . 遊離脂肪酸

遊離脂肪酸レベルの上昇は、インスリン抵抗の発症原因の一つでもあり、インスリン抵抗状態の重要な特徴の一つでもある。遺伝的要因または環境要因の作用下で、血液中の遊離脂肪酸レベルが高くなり、脂肪組織の貯蔵能力を超えるとインスリン抵抗がおこる。研究によると、長期的な高脂食は臍島 細胞の機能異常を引き起こすことになる。その原因として、高脂食は外周インスリン抵抗を引き起こす他、腹腔脂肪含有量を上昇させ、インスリンが脂肪分解を抑制する能力を低下させ、これによって遊離脂肪酸の含有量の上昇を促進し、さらにインスリン受容体及びその基質I R S - 1、I R S - 2 のチロシンリン酸化を抑制し、P 1 3 K の活性を抑制し、インスリンシグナル伝達経路が阻害されてインスリン抵抗が形成する。

30

#### 【 0 0 0 9 】

##### 2 . 炎症性反応

###### 1 ) 炎症とインスリン抵抗

T 2 D Mは軽度の非特異性炎性疾患である。近年の研究で示されているように、炎症によるインスリン抵抗の主なメカニズムは、炎性因子とインスリン受容体基質のシグナル伝達が交差し、非特異性炎症による炎性因子がI R S / P I 3 K シグナル経路に対して阻害作用を果たす一方、炎性因子によって活性化された一連のキナーゼがI R S のセリン、スレオニン部位のリン酸化を誘導して正常なチロシンリン酸化を阻害し、最終的にインスリンのシグナル伝達能力が低下してインスリン抵抗が誘発される [ 2 - 3 ] 。

40

#### 【 0 0 1 0 】

ターゲット細胞において、インスリンとその受容体との結合は受容体を活性化させることができ、その後細胞内のシグナル伝達経路では一連の細胞内伝達分子が生じて酵素とカスケード反応してシグナルが細胞内に逐次伝達されて增幅され、シグナルが最後にターゲット器官に伝達されて一連の生物学的効果が生じる。シグナル伝達経路は主に二つあり、一つはI R S - 1 - P I 3 K - P K B / A K T ルートであり、もう一つはマイトジェン活性化プロテインキナーゼ ( S h c / R a f / M A P K ) ルートである。一つ目の経路では、まず外因性インスリン及び / m またはブドウ糖の刺激の下でインスリンとその受容体とが結合し、受容体の内因性チロシンキナーゼが活性化される。活性化されたチロシンキナーゼは自身のリン酸化を実現すると同時に、インスリン受容体基質I R S のチロシン部位の

50

リン酸化を誘発する。活性化された IRS は細胞膜に移り、リン酸チロシン結合領域 (PTB) によりリン酸チロシンを IRS チロシンキナーゼにアンカーし、チロシンリン酸化された IRS はその SH2 構造領域を通して PI3K の調節サブユニット P85 に募集される。P85 は、ホスホイノシチドの 3 リン酸分子と結合し、ホスファチジルイノシトール 1 リン酸 (PIP) をホスファチジルイノシトール 2 リン酸 (PIP2) とホスファチジルイノシトール 3 リン酸 (PIP3) に変換し、これらはインスリンとその他の成長因子の第 2 のメッセンジャーであり、下流のシグナル分子ホスホイノシチドが頼るプロテインキナーゼ-1 (PDK1) 及び (または) プロテインキナーゼ c (PKC) のある亜型のアンカーポイントである。PDK1 はプロテインキナーゼ B (PKB、Akt とも呼ばれる) とある非典型的な PKC 亜型を活性化させることができる。活性化された PKB は、セリン / スレオニンリン酸化によってグリコーゲン合成酵素キナーゼ-3 (GSK3) を不活性化させる一方、哺乳動物のレパーマイシンターゲットポイント (mTOR) プロテインキナーゼを活性化させ、下流の 70ku-S6 キナーゼ (p70S6K) のリン酸化活性化を誘導する。mTOR プロテインキナーゼは「ATP 感受器」として、Ca<sup>2+</sup> / cAMP を通さずに p70S6K を活性化させ、タンパクの合成を制御し、遺伝子の転写を強化し、膵島 細胞肥大化及びその他の生物効果を促進することができる。PKB はある 転写因子のセリン / スレオニンリン酸化を直接に誘導して細胞の有糸分裂の発生を促進することができる [4-5]。二つ目の経路では、Ras の活性化は二つの通路を通じて実現できる。1) 活性化されたインスリン受容体は IRS-2 タンパク質を活性化させ、IRS-2 タンパク質はシグナルをアダプタータンパク質成長因子受容体結合タンパク質 2 (Grb2) に送り、シグナルタンパク質 GDP / GTP 交換因子 (SOS) と相互作用し、不活性化させられた Ras - GDP から変換された Ras - GT を活性化させて Ras の活性化を実現することができる。インスリン受容体の直接な作用により、シグナルタンパク質 Shc のチロシンリン酸化がされ、そして Shc と Grb2 とが結合して SOS ルート経由で Ras を活性化させる。活性化された Ras - GTP は Raf セリンキナーゼを募集し、MAPK キナーゼ、MAPK をこの順でリン酸化する。活性化された MAPK ははその他のプロテインキナーゼを活性化させて遺伝子転写の誘導や細胞アポトーシスの調節制御などの過程に参加させることができる [6]。

#### 【0011】

IRS-1 のセリン残基は、c-Jun アミノ末端キナーゼ (JNK)、IκB キナーゼ (IκK)、プロテインキナーゼ C (PKC) - などの多種の炎症キナーゼによりリン酸化されることは、これまでに実証されている。セリン 307 部位は、JNK により IRS-1 をリン酸化する主要な部位であり、その変異は、JNK により誘導される IRS-1 リン酸化と TNF がインスリンによる IRS-1 チロシンリン酸化に対する抑制作用を消失させることは、IRS-1 放射免疫分析法により明らかになった。JNK は、リン酸化された IRS-1 のセリン 307 により、インスリン受容体基質のチロシンリン酸化を低減し、インスリンシグナルの伝達を抑制する [7]。食事性肥満マウスと b / b マウスの肝臓、筋肉、脂肪組織の中の JNK 活性が著しく上昇していると Hirsumiらは発見した。遺伝子ノックアウト (JNK1 - / -) は、食事誘導性肥満マウスのインスリン抵抗現象を弱め、b / b マウスの肥満、高血糖、及び高インスリン血症を緩和することができる。肥満マウスの肝臓組織 IRS-1 のセリン 307 部位のリン酸化レベルは、リーンマウスより高いが、遺伝子ノックアウト (JNK1 - / -) の肥満マウスでは上昇することはないことから、IRS-1 のセリン 307 部位が JNK の体内作用のターゲットであることが分かる [8]。TNF により肝臓細胞インスリン抵抗を刺激誘起するモデルにおいて、JNK 阻害剤はセリン 307 のリン酸化を完全に遮断できることは研究によって明らかである。IκK は少なくとも二つのルートでインスリンシグナルの伝達を影響することができ、IRS-1 の Ser 307 部位のリン酸化を直接に誘導してもよく、IκB のリン酸化によって NF-κB をさらに活性化させ、多種の炎症因子の発現を刺激することによってインスリン抵抗を間接的に誘発してもよい。

#### 【0012】

10

20

30

40

50

炎症反応は、感染、組織損傷及びストレス反応後に人体免疫システムがこれらの損傷を対抗する防御反応であるとともに、糖尿病、心血管疾患及び腫瘍の病因または発症メカニズムでもある。

#### 【0013】

1993年には、Hotamisligilら<sup>[9]</sup>は動物実験により、インスリン抵抗の肥満ラットの脂肪組織の中で炎症性細胞因子、TNF-αのレベルが高いことを証明した。その後、多くの研究者は炎症と肥満、インスリン抵抗との関係を検討し始め、分子の発症メカニズムを研究し始めた。2006年にHotamisligilら<sup>[10]</sup>は代謝性炎症(metabolic inflammation)という新しい医学的定義を初めて提案し、この低度の慢性的な全身炎症が主に余分な栄養物質と代謝物質によるものであると強調した。代謝性炎症には、典型的な炎症と類似した分子とシグナルの伝達経路が存在する可能性があり、今まで認識している典型的な炎症とは違い、代謝性炎症には赤、腫れ、熱、痛み、機能障害の症状は存在しない。正常な状況では、生体内の環境は安定しており、炎症と代謝はそれぞれ及び相互に動的なバランスを保っている。生体に代謝障害が起こると、生体のバランス状態が破られ、免疫システムのバランスが崩れ、炎症シグナル伝達経路が刺激され、生体から一連の炎症因子の放出が促進される。一部の炎症因子はさらに自身の炎症反応を拡大し、炎症の滝効果が形成され、さらに生体からインスリン抵抗が発生し、代謝症候群を引き起こす。

10

#### 【0014】

TNF-αは代謝症候群と密接な関係があることは研究によって証明された。TNFはカケクチンとも呼ばれ、主に活性化したマクロファージ、ナチュラルキラー(NK)細胞、及びTリンパ球から生じるものであり、マクロファージから分泌されるTNFはTNF-αと呼ばれ、Tリンパ球から分泌されるリンパ毒素はTNF-βと呼ばれる。TNF-αの生物学的活性はTNFの全活性の70%~95%を占めているので、よく係わっているTNFは多くの場合TNF-αを指す。長年の研究検討を経て、TNF-αがインスリン抵抗、自己免疫性疾患、腫瘍、慢性B型肝炎など多くの病気と関係があることは明らかになっている。インスリン抵抗の発生発展過程においてTNF-αは極めて重要な役割を果たす。Swaroopら<sup>[11]</sup>はT2DM患者の血清TNF-αレベルを50例検出すことにより、T2DM患者のTNF-αレベルが上昇し、BMI、空腹インスリンレベル及び定常状態モデルインスリン抵抗性指数(HOMA-IR)と著しく相関することに至り、TNF-αがT2DM発症メカニズムにおいて重要な役割を果たしていることは示唆されている。また、TNF-αはインスリン受容体のリン酸化を抑制させることができ、インスリン受容体のリン酸化が抑制されると、グルコース輸送タンパク質の遺伝子発現を減少させることができ、リポタンパク質リバーゼの活性を低下させ、最終的に脂肪分解を引き起こすことができると研究によって指摘されている<sup>[12]</sup>。

20

30

#### 【0015】

##### 2) 炎症と膵島細胞のアポトーシス

慢性低度炎症反応は膵島細胞の機能障害と密接に関係している。細胞数の減少による膵島細胞の機能障害はT2DMの発症のもう一つの重要な原因であり、細胞アポトーシスは細胞数の減少の最も重要な原因である。遺伝または飲食の原因で、T2DM患者にはインスリン抵抗が発生し易く、患者の血糖が上昇し、高血糖の状態はまたIL-6の発生を促進することができる。IL-6はGLUT4発現を減少させ、脂肪細胞のブドウ糖に対する輸送を低下させ、グリコーゲンの合成を阻害し、インスリンの感受性を低下させることができるだけではなく、膵島細胞のIL-6の分泌を促進し、悪循環を引き起こすこともできる。高血糖に誘導されるIL-1は大量に生成し、NF-κB、MAPK、Fas、NOなどの経路を活性化させることによって膵島細胞のアポトーシスが発生し、多種の炎症経路は互いに交差して促進され、膵島細胞のアポトーシスを激化してついに膵島機能の低下を招く<sup>[13]</sup>。また、IL-1は、白細胞間の相互作用を介在し、しかもIFN-γ、TNF-αなどのその他の細胞因子と互いに影響制約することができ、細胞の損傷過程で重要な役割を果たしている。T2DMの血中脂質異常はレプチンなどのホ

40

50

ルモン類物質とIL-6レベルを増加させる。レプチンはIL-1の放出を増加させて細胞アポトーシスを誘導することができ、インスリンの分泌をマイナスコントロールすることができる<sup>[14]</sup>。ROSはインスリン抵抗を招く他、膵島細胞の損傷に対しても作用があり、酸化ストレス状態下で、インスリン遺伝子転写因子の発現及びインスリン結合部位は顕著に減少してインスリンの生成及び分泌に影響を与える。TNF-αのような他の脂肪細胞因子とレプチンも細胞の機能を低下させることができる<sup>[15]</sup>。これらの細胞因子の連合作用は、膵島細胞の機能に対してより顕著な損傷をもたらす。また、一部の炎症因子はインスリン受容体基質2の肝心な部位にも作用し、セリン/スレオニンをリン酸化させ、インスリン受容体基質2の分解を加速し、膵島細胞のアポトーシスを促進する。

10

#### 【0016】

##### 3. 酸化ストレス

酸化ストレスはT2DMの発生及び発展を引き起こす要素であることは研究によって示されている。酸化ストレスとは、活性酸素(reactive oxygen species、ROS)と活性窒素(reactive nitrogen species、RNS)の発生と、生体内の抗酸化防御システムの除去との間のバランスが崩れ、ROSとRNSが過剰に発生して生体組織細胞およびタンパクや核酸などの生体高分子に損傷を与えることをいう<sup>[13]</sup>。高血糖は酸化ストレスを引き起こす主因であり、ミトコンドリア電子伝達鎖<sup>[14]</sup>、ブドウ糖の自己酸化、多価アルコール経路などのルート<sup>[15]</sup>を通して生体内のROSとRNS含有量を増加させ、その中で、ミトコンドリア電子伝達鎖はROSを発生させる主要なルートである。ミトコンドリア電子伝達鎖は主に酵素複合体I～IV、細胞色素cおよび補酵素Qに係り、酵素複合体IとIIIにおいて、スーパーオキシドアニオン、過酸化水素、ヒドロキシルラジカルを含む少量の超酸化物が持続的に生成し、超酸化物不均化酵素、過酸化水素酵素、及びグルタチオン過酸化物酵素は、超酸化物を酸素と水に変換する。しかし、肥満または高血糖の条件下で、超酸化物は大幅に増加し、超酸化物の生成速度がその除去速度を超えたときに酸化ストレスが発生する。

20

#### 【0017】

多くの研究<sup>[16～18]</sup>により示されているように、ROSは直接に細胞を損傷し、特に細胞ミトコンドリア構造を破壊し、細胞のアポトーシスを促進することができる；ROSはインスリンシグナル伝達経路に影響を与えることで細胞の機能を間接的に抑制することができ、例えば、核転写因子kB(nuclear transcription factor kB、NF-kB)シグナル経路を活性化して細胞の炎症反応を引き起こすことができる；膵臓・十二指腸ホメオボックス因子1(pancreatic and duodenal homeobox 1、PDX-1)の核質の転位を抑制し、ミトコンドリアのエネルギー代謝を抑制し、インスリンの合成と分泌などを減少させる。酸化ストレスはNF-kB経路を通じて細胞の損傷を引き起こしてNF-kBはp50とRelAとの二サブユニットからなる二量体になり、休止細胞において、抑制タンパクIkBと結合して非活性の三量体として細胞質中に存在し、細胞がストレス、細胞因子、ラジカル、細菌ウイルスなどの刺激に対する応答および遺伝子発現の瞬時調節などに主に関与する<sup>[19]</sup>。高血糖に誘発されるROSは細胞内シグナル伝達を攪乱することによりNF-kBを活性化させ、細胞の損傷を誘起することは研究によって示されている<sup>[20]</sup>。Mariappanら<sup>[21]</sup>はピロリジンジチオカルバメート(PDTC)を用いて肥満db/dbマウスの体内NF-kB発現を抑制した結果、酸化ストレスがマウスの細胞ミトコンドリアに対する損傷程度が明らかに軽減されたことを発見した；Hermannら<sup>[22]</sup>は抗酸化薬-チオクト酸を利用して糖尿病患者を治療した結果、患者体内のNF-kB活性が顕著に低下し、患者の病状も改善されたことを発見した；Eldorら<sup>[23]</sup>は遺伝子組み換え技術によりマウスのNF-kBの発現を特異的に抑制し、STZ誘導後のマウスの糖尿病発症率を顕著に低下させた。

30

#### 【0018】

NF-kBは多方向核転写因子として、活性化された後、細胞増殖、細胞アポトーシス

40

NF-kBは多方向核転写因子として、活性化された後、細胞増殖、細胞アポトーシス

50

、炎症および免疫など多くの遺伝子の調節に寄与する<sup>[24]</sup>。糖尿病の生体には、NF-  
kBは、例えはIL-1 (interleukin-1)とMCP-1 (monocyte/macrophage chemoattractant protein-1)因子などの細胞因子と走化性因子の遺伝子発現を調節することにより、膵島白細胞の増加を引き起こし、細胞損傷を引き起こす<sup>[25]</sup>。また、腫瘍壞死因子 (tumor necrosis factor、TNF-)などの、NF-kBに調節制御される多くの遺伝子生成物はさらにNF-kBを活性化させ、細胞損傷を重くする<sup>[26]</sup>。

#### 【0019】

Mahadevら<sup>[27]</sup>の研究によると、ROSはインスリンシグナル伝達に対して調節制御の作用があり、しかもこのような作用は多面性である。インスリンの刺激の下で、生体はNox (NADPH oxidase)依存メカニズムによって迅速に微量のROSを生成し、後者は第二のメッセンジャーとして、主に酸化作用によってPTP1Bの活性を抑制してインスリンカスケード反応を促進する<sup>[28]</sup>。DPI (diphenylene niodonium)でNoxを抑制した後、インスリンに刺激されるインスリン受容体 (insulin receptor, IRS)とインスリン受容体基質 (insulin receptor substrate, IRS)のリン酸化が48%低下した<sup>[29]</sup>。Lohら<sup>[30]</sup>の研究によると、生理的なROSは、インスリンに対する生体の感度を促進することができる。生理状態では、インスリンの刺激による微量のROSはインスリンの作用を促進するが、長期的に高血糖になると、生体はミトコンドリア経由で大量のROSを生成し<sup>[31]</sup>、インスリン抵抗を引き起こす。

#### 【0020】

IRSとIRSはインスリンシグナル伝達経路において重要なシグナル要素である。前者はインスリンシグナル伝達の開始要素であり、IRSは前者と経路下流要素との接続橋である。酸化ストレスは複数のルートでIRSとIRSのリン酸化反応を妨害してインスリンシグナル伝達を阻害することができることは大量の研究によって示されている。IKKはNF-kBの抑制サブユニットIKBの活性化剤であり、ROSの刺激の下でIKKはIRSとIRSのセリン/スレオニンリン酸化キナーゼとしてIRSとIRSにセリンリン酸化をさせることができ、正常なチロシン化が抑制され、インスリンシグナル伝達を阻害する<sup>[32]</sup>。Brownlee<sup>[33]</sup>の研究によると、IKKはIRS307部位のセリン残基を直接にリン酸化させることができ、IRSの正常なチロシンリン酸化が弱まり、IRSとIRSとの結合を阻害し、インスリン抵抗を引き起こす。

#### 【0021】

IKKの他にも、MAPK家族の複数のメンバーはIRSとIRSに対して影響がある。JNK、細胞外調整プロテインキナーゼ (extracellular regulated protein kinases, ERK) およびp38マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (p38 MAPK) はMAPK家族のメンバーであり、セリン/スレオニンプロテインキナーゼ活性を持ち、酸化ストレス、細胞因子およびG-タンパク質共役型受容体作動剤などの作用下で活性化させることができる。多くの研究によると、JNK、ERKおよびp38 MAPKの活性化は、IRSとIRSのセリン/スレオニンのリン酸化程度を重くし、IRSとIRSとの間のタンパク結合能力、およびIRS活性化下流にSH-2構造領域を含むシグナル分子の能力を低下させることができる<sup>[34]-[36]</sup>。

#### 【0022】

糖尿病の高糖状態による酸化ストレスは、多種の慢性合併症が形成する重要な原因の一つであり、DNA損傷を誘発する重要な要素でもある<sup>[37]</sup>。糖尿病が発生すると、細胞外液に持続的な高糖が見える。この状態下で、ミトコンドリア電子伝達鎖によって発生する電子は明らかに増え、過剰なROSが生成し、細胞内環境と脂質、タンパク質とDNAなどの生体高分子に損傷を与える。生体が有酸素代謝ルートで発生する活性酸素は突然変異誘導剤として、DNA連鎖上のグアニンを8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-hydroxyguanine, 8-OHdG) に酸化することができる

10

20

30

40

50

きる。DNA複製過程において、8-OHdGはアデニンとミスマッチングしがちであり、G:CからT:Aへの転換型突然変異を引き起こしてDNA損傷をもたらす。また、ROSは、DNA鎖の破壊、DNA部位の突然変異、DNA二重鎖の歪み、がん原遺伝子と腫瘍抑制遺伝子の突然変異などを含むその他の形のDNA損傷を引き起こす。また、DNA損傷はROSおよび酸化ストレス過程を激化させる可能性があり、例えば、DNA損傷はH2AX-還元型補酵素I/酸化酵素1(Nox1)/Rac1経路によってROSを誘発することができる。ROSはさらに大量のCa<sub>2+</sub>をミトコンドリアに入らせ、細胞の壊死とアポトーシスを引き起こし、あるいはミトコンドリアを直接に損傷してミトコンドリアの機能障害を引き起こし、さらに膵島細胞を損傷し、糖尿病の病理的過程を悪化させる<sup>[38]</sup>。

10

#### 【0023】

ROSはインスリン抵抗を引き起こす他、膵島細胞の損傷に対しても作用があり、酸化ストレスの状態下で、インスリン遺伝子転写因子の発現及びインスリン結合部位は明らかに減少してインスリンの発生及び分泌に影響を与える。TNF-αのようなその他の脂肪細胞因子も、細胞の機能を低下させることができる<sup>[15]</sup>。これらの細胞因子の連合作用は、膵島細胞の機能に対してより顕著な損傷をもたらす。また、一部の炎症因子はインスリン受容体基質2の肝心な部位にも作用し、セリン/スレオニンをリン酸化させ、インスリン受容体基質2の分解を加速し、膵島細胞のアポトーシスを促進することができる。

20

#### 【0024】

以上から分かるように、糖尿病の発生と発展の過程における酸化ストレスの役割は非常に複雑である。ROSは膵島細胞を直接に損傷する他、シグナル分子としてあるストレス感受性経路を活性化させ、相関因子の発現を調節し、細胞のアポトーシスまたは壊死を引き起こし、インスリン分泌を抑制、インスリン抵抗を誘発し、最終的に糖尿病を誘発または激化し得る。

#### 【0025】

##### DMの治療

糖尿病について通常は薬物治療は採用され、伝統的な薬物治療は、インスリン類の薬物と経口類の血糖降下薬を含む。

30

#### 【0026】

早期にはインスリンは主に豚や牛などの動物の膵臓から抽出され、人体に適用されると明らかなアレルギー反応が発生した。20世紀90年代になるとますます成熟してきて、インスリンの類似物は次第に応用されてきている。このようなインスリンは伝統的なインスリンの薬物動態学を顕著に変えることができ、低血糖の発生率が低く、効果が速く、作用が長持ちであるなどの利点を持っている。現在、インスリン製剤に対する探索が進むにつれて、一部の経口類インスリン製剤はすでに試験段階に入っているが、技術的には難点があるため、いまだに臨床に適用される効果的な経口製剤はない。

#### 【0027】

伝統的な経口類血糖降下薬は多く、一般的には下記のようなものが挙げられる。(1)メトホルミンのようなビグアナイド系。メトホルミンは心血管を保護する良好な作用があり、血糖降下効果も悪くない。現在、多くの国でT2DMを治療する第一線の薬物として用いられている。(2)スルホニル尿素系：スルホニル尿素系はインスリン分泌促進剤の一種であり、膵島細胞を刺激してインスリンを分泌させ、血糖レベルを改善する効果がある。現在、中国では市販が許可されているこの種類のインスリンは主にグリメピリド、グリベンクラミド、グリビジド、グリクラジド、グリキドンなどがあるが、このような薬物を長期的に服用すると血糖降下効果が失敗する可能性があり、低血糖と体質量の増加などの合併症が発生しやすいことはいくつかの研究より明らかになった。(3)チアゾリジンジオン(thiazolidinedione compounds, TZD)系。1999年にFDAは、ロシグリタゾンとピオグリタゾンのT2DMにおける使用を承認し、前者は心臓病のリスクを増やす可能性があるため、その後第二線治療薬物としてその使

40

50

用が制限されるとともに、心不全症における使用は禁止された。2013年6月にFDAはロシグリタゾンを新たに審査した結果、この薬物が引き続き臨床に使用できることを指摘し、さらにこの薬物およびその合成調合剤の使用を緩しましたは完全に禁止を解除した。

(4) - グリコシダーゼ阻害剤：このようなインスリンは腸の粘膜上皮細胞のグリコシダーゼを抑制し、さらに炭水化物の吸収作用を緩和し、食後の血糖レベルを低下させる。常用のこのような薬物として、ボグリボース、アカルボース、ミグリトールなどが挙げられる。

#### 【0028】

現段階で糖尿病を治療する薬物は主に伝統的な糖尿病薬物であり、スルホニル尿素系、グリニド系、ビグアナイド系、チアゾリジンジオン (thiazolidinedione compounds, TZD) 系、- グルコシダーゼ阻害剤およびインスリンなどを含む。これらの薬物はいずれも、低血糖、胃腸障害、肥満などの異なる程度の不良反応がある。糖尿病の基礎理論に対する研究が進むにつれて、伝統的な血糖降下薬の副作用を避けて膵島 細胞に保護作用をもたらすために、人々は積極的に糖尿病治療の新しいターゲットを探している。現在、糖尿病の発症メカニズムに関連するターゲットは主に、グルカゴン様ペプチド-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1)、ジペプチドペプチダーゼ-4 (dipeptidyl peptidase-4, DPP-4)、ナトリウム・グルコース共輸送体-2 (sodium-glucose co-transporter-2, SGLT-2)、グリコーゲン合成酵素キナーゼ-3 (glycogen synthase kinase-3, GSK-3)、タンパク質チロシンホスファターゼ (protein tyrosine phosphates, PTP)、グルコキナーゼ (glucokinase, GK)などを含む。その中で、グルカゴン様ペプチド-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 類似物、GLP-1受容体作動剤およびジペプチジルペプチダーゼ-4 (dipeptidyl peptidase-4, DPP-4) 阻害剤のようなグルカゴンの調整に基づく薬物は、効果的に血糖の安定性を維持し、細胞の機能を改善し、糖尿病の発展を遅らせ、さらに糖尿病の病程過程を逆転することができると考えられている。

#### 【0029】

いまだに糖尿病を完全に治癒できる効果的な薬物または手段はなく、現在の薬物による治療は主に、血糖を一定の範囲内でコントロールすることで合併症の発生を低くして遅らせることにある。糖尿病の発症メカニズムに対する理解がより深く、全面的になるにつれて、糖尿病の治療薬についての研究も、伝統的なメカニズムを有する薬物についての研究から新しいターゲットと新しい作用メカニズムを有する薬物についての研究へ移行している。例えば、GLP-1受容体作動剤、DPP-4阻害剤、及びSGLT-2阻害剤など、一部はすでに市販されており、GPR119受容体作動剤、11-HSD1阻害剤、PTP1B阻害剤およびGK作動剤など、一部の薬物は臨床または臨床前研究段階にあり、その治療効果と安全性について臨床的に検証する必要がある。近年来、新しいターゲット抗糖尿病薬の登場はDM治療により多くの選択を提供しているが、糖尿病の発症メカニズムが複雑であるため、係るホルモン、酵素および受容体は多く、新薬の研究分野では、シングルターゲット薬の作用範囲が狭く、血糖降下作用が弱く、全身システムに作用して不良反応を引き起こすなどの問題があり、更なる研究が必要である。そのため、糖尿病の発症メカニズムの多くの方面に作用でき、より効果的な治療薬を探す必要がある。

#### 【0030】

プラスミノーゲンは、糖尿病実験のマウスの膵臓組織の損傷を軽減し、炎症を抑制し、膵島 細胞のアポトーシスを減少させ、膵臓組織を修復し、膵島 細胞の分泌機能を回復し、血糖を降下することができ、糖尿病の発症メカニズムの多くの方面に全面的にに対する新しい薬物となる見込みがあることは、本発明により発見された。

#### 【発明の概要】

#### 【0031】

本発明は下記項に係る。

10

20

30

40

50

**【 0 0 3 2 】**

1 . 被験者に有効量のプラスミノーゲンを投与することを含む、糖尿病被験者のインスリン分泌を促進する方法。

**【 0 0 3 3 】**

2 . 前記プラスミノーゲンはさらに糖尿病被験者のインスリンの発現を促進する、項1に記載の方法。

**【 0 0 3 4 】**

3 . 前記糖尿病はT 1 DMまたはT 2 DMである、項1または2に記載の方法。

**【 0 0 3 5 】**

4 . 前記プラスミノーゲンは糖尿病被験者の食後のインスリン分泌を促進する、項1～3のいずれか1項に記載の方法。 10

**【 0 0 3 6 】**

5 . 前記プラスミノーゲンは糖尿病被験者の禁食状態下のインスリン分泌を促進する、項1～3のいずれか1項に記載の方法。

**【 0 0 3 7 】**

6 . 前記プラスミノーゲンは、糖尿病被験者の応答血糖の上昇により刺激されるインスリン分泌を促進し、血糖を正常または正常に近いレベルに戻らせる、項1～5のいずれか1項に記載の方法。

**【 0 0 3 8 】**

7 . 前記プラスミノーゲンは、前記インスリンの発現及び／または分泌を促進するとともに被験者のグルカゴンの発現及び／または分泌を低める、項1～6のいずれか1項に記載の方法。 20

**【 0 0 3 9 】**

8 . 前記プラスミノーゲンは、前記インスリンの発現及び／または分泌を促進するとともに被験者のグルカゴンの発現及び／または分泌を低めることにより、被験者の血糖を正常または正常に近いレベルに戻らせる、項7に記載の方法。

**【 0 0 4 0 】**

9 . 被験者に有効量のプラスミノーゲンを投与することを含む、糖尿病被験者のグルカゴン分泌を低める方法。

**【 0 0 4 1 】**

10 . 前記プラスミノーゲンはさらに糖尿病被験者のグルカゴンの発現を低める、項9に記載の方法。 30

**【 0 0 4 2 】**

11 . 前記糖尿病はT 1 DMまたはT 2 DMである、項9または10に記載の方法。

**【 0 0 4 3 】**

12 . 前記プラスミノーゲンは、糖尿病被験者の食後のグルカゴン分泌を低める、項9～11のいずれか1項に記載の方法。

**【 0 0 4 4 】**

13 . 前記プラスミノーゲンは、糖尿病被験者の禁食状態下のグルカゴン分泌を低める、項9～12のいずれか1項に記載の方法。 40

**【 0 0 4 5 】**

14 . 前記プラスミノーゲンは、糖尿病被験者の血糖が上昇した状態下にグルカゴン分泌を低め、血糖を正常または正常に近いレベルに戻らせる、項9～13のいずれか1項に記載の方法。

**【 0 0 4 6 】**

15 . 前記プラスミノーゲンは、被験者のグルカゴンの発現及び／または分泌を低めるとともに、前記インスリンの発現及び／または分泌を促進する、項9～14のいずれか1項に記載の方法。

**【 0 0 4 7 】**

16 . 前記プラスミノーゲンは、被験者のグルカゴンの発現及び／または分泌を低める 50

とともに前記インスリンの発現及び／または分泌を促進することにより、被験者の血糖を正常または正常に近いレベルに戻らせる、項15に記載の方法。

【0048】

17. 前記プラスミノーゲンはインスリン受容体基質2(IRS-2)の発現を促進する、項1~16のいずれか1項に記載の方法。

【0049】

18. 被験者に有効量のプラスミノーゲンを投与することを含む、糖尿病被験者の血糖を降下する方法。

【0050】

19. 前記血糖は、血清ブドウ糖レベルと、血清フルクトサミンレベルと、血清糖化ヘモグロビンレベルとからなる群より選ばれる一つ以上のものである、項18に記載の方法。 10

【0051】

20. 前記血糖は血清ブドウ糖レベルである、項19に記載の方法。

【0052】

21. 前記糖尿病はT1DMまたはT2DMである、項18~20のいずれか1項に記載の方法。

【0053】

22. 被験者に有効量のプラスミノーゲンを投与することを含む、糖尿病被験者の糖の耐量を高める方法。

【0054】

23. 前記糖尿病はT2DMである、項22に記載の方法。

【0055】

24. 被験者に有効量のプラスミノーゲンを投与することを含む、糖尿病被験者の食後の血糖降下を促進する方法。

【0056】

25. 前記プラスミノーゲンを被験者の食前30分間から1.5時間までの間に投与する、項24に記載の方法。

【0057】

26. 前記プラスミノーゲンを被験者の食前30分間から1時間までの間に投与する、請求項25に記載の方法。

【0058】

27. 被験者に有効量のプラスミノーゲンを投与することを含む、糖尿病被験者のブドウ糖利用を促進する方法。

【0059】

28. 被験者に有効量のプラスミノーゲンを投与することを含む、糖尿病被験者の膵島の炎症の修復を促進する方法。

【0060】

29. 前記プラスミノーゲンは細胞因子TNF- の発現を促進する、項28に記載の方法。

【0061】

30. 前記プラスミノーゲンは被験者の多方向核転写因子NF-kBの発現を促進する、項28または29に記載の方法。

【0062】

31. 前記プラスミノーゲンは膵島コラーゲンの沈着を減少させる、項28~30のいずれか1項に記載の方法。

【0063】

32. 前記プラスミノーゲンは膵島の纖維化を軽減する、項31に記載の方法。

【0064】

33. 前記プラスミノーゲンは膵島細胞のアポトーシスを抑制する、項28~32のいずれか1項に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【0065】

34. 前記糖尿病患者はT1DMまたはT2DMである、項28～33に記載の方法。

## 【0066】

35. 前記T1DM被験者はPLG活性が正常な被験者またはPLG活性が損傷された被験者である、項34に記載の方法。

## 【0067】

36. 前記プラスミノーゲンは一種以上のその他の薬物または治療方法と併用することができる、項1～35のいずれか1項に記載の方法。

## 【0068】

37. 前記プラスミノーゲンは、抗糖尿病薬と、抗心脳血管疾患薬と、抗血栓薬と、抗高血圧薬と、抗血脂薬と、抗凝固薬と、抗感染薬とからなる群より選ばれる一つ以上の薬物と併用することができる、項36に記載の方法。 10

## 【0069】

38. 前記プラスミノーゲンは配列2、6、8、10または12と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有し、且つ依然プラスミノーゲン活性を有するものである、項1～37のいずれか1項に記載の方法。

## 【0070】

39. 前記プラスミノーゲンは配列2、6、8、10または12において、1-100、1-90、1-80、1-70、1-60、1-50、1-45、1-40、1-35、1-30、1-25、1-20、1-15、1-10、1-5、1-4、1-3、1-2、1個のアミノ酸を添加、削除及び/または置換したものであり、且つ依然プラスミノーゲン活性を有するタンパク質である、項1～38のいずれか1項に記載の方法。 20

## 【0071】

40. 前記プラスミノーゲンはプラスミノーゲン活性フラグメントを含有し、且つ依然プラスミノーゲン活性を有するタンパク質である、項1～39のいずれか1項に記載の方法。

## 【0072】

41. 前記プラスミノーゲンは、Glu-プラスミノーゲン、Lys-プラスミノーゲン、ミニプラスミノーゲン、マイクロプラスミノーゲン、-プラスミノーゲンまたはそれらのプラスミノーゲン活性を保持した変異体である、項1～40のいずれか1項に記載の方法。 30

## 【0073】

42. 前記プラスミノーゲンは、天然または合成のヒトプラスミノーゲン、またはその依然プラスミノーゲン活性を保持した変異体若しくはフラグメントである、項1～41のいずれか1項に記載の方法。

## 【0074】

43. 前記プラスミノーゲンは、靈長類動物またはげっ歯類動物に由来するヒトプラスミノーゲンのオルソログ、またはその依然プラスミノーゲン活性を保持した変異体若しくはフラグメントである、項1～41のいずれか1項に記載の方法。 40

## 【0075】

44. 前記プラスミノーゲンのアミノ酸配列は配列2、6、8、10または12に示される通りである、項1～43のいずれか1項に記載の方法。

## 【0076】

45. 前記プラスミノーゲンは、ヒト由来の天然プラスミノーゲンである、項1～44のいずれか1項に記載の方法。

## 【0077】

46. 前記被験者はヒトである、項1～45のいずれか1項に記載の方法。

## 【0078】

47. 前記被験者はプラスミノーゲンが不足、または欠乏している、項1～46のいず 50

れか 1 項に記載の方法。

【 0 0 7 9 】

4 8 . 前記不足または欠乏は、先天的、継発的及び / または局所的である、項 1 ~ 4 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【 0 0 8 0 】

4 9 . 項 1 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法に使用されるプラスミノーゲン。

【 0 0 8 1 】

5 0 . 薬学的に許容される担体及び項 1 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法に使用されるプラスミノーゲンを含む薬物組成物。

【 0 0 8 2 】

5 1 . ( i ) 項 1 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法に使用されるプラスミノーゲンと、( i i ) 前記プラスミノーゲンを前記被験者に送達するための手段 ( m e a n s ) とを含む、予防性または治療性キット。

【 0 0 8 3 】

5 2 . 前記手段はシリンジまたはバイアルである、項 5 1 に記載のキット。

【 0 0 8 4 】

5 3 . 項 1 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法を実施するように前記プラスミノーゲンを前記被験者に投与することを指示するラベルまたはプロトコルをさらに含む、項 5 1 または 5 2 に記載のキット。

【 0 0 8 5 】

5 4 . ラベルを含む容器と、

( i ) 項 1 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法に使用されるプラスミノーゲン、またはプラスミノーゲンを含む薬物組成物とを含む製品であって、前記ラベルは、項 1 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法を実施するように前記プラスミノーゲンまたは組成物を前記被験者に投与することを指示する、製品。

【 0 0 8 6 】

5 5 . その他の薬物を含む、もう一つ以上の部材または容器をさらに含む、項 5 1 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載のキット、または項 5 4 に記載の製品。

【 0 0 8 7 】

5 6 . 前記その他の薬物は、抗糖尿病薬と、抗心脳血管疾患薬と、抗血栓薬と、抗高血圧薬と、抗血脂薬と、抗凝固薬と、抗感染薬とからなる群より選ばれる、項 5 5 に記載のキットまたは製品。

【 0 0 8 8 】

一つの局面において、本発明は、被験者に有効量のフィブリンプラスミノーゲンまたはプラスミンを投与することを含む、糖尿病を予防及び治療する方法に係る。

【 0 0 8 9 】

もう一つの局面において、本発明は、被験者に有効量のプラスミノーゲンを投与することを含む、糖尿病被験者の血糖を降下する方法に係る。本発明はさらに、糖尿病被験者の血糖降下におけるプラスミノーゲンの用途に係る。本発明はさらに、糖尿病被験者の血糖を降下する薬物の製造におけるプラスミノーゲンの用途に係る。また、本発明は、糖尿病被験者の血糖降下に用いられるプラスミノーゲンに係る。一部の実施形態において、前記血糖は、血清ブドウ糖レベルと、血清フルクトサミンレベルと、血清糖化ヘモグロビンレベルとからなる群より選ばれる一つ以上のものである。もう一部の実施形態において、前記血糖は血清ブドウ糖レベルである。上記実施形態において、前記糖尿病は T 1 D M または T 2 D M である。

【 0 0 9 0 】

もう一つの局面において、本発明は、被験者に有効量のプラスミノーゲンを投与することを含む、糖尿病被験者の糖の耐量を高める方法に係る。本発明はさらに、糖尿病被験者の糖の耐量の向上におけるプラスミノーゲンの用途に係る。本発明はさらに、糖尿病被験者の糖の耐量を高める薬物の製造におけるプラスミノーゲンの用途に係る。また、本発明

10

20

30

40

50

はさらに、糖尿病被験者の糖の耐量の向上に用いられるプラスミノーゲンに係る。一部の実施形態において、前記糖尿病はT2DMである。

#### 【0091】

一つの局面において、本発明は、被験者に有効量のプラスミノーゲンを投与することを含む、糖尿病被験者の食後の血糖降下を促進する方法に係る。本発明はさらに、糖尿病被験者の食後の血糖降下の促進におけるプラスミノーゲンの用途に係る。本発明はさらに、糖尿病被験者の食後の血糖を降下する薬物の製造におけるプラスミノーゲンの用途に係る。また、本発明はさらに、糖尿病被験者の食後の血糖低下の促進に用いられるプラスミノーゲンに係る。一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンを被験者の食前30分間から1.5時間までの間に投与する。もう一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンを被験者の食前30分間から1時間までの間に投与する。

10

#### 【0092】

一つの局面において、本発明は、被験者に有効量のプラスミノーゲンを投与することを含む、糖尿病被験者のブドウ糖利用を促進する方法に係る。本発明はさらに、糖尿病被験者のブドウ糖利用の促進におけるプラスミノーゲンの用途に係る。本発明はさらに、糖尿病被験者のブドウ糖利用を促進する薬物の製造におけるプラスミノーゲンの用途に係る。また、本発明はさらに、糖尿病被験者のブドウ糖利用を促進するために用いられるプラスミノーゲンに係る。もう一つの局面において、本発明は、被験者に有効量のプラスミノーゲンを投与することを含む、糖尿病被験者のインスリン分泌を促進する方法に係る。一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンはさらに糖尿病被験者のインスリンの発現を促進する。上記実施形態において、前記糖尿病はT1DMまたはT2DMである。一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは糖尿病被験者の食後のインスリン分泌を促進する。もう一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは糖尿病被験者の禁食状態下のインスリン分泌を促進する。一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは、糖尿病被験者の応答血糖の上昇により刺激されるインスリン分泌を促進し、血糖を正常または正常に近いレベルに戻らせる。もう一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは、前記インスリンの発現及び/または分泌を促進するとともに被験者のグルカゴンの発現及び/または分泌を低め、具体的には、前記プラスミノーゲンは、前記インスリンの発現及び/または分泌を促進するとともに被験者のグルカゴンの発現及び/または分泌を低めることにより、被験者の血糖を正常または正常に近いレベルに戻らせる。

20

#### 【0093】

一つの局面において、本発明は、被験者に有効量のプラスミノーゲンを投与することを含む、糖尿病被験者のグルカゴン分泌を低める方法に係る。本発明はさらに、糖尿病被験者のグルカゴン分泌を低めることにおけるプラスミノーゲンの用途に係る。本発明はさらに、糖尿病被験者のグルカゴン分泌を低める薬物の製造におけるプラスミノーゲンの用途に係る。また、本発明はさらに、糖尿病被験者のグルカゴン分泌を低めるために用いられるプラスミノーゲンに係る。一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンはさらに糖尿病被験者のグルカゴンの発現を低める。上記実施形態において、前記糖尿病はT1DMまたはT2DMである。一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは、糖尿病被験者の食後のグルカゴン分泌を低める。もう一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは、糖尿病被験者の禁食状態下のグルカゴン分泌を低める。一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは、糖尿病被験者の血糖が上昇した状態下にグルカゴン分泌を低め、血糖を正常または正常に近いレベルに戻らせる。一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは、糖尿病被験者の血糖が上昇した状態下にグルカゴン分泌を低め、血糖を正常または正常に近いレベルに戻らせる。もう一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは、被験者のグルカゴンの発現及び/または分泌を低めるとともに、前記インスリンの発現及び/または分泌を促進し、具体的には、前記プラスミノーゲンは、被験者のグルカゴンの発現及び/または分泌を低めるとともに前記インスリンの発現及び/または分泌を促進することにより、被験者の血糖を正常または正常に近いレベルに戻らせる。上記実施形態において、前記プラスミノーゲンはインスリン受容体基質2(IRS-2)の発現

30

40

50

を促進する。

【 0 0 9 4 】

一つの局面において、本発明は、被験者に有効量のプラスミノーゲンを投与することを含む、糖尿病被験者の膵島細胞損傷の修復を促進する方法に係る。本発明はさらに、糖尿病被験者の膵島細胞損傷の修復を促進することにおけるプラスミノーゲンの用途に係る。本発明はさらに、糖尿病被験者の膵島細胞損傷の修復を促進する薬物の製造におけるプラスミノーゲンの用途に係る。また、本発明はさらに、糖尿病被験者の膵島細胞損傷の修復を促進するために用いられるプラスミノーゲンに係る。一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンはインスリン受容体基質 2 ( I R S - 2 ) の発現を促進する。もう一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは細胞因子 T N F - の発現を促進する。もう一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは被験者の多方向核転写因子 N F - k B の発現を促進する。一部の実施形態において、前記膵島細胞の損傷は、膵島細胞の合成及びインスリン分泌の機能損傷、膵島組織構造の損傷、膵島コラーゲンの沈着、膵島の纖維化、膵島細胞のアポトーシス、膵島が分泌するグルカゴンとインスリンのバランス障害、膵島が分泌するグルカゴンとインスリンのレベルが被験者の血糖レベルに適応できることからなる群より選ばれる一つ以上である。一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは、前記糖尿病被験者のグルカゴン分泌を減少させ、インスリン分泌を増加させ、具体的には、前記膵島グルカゴンとインスリン分泌の正常なバランスが修復される。

10

【 0 0 9 5 】

もう一つの局面において、本発明は、被験者に有効量のプラスミノーゲンを投与することを含む、被験者の膵島を保護する方法に係る。本発明はさらに、被験者の膵島の保護におけるプラスミノーゲンの用途に係る。本発明はさらに、被験者の膵島を保護する薬物の製造におけるプラスミノーゲンの用途に係る。また、本発明はさらに、被験者の膵島を保護するために用いられるプラスミノーゲンに係る。一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは膵島コラーゲンの沈着を減少させる。もう一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは膵島の纖維化を軽減する。もう一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは膵島細胞のアポトーシスを抑制する。もう一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは膵島インスリン受容体基質 2 ( I R S - 2 ) の発現を促進する。一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは膵島炎症の修復を促進する。もう一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは細胞因子 T N F - の発現を促進する。もう一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは被験者の多方向核転写因子 N F - k B の発現を促進する。上記実施形態において、前記被験者は糖尿病患者であり、具体的には、前記糖尿病患者は T 1 D M または T 2 D M である。一部の実施形態において、前記 T 1 D M 被験者は P L G 活性が正常な被験者または P L G 活性が損傷された被験者である。

20

【 0 0 9 6 】

もう一つの局面において、本発明は、被験者に有効量のプラスミノーゲンを投与することを含む、糖尿病被験者の膵島の炎症の修復を促進する方法に係る。本発明はさらに、糖尿病被験者の膵島の炎症の修復を促進することにおけるプラスミノーゲンの用途に係る。本発明はさらに、糖尿病被験者の膵島の炎症の修復を促進する薬物の製造におけるプラスミノーゲンの用途に係る。また、本発明はさらに、糖尿病被験者の膵島の炎症の修復を促進するプラスミノーゲンに係る。一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは細胞因子 T N F - の発現を促進する。もう一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは被験者の多方向核転写因子 N F - k B の発現を促進する。もう一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは膵島コラーゲンの沈着を減少させる。もう一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは膵島の纖維化を軽減する。もう一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは膵島細胞のアポトーシスを抑制する。上記実施形態において、前記糖尿病患者は T 1 D M または T 2 D M であり、具体的には、前記 T 1 D M 被験者は P L G 活性が正常な被験者または P L G 活性が損傷された被験者である。

30

【 0 0 9 7 】

一つの局面において、本発明は、被験者に有効量のプラスミノーゲンを投与することを含む、糖尿病被験者の膵島の炎症の修復を促進する方法に係る。本発明はさらに、糖尿病被験者の膵島の炎症の修復を促進することにおけるプラスミノーゲンの用途に係る。本発明はさらに、糖尿病被験者の膵島の炎症の修復を促進する薬物の製造におけるプラスミノーゲンの用途に係る。また、本発明はさらに、糖尿病被験者の膵島の炎症の修復を促進するプラスミノーゲンに係る。一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは細胞因子 T N F - の発現を促進する。もう一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは被験者の多方向核転写因子 N F - k B の発現を促進する。もう一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは膵島コラーゲンの沈着を減少させる。もう一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは膵島の纖維化を軽減する。もう一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは膵島細胞のアポトーシスを抑制する。上記実施形態において、前記糖尿病患者は T 1 D M または T 2 D M であり、具体的には、前記 T 1 D M 被験者は P L G 活性が正常な被験者または P L G 活性が損傷された被験者である。

40

一つの局面において、本発明は、被験者に有効量のプラスミノーゲンを投与することを

50

含む、糖尿病被験者の細胞因子 TNF - α の発現を促進する方法に係る。本発明はさらに、糖尿病被験者の細胞因子 TNF - α の発現を促進することにおけるプラスミノーゲンの用途に係る。本発明はさらに、糖尿病被験者の細胞因子 TNF - α の発現を促進する薬物の製造におけるプラスミノーゲンの用途に係る。また、本発明はさらに、糖尿病被験者の細胞因子 TNF - α の発現を促進するために用いられるプラスミノーゲンに係る。

#### 【 0 0 9 8 】

もう一つの局面において、本発明は、被験者に有効量のプラスミノーゲンを投与することを含む、糖尿病被験者の多方向核転写因子 NF - κ B の発現を促進する方法に係る。本発明はさらに、糖尿病被験者の多方向核転写因子 NF - κ B の発現を促進することにおけるプラスミノーゲンの用途に係る。本発明はさらに、糖尿病被験者の多方向核転写因子 NF - κ B の発現を促進する薬物の製造におけるプラスミノーゲンの用途に係る。

10

#### 【 0 0 9 9 】

もう一つの局面において、本発明は、被験者に有効量のプラスミノーゲンを投与することを含む、膵島インスリン受容体基質 2 ( IRS - 2 ) の発現を促進する方法に係る。本発明はさらに、膵島インスリン受容体基質 2 ( IRS - 2 ) の発現を促進することにおけるプラスミノーゲンの用途に係る。本発明はさらに、膵島インスリン受容体基質 2 ( IRS - 2 ) の発現を促進する薬物の製造におけるプラスミノーゲンの用途に係る。また、本発明はさらに、膵島インスリン受容体基質 2 ( IRS - 2 ) の発現を促進するために用いられるプラスミノーゲンに係る。

#### 【 0 1 0 0 】

もう一つの局面において、本発明は、被験者に有効量のプラスミノーゲンを投与してインスリン受容体基質 2 ( IRS - 2 ) の発現を促進することを含む、糖尿病被験者のインスリン分泌を促進する方法に係る。本発明はさらに、糖尿病被験者のインスリン分泌を促進することにおけるプラスミノーゲンの用途に係る。本発明はさらに、糖尿病被験者のインスリン分泌を促進する薬物の製造におけるプラスミノーゲンの用途に係る。また、本発明はさらに、糖尿病被験者のインスリン分泌を促進するために用いられるプラスミノーゲンに係る。

20

#### 【 0 1 0 1 】

もう一つの局面において、本発明は、被験者に有効量のプラスミノーゲンを投与することを含む、糖尿病被験者の膵島 細胞数の増加を促進する方法に係る。本発明はさらに、糖尿病被験者の膵島 細胞数の増加を促進することにおけるプラスミノーゲンの用途に係る。本発明はさらに、糖尿病被験者の膵島 細胞数の増加を促進する薬物の製造におけるプラスミノーゲンの用途に係る。また、本発明はさらに、糖尿病被験者の膵島 細胞数の増加を促進するために用いられるプラスミノーゲンに係る。一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは、インスリン受容体基質 2 ( IRS - 2 ) の発現を促進する。

30

#### 【 0 1 0 2 】

もう一つの局面において、本発明は、被験者に有効量のプラスミノーゲンを投与することを含む、膵島 細胞のアポトーシスを減少させる方法に係る。本発明はさらに、膵島 細胞のアポトーシスを減少させることにおけるプラスミノーゲンの用途に係る。本発明はさらに、膵島 細胞のアポトーシスを減少させる薬物の製造におけるプラスミノーゲンの用途に係る。また、本発明はさらに、膵島 細胞のアポトーシスを減少させるために用いられるプラスミノーゲンに係る。一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは、インスリン受容体基質 2 ( IRS - 2 ) の発現を促進する。

40

#### 【 0 1 0 3 】

もう一つの局面において、本発明は、被験者に有効量のプラスミノーゲンを投与することを含む、膵島 細胞の損傷の修復を促進する方法に係る。本発明はさらに、膵島 細胞の損傷の修復を促進することにおけるプラスミノーゲンの用途に係る。本発明はさらに、膵島 細胞の損傷の修復を促進する薬物の製造におけるプラスミノーゲンの用途に係る。また、本発明はさらに、膵島 細胞の損傷の修復を促進するために用いられるプラスミノーゲンに係る。一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは、インスリン受容体基

50

質 2 ( I R S - 2 ) の発現を促進する。

【 0 1 0 4 】

もう一つの局面において、本発明は、被験者に有効量のプラスミノーゲンを投与することを含む、臍島 細胞の機能の回復を促進する方法に係る。本発明はさらに、臍島 細胞の機能の回復を促進することにおけるプラスミノーゲンの用途に係る。本発明はさらに、臍島 細胞の機能の回復を促進する薬物の製造におけるプラスミノーゲンの用途に係る。また、本発明はさらに、臍島 細胞の機能の回復を促進するために用いられるプラスミノーゲンに係る。一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは、インスリン受容体基質 2 ( I R S - 2 ) の発現を促進する。

【 0 1 0 5 】

上記実施形態において、前記プラスミノーゲンは一種以上のその他の薬物または治療方法と併用することができる。具体的には、前記プラスミノーゲンは、抗糖尿病薬と、抗心脳血管疾患薬と、抗血栓薬と、抗高血圧薬と、抗血脂薬と、抗凝固薬と、抗感染薬とからなる群より選ばれる一つ以上の薬物と併用することができる。

【 0 1 0 6 】

上記実施形態において、前記プラスミノーゲンは配列 2 、 6 、 8 、 10 または 12 と少なくとも 75% 、 80% 、 85% 、 90% 、 95% 、 96% 、 97% 、 98% または 99% の配列同一性を有し、且つ依然プラスミノーゲン活性を有するものである。

【 0 1 0 7 】

上記実施形態において、前記プラスミノーゲンのアミノ酸は、例えば配列 2 、 6 、 8 、 10 または 12 に示される。一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは配列 2 、 6 、 8 、 10 または 12 において、 1 - 100 、 1 - 90 、 1 - 80 、 1 - 70 、 1 - 60 、 1 - 50 、 1 - 45 、 1 - 40 、 1 - 35 、 1 - 30 、 1 - 25 、 1 - 20 、 1 - 15 、 1 - 10 、 1 - 5 、 1 - 4 、 1 - 3 、 1 - 2 、 1 個のアミノ酸を添加、削除及び／または置換したものであり、且つ依然プラスミノーゲン活性を有するタンパク質である。

【 0 1 0 8 】

上記実施形態において、前記プラスミノーゲンはプラスミノーゲン活性フラグメントを含有し、且つ依然プラスミノーゲン活性を有するタンパク質である。具体的には、前記プラスミノーゲンは、 G l u - プラスミノーゲン、 L y s - プラスミノーゲン、ミニプラスミノーゲン、マイクロプラスミノーゲン、 - プラスミノーゲンまたはそれらのプラスミノーゲン活性を保持した変異体である。

【 0 1 0 9 】

上記実施形態において、プラスミノーゲンは、天然または合成のヒトプラスミノーゲン、またはその依然プラスミノーゲン活性を保持した変異体若しくはフラグメントである。一部の実施形態において、前記プラスミノーゲンは、靈長類動物またはげっ歯類動物に由来するヒトプラスミノーゲンのオルソログ、またはその依然プラスミノーゲン活性を保持した変異体若しくはフラグメントであり、例えば、靈長類動物またはげっ歯類動物に由来するフィブリンプラスミノーゲンのオルソログであり、例えばゴリラ、アカゲザル、マウス、ウシ、ウマ、イヌに由来するフィブリンプラスミノーゲンのオルソログである。もっとも好ましくは、本発明のフィブリンプラスミノーゲンのアミノ酸配列は配列 2 、 6 、 8 、 10 または 12 に示される通りである。

【 0 1 1 0 】

上記実施形態において、前記被験者はヒトである。一部の実施形態において、前記被験者はプラスミノーゲンが不足、または欠乏している。具体的には、前記不足または欠乏は、先天的、継発的及び／または局所的である。

【 0 1 1 1 】

一つの実施形態において、前記フィブリンプラスミノーゲンは好ましくは、表面、静脈内、筋肉内、皮下、吸入、脊柱管内、局所注射、関節内注射または直腸投与によって全身または局所にて投与される。一つの実施形態において、前記局所投薬は、例えばドレッシング材やガイドチューブなどによって骨希薄化した領域に直接に行われる。

10

20

30

40

50

## 【0112】

一つの実施形態において、前記プラスミノゲンは適切なポリペプチド担体または安定化剤と組み合わせて投与される。一つの実施形態において、前記プラスミノゲンは毎日 0.0001 - 2000 mg / kg、0.001 - 800 mg / kg、0.01 - 600 mg / kg、0.1 - 400 mg / kg、1 - 200 mg / kg、1 - 100 mg / kg、10 - 100 mg / kg (体重一キロあたりで計算) または 0.0001 - 2000 mg / cm<sup>2</sup>、0.001 - 800 mg / cm<sup>2</sup>、0.01 - 600 mg / cm<sup>2</sup>、0.1 - 400 mg / cm<sup>2</sup>、1 - 200 mg / cm<sup>2</sup>、1 - 100 mg / cm<sup>2</sup>、10 - 100 mg / cm<sup>2</sup> (体表面積平方センチメートルあたりで計算) の用量を投与し、好ましくは少なくとも一回繰り返し、好ましくは毎日投与する。局所投与の場合、前記用量はさらに状況に応じて調整することができる。一つの局面において、本発明は、薬学的に許容される担体及び本発明に記載の方法に使用されるプラスミノーゲンを含む薬物組成物に係る。

10

## 【0113】

もう一つの局面において、本発明は、(i) 本発明に記載の方法に使用されるプラスミノーゲンと、(ii) 前記プラスミノーゲンを前記被験者に送達するための手段 (means) とを含む、予防性または治療性キットに係る。具体的には、前記手段はシリングまたはバイアルである。一部の実施形態において、前記キットは、本発明に記載の方法を実施するように前記プラスミノーゲンを前記被験者に投与することを指示するラベルまたはプロトコルをさらに含む。

20

## 【0114】

もう一つの局面において、本発明は、ラベルを含む容器と、(i) 本発明に記載の方法に使用されるプラスミノーゲン、またはプラスミノーゲンを含む薬物組成物とを含む製品であって、前記ラベルは、本発明に記載の方法を実施するように前記プラスミノーゲンまたは組成物を前記被験者に投与することを指示する、製品に係る。

## 【0115】

上記実施形態において、前記キットまたは製品は、その他の薬物を含む、もう一つ以上の部材または容器をさらに含む。一部の実施形態において、前記その他の薬物は、抗糖尿病薬と、抗心脳血管疾患薬と、抗血栓薬と、抗高血圧薬と、抗血脂薬と、抗凝固薬と、抗感染薬とからなる群より選ばれる。

## 【0116】

30

## [発明の詳細な説明]

「糖尿病」は遺伝的要素、免疫機能の乱れ、微生物感染及びその毒素、フリーラジカル毒素、精神要因などの各種病気誘発因子が生体に作用することによる、膵島機能不全、インスリン抵抗などによって引き起こされる糖、タンパク質、脂肪、水及び電解質等の一連の代謝に乱れが生じる症候群であり、臨床的には高血糖を主な特徴とする。

## 【0117】

「糖尿病合併症」は糖尿病プロセスにおける血糖の制御不良によって引き起こされる身体のその他の臓器または組織のダメージまたは機能障害であり、肝臓、腎臓、心臓、網膜、神経系のダメージまたは機能障害等を含む。世界保健機関 (WHO) の統計によれば、糖尿病合併症は 100 種類以上あり、現在における合併症が最も多い疾患である。

40

## 【0118】

「インスリン抵抗」とは、様々な原因でインスリンがブドウ糖の摂取と利用を促進する効率が低下してしまい、血糖の安定性を維持するように生体が代償的に過剰のインスリンを分泌して高インスリン血症が生じることをいう。

## 【0119】

「プラスミン」は血液中に存在する非常に重要な酵素であり、フィブリン多量体を分解することができる。

## 【0120】

「プラスミノーゲン (plasminogen, plg)」はプラスミンの酵素前駆体の形であり、swiss prot 中の配列に基づいて、シグナルペプチドの天然ヒト由

50

来プラスミノーゲンのアミノ酸配列（配列4）は計算によれば810個のアミノ酸からなり、分子量は約90kDであり、主に肝臓において合成され且つ血液中で循環できる糖タンパク質であり、該アミノ酸配列をコードするcDNA配列は配列3に示される通りである。フルサイズのプラスミノーゲンは七つのドメインを含む：C末端に位置するセリンプロテアーゼドメイン、N末端に位置するPan Apple (PAp) ドメイン及び5つのKringleドメイン (Kringle 1-5) を含む。swiss prot中の配列を参照すれば、そのシグナルペプチドは残基Met 1-Gly 19を含み、Papは残基Glu 20-Val 98を含み、Kringle 1は残基Cys 103-Cys 181を含み、Kringle 2は残基Glu 184-Cys 262を含み、Kringle 3は残基Cys 275-Cys 352を含み、Kringle 4は残基Cys 377-Cys 454を含み、Kringle 5は残基Cys 481-Cys 560を含む。NCB Iデータによれば、セリンプロテアーゼドメインは残基Val 581-Arg 804を含む。

#### 【0121】

Glu-プラスミノーゲンは天然のフルサイズのプラスミノーゲンであり、791個のアミノ酸からなる（19個のアミノ酸からなるシグナルペプチドを含まない）。該配列をコードするcDNA配列は配列1に示される通りであり、そのアミノ酸配列は配列2に示される通りである。体内において、さらにGlu-プラスミノーゲンの第76-77位のアミノ酸の位置で加水分解することにより形成されたLys-プラスミノーゲンが存在し、例えば配列6に示されるものであり、該アミノ酸配列をコードするcDNA配列は配列5が示す通りである。-プラスミノーゲン (-plasminogen) はフルサイズのプラスミノーゲンにKringle 2-Kringle 5構造の欠損が生じているフラグメントであり、Kringle 1及びセリンプロテアーゼドメインしか含有せず〔39、40〕、-プラスミノーゲンのアミノ酸配列（配列8）を報告している文献があり〔40〕、該アミノ酸配列をコードするcDNA配列は例えば配列7である。ミニプラスミノーゲン (Mini-plasminogen) はKringle 5及びセリンプロテアーゼドメインからなり、残基Val 443-Asn 791（シグナルペプチドGlu-プラスミノーゲン配列を含まないGlu残基を開始アミノ酸とする）について文献が報告しており〔41〕、そのアミノ酸配列は配列10に示される通りであり、該アミノ酸配列をコードするcDNA配列は配列9が示す通りである。しかしマイクロプラスミノーゲン (Micro-plasminogen) はセリンプロテアーゼドメインのみ含有し、そのアミノ酸配列は残基Ala 543-Asn 791（シグナルペプチドを含まないGlu-プラスミノーゲン配列のGlu残基は開始アミノ酸である）と文献が報告し〔42〕、特許文献CN 102154253 Aはそれが残基Lys 531-Asn 791を含むと開示し（シグナルペプチドを含まないGlu-プラスミノーゲン配列のGlu残基を開始アミノ酸とする）、本特許の配列は特許文献CN 102154253 Aを参照でき、そのアミノ酸配列は配列12に示される通りであり、該アミノ酸配列をコードするcDNA配列は配列11に示される通りである。

#### 【0122】

本発明の「プラスミン」と「フィブリンプラスミン」、「纖維タンパクプラスミン」は互いに置き換えて使用でき、その意味は同じである。「プラスミノーゲン」と「フィブリンプラスミノーゲン」、「纖維タンパクプラスミノーゲン」は互いに置き換えて使用でき、その意味は同じである。

#### 【0123】

本願において、プラスミノーゲンの「欠乏」とは、被験者体内のプラスミノーゲンの含有量または活性が正常な人より低く、被験者の正常な生理学的機能に影響を及ぼすのに十分に低いことをいう。プラスミノーゲンの「欠乏」の意味は、被験者体内のプラスミノーゲンの含有量または活性が正常な人より明らかに低く、活性または発現が極微量であり、外部供給によってのみ正常な生理学的機能を維持できることである。

#### 【0124】

10

20

30

40

50

当業者は以下のように理解できる。本発明のプラスミノーゲンのすべての技術構成はプラスミンに適用でき、そのため、本発明に記載の技術構成はプラスミノーゲン及びプラスミンをカバーするものである。

【0125】

本発明の実施形態において、「老衰」と「早老」は互いに置き換えて使用でき、その意味は同じである。

【0126】

循環プロセスにおいて、プラスミノーゲンは閉鎖した非活性コンフォメーションであるが、血栓または細胞表面に結合した際、プラスミノーゲン（PLG）活性化剤（plasminogen activator, PA）の介在下において、開放性のコンフォメーションを有する活性プラスミン（PLM）となる。活性を有するプラスミン（PLM）はさらにフィブリン凝塊をフィブリン分解生成物及びD-二量体に加水分解させ、これにより血栓を溶解させる。そのうちプラスミノーゲンのPApドメインはプラスミノーゲンを非活性閉鎖コンフォメーションにする重要なエピトープであり、しかしKRドメインは受容体及び基質上のリジン残基と結合できるものである。プラスミノーゲン活性化剤としての酵素は、既に複数種類知られ、以下を含む：組織プラスミノーゲン活性化剤（tPA）、ウロキナーゼプラスミノーゲン活性化剤（uPA）、カリクレイン及び凝結因子XII（ハーゲマン因子）などである。

10

【0127】

「プラスミノーゲン活性フラグメント」とはプラスミノーゲンタンパク質において、基質中のターゲット配列と結合してタンパク質加水分解機能を発揮できる活性フラグメントである。本発明はプラスミノーゲンの技術構成に係り、プラスミノーゲン活性フラグメントでプラスミノーゲンの代替とする技術構成を含む。本発明に記載のプラスミノーゲン活性フラグメントはプラスミノーゲンのセリンプロテアーゼドメインを含むタンパク質であり、好ましくは、本発明に記載のプラスミノーゲン活性フラグメントは配列14、配列14と少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性のアミノ酸配列を含有するタンパク質を含むものである。そのため、本発明に記載のプラスミノーゲンは該プラスミノーゲン活性フラグメントを含み、且つ依然として該プラスミノーゲン活性を有するタンパク質を含む。

20

【0128】

現在、血液中のフィブリンプラスミノーゲン及びその活性測定方法は以下を含む：組織フィブリンプラスミノーゲン活性化剤の活性に対する測定（t-PAA）、血漿組織フィブリンプラスミノーゲン活性化剤抗原に対する測定（t-PAAg）、血漿組織プラスミノーゲン活性に対する測定（plgA）、血漿組織プラスミノーゲン抗原に対する測定（plgAg）、血漿組織フィブリンプラスミノーゲン活性化剤の阻害物活性に対する測定、血漿フィブリンプラスミン-抗プラスミン複合物に対する測定（PAP）。最もよく見られる測定方法は発色基質法である：測定対象の血漿中にストレプトキナーゼ（SK）と発光基質を添加し、測定対象の血漿中のPLGはSKの作用下においてプラスミンとなり、後者は発光基質に作用し、それから分光光度計で測定し、吸光度の増加はフィブリンプラスミノーゲンの活性と正比例関係となる。この他にも免疫化学法、ゲル電気泳動法、免疫比濁法、放射免疫拡散法などを用いて血液中のフィブリンプラスミノーゲン活性に対して測定を行うことができる。

30

【0129】

「オルソログ（ortholog）」とは異なる種どうしのホモログであり、タンパク質の相同物もDNAの相同物も含む。それは具体的に異なる種どうしの同じ祖先の遺伝子から進化して得られるタンパク質または遺伝子を言う。本発明のプラスミノーゲンはヒト由来の天然プラスミノーゲンを含み、さらには異なる種に由来する、プラスミノーゲン活性を有するプラスミノーゲンオルソログを含む。

40

【0130】

50

「保存的置換バリアント」とはそのうちの一つの指定されたアミノ酸残基が改変されたがタンパク質または酵素の全体のコンフォメーション及び機能を変えないものであり、これは類似の特性（例えば酸性、塩基性、疎水性など）のアミノ酸でペアレントタンパク質中のアミノ酸配列中のアミノ酸を置換するものを含むがこれらに限られない。類似の性質を有するアミノ酸は知られている通りである。例えば、アルギニン、ヒスチジン及びリジンは親水性の塩基性アミノ酸であり且つ互いに置き換えることができる。同じように、イソロイシンは疎水アミノ酸であり、ロイシン、メチオニンまたはバリンによって置換することができる。そのため、機能の類似する二つのタンパク質またはアミノ酸配列の類似性は異なる可能性もある。例えば、M E G A L I G N アルゴリズムに基づいて 70% ~ 99% の類似性（同一性）を有する。「保存的置換バリアント」はさらに B L A S T または F A S T A アルゴリズムに基づいて 60% 以上のアミノ酸同一性を有するポリペプチドまたは酵素を含み、75% 以上に達すればさらによく、最も好ましくは 85% 以上に達し、さらには 90% 以上に達するのが最も好ましく、さらに天然またはペアレントタンパク質または酵素と比較して同じまたは基本的に類似する性質または機能を有する。

#### 【0131】

「分離された」プラスミノーゲンとは天然環境から分離及び / または回収されたプラスミノーゲンタンパク質である。いくつかの実施形態において、前記プラスミノーゲンは（1）90% を超える、95% を超える、または 98% を超える純度（重量で計算した場合）になるまで精製し、例えば Lowry 法によって決まるもので、例えば 99%（重量で計算した場合）を超えるまで精製する、（2）少なくともスピニングカップ配列分析装置により N 末端または内部アミノ酸配列の少なくとも 15 個の残基が得られる程度になる精製する、または（3）同質性になるまで精製する。該同質性はクマシーブリリアントブルーまたは銀染色により還元性または非還元性条件下のドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミノゲル電気泳動（S D S - P A G E ）によって決まるものである。分離されたプラスミノーゲンはバイオエンジニアリング技術により組み換え細胞から製造することができ、さらに少なくとも一つの精製ステップで分離されたプラスミノーゲンを含む。

#### 【0132】

用語の「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」は本明細書において互いに置き換えて使用でき、いかなる長さのアミノ酸の重合体を指し、遺伝的にコードされた及び非遺伝的にコードされたアミノ酸、化学的または生化学的に修飾されまたは派生したアミノ酸、及び修飾されたペプチド主鎖を有するポリペプチドを含む。該用語は融合タンパク質を含み、異種性アミノ酸配列を有する融合タンパク質を含むがこれに限られず、異種性と同種性由来のリーダー配列（N 端メチオニン残基を有するか有しない）を含む融合物；等々である。

#### 【0133】

参照ペプチド配列の「アミノ酸配列同一性パーセンテージ（%）」の定義は、必要な時にギャップを導入することで最大のパーセンテージ配列の同一性を実現した後、如何なる保存的な置換も配列同一性の一部として見なさない場合、候補配列中における参照ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同じアミノ酸残基のパーセンテージである。パーセンテージのアミノ酸配列の同一性を測定することを目的とした比較は本分野の技術範囲における複数種類の方式によって実現でき、例えば公衆が入手できるコンピュータソフトウェア、例えば B L A S T 、 B L A S T - 2 、 A L I G N または M e g a l i g n ( D N A S T A R ) ソフトウェアによって実現できる。当業者は配列をアライメントするための適切なパラメータを決めることができ、該パラメータが比較対象の配列のフルサイズに対して最大比較の要求を実現するための如何なるアルゴリズムも含む。しかし、本発明の目的のために、アミノ酸配列の同一性パーセンテージは配列比較コンピュータソフトウェア A L I G N - 2 により得られるものである。

#### 【0134】

A L I G N - 2 を用いることによりアミノ酸配列を比較する場合、所定のアミノ酸配列 A の所定のアミノ酸配列 B に対するアミノ酸配列同一性%（または所定のアミノ酸配列 B

に対して、および、またはについてのあるアミノ酸配列と同一性を有する又は含む所定のアミノ酸配列 A ともいう) は以下のように計算される:

分数  $X / Y \times 100$

【0135】

そのうち X は配列アライメントプログラム A L I G N - 2 において該プログラムの A 及び B のアライメントにおいて同一でマッチングすると評価したアミノ酸残基の数であり、且つそのうち Y は B におけるアミノ酸残基の総数である。以下のように理解するべきである: アミノ酸配列 A の長さとアミノ酸配列 B の長さが等しくない場合、A の B に対するアミノ酸配列の同一性 % は、B の A に対するアミノ酸配列同一性 % とは異なる。特に断りのない限り、本文中において使用するすべてのアミノ酸配列同一性値 % は前記の段落に記載の通りであり、A L I G N - 2 コンピュータプログラムによって得られるものである。

10

【0136】

本文において使用されているように、用語の「治療」及び「処理」は期待される薬理及び/または生理的効果が得られることを言う。前記効果は疾患またはその症状を完全または一部予防すること、及び/または疾患及び/またはその症状を一部または完全に治癒するものとすることができます。さらに以下を含む: (a) 疾患が被験者の体内で発生することを予防し、前記被験者は疾患の要因を持っているが、該疾患を有すると診断されていない状況であること; (b) 疾患を抑制し、その形成を阻害すること; 及び (c) 疾患及び/またはその症状を減軽し、即ち疾患及び/またはその症状を減退させること。

20

【0137】

用語の「個体」、「被験者」及び「患者」は本明細書中において互いに置き換えて使用でき、哺乳動物を指し、ネズミ(ラット、マウス)、ヒト以外の霊長類、ヒト、イヌ、ネコ、有蹄動物(例えばウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ)などを含むがこれらに限られない。

【0138】

「治療上有効量」または「有効量」とは、哺乳動物またはその他の被験者に投与して疾患の治療に用いられる際に疾患の前記予防及び/または治療を実現できるプラスミノーゲンの量である。「治療上有効量」は使用するプラスミノーゲン、治療しようとする被験者の疾患及び/または症状の重症度及び年齢、体重などに従って変化するものである。

30

【0139】

2. 本発明のプラスミノーゲンの調製

プラスミノーゲンは治療の用途に用いられるために、自然界から分離及び精製されるものでもよく、標準的な化学ペプチド合成技術によって合成することでもよい。化学的手法によりポリペプチドを合成する際、液相または固相で合成を行うことができる。固相ポリペプチド合成(S P P S)(配列の C 末端アミノ酸を不溶性支持体に附着させ、順番に配列中の残りのアミノ酸を添加する)はプラスミノーゲンの化学的合成に適したものである。各種形式の S P P S、例えば F m o c 及び B o c は、プラスミノーゲンの合成に用いることができる。固相合成に用いられる技術は以下に記載されている: Barany 及び Solid-Phase Peptide Synthesis; 3 - 284 ページ、The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. 第二巻: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A., Merrifield, ら J. Am. Chem. Soc., 85: 2149 - 2156 (1963); Stewart, Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984); 及び Ganesan A. 2006 Mini Rev. Med Chem. 6: 3 - 10 及び Camarero JA ら 2005 Protein Pept Lett. 12: 723 - 8。簡単に言えば、その上にペプチド鎖が構築されている機能性ユニットにより不溶性の多孔ビーズを処理する。カップリング/脱保護の繰り返し循環後に、附着した固相の遊離 N 末端アミンと単一の N 保護を受けているアミノ酸ユニットをカップリングさせる。それから、該ユニットを脱保護し、他のアミノ酸と接続する新しい

40

50

N末端アミンを露出させる。ペプチドを固相上に固定したままにし、それからそれを切除する。

【0140】

標準的な組み換え方法により本発明のプラスミノーゲンを生産する。例えば、プラスミノーゲンをコードする核酸を発現ベクター中に挿入し、それと発現ベクター中の制御配列を操作可能に接続させる。発現制御配列はプロモーター（例えば天然に関連されているプロモーター、または異種由来のプロモーター）、シグナル配列、エンハンサー要素及び転写終了配列を含むが、これらに限られない。発現の制御はベクター中の真核プロモーターシステムとすることができる、前記ベクターは真核宿主細胞（例えばCOSまたはCHO細胞）を形質転換またはトランスフェクションさせる。一旦ベクターを適切な宿主に導入すれば、ヌクレオチド配列の高レベル発現及びプラスミノーゲンの収集及び精製に適した条件下において宿主を維持する。

10

【0141】

適切な発現ベクターは通常宿主体内において附加体または宿主染色体DNAの整合部分として複製される。通常、発現ベクターは選択マーカー（例えばアンピシリン耐性、ハイグロマイシン耐性、テトラサイクリン耐性、カナマイシン耐性またはネオマイシン耐性）を含み、インビトロで所望のDNA配列によって形質転換されたそれらの細胞に対して測定を行うことに有用である。

【0142】

大腸菌 (*Escherichia coli*) は目的抗体をコードするポリヌクレオチドをクローンする原核宿主細胞の例である。その他の使用に適した微生物宿主は桿菌を含み、例えばバチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) 及びその他の腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae*)、例えばサルモネラ属 (*Salmonella*)、セラチア属 (*Serratia*)、及び各種シュードモナス属 (*Pseudomonas*) 種である。これらの原核宿主において、発現ベクターを生成でき、通常は宿主細胞と相容する発現制御配列（例えば複製開始点）を含むものである。また、多くの公知のプロモーターが存在し、例えば乳糖プロモーターシステム、トリプトファン (*trp*) プロモーターシステム、-ラクタマーゼプロモーターシステム、またはファージ由来のプロモーターシステムである。プロモーターは一般的に発現を制御し、必要に応じて遺伝子配列を制御する場合に、転写及び翻訳を起動するために、さらにリボソームの結合位置配列などを有してもよい。

20

【0143】

その他の微生物、例えば酵母も発現に用いることができる。酵母（例えばサッカロミセス (*S. cerevisiae*)）及びピキア (*Pichia*) が適した酵母宿主細胞の例であり、そのうちの適切な担体は必要に応じて発現制御配列（例えばプロモーター）、複製開始点、終止配列など含む。典型的なプロモーターは3-ホスホグリセリン酸キナーゼ及びその他の糖分解酵素を含む。誘導型酵母プロモーターはアルコール脱水素酵素、イソチトクロムC、及び麦芽糖とガラクトースの利用のための酵素のプロモーターを含む。

30

【0144】

微生物以外に、哺乳動物細胞（例えば体外細胞培養物中において培養された哺乳動物細胞）も本発明のプラスミノーゲンの発現に用いることができる（例えば目的抗-Tau抗体をコードするポリヌクレオチド）。例えば *Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987)* 参照。適した哺乳動物宿主細胞はCHO細胞系、各種COS細胞系、HeLa細胞、骨髄腫細胞系、及び形質転換されたB細胞またはハイブリドーマを含む。これらの細胞に用いられる発現ベクターは発現制御配列、例えば複製開始点、プロモーター、及びエンハンサー (*Queenら, Immunol. Rev. 89: 49 (1986)*)、及び必要とされる加工情報位置、例えばリボソームの結合サイト、RNAの切断サイト、ポリアデノシン酸化サイト、及び転写ターミネーター配列を含むことができる。適切な発現制御配列の例はウサギ免疫グロブリン遺伝子、SV40、アデノウイルス、ウシ乳頭腫ウィルス、サイ

40

50

トメガロウイルスなどの派生のプロモーターである。Coら、J. Immunol. 148: 1149 (1992) を参照すること。

【0145】

一旦合成（化学または組み換え的に）されれば、本分野の標準的な手順、例えば硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティカラム、カラムクロマトグラフィー、高速液相クロマトグラフィー（HPLC）、ゲル電気泳動などにより本発明に記載のプラスミノーゲンを精製することができる。該プラスミノーゲンは基本的に純粋なものであり、例えば少なくとも約80%から85%の純度で、少なくとも約85%～90%の純度で、少なくとも約90%～95%の純度で、または98%～99%の純度またはさらに純度が高いものであり、例えば汚染物を含まず、前記汚染物は例えば細胞碎片、目的抗体以外の大分子などである。

10

【0146】

3. 薬物配合剤

所望の純度のプラスミノーゲンと必要に応じて薬用担体、賦形剤、または安定化剤（Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, O sol, A. ed. (1980)）を混合して凍結乾燥製剤または水溶液を形成して治療用の配合剤を得る。許容可能な担体、賦形剤、安定化剤は所要の用量及び濃度下において被験者に対して毒性がなく、さらに例えばリン酸塩、クエン酸塩及びその他の有機酸などの緩衝剤を含む。抗酸化剤はアスコルビン酸和メチオニンを含む；防腐剤（例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメチレンジアミン；塩化ベンザルコニウム（benzalkonium chloride）、ベンゼトニウムクロリド；フェノール、ブタノールまたはベンジルアルコール；アルキルパラヒドロキシ安息香酸エステル、例えばメチルまたはプロピルパラヒドロキシ安息香酸エステル；ピロカテコール；レソルシノール；シクロヘキサノール；3-ペントノール；m-クレゾール）；低分子量ポリペプチド（少なくとも約10個の残基を有するもの）；タンパク質例えば血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン；親水性重合体、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン酸、ヒスチジン、アルギニンまたはリシンである；単糖、二糖及びその他の炭水化物はグルコース、マンノース、またはデキストリンを含む；キレート剤は例えばEDTAである；糖類は例えばショ糖、マンニトール、フコースまたはソルビトールである；塩形成イオン、例えばナトリウム；金属複合体（例えば亜鉛-タンパク複合体）；及び/または非イオン界面活性剤、例えばTWEEN TM、PLURONIC CSTMまたはポリエチレングリコール（PEG）である。好ましくは凍結乾燥された抗-VEGF抗体配合剤であり、WO 97/04801に記載されているとおりであり、本明細書において参考とされるものである。

20

【0147】

本発明の配合剤は治療を必要とする具体的な症状の必要とする一種類以上の活性化合物を含有してもよく、好ましくは活性が相補的で互いに副作用を有しないものである。例えば、血圧降下薬、抗不整脈薬、糖尿病治療薬等である。

30

【0148】

本発明のプラスミノーゲンは例えば凝集技術または界面重合によって作られるマイクロカプセル中に内包ことができ、例えば、膠質薬物輸送系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン剤、ナノ粒子及びナノカプセル）中に入れまたは粗エマルジョン状液中のヒドロキシメチルセルロースまたはグルーマイクロカプセル及びポリ（メタアクリル酸メチル）マイクロカプセル中に入れることができる。これらの技術はRemington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, O sol, A. Ed. (1980) に開示されている。

40

【0149】

体内に投与することに用いられる本発明のプラスミノーゲンは必ず無菌である必要がある。これは凍結乾燥及び再度配合する前または後に除菌濾過膜で濾過することで容易に実現できる。

【0150】

50

本発明のプラスミノーゲンは緩衝製剤を調製できる。緩衝製剤の適切な実例は一定の形状を有し且つ糖タンパクを含む固体の疎水性重合体の半透過マトリックスを含み、例えば膜またはマイクロカプセルである。緩衝基質の実例はポリエステル、水性ゲル（例えばポリ（2-ヒドロキシエチル-メタアクリル酸エステル）（Langerら, J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 (1981); Langer, Chem. Tech., 12: 98-105 (1982)）またはポリ（ビニールアルコール）、ポリラクチド（米国特許 3773919, EP 58, 481）、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタミン酸の共重合体（Sidmanら, Biopolymers 22: 547 (1983)），分解できないエチレン-ビニルアセテート（ethylene-vinyl acetate）（Langerら, 出所は前記と同じ）、または分解可能な乳酸-ヒドロキシ酢酸共重合体、例えばLupron Depot TM（乳酸-ヒドロキシ酢酸共重合体及びリュープロレリン（leuprolide）酢酸エステルからなる注射可能なミクロスフェア体）、及びポリD-(-)-3-ヒドロキシ酪酸を含む。重合体、例えばエチレン-酢酸エチル及び乳酸-ヒドロキシ酢酸は、持続的に分子を100日間以上放出することができ、しかしいくつかの水性ゲルがタンパク質を放出する時間は比較的短い。関連のメカニズムに応じてタンパク質を安定化させる合理的なストラテジーにより設計できる。例えば、凝集のメカニズムが硫化ジスルフィド結合の交換によって分子間S-S結合を形成するであれば、メルカプト基残基を修飾することにより、酸性溶液中から凍結乾燥させ、湿度を制御し、適切な添加剤を用いて、及び特定の重合体基質組成物を開発することで安定化を実現できる。

#### 【0151】

##### 4. 投与及び使用量

異なる方式、例えば静脈内、腹膜内、皮下、頭蓋骨内、髄腔内、動脈内（例えば頸動脈）、筋肉内、鼻内、体表または皮内投与または脊髄または脳内輸送により本発明の薬物組成物の投与を実現できる。エアロゾル製剤例えば鼻噴霧製剤は活性化剤を含有する精製した水性またはその他の溶液及び防腐剤と等張剤を含有する。このような製剤を鼻粘膜と相容し得るpH及び等張状態に調整する。

#### 【0152】

一部の場合において、以下的方式により本発明のプラスミノーゲン薬物組成物を修飾または配合することができ、これにより血液脳関門を通過できる能力を提供する。

#### 【0153】

胃腸外での投与に用いられる製造物は無菌水性または非水性溶液、懸濁液及び乳剤を含む。非水性溶媒の例はプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、例えばオリーブオイルのような植物油、及び注射可能な有機エステル、例えばオレイン酸エチルである。水性担体は水、アルコール性/水性溶液、乳剤または懸濁液を含み、食塩水及び緩衝媒介を含む。胃腸外媒介物は塩化ナトリウム溶液、リンガ・デキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、または固定油である。静脈内媒介物は液体及び栄養補充物、電気分解補充物などを含む。されば防腐剤及びその他の添加剤、例えば抗微生物製剤、抗酸化剤、キレート剤、不活性ガスなども存在してもよい。

#### 【0154】

いくつかの実施形態において、本発明のプラスミノーゲンは血液脳関門の通過を促進する薬剤と配合されている。いくつかの場合において、本発明のプラスミノーゲンは直接またはリンカにより血液脳関門の通過を促進する担体分子、ペプチドまたはタンパク質と融合する。一部の実施形態において、本発明のプラスミノーゲンは内在性血液脳関門（BBB）受容体に結合するポリペプチドと融合する。プラスミノーゲンと内在性血液脳関門受容体に結合するポリペプチドは、BBBの通過を促進する。内在性血液脳関門（BBB）受容体に結合するポリペプチドは抗体、例えばモノクローナル抗体、またはその抗原結合フラグメントを含み、それは特異的に内在性BBB受容体に結合する。適切な内在性BBB受容体はインスリン受容体を含むがこれに限られず、抗体はリポソームに内包されたものである。例えば米国特許公開書類No. 2009/0156498を参照すること。

10

20

30

40

50

**【 0 1 5 5 】**

医療関係者は各種臨床的要素により用量案を決めることができる。例えば医学分野で公知のように、任意の患者の用量は複数の要素によって決められ、これらの要素は患者の体型、体表面積、年齢、投与される具体的な化合物、性別、投与回数及び経路、全体の健康度、及び同時に投与するその他の薬物を含む。本発明が含有するプラスミノーゲンの薬物組成物の用量の範囲は例えば被験者体重に対して毎日約 0.0001 ~ 2000 mg / kg であり、または約 0.001 ~ 500 mg / kg ( 例えば 0.02 mg / kg , 0.25 mg / kg , 0.5 mg / kg , 0.75 mg / kg , 10 mg / kg , 50 mg / kg など ) とすることができます。例えば、用量は 1 mg / kg 体重または 50 mg / kg 体重または 1 - 50 mg / kg の範囲とすることができます、または少なくとも 1 mg / kg である。この例示性の範囲より高いまたは低い用量もカバーされ、特に前記の要素を考慮した場合である。前記範囲の中間用量も本発明の範囲内に含まれるものである。被験者は毎日、隔日、毎週または経験分析によって決められた任意のスケジュール表に従ってに従ってこのような用量を投与できる。例示的な用量のスケジュール表は連続数日 1 - 10 mg / kg 投与することである。本発明の薬物の投与過程において血栓及びその関連疾患の治療効果及び安全性はリアルタイムに評価、定期的に評価すべきである。

10

**【 0 1 5 6 】****5 . 治療の効力と治療安全性**

本発明の一つの実施形態はプラスミノーゲンを用いて被験者を治療した後、治療効力及び治療安全性に対して判断を行うことに係る。よく用いられる骨の希薄化症の治療効果のモニタリングと評価内容は、定着フォロー ( 不良反応、規則正しい服薬、基礎措置および骨折リスク因子再評価など ) 、新発骨折評価 ( 臨床的骨折、身長低下、映像学検査 ) 、骨密度 ( bone mineral density , BMD ) 測定と骨代謝回転マーカー ( bone turnover markers , BTM ) 測定、及びこれらのデータに基づく総合的再評価などを含む。その中で、 BMD は現在最も広範に応用されている治療効果のモニタリングと評価方法である。例えば、二重エネルギー X 線吸収測定器 ( dual energy X-ray absorptiometry , DXA ) 、定量 CT ( quantitative computed tomography , QCT ) 、単一光子吸収法 ( SPA ) 、または超音波測定法により BMD を測定することができる。治療開始後、毎年 BMD を 1 回測定し、 BMD が安定してから間隔を適切に延長することができ、例えば、 2 年に 1 回モニタリングすることができる。 BTM について、現在、血清学指標においてよく使用されている骨形成指標は、血清 1 型プロコラゲン N 末端プロペプチド ( procollagen type 1 n-terminal propeptide , PINP ) であり、骨吸収指標は血清 1 型プロコラゲン C 末端テロペプチド ( serum C-terminal telopeptide , S-CTX ) である。研究の進展により、より合理的な測定指標を適時に調整することができる。治療開始前にベースライン値を測定し、形成を促進する薬物を用いて治療してから 3 ヶ月、吸収を抑制する薬物を用いて治療してから 3 ~ 6 ヶ月に測定すべきである。 BTM は骨格の動態情報を提供することができ、作用と機能では BMD から独立しているとともに、 BMD と相互補完のモニタリング手段となり、両者を結合するとより高い臨床的価値を有する。一般的には、治療後 BMD が上昇したり安定したりし、 BTM には予想される変化があり、しかも治療中に骨折がない場合、治療反応が良好であると考えられる。また、本発明はさらに、プラスミノーゲン及びその変体を用いて被験者を治療する過程中および治療後に該治療案の安全性に対する判断に係り、これは、被験者体内での薬物の血清半減期、治療半減期、半数中毒量 ( TD50 ) 、半数致死量 ( LD50 ) を統計し、または治療過程においてまたは治療後に発生する、アレルギー反応のような様々な不良事件を観察することを含むが、これらに限定されていない。

20

**【 0 1 5 7 】****6 . 製品または薬物キット**

本発明の一つの実施形態は製品または薬物キットに係るものであり、本発明のプラスミ

30

40

50

ノーゲンを含有する。前記製品は好ましくは一つの容器、ラベルまたはプロトコルを含む。適切な容器はボトル、バイアル、注射器などである。容器は各種材料例えばガラスまたはプラスチックから作られることができる。前記容器は組成物を含有し、前記組成物は本発明の疾患または症状を有効に治療し且つ無菌の入口を有する（例えば前記容器は静脈輸液用パックまたはバイアルであり、皮下注射針によって貫通される栓を含む）。前記組成物中の少なくとも一種類の活性化剤がプラスミノーゲンである。前記容器上にあるまたは添付されているラベルは前記組成物を本発明の前記老衰または老衰の関連疾患の治療に用いられると説明するものである。前記製品はさらに薬用緩衝液を含有する第二容器を含み、前記薬用緩衝液は例えばリン酸塩緩衝の食塩水、リンガー溶液及びグルコース溶液を含む。さらには商業及び使用者の角度から見ると必要とされるその他の物質、即ちその他の緩衝液、希釈剤、濾過物、針及び注射器を含むことができる。また、前記製品は使用説明を有するプロトコルを含み、これは例えば前記組成物の使用者にプラスミノーゲン組成物及び疾患の治療に伴うその他の薬物を患者に投与することを指示するものである。

【図面の簡単な説明】

【0158】

【図1】図1は26週齢の糖尿病マウスにプラスミノーゲンを35日投与した後の血清インスリンの測定結果を示したものである。その結果、プラスミノーゲン投与群の血清インスリンレベルは溶媒PBS投与対照群より明らかに高く、しかもその差が統計学的に有意である（＊は、 $P < 0.05$ を表す）ことは示されている。これは、プラスミノーゲンがインスリンの分泌を効果的に促進できることを示している。

【図2】図2は24～25週齢の糖尿病マウスにプラスミノーゲンを35日投与した後のインスリン免疫組織化学的染色の観察結果を示すものである。Aは溶媒PBS投与対照群であり、Bはプラスミノーゲン投与群であり、Cは定量分析結果である。その結果、プラスミノーゲン投与群のインスリンの発現（矢印に表記される）は溶媒PBS投与対照群より明らかに高く、しかもその差が統計学的に有意である（＊は、 $P < 0.05$ を表す）ことは示されている。これは、プラスミノーゲンが膵島の機能修復を促進でき、インスリンの生成と分泌Tを促進できることを示している。

【図3】図3は26週齢の糖尿病マウスにプラスミノーゲンを35日投与した後のインスリン免疫組織化学的染色の観察結果を示すものである。Aは溶媒PBS投与対照群であり、Bはプラスミノーゲン投与群であり、Cは定量分析の結果である。その結果、プラスミノーゲン投与群のインスリンの発現（矢印に表記される）は溶媒PBS投与対照群より明らかに高く、しかもその差が統計学的に極めて有意である（＊＊は、 $P < 0.01$ を表す）ことは示されている。これは、プラスミノーゲンが膵島の機能修復を効果的に促進でき、インスリンの生成と分泌を促進できることを示している。

【図4】図4はT1DMモデルにおけるPLG活性が損傷したマウスにプラスミノーゲンを28日投与した後の膵島インスリンの免疫組織化学的観察結果を示すものである。Aはブランク対照群であり、Bは溶媒PBS投与対照群であり、Cはプラスミノーゲン投与群である。免疫組織化学的結果によると、プラスミノーゲン投与群のインスリン陽性発現（矢印に表記される）は溶媒PBS投与対照群より明らかに多く、しかもプラスミノーゲン投与群は溶媒PBS投与対照群よりブランク対照群により近い。これは、プラスミノーゲンがPLG活性が損傷したマウスのT1DMモデルにおけるインスリンの合成と分泌を促進できることを示している。

【図5】図5はT1DMモデルにおけるPLG活性が正常であるマウスにプラスミノーゲンを28日投与した後の膵島インスリンの免疫組織化学的観察結果を示すものである。Aはブランク対照群であり、Bは溶媒PBS投与対照群であり、Cはプラスミノーゲン投与群である。免疫組織化学的結果によると、プラスミノーゲン投与群のインスリン陽性発現（矢印に表記される）は溶媒PBS投与対照群より明らかに多く、しかもプラスミノーゲン投与群は溶媒PBS投与対照群よりブランク対照群により近い。これは、プラスミノーゲンがPLG活性が正常であるマウスのT1DMモデルにおけるインスリンの合成と発現を促進できることを示している。

10

20

30

40

50

【図 6】図 6 は T 1 DM モデルマウスにプラスミノーゲンを 20 日投与した後の血清インスリンの測定結果を示すものである。その結果、溶媒 PBS 投与対照群マウスの血清インスリン濃度はプラスミノーゲン投与群マウスより明らかに低く、しかもその差が統計学的な有意の差に近い ( $P = 0.08$ )。これは、プラスミノーゲンが T 1 DM マウスのインスリン分泌を促進することができるることを示している。

【図 7】図 7 は 24 ~ 25 週齢の糖尿病マウスにプラスミノーゲンを 10 日、 31 日投与した後の血糖測定結果を示したものである。その結果、プラスミノーゲン投与群マウスの血糖は溶媒 PBS 投与対照群より明らかに低く、しかもその差が統計学的に有意である (\* は、  $P < 0.05$  を表し、 \*\* は、  $P < 0.01$  を表す) ことは示されている。また、投与時間が長くなるにつれて、溶媒 PBS 投与対照群マウスの血糖は上昇する傾向があるに対して、プラスミノーゲン投与群の血糖は徐々に低下する。これは、プラスミノーゲンが血糖を降下する作用があることを示している。

【図 8】図 8 はプラスミノーゲンが糖尿病マウスの血清フルクトサミンの濃度に対する影響を示したものである。測定した結果、プラスミノーゲン投与後の血清フルクトサミンの濃度は明らかに低下し、投与前と比べ、その差が統計学的に極めて有意である (\*\* は、  $P < 0.01$  を表す) ことは示されている。これは、プラスミノーゲンが糖尿病マウスの血糖を顕著に降下することができるることを示している。

【図 9】図 9 は 26 週齢の糖尿病マウスにプラスミノーゲンを 35 日投与した後の血清フルクトサミンの測定結果を示すものである。測定結果によると、プラスミノーゲン投与群の血清フルクトサミンの濃度は溶媒 PBS 投与対照群より明らかに低く、その差が統計学的な有意の差に近い ( $P = 0.06$ )。これは、プラスミノーゲンが糖尿病マウスの血糖レベルを顕著に低下させることができることを示している。

【図 10】図 10 は 26 週齢の糖尿病マウスにプラスミノーゲンを 35 日投与した後の血漿糖化ヘモグロビンの測定結果を示したものである。その結果、プラスミノーゲン投与群マウスの糖化ヘモグロビンの OD 値は溶媒 PBS 投与対照群より明らかに低く、しかもその差が統計学的に極めて有意である (\*\* は、  $P < 0.01$  を表す) ことは示されている。これは、プラスミノーゲンが糖尿病マウスの血糖を降下する作用があることを示している。

【図 11】図 11 は 26 週齢の糖尿病マウスにプラスミノーゲンを 10 日投与した後の I P G T T 測定結果を示したものである。その結果、ブドウ糖を腹腔に注射した後、プラスミノーゲン投与群マウスの血糖レベルは溶媒 PBS 投与対照群より低く、しかも溶媒 PBS 投与対照群と比べてプラスミノーゲン投与群の糖耐性曲線は正常なマウスにより近いことは示されている。これは、プラスミノーゲンが糖尿病マウスの耐糖能を明らかに改善できることを示している。

【図 12】図 12 は T 1 DM モデル P L G 活性が正常であるマウスにプラスミノーゲンを 10 日投与してから禁食後の血糖測定結果を示したものである。その結果、溶媒 PBS 投与対照群マウスの血糖はプラスミノーゲン投与群より明らかに高く、しかもその差が統計学的に極めて有意である (\*\* は、  $P < 0.001$  を表す) ことは示されている。これは、プラスミノーゲンが、 T 1 DM モデルにおける P L G 活性が正常なマウスの血糖レベルを顕著に低下させることができることを示している。

【図 13】図 13 は T 1 DM モデル P L G 活性が正常なマウスにプラスミノーゲンを 28 日投与した後の I P G T T 測定結果を示したものである。その結果、溶媒 PBS 投与対照群マウスのブドウ糖注射後の血糖濃度はプラスミノーゲン投与群より明らかに高く、しかも溶媒 PBS 投与対照群と比べ、プラスミノーゲン投与群の糖耐性曲線は正常なマウスにより近いことは示されている。これは、プラスミノーゲンが、 T 1 DM モデルにおける P L G 活性が正常なマウスの耐糖能を高めることができることを示している。

【図 14】図 14 は T 1 DM モデルマウスにプラスミノーゲンを 20 日投与した後の血糖測定結果を示すものである。その結果、溶媒 PBS 投与対照群マウスの血糖はプラスミノーゲン投与群マウスより明らかに高く、しかもその差が統計学的に有意である ( $P = 0.04$ ) ことは示されている。これは、プラスミノーゲンが T 1 DM マウスのブドウ糖分解

能力を促進でき、血糖を降下することができることを示している。

【図15】図15は24～25週齢の糖尿病マウスにプラスミノーゲンを31日投与した後の膵臓のH E染色の写真および膵島面積比を示したものである。A、Bは溶媒PBS投与対照群であり、CとDはプラスミノーゲン投与群であり、Eは膵島面積定量分析結果である。その結果、溶媒PBS投与対照群の大部分の膵島が委縮し、委縮した膵島細胞は腺房（図に示される）に置き換えられ、膵島のヘリの腺房が増殖して膵島と腺房との境目があいまいになっている；プラスミノーゲン投与群の大部分の膵島は対照群より面積が大きく、しかも膵島内には腺房増殖がなく、ただ僅かの膵島内に僅かの腺房が残存しており、膵島と腺房との境目がはっきりしていることは示されている。プラスミノーゲン投与群と対照群の、膵島と膵臓との面積比を比較すると、プラスミノーゲン投与群は対照群の倍近くになっていることが分かる。これは、プラスミノーゲンが24～25週齢の糖尿病マウスの膵島損傷の修復を促進でき、損傷した膵島を修復することにより糖尿病を治療することができることを示している。

【図16】図16は24～25週齢の糖尿病マウスにプラスミノーゲンを31日投与した後の膵島のシリウスレッド染色の観察結果を示したものである。Aは溶媒PBS投与対照群であり、Bはプラスミノーゲン投与群であり、Cは定量分析の結果である。その結果、プラスミノーゲン投与群マウスの膵島コラーゲン沈着（矢印に標記される）は溶媒PBS投与対照群より明らかに少なく、しかもその差が統計学的に有意である（＊は、P < 0.05を表す）ことは示されている。これは、プラスミノーゲンが糖尿病動物の膵島の纖維化を改善できることを示している。

【図17】図17は24～25週齢の糖尿病マウスにプラスミノーゲンを31日投与した後の膵島Caspase-3免疫組織化学的染色の観察結果を示したものである。Aは溶媒PBS投与対照群であり、Bはプラスミノーゲン投与群である。その結果、プラスミノーゲン投与群のCaspase-3の発現（矢印に表記される）は溶媒PBS投与対照群より明らかに低いことは示されている。これは、プラスミノーゲンが膵島細胞のアポトーシスを減少させ、糖尿病マウスの膵臓組織を保護できることを示している。

【図18】図18は18週齢の糖尿病マウスにプラスミノーゲンを35日投与した後の膵島インスリン免疫組織化学的染色結果を示すものである。Aは溶媒PBS投与対照群であり、Bはプラスミノーゲン投与群であり、Cは定量分析の結果である。その結果、プラスミノーゲン投与群のインスリンの発現（矢印に表記される）は溶媒PBS投与対照群より明らかに高く、しかもその差が統計学的な有意の差に近い（P = 0.15を表す）ことは示されている。これは、プラスミノーゲンが膵島の機能修復を促進でき、インスリンの生成と分泌Tを促進できることを示している。

【図19】図19は24～25週齢の糖尿病マウスにプラスミノーゲンを31日投与した後の膵臓組織NF-kB免疫組織化学的染色の観察結果を示すものである。Aは正常対照群であり、Bは溶媒PBS投与対照群であり、Cはプラスミノーゲン投与群であり、Dは定量分析結果である。その結果、プラスミノーゲン投与群のNF-kBの発現（矢印に表記される）は溶媒PBS投与対照群より明らかに高く、しかもその差が統計学的に有意である（＊は、P < 0.05を表す）ことは示されている。これは、プラスミノーゲンが多方向核転写因子NF-kBの発現を促進でき、24～25週齢の糖尿病マウスの膵島炎症の修復を促進できることを示している。

【図20】図20は18週齢の糖尿病マウスにプラスミノーゲンを35日投与した後の膵島グルカゴン免疫組織化学的観察結果を示すものである。Aは正常対照群であり、Bは溶媒PBS投与対照群であり、Cはプラスミノーゲン投与群であり、Dは定量分析の結果である。その結果、グルカゴンは正常対照群マウスにおいて膵島周辺の細胞の領域に発現されている。プラスミノーゲン投与群と比べ、溶媒PBS投与対照群のグルカゴンの陽性細胞（矢印に表記される）は明らかに増え、グルカゴンの陽性細胞は膵島の中央に浸潤し、しかも平均光学密度の定量分析結果のその差が統計学的に極めて有意である（＊＊は、P < 0.01を表す）；プラスミノーゲン投与群のグルカゴンの陽性細胞は膵島周辺に散在的に分布し、PBS投与対照群と比べ、プラスミノーゲン投与群の膵島形態は正常マウ

スにより近い。これは、プラスミノーゲンが膵島 細胞の増殖およびグルカゴンの分泌を顕著に抑制でき、膵島 細胞の分布の乱れを修正でき、膵島損傷の修復を促進できることを示している。

【図21】図21は24～25週齢の糖尿病マウスにプラスミノーゲンを35日投与した後の膵島グルカゴン免疫組織化学的観察結果を示すものである。Aは正常対照群であり、Bは溶媒PBS投与対照群であり、Cはプラスミノーゲン投与群である。その結果、グルカゴンは正常対照群マウスにおいて膵島周辺の 細胞の領域に発現されている。プラスミノーゲン投与群と比べ、溶媒PBS投与対照群のグルカゴンの陽性細胞（矢印に表記される）は明らかに増え、陽性細胞は膵島の中央に浸潤している；プラスミノーゲン投与群のグルカゴンの陽性細胞は膵島周辺に散在的に分布し、PBS投与対照群と比べ、プラスミノーゲン投与群の膵島形態は正常マウスにより近い。これは、プラスミノーゲンが膵島細胞の増殖およびグルカゴンの分泌を顕著に抑制でき、膵島 細胞の分布の乱れを修正でき、膵島損傷の修復を促進できることを示している。

【図22】図22は26週齢の糖尿病マウスにプラスミノーゲンを35日投与した後の膵島グルカゴン免疫組織化学的観察結果を示すものである。Aは正常対照群であり、Bは溶媒PBS投与対照群であり、Cはプラスミノーゲン投与群であり、Dは定量分析の結果である。その結果、グルカゴンは正常対照群マウスにおいて膵島周辺の 細胞の領域に発現されている。プラスミノーゲン投与群と比べ、溶媒PBS投与対照群のグルカゴンの陽性細胞（矢印に表記される）は明らかが増え、陽性細胞は膵島の中央に浸潤し、しかも平均光学密度の定量分析結果に統計学的に有意の差がある（＊は、 $P < 0.05$ を表す）；プラスミノーゲン投与群のグルカゴンの陽性細胞は膵島周辺に散在的に分布し、PBS投与対照群と比べ、プラスミノーゲン投与群の膵島形態は正常マウスにより近い。これは、プラスミノーゲンが膵島 細胞の増殖およびグルカゴンの分泌を顕著に抑制でき、膵島 紵胞の分布の乱れを修正でき、膵島損傷の修復を促進できることを示している。

【図23】図23はプラスミノーゲンを28日投与した後のPLG活性が正常であるマウスがT1DMモデルにおける膵島グルカゴン免疫組織化学的観察結果を示すものである。Aはブランク対照群であり、Bは溶媒PBS投与対照群であり、Cはプラスミノーゲン投与群であり、Dは定量分析結果である。その結果、溶媒PBS投与対照群のグルカゴンの陽性発現はプラスミノーゲン投与群より明らかに多く、しかも平均光学密度の定量分析結果のその差が統計学的に有意である（＊は、 $P < 0.05$ を表す）ことは示されている。これは、プラスミノーゲンが糖尿病マウスの膵島 細胞のグルカゴン分泌を顕著に減少させることができ、膵島損傷の修復を促進できることを示している。

【図24】図24は18週齢の糖尿病マウスにプラスミノーゲンを35日投与した後の膵島IRS-2免疫組織化学的観察結果を示すものである。Aは正常対照群であり、Bは溶媒PBS投与対照群であり、Cはプラスミノーゲン投与群であり、Dは定量分析の結果である。その結果、溶媒PBS投与対照群マウスの膵島IRS-2陽性発現（矢印に表記される）はプラスミノーゲン投与群より明らかに少なく、しかもその差が統計学的に極めて有意である（＊＊は、 $P < 0.01$ を表す）；プラスミノーゲン投与群のIRS-2発現レベルは溶媒PBS投与対照群より正常対照群マウスにより近い。これは、プラスミノーゲンが膵島細胞IRS-2の発現を効果的に増加させ、インスリンシグナル伝達を改善し、糖尿病マウスの膵島 細胞損傷を減少させることができることを示している。

【図25】図25は24～25週齢の糖尿病マウスにプラスミノーゲンを31日投与した後の膵島IRS-2免疫組織化学的観察結果を示すものである。Aは正常対照群であり、Bは溶媒PBS投与対照群であり、Cはプラスミノーゲン投与群であり、Dは定量分析の結果である。その結果、溶媒PBS投与対照群マウスの膵島IRS-2陽性発現（矢印に表記される）はプラスミノーゲン投与群より明らかに少なく、しかもその差が統計学的に有意である（＊は、 $P < 0.05$ を表す）；プラスミノーゲン投与群のIRS-2発現レベルは溶媒PBS投与対照群より正常対照群マウスにより近い。これは、プラスミノーゲンが膵島細胞IRS-2の発現を効果的に増加させ、インスリンシグナル伝達を改善し、糖尿病マウスの膵島 細胞損傷を減少させることができることを示している。

10

20

30

40

50

【図26】図26は26週齢の糖尿病マウスにプラスミノーゲンを35日投与した後の膵島IRS-2免疫組織化学的観察結果を示すものである。Aは正常対照群であり、Bは溶媒PBS投与対照群であり、Cはプラスミノーゲン投与群であり、Dは定量分析結果である。その結果、溶媒PBS投与対照群マウスの膵島IRS-2陽性発現（矢印に表記される）はプラスミノーゲン投与群より明らかに少ない；プラスミノーゲン投与群のIRS-2発現レベルは溶媒PBS投与対照群より正常対照群マウスにより近い。これは、プラスミノーゲンが膵島細胞IRS-2の発現を効果的に増加させ、インスリンシグナル伝達を改善し、糖尿病マウスの膵島細胞損傷を減少させることができることを示している。

【図27】図27はプラスミノーゲンを28日投与した後のPLG活性が正常であるT1DMマウスの膵島IRS-2免疫組織化学的観察結果を示すものである。Aは正常対照群であり、Bは溶媒PBS投与対照群であり、Cはプラスミノーゲン投与群である。その結果、溶媒PBS投与対照群マウスの膵島IRS-2陽性発現（矢印に表記される）はプラスミノーゲン投与群より明らかに少ない；プラスミノーゲン投与群のIRS-2発現レベルは溶媒PBS投与対照群より正常対照群マウスにより近い。これは、プラスミノーゲンが膵島細胞IRS-2の発現を効果的に増加させ、インスリンシグナル伝達を改善し、PLG活性が正常であるT1DMマウスの膵島細胞損傷を減少させることができることを示している。

【図28】図28は26週齢の糖尿病マウスにプラスミノーゲンを35日投与した後の膵島好中球の免疫組織化学的観察結果を示すものである。Aは正常対照群であり、Bは溶媒PBS投与対照群であり、Cはプラスミノーゲン投与群である。その結果、プラスミノーゲン投与群の陽性発現の細胞（矢印に表記される）は溶媒PBS投与対照群より少なく、しかもプラスミノーゲン投与群は溶媒PBS投与対照群より正常対照群により近い。これは、プラスミノーゲンが好中球の浸潤を減少させることができることを示している。

【図29】図29はT1DMモデルにおけるPLG活性が損傷したマウスにプラスミノーゲンを28日投与した後の膵島好中球の免疫組織化学的観察結果を示すものである。Aはプランク対照群であり、Bは溶媒PBS投与対照群であり、Cはプラスミノーゲン投与群である。その結果、プラスミノーゲン投与群の陽性発現の細胞（矢印に表記される）は溶媒PBS投与対照群より少なく、しかもプラスミノーゲン投与群は溶媒PBS投与対照群よりプランク対照群により近い。これは、プラスミノーゲンがPLG活性が損傷したマウスのT1DMモデルにおける膵島好中球の浸潤を減少させることができることを示している。

【図30】図30はT1DMモデルにおけるPLG活性が正常であるマウスにプラスミノーゲンを28日投与した後の膵島好中球の免疫組織化学的観察結果を示すものである。Aはプランク対照群であり、Bは溶媒PBS投与対照群であり、Cはプラスミノーゲン投与群である。その結果、プラスミノーゲン投与群の陽性発現の細胞（矢印に表記される）は溶媒PBS投与対照群より少なく、しかもプラスミノーゲン投与群は溶媒PBS投与対照群よりプランク対照群により近い。これは、プラスミノーゲンがPLG活性が正常であるマウスのT1DMモデルにおける膵島好中球の浸潤を促進できることを示している。

【図31】図31はT1DMモデルにおけるPLG活性が損傷したマウスにプラスミノーゲンを28日投与した後の膵島NF-kBの免疫組織化学的観察結果を示すものである。Aはプランク対照群であり、Bは溶媒PBS投与対照群であり、Cはプラスミノーゲン投与群である。その結果、プラスミノーゲン投与群のNF-kB発現（矢印に表記される）は溶媒PBS投与対照群より明らかに多いことは示されている。これは、プラスミノーゲンが炎症修復因子NF-kBの発現を促進することができ、膵島炎症の修復を促進することができることを示している。

【図32】図32は18週齢の糖尿病マウスにプラスミノーゲンを35日投与した後の膵島NF-kBの免疫組織化学的観察結果を示すものである。Aは溶媒PBS投与対照群であり、Bはプラスミノーゲン投与群である。その結果、プラスミノーゲン投与群のNF-kB発現（矢印に表記される）は溶媒PBS投与対照群より明らかに多いことは示されている。これは、プラスミノーゲンが多方向核転写因子NF-kBの発現を促進することができ

10

20

30

40

50

でき、比較的に若い（18週齢）糖尿病マウスの膵島炎症の修復を促進することができる

ことを示している。

【図33】図33は26週齢の糖尿病マウスにプラスミノーゲンを35日投与した後の膵島NF-kBの免疫組織化学的観察結果を示すものである。Aは正常対照群であり、Bは溶媒PBS投与対照群であり、Cはプラスミノーゲン投与群である。本発明の実験結果によると、プラスミノーゲン投与群のNF-kB発現（矢印に表記される）は溶媒PBS投与対照群より明らかに高いことは示されている。これは、プラスミノーゲンが多方向核転写因子NF-kBの発現を促進することができ、比較的に老齢（26週齢）の糖尿病マウスの膵島炎症の修復を促進することができることを示している。

【図34】図34は24～25週齢の糖尿病マウスにプラスミノーゲンを31日投与した後の膵島TNF-の免疫組織化学的観察結果を示すものである。Aは正常対照群であり、Bは溶媒PBS投与対照群であり、Cはプラスミノーゲン投与群である。研究結果によると、プラスミノーゲン投与群のTNF-の陽性発現（矢印に表記される）は溶媒PBS投与対照群より明らかに高く、しかもプラスミノーゲン投与群は溶媒PBS投与対照群より正常対照群により近いことは示されている。これは、プラスミノーゲンがTNF-の発現を促進することができ、24～25週齢の糖尿病マウスの膵島損傷の修復を促進することができることを示している。

【図35】図35は26週齢の糖尿病マウスにプラスミノーゲンを31日投与した後の膵島TNF-の免疫組織化学的観察結果を示すものである。Aは正常対照群であり、Bは溶媒PBS投与対照群であり、Cはプラスミノーゲン投与群である。研究結果によると、プラスミノーゲン投与群のTNF-の陽性発現（矢印に表記される）は溶媒PBS投与対照群より明らかに高く、しかもプラスミノーゲン投与群は溶媒PBS投与対照群より正常対照群により近いことは示されている。これは、プラスミノーゲンがTNF-の発現を促進することができ、26週齢の糖尿病マウスの膵島損傷の修復を促進することができることを示している。

【図36】図36はT1DMモデルにおけるPLG活性が損傷したマウスにプラスミノーゲンを28日投与した後の膵島TNF-の免疫組織化学的観察結果を示すものである。Aは溶媒PBS投与対照群であり、Bはプラスミノーゲン投与群である。研究結果によると、プラスミノーゲン投与群のTNF-の陽性発現（矢印に表記される）は溶媒PBS投与対照群より明らかに高い。これは、プラスミノーゲンがTNF-の発現を促進することができ、T1DMモデルにおけるPLG活性が損傷したマウスの膵島損傷の修復を促進することができることを示している。

【図37】図37はT1DMモデルにおけるPLG活性が損傷したマウスにプラスミノーゲンを28日投与した後の膵島IgMの免疫組織化学的観察結果を示すものである。Aはプランク対照群であり、Bは溶媒PBS投与対照群であり、Cはプラスミノーゲン投与群である。本実験研究の結果によると、プラスミノーゲン投与群のIgMの陽性発現（矢印に表記される）は溶媒PBS投与対照群より明らかに低く、しかもプラスミノーゲン投与群は溶媒PBS投与対照群より正常対照群により近い。これは、プラスミノーゲンがIgMの発現を低下させることができ、T1DMモデルにおけるPLG活性が損傷したマウスの膵島損傷を減少させることを示している。

【図38】図38は24～25週齢の糖尿病マウスにプラスミノーゲンを31日投与した後の膵島TUNEL染色の観察結果を示すものである。Aは正常対照群であり、Bは溶媒PBS投与対照群であり、Cはプラスミノーゲン投与群である。本実験研究の結果によると、プラスミノーゲン投与群の陽性細胞数（矢印に表記される）は溶媒PBS投与対照群より明らかに少ない。正常対照群のTUNEL陽性染色は極めて低い。正常対照群のアポトーシス率は約8%であり、溶媒PBS投与対照群のアポトーシス率は約93%であり、プラスミノーゲン投与群のアポトーシス率は約16%である。これは、プラスミノーゲンが糖尿病マウスの膵島細胞のアポトーシスを顕著に減少させることができることを示している。

【実施例1】

10

20

30

40

50

**【0159】**

実施例1は、プラスミノーゲンが糖尿病マウスのインスリン分泌機能を促進することに関するものである。

26週齢のdb/dbオスマウスを9匹取り、実験開始当日を0日目とし、体重を計って体重によってランダムに二つの群に分け、プラスミノーゲン投与群に4匹、溶媒PBS投与対照群に5匹である。一日目からプラスミノーゲンまたは溶媒PBSを投与し、プラスミノーゲン投与群に2mg/0.2mL/匹/日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒PBS投与対照群にも同じ体積のPBSを尾静脈注射により投与し、連続して35日投与した。35日目にマウスを16時間禁食し、36日目に眼球を摘出して採血し、遠心分離して上澄み液を取り、インスリン測定キット(Mercodia AB)で取扱説明書に従って血清インスリンレベルを測定した。

測定した結果、プラスミノーゲン投与群の血清インスリンレベルは溶媒PBS投与対照群より明らかに高く、しかもその差が統計学的に有意である(図1)。これは、プラスミノーゲンが糖尿病マウスのインスリン分泌を顕著に向上させることができることを示している。

**【実施例2】****【0160】**

実施例2は、プラスミノーゲンが24~25週齢の糖尿病マウスのインスリンの発現と分泌を促進することに関するものである。

24~25週齢のdb/dbオスマウスを8匹取り、実験開始当日を0日目とし、体重を計って体重によってランダムに二つの群に分け、プラスミノーゲン投与群に5匹、溶媒PBS投与対照群に3匹である。一日目からプラスミノーゲンまたは溶媒PBSを投与し、プラスミノーゲン投与群に2mg/0.2mL/匹/日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒PBS投与対照群にも同じ体積のPBSを尾静脈注射により投与し、連続して31日投与した。32日目にマウスを殺処分して脾臓を取り、4%パラホルムアルデヒド固定液において固定を行った。固定後の脾臓組織をアルコールで段階的に脱水させ及びキシレンで透徹化処理した後にパラフィンで包埋処理を行った。組織切片の厚みは3μmであり、切片を脱パラフィンさせて浸水して1回水で洗った。3%過酸化水素水で15分間インキュベーションし、水で2回洗い、毎回5分間であった。5%の健常ヒツジ血清液(Vector laboratories, Inc., USA)で1時間ブロッキングした;時間になった後、ヒツジ血清液を廃棄し、PAPマーカーで組織を丸で囲み、ウサギ抗マウスインスリン抗体(Abcam)を滴加して4で終夜インキュベーションし、PBSで2回洗い、毎回5分間であった。ヤギ抗ウサギIgG(HRP)抗体(Abcam)二次抗体を室温で1時間インキュベーションし、PBSで2回洗い、毎回5分間であった。DABキット(Vector laboratories, Inc., USA)で呈色させ、3回水洗いした後にヘマトキシリンで30秒複染色して、流水で5分間流した。段階的に脱水させて透徹にし、封入させた後、切片を光学顕微鏡下で200倍にて観察した。

その結果、プラスミノーゲン投与群のインスリンの発現(矢印に表記される)は溶媒PBS投与対照群より明らかに高く、しかもその差が統計学的に有意である(P=0.02)(図2)ことは示されている。これは、プラスミノーゲンが脾島の機能を効果的に修復でき、インスリンの発現と分泌を促進できることを示している。

**【実施例3】****【0161】**

実施例3は、プラスミノーゲンが糖尿病マウスのインスリン合成分泌機能の修復を促進することに関するものである。

26週齢のdb/dbオスマウスを9匹取り、実験開始当日を0日目とし、体重を計って体重によってランダムに二つの群に分け、プラスミノーゲン投与群に4匹、溶媒PBS投与対照群に5匹である。一日目からプラスミノーゲンまたは溶媒PBSを投与し、プラスミノーゲン投与群に2mg/0.2mL/匹/日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈

10

20

30

40

50

脈注射により投与し、溶媒 PBS 投与群と対照群にも同じ体積の PBS を尾静脈注射により投与し、連続して 35 日投与した。35 日目にマウスを 16 時間禁食した後、36 日目にマウスを殺処分して臍臓を取り、4% パラホルムアルデヒド固定液において固定を行った。固定後の臍臓組織をアルコールで段階的に脱水させ及びキシレンで透徹化処理した後にパラフィンで包埋処理を行った。組織切片の厚みは 3  $\mu$ m であり、切片を脱パラフィンさせて浸水して 1 回水で洗った。3% 過酸化水素水で 15 分間インキュベーションし、水で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。5% の健常ヒツジ血清液 (Vector laboratories, Inc., USA) で 1 時間ブロッキングした；時間になった後、ヒツジ血清液を廃棄し、PAP マーカーで組織を丸で囲み、ウサギ抗マウスインスリン抗体 (Abcam) を滴加して 4 で終夜インキュベーションし、PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。ヤギ抗ウサギ IgG (HRP) 抗体 (Abcam) 二次抗体を室温で 1 時間インキュベーションし、PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。DAB キット (Vector laboratories, Inc., USA) で呈色させ、3 回水洗いした後にヘマトキシリンで 30 秒複染色して、流水で 5 分間流した。段階的に脱水させて透徹にし、封入させた後、切片を光学顕微鏡下で 200 倍にて観察した。

その結果、プラスミノーゲン投与群のインスリンの発現 (矢印に表記される) は溶媒 PBS 投与群と対照群より明らかに高く、しかもその差が統計学的に極めて有意である ( $P = 0.005$ ) (図 3) ことは示されている。これは、プラスミノーゲンが糖尿病マウスの臍島の機能を効果的に修復でき、インスリンの発現と分泌を促進できることを示している。

#### 【実施例 4】

##### 【0162】

実施例 4 は、プラスミノーゲンが、PLG 活性が損傷したマウスの T1DM モデルにおけるインスリンの合成と分泌を促進することに関するものである。

9 ~ 10 週齢の PLG 活性が損傷したオスマウスを 10 匹取り、ランダムに三つの群に分け、プランク対照群に 3 匹、溶媒 PBS 投与群と対照群に 3 匹、及びプラスミノーゲン投与群に 4 匹である。溶媒 PBS 投与群と対照群とプラスミノーゲン投与群マウスを 4 時間禁食した後、一回経腹腔で 200 mg / kg の STZ (Sigma S0130) を注射して I 型糖尿病を誘導し [43]、プランク対照群に対して処置しなかった。注射して 12 日後から投薬し始め、投薬開始当日を 1 日目とし、プラスミノーゲン投与群に 1 mg / 0.1 mL / 匹 / 日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒 PBS 投与群にも同じ体積の PBS を尾静脈注射により投与し、連続して 28 日投与した。29 日目にマウスを殺処分して臍臓を取り、4% パラホルムアルデヒド固定液において固定を行った。固定後の臍臓組織をアルコールで段階的に脱水させ及びキシレンで透徹化処理した後にパラフィンで包埋処理を行った。組織切片の厚みは 3  $\mu$ m であり、切片を脱パラフィンさせて浸水して 1 回水で洗った。PAP マーカーで組織を丸で囲み、3% 過酸化水素水で 15 分間インキュベーションし、0.01M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。5% の健常ヒツジ血清液 (Vector laboratories, Inc., USA) で 30 分間ブロッキングした；時間になった後、ヒツジ血清液を廃棄し、ウサギ抗マウスインスリン抗体 (Abcam) を滴加して 4 で終夜インキュベーションし、0.01M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。ヤギ抗ウサギ IgG (HRP) 抗体 (Abcam) 二次抗体を室温で 1 時間インキュベーションし、0.01M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。DAB キット (Vector laboratories, Inc., USA) で呈色させ、3 回水洗いした後にヘマトキシリンで 30 秒複染色して、流水で 5 分間流した。アルコールで段階的に脱水させてキシレンで透徹にし、中性ゴムに封入させ、切片を光学顕微鏡下で 200 倍にて観察した。

免疫組織化学的結果によると、プラスミノーゲン投与群 (図 4C) のインスリンの陽性発現 (矢印に表記される) は溶媒 PBS 投与群 (図 4B) より明らかに多く、しかも溶媒 PBS 投与群と比べ、プラスミノーゲン投与群はプランク対照群 (図 4A) により近い。これは、プラスミノーゲンが、T1DM モデルにおける PLG 活性が損傷したマウスのインスリンの合成と分泌を促進できることを示している。

10

20

30

40

50

## 【実施例 5】

## 【0163】

実施例 5 は、プラスミノーゲンが、PLG 活性が正常であるマウスの T1DM モデルにおけるインスリンの合成と発現を促進することに関するものである。

9 ~ 10 週齢の PLG 活性が正常であるオスマウスを 11 匹取り、ランダムに三つの群に分け、プランク対照群に 3 匹、溶媒 PBS 投与対照群に 4 匹、及びプラスミノーゲン投与群に 4 匹である。溶媒 PBS 投与対照群とプラスミノーゲン投与群マウスを 4 時間禁食した後、一回経腹腔で 200 mg / kg の STZ (Sigma S0130) を注射して I 型糖尿病を誘導し [43]、プランク対照群に対して処置しなかった。注射して 12 日後から投薬し始め、投薬開始当日を 1 日目とし、プラスミノーゲン投与群に 1 mg / 0.1 mL / 匹 / 日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒 PBS 投与対照群にも同じ体積の PBS を尾静脈注射により投与し、連続して 28 日投与した。29 日目にマウスを殺処分して臍臓を取り、4% パラホルムアルデヒド固定液において固定を行った。固定後の臍臓組織をアルコールで段階的に脱水させ及びキシレンで透徹化処理した後にパラフィンで包埋処理を行った。組織切片の厚みは 3 μm であり、切片を脱パラフィンさせて浸水して 1 回水で洗った。PAP マーカーで組織を丸で囲み、3% 過酸化水素水で 15 分間インキュベーションし、0.01 M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。5% の健常ヒツジ血清液 (Vector laboratories, Inc., USA) で 30 分間ブロッキングした；時間になった後、ヒツジ血清液を廃棄し、ウサギ抗マウスインスリン抗体 (Abcam) を滴加して 4 で終夜インキュベーションし、0.01 M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。ヤギ抗ウサギ IgG (HRP) 抗体 (Abcam) 二次抗体を室温で 1 時間インキュベーションし、0.01 M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。DAB キット (Vector laboratories, Inc., USA) で呈色させ、3 回水洗いした後にヘマトキシリンで 30 秒複染色して、流水で 5 分間流した。アルコールで段階的に脱水させてキシレンで透徹にし、中性ゴムに封入させ、切片を光学顕微鏡下で 200 倍にて観察した。

免疫組織化学的結果によると、プラスミノーゲン投与群 (図 5C) のインスリンの陽性発現 (矢印に表記される) は溶媒 PBS 投与対照群 (図 5B) より明らかに多く、しかも溶媒 PBS 投与対照群と比べ、プラスミノーゲン投与群はプランク対照群 (図 5A) により近い。これは、プラスミノーゲンが、T1DM モデルにおける PLG 活性が正常であるマウスのインスリンの合成と発現を促進できることを示している。

## 【実施例 6】

## 【0164】

実施例 6 は、プラスミノーゲンが T1DM モデルにおけるマウスのインスリン分泌を改善できることに関するものである。

9 ~ 10 週齢の C57 オスマウスを 6 匹取り、ランダムに二つの群に分け、溶媒 PBS 投与対照群とプラスミノーゲン投与群で 3 匹ずつである。二つの群のマウスを 4 時間禁食した後、ストレプトゾトシン (STZ) (sigma S0130) 200 mg / kg を腹腔注射により一回投与して T1DM を誘導した [43]。STZ 注射して 12 日後に投薬し始め、投薬開始当日を一日目とし、プラスミノーゲン投与群に 1 mg / 0.1 mL / 匹 / 日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒 PBS 投与対照群にも同じ体積の PBS を尾静脈注射により投与し、連続して 20 日投与した。21 日目にマウスを 6 時間禁食した後、眼球静脈叢から採血して遠心分離して上澄み液を取り、インスリン測定キット (Mercodia AB) を用いて取扱説明書に従って血清インスリン濃度を測定した。

その結果、溶媒 PBS 投与対照群マウスのインスリン濃度はプラスミノーゲン投与群マウスより明らかに低く、しかもその差が統計学的な有意の差に近い (P = 0.08) (図 6) ことは示されている。これは、プラスミノーゲンが T1DM モデルにおけるマウスのインスリン分泌を促進できることを示している。

## 【実施例 7】

10

20

30

40

50

**【0165】**

実施例7は、プラスミノーゲンが糖尿病マウスの血糖を低下することに関するものである。

24～25週齢のd b / d bオスマウスを8匹取り、ランダムに二つの群に分け、プラスミノーゲン投与群に5匹と溶媒P B S投与対照群に3匹である。実験開始当日を0日目として体重を測ってから群分けし、一日目からプラスミノーゲンまたは溶媒P B Sを投与し、プラスミノーゲン投与群に2m g / 0 . 2m L / 匹 / 日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒P B S投与対照群にも同じ体積のP B Sを尾静脈注射により投与し、連続して31日投与した。10、31日目に16時間禁食した後、血糖試験紙(Roche, Mannheim, Germany)で血糖検出をした。

10

その結果、プラスミノーゲン投与群マウスの血糖は溶媒P B S投与対照群より明らかに低く、しかもその差が統計学的に有意である(\*は、P < 0 . 05を表し、\*\*は、P < 0 . 01を表す)。また、投与時間が長くなるにつれて、溶媒P B S投与対照群マウスの血糖は上昇する傾向があるに対して、プラスミノーゲン投与群の血糖は徐々に低下する(図7)。これは、プラスミノーゲンが糖尿病動物の血糖を低下する作用があることを示している。

**【実施例8】****【0166】**

実施例8は、プラスミノーゲンが糖尿病マウスのフルクトサミンレベルを低下させることに関するものである。

24～25週齢のd b / d bオスマウスを5匹取り、血清フルクトサミン濃度の測定のために投薬する前日にマウス1匹ずつ眼球静脈叢から50μl採血し、採血当日を0日目として、1日目にプラスミノーゲンを投与し始め、連続して31日投与した。32日目に眼球を摘出して採血し、血清フルクトサミンの濃度を測定した。フルクトサミン濃度について、フルクトサミン測定キット(南京建成、A037-2)で測定した。

20

フルクトサミン濃度は1～3週間以内の血糖の平均レベルを反映する。その結果、プラスミノーゲン投与後の血清フルクトサミンの濃度は明らかに低下し、投薬前と比べてその差が統計学的に極めて有意である(図8)。これは、プラスミノーゲンが糖尿病動物の血糖を効果的に降下できることを示している。

**【実施例9】****【0167】**

実施例9は、プラスミノーゲンが26週齢の糖尿病マウスの血清フルクトサミンレベルを低下させることに関するものである。

26週齢のd b / d bオスマウスを9匹取り、実験開始当日を0日目として体重を測ってから体重によってランダムに二つの群に分け、プラスミノーゲン投与群に4匹と溶媒P B S投与対照群に5匹である。プラスミノーゲン投与群に2m g / 0 . 2m L / 匹 / 日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒P B S投与対照群にも同じ体積のP B Sを尾静脈注射により投与した。一日目からプラスミノーゲンまたはP B Sを投与し、連続して35日投与した。36日目にマウスを殺処分し、血清フルクトサミンの濃度を測定した。フルクトサミンの濃度をフルクトサミン測定キット(南京建成、A037-2)で測定した。

30

測定の結果、プラスミノーゲン投与群の血清フルクトサミンの濃度は溶媒P B S投与対照群より明らかに低く、その差が統計学的な有意の差に近いことは示されている(P = 0 . 06)(図9)。これは、プラスミノーゲンが26週齢の糖尿病マウスの血糖フルクトサミンを降下できることを示している。

**【実施例10】****【0168】**

実施例10は、プラスミノーゲンが糖尿病マウスの糖化ヘモグロビンレベルを低下させることに関するものである。

26週齢のd b / d bオスマウスを9匹取り、実験開始当日に体重を計って体重によっ

40

50

てランダムに二つの群に分け、プラスミノーゲン投与群に4匹、溶媒PBS投与対照群に5匹である。一日目からプラスミノーゲンまたは溶媒PBSを投与し、プラスミノーゲン投与群に2mg / 0.2mL / 匹 / 日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒PBS投与対照群にも同じ体積のPBSを尾静脈注射により投与し、連続して35日投与した。35日目にマウスを16時間禁食し、36日目に眼球を摘出して採血し、血漿糖化ヘモグロビンの濃度を測定した。

糖化ヘモグロビンの含有量は通常患者の最近8～12週間内の血糖コントロール状況を反映することができる。その結果、プラスミノーゲン投与群マウスの糖化ヘモグロビンの濃度は溶媒PBS投与対照群より明らかに低く、しかもその差が統計学的に有意である(図10)。これは、プラスミノーゲンが糖尿病動物の血糖レベルを効果的に降下できることを示している。

10

【実施例11】

【0169】

実施例11は、プラスミノーゲンが糖尿病マウスの耐糖能を改善することに関するものである。

26週齢のdb / dbオスマウスを9匹、及びdb / mマウスを3匹取った。実験開始当日にdb / dbマウスの体重を計って体重によってランダムに二つの群に分け、プラスミノーゲン投与群に4匹、溶媒PBS投与対照群に5匹とし、db / mマウスを正常対照群とした。一日目からプラスミノーゲンまたは溶媒PBSを投与し、プラスミノーゲン投与群に2mg / 0.2mL / 匹 / 日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒PBS投与対照群にも同じ体積のPBSを尾静脈注射により投与し、連続して10日投与した。11日目にマウスを16時間禁食した後、マウス1匹ずつ5g / kg体重で5%ブドウ糖溶液を腹腔注射により投与し、0、30、60、90、120、180分に血糖試験紙(Roche, Mannheim, Germany)で血糖濃度を測定した。

20

腹腔糖耐性テスト(Intraperitoneal glucose test, IPGTT)は、生体がブドウ糖に対する耐性能力をテストすることができる。従来技術では、糖尿病患者の糖耐量が低下することが知られている。

実験の結果、ブドウ糖を腹腔に注射した後、プラスミノーゲン投与群マウスの血糖レベルは溶媒PBS投与対照群より低く、しかも溶媒PBS投与対照群と比べてプラスミノーゲン投与群の糖耐性曲線は正常マウス群により近いことは示されている(図11)。これは、プラスミノーゲンが糖尿病マウスの耐糖能を明らかに改善できることを示している。

30

【実施例12】

【0170】

実施例12は、プラスミノーゲンがT1DMモデルにおけるPLG活性が正常であるマウスの血糖レベルを低下させることに関するものである。

9～10週齢のPLG活性が正常であるオスマウスを10匹取り、ランダムに二つの群に分け、溶媒PBS投与対照群とプラスミノーゲン投与群で5匹ずつである。二つの群のマウスを4時間禁食した後、ストレプトゾトシン(STZ)(sigma S0130)200mg / kgを腹腔注射により一回投与してT1DMを誘導した[43]。STZ注射して12日後に投薬し始め、投薬開始当日を一日目とし、プラスミノーゲン投与群に1mg / 0.1mL / 匹 / 日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒PBS投与対照群にも同じ体積のPBSを尾静脈注射により投与し、連続して10日投与した。11日目にマウスを6時間禁食した後、血糖試験紙(Roche, Mannheim, Germany)で血糖を測定した。

40

その結果、溶媒PBS投与対照群マウスの血糖はプラスミノーゲン投与群マウスより明らかに高く、しかもその差が統計学的に極めて有意である(図12)。これは、プラスミノーゲンがT1DMモデルにおけるPLG活性が正常であるマウスの血糖レベルを顕著に低下させできることを示している。

【実施例13】

50

## 【0171】

実施例13は、プラスミノーゲンがT1DMモデルマウスの糖耐性レベルを改善することに関するものである。

9～10週齢のPLG活性が正常であるオスマウスを15匹取り、ランダムに三つの群に分け、プランク対照群、溶媒PBS投与対照群、及びプラスミノーゲン投与群で5匹ずつである。溶媒PBS投与対照群とプラスミノーゲン投与群マウスを4時間禁食した後、STZ (sigma S0130) 200mg/kgを腹腔注射により一回投与してT1DMを誘導し<sup>[43]</sup>、プランク対照群に対して処置しなかった。STZ注射して12日後に投薬し始め、投薬し始めた日を一日目とし、プラスミノーゲン投与群に1mg/0.1mL/匹/日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒PBS投与対照群にも同じ体積のPBSを尾静脈注射により投与し、連続して28日投与した。28日目にマウスを6時間禁食した後、5g/kg体重で5%ブドウ糖溶液を腹腔注射により投与し、注射後0、15、30、60、90分に血糖試験紙 (Roche, Mannheim, Germany) で血糖濃度を測定した。  
10

腹腔糖耐性テスト (Intraperitoneal glucose test, IPGTT) は、生体がブドウ糖に対する耐性能力をテストすることができる。従来技術では、糖尿病患者の糖耐量が低下することが知られている。

その結果、ブドウ糖注射後、溶媒PBS投与対照群マウスの血糖濃度はプラスミノーゲン投与群より明らかに高く、しかも溶媒PBS投与対照群と比べてプラスミノーゲン投与群の糖耐性曲線は正常マウス群により近いことは示されている (図13)。これは、プラスミノーゲンが、PLG活性が正常であるマウスのT1DMモデルにおける耐糖能向上させることができることを示している。  
20

## 【実施例14】

## 【0172】

実施例14は、プラスミノーゲンがT1DMモデルにおけるマウスのブドウ糖分解能力を向上させることに関するものである。

9～10週齢のC57オスマウスを8匹取り、ランダムに二つの群に分け、溶媒PBS投与対照群とプラスミノーゲン投与群で4匹ずつである。溶媒PBS投与対照群とプラスミノーゲン投与群マウスを4時間禁食した後、ストレプトゾトシン (STZ) (sigma S0130) 200mg/kgを腹腔注射により一回投与してT1DMを誘導した<sup>[43]</sup>。STZ注射して12日後に投薬し始め、投薬開始当日を一日目とし、プラスミノーゲン投与群に1mg/0.1mL/匹/日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒PBS投与対照群にも同じ体積のPBSを尾静脈注射により投与し、連続して19日投与した。20日目にマウスを6時間禁食した後、2g/kg体重で20%のブドウ糖を胃管栄養法により投与し、60分間後、眼窩静脈叢から採血して遠心分離して上澄み液を取り、ブドウ糖測定キット (上海栄盛361500) により血糖を測定した。  
30

その結果、溶媒PBS投与対照群マウスの血糖はプラスミノーゲン投与群マウスの血糖より明らかに高く、しかもその差が統計学的に有意である (P = 0.04) (図14)。これは、プラスミノーゲンがT1DMモデルにおけるマウスのブドウ糖分解能力向上させることができ、血糖を低下させることができることを示している。  
40

## 【実施例15】

## 【0173】

実施例15は、プラスミノーゲンが糖尿病マウスの臍臓に対する保護作用に関するものである。

24～25週齢のdb/dbオスマウスを7匹取り、実験開始当日を0日目とし、体重を計って体重によってランダムに二つの群に分け、プラスミノーゲン投与群に4匹、溶媒PBS投与対照群に3匹である。一日目からプラスミノーゲンまたは溶媒PBSを投与し、プラスミノーゲン投与群に2mg/0.2mL/匹/日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒PBS投与対照群にも同じ体積のPBSを尾静脈注射により投与し、連続して31日投与した。32日目にマウスを殺処分して臍臓を取り、4%  
50

パラホルムアルデヒド固定液において固定を行った。固定後の臍臓組織をアルコールで段階的に脱水させてキシレンで透徹にした後にパラフィンで包埋処理を行った。組織切片の厚みは3 μmであり、切片を脱パラフィンさせさらに浸水してヘマトキシリン及びエオシンで染色(HE染色)させ、1%塩酸アルコールで分別させ、アンモニア水でブルーイングさせ、さらにアルコールで段階的に脱水させて封入させ、切片を光学顕微鏡下で200倍と400倍にて観察した。

その結果、溶媒PBS投与対照群(図15A、15B)の大部分の臍島が委縮し、委縮した臍島細胞は腺房(矢印に表記される)に置き換えられ、臍島のヘリの腺房が増殖して臍島と腺房との境目があいまいになっている；プラスミノーゲン投与群(図15C、15D)の大部分の臍島は対照群より面積が大きく、しかも臍島内には腺房増殖がなく、ただ僅かの臍島内に僅かの腺房が残存しており、臍島と腺房との境目がはっきりしていることは示されている。プラスミノーゲン投与群と対照群の、臍島と臍臓との面積比を比較すると、プラスミノーゲン投与群は対照群の倍近くになっていることが分かる(図15E)。これは、プラスミノーゲンが糖尿病マウスの臍島損傷の修復を促進できることを示し、プラスミノーゲンが臍島損傷の修復を促進することにより根本的に糖尿病を完治することができることを示唆している。

#### 【実施例16】

##### 【0174】

実施例16は、プラスミノーゲンが糖尿病マウスの臍島コラーゲンの沈着を減少させることに関するものである。

24～25週齢のdb/dbオスマウスを16匹取り、実験開始当日を0日目とし、体重を計って体重によってランダムに二つの群に分け、プラスミノーゲン投与群に10匹、溶媒PBS投与対照群に6匹である。一日目からプラスミノーゲンまたは溶媒PBSを投与し、プラスミノーゲン投与群に2mg/0.2mL/匹/日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒PBS投与対照群にも同じ体積のPBSを尾静脈注射により投与し、連続して31日投与した。32日目にマウスを殺処分して臍臓を取り、4%パラホルムアルデヒド固定液において固定を行った。固定後の臍臓組織をアルコールで段階的に脱水させ及びキシレンで透徹化処理した後にパラフィンで包埋処理を行った。組織切片の厚みは3 μmであり、切片を脱パラフィンさせて浸水して1回水で洗い、0.1%シリウスレッドで60分間染色した後、流水で流し、ヘマトキシリンで1分間染色してから流水で流し、1%塩酸アルコールとアンモニア水で分別させてブルーイングさせ、流水で流した。乾燥した後に封入させ、切片を光学顕微鏡下で200倍にて観察した。

シリウスレッド染色はコラーゲンを持続的に染色することができ、病理学的切片の特殊の染色方法として、シリウスレッド染色はコラーゲン組織を特異的に示すことができる。

染色の結果、プラスミノーゲン投与群マウス(図16B)の臍島コラーゲンの沈着(矢印に表記される)は溶媒PBS投与対照群(図16A)より明らかに低く、しかもその差が統計学的に有意である(図16C)ことは示されている。これは、プラスミノーゲンが糖尿病動物の臍島の纖維化を低下させることを示している。

#### 【実施例17】

##### 【0175】

実施例17は、プラスミノーゲンが糖尿病マウスの臍島細胞のアポトーシスを減少させることに関するものである。

24～25週齢のdb/dbオスマウスを6匹取り、実験開始当日を0日目とし、体重を計って体重によってランダムに二つの群に分け、プラスミノーゲン投与群に4匹、溶媒PBS投与対照群に2匹である。一日目からプラスミノーゲンまたは溶媒PBSを投与し、プラスミノーゲン投与群に2mg/0.2mL/匹/日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒PBS投与対照群にも同じ体積のPBSを尾静脈注射により投与し、連続して31日投与した。32日目にマウスを殺処分して臍臓を取り、4%パラホルムアルデヒド固定液において固定を行った。固定後の臍臓組織をアルコールで段階的に脱水させ及びキシレンで透徹化処理した後にパラフィンで包埋処理を行った。組織

10

20

30

40

50

切片の厚みは 3  $\mu\text{m}$  であり、切片を脱パラフィンさせて浸水して 1 回水で洗った。3 % 過酸化水素水で 15 分間インキュベーションし、水で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。5 % の健常ヒツジ血清液 (Vector laboratories, Inc., USA) で 1 時間ブロッキングした；時間になった後、ヒツジ血清液を廃棄し、PAPマーカーで組織を丸で囲み、ウサギ抗マウス Caspase-3 (Abcam) を滴加して 4 で終夜インキュベーションし、PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。ヤギ抗ウサギ IgG (HRP) 抗体 (Abcam) 二次抗体を室温で 1 時間インキュベーションし、PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。DAB キット (Vector laboratories, Inc., USA) で呈色させ、3 回水洗いした後にヘマトキシリンで 30 秒複染色して、流水で 5 分間流した。段階的に脱水させて透徹にし、封入させた後、切片を光学顕微鏡下で 200 倍にて観察した。

Caspase-3 は細胞アポトーシス過程において最も主要な末端制限酵素であり、その発現は多ければ多いほど、アポトーシス状態にある細胞が多いことは示される [44] 。

本発明の実験の結果、プラスミノーゲン投与群 (図 17B) の Caspase-3 の発現 (矢印に表記される) は溶媒 PBS 投与対照群 (図 17A) より明らかに低いことは示されている。これは、プラスミノーゲンが膵島細胞のアポトーシスを減少させることができることを示している。

#### 【実施例 18】

##### 【0176】

実施例 18 は、プラスミノーゲンが 18 週齢の糖尿病マウスのインスリンの発現と分泌を促進することに関するものである。

18 週齢の dd / dd オスマウスを 8 匹取り、実験開始当日を 0 日目とし、体重を計って体重によってランダムに二つの群に分け、プラスミノーゲン投与群と溶媒 PBS 投与対照群で 4 匹ずつである。一日目からプラスミノーゲンまたは溶媒 PBS を投与し、プラスミノーゲン投与群に 2 mg / 0.2 mL / 匹 / 日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒 PBS 投与対照群にも同じ体積の PBS を尾静脈注射により投与し、連続して 31 日投与した。36 日目にマウスを殺処分して膵臓を取り、4 % パラホルムアルデヒド固定液において固定を行った。固定後の膵臓組織をアルコールで段階的に脱水させ及びキシレンで透徹化処理した後にパラフィンで包埋処理を行った。組織切片の厚みは 3  $\mu\text{m}$  であり、切片を脱パラフィンさせて浸水して 1 回水で洗った。3 % 過酸化水素水で 15 分間インキュベーションし、水で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。5 % の健常ヒツジ血清液 (Vector laboratories, Inc., USA) で 1 時間ブロッキングした；時間になった後、ヒツジ血清液を廃棄し、PAPマーカーで組織を丸で囲み、ウサギ抗マウスインスリン抗体 (Abcam) を滴加して 4 で終夜インキュベーションし、PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。ヤギ抗ウサギ IgG (HRP) 抗体 (Abcam) 二次抗体を室温で 1 時間インキュベーションし、PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。DAB キット (Vector laboratories, Inc., USA) で呈色させ、3 回水洗いした後にヘマトキシリンで 30 秒複染色して、流水で 5 分間流した。段階的に脱水させて透徹にし、封入させた後、切片を光学顕微鏡下で 200 倍にて観察した。

その結果、プラスミノーゲン投与群 (図 18B) のインスリンの発現 (矢印に表記される) は溶媒 PBS 投与対照群 (図 18A) より明らかに高く、しかもその差が統計学的な有意の差に近い (P = 0.15) (図 18C) ことは示されている。これは、プラスミノーゲンが膵島の機能修復を促進でき、インスリンの発現と分泌を促進できることを示している。

#### 【実施例 19】

##### 【0177】

実施例 19 は、プラスミノーゲンが 24 ~ 25 週齢の糖尿病マウスの膵島多方向核転写因子 NF - kB の発現を促進することに関するものである。

10

20

30

40

50

24～25週齢のdb/dbオスマウスを10匹取り、実験開始当日を0日目とし、体重を計って体重によってランダムに二つの群に分け、プラスミノーゲン投与群に4匹、溶媒PBS投与対照群に6匹である。また、db/mを4匹取って正常対照群とし、正常対照群に対して処置しなかった。一日目からプラスミノーゲンまたは溶媒PBSを投与し、プラスミノーゲン投与群に2mg/0.2mL/匹/日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒PBS投与対照群にも同じ体積のPBSを尾静脈注射により投与し、連続して31日投与した。32日目にマウスを殺処分して臍臓を取り、4%パラホルムアルデヒド固定液において固定を行った。固定後の臍臓組織をアルコールで段階的に脱水させ及びキシレンで透徹化処理した後にパラフィンで包埋処理を行った。組織切片の厚みは3μmであり、切片を脱パラフィンさせて浸水して1回水で洗った。3%過酸化水素水で15分間インキュベーションし、水で2回洗い、毎回5分間であった。5%の健常ヒツジ血清液(Vector laboratories, Inc., USA)で1時間ブロッキングした；時間になった後、ヒツジ血清液を廃棄し、PAPマーカーで組織を丸で囲み、ウサギ抗マウスNF-kB(Abcam)を滴加して4で終夜インキュベーションし、PBSで2回洗い、毎回5分間であった。ヤギ抗ウサギIgG(HRP)抗体(Abcam)二次抗体を室温で1時間インキュベーションし、PBSで2回洗い、毎回5分間であった。DABキット(Vector laboratories, Inc., USA)で呈色させ、3回水洗いした後にヘマトキシリソで30秒複染色して、流水で5分間流した。段階的に脱水させて透徹にし、封入させた後、切片を光学顕微鏡下で200倍にて観察した。

NF-kBは転写因子タンパクの家族メンバーであり、炎症修復の過程において重要な役割を果たしている[45]。

本発明の実験の結果、プラスミノーゲン投与群のNF-kBの発現(矢印に表記される)は溶媒PBS投与対照群より明らかに高く、しかもその差が統計学的に有意である(図19)ことは示されている。これは、プラスミノーゲンが多方向核転写因子NF-kBの発現を促進できることを示している。

#### 【実施例20】

#### 【0178】

実施例20は、プラスミノーゲンが18週齢の糖尿病マウスの臍島細胞の増殖を減少させ、臍島細胞の正常な分布を回復し、グルカゴン分泌を低下させることに関するものである。

18週齢のdb/dbオスマウスを8匹、db/mオスマウスを3匹取り、実験開始当日を0日目とし、体重を計って体重によってdb/dbマウスをランダムに二つの群に分け、プラスミノーゲン投与群と溶媒PBS投与対照群で4匹ずつであり、db/mマウスを正常対照群とした。一日目からプラスミノーゲンまたは溶媒PBSを投与し、プラスミノーゲン投与群に2mg/0.2mL/匹/日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒PBS投与対照群にも同じ体積のPBSを尾静脈注射により投与し、連続して35日投与した。36日目にマウスを殺処分して臍臓を取り、4%パラホルムアルデヒド固定液において固定を行った。固定後の臍臓組織をアルコールで段階的に脱水させ及びキシレンで透徹化処理した後にパラフィンで包埋処理を行った。組織切片の厚みは3μmであり、切片を脱パラフィンさせて浸水して1回水で洗った。PAPマーカーで組織を丸で囲み、3%過酸化水素水で15分間インキュベーションし、0.01M PBSで2回洗い、毎回5分間であった。5%の健常ヒツジ血清液(Vector laboratories, Inc., USA)で30分間ブロッキングした；時間になった後、ヒツジ血清液を廃棄し、ウサギ抗マウスグルカゴン抗体(Abcam)を滴加して4で終夜インキュベーションし、0.01M PBSで2回洗い、毎回5分間であった。ヤギ抗ウサギIgG(HRP)抗体(Abcam)二次抗体を室温で1時間インキュベーションし、0.01M PBSで2回洗い、毎回5分間であった。DABキット(Vector laboratories, Inc., USA)で呈色させ、3回水洗いした後にヘマトキシリソで30秒複染色して、流水で5分間流した。アルコールで段階的に脱水させてキ

10

20

30

40

50

シレンで透徹にし、中性ゴムに封入させ、切片を光学顕微鏡下で200倍にて観察した。

臍島 細胞はグルカゴンを合成分泌し、主に臍島の周辺領域に分布されている。

その結果、プラスミノーゲン投与群（図20C）と比べ、溶媒PBS投与対照群（図20B）のグルカゴンの陽性細胞（矢印に表記される）は明らかに増え、陽性細胞は臍島の中央に浸潤し、しかも平均光学密度の定量分析結果に統計学的に有意の差がある（＊＊は、 $P < 0.01$ を表す）（図20D）；プラスミノーゲン投与群のグルカゴンの陽性細胞は臍島周辺に散在的に分布し、PBS投与対照群と比べ、プラスミノーゲン投与群の臍島形態は正常対照群（20A）により近い。これは、プラスミノーゲンが18週齢の糖尿病マウスの臍島細胞の増殖およびグルカゴンの分泌を顕著に抑制でき、臍島細胞の分布の乱れを修正できることを示し、プラスミノーゲンが臍島損傷の修復を促進できることを示唆している。

10

#### 【実施例21】

##### 【0179】

実施例21は、プラスミノーゲンが24～25週齢の糖尿病マウスの臍島細胞の増殖を減少させ、臍島細胞の正常な分布を回復し、グルカゴン分泌を低下させることに関するものである。

24～25週齢のdb/dbオスマウスを11匹、db/mオスマウスを5匹取り、実験開始当日を0日目とし、体重を計って体重によってdb/dbマウスをランダムに二つの群に分け、プラスミノーゲン投与群に5匹、溶媒PBS投与対照群に6匹であり、db/mマウスを正常対照群とした。一日目からプラスミノーゲンまたは溶媒PBSを投与し、プラスミノーゲン投与群に2mg/0.2mL/匹/日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒PBS投与対照群にも同じ体積のPBSを尾静脈注射により投与するか何ら液体も注射せずに、連続して31日投与した。32日目にマウスを殺処分して臍臓を取り、4%パラホルムアルデヒド固定液において固定を行った。固定後の臍臓組織をアルコールで段階的に脱水させ及びキシレンで透徹化処理した後にパラフィンで包埋処理を行った。組織切片の厚みは3μmであり、切片を脱パラフィンさせて浸水して1回水で洗った。PAPマーカーで組織を丸で囲み、3%過酸化水素水で15分間インキュベーションし、0.01M PBSで2回洗い、毎回5分間であった。5%の健常ヒツジ血清液（Vector laboratories, Inc., USA）で30分間プロッキングした；時間になった後、ヒツジ血清液を廃棄し、ウサギ抗マウスグルカゴン抗体（Abcam）を滴加して4で終夜インキュベーションし、0.01M PBSで2回洗い、毎回5分間であった。ヤギ抗ウサギIgG（HRP）抗体（Abcam）二次抗体を室温で1時間インキュベーションし、0.01M PBSで2回洗い、毎回5分間であった。DABキット（Vector laboratories, Inc., USA）で呈色させ、3回水洗いした後にヘマトキシリンで30秒複染色して、流水で5分間流した。アルコールで段階的に脱水させてキシレンで透徹にし、中性ゴムに封入させ、切片を光学顕微鏡下で200倍にて観察した。

20

臍島細胞はグルカゴンを合成分泌し、主に臍島の周辺領域に分布されている。

その結果、プラスミノーゲン投与群（図21C）と比べ、溶媒PBS投与対照群（図21B）のグルカゴンの陽性細胞（矢印に表記される）は明らかに増え、陽性細胞は臍島の中央に浸潤する；プラスミノーゲン投与群のグルカゴンの陽性細胞は臍島周辺に散在的に分布し、PBS投与対照群と比べ、プラスミノーゲン投与群の臍島形態は正常対照群（21A）により近い。これは、プラスミノーゲンが24～25週齢の糖尿病マウスの臍島細胞の増殖およびグルカゴンの分泌を顕著に抑制でき、臍島細胞の分布の乱れを修正できることを示し、プラスミノーゲンが臍島損傷の修復を促進できることを示唆している。

30

#### 【実施例22】

##### 【0180】

実施例22は、プラスミノーゲンが26週齢の糖尿病マウスの臍島細胞の増殖を減少させ、臍島細胞の正常な分布を回復し、グルカゴン分泌を低下させることに関するものである。

40

50

26週齢のd b / d b オスマウスを9匹、d b / m オスマウスを3匹取り、実験開始当10日を0日目とし、体重を計って体重によってd b / d b マウスをランダムに二つの群に分け、プラスミノーゲン投与群に4匹、溶媒P B S投与対照群に5匹であり、d b / m マウスを正常対照群とした。一日目からプラスミノーゲンまたは溶媒P B Sを投与し、プラスミノーゲン投与群に2 mg / 0.2 mL / 匹 / 日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒P B S投与対照群にも同じ体積のP B Sを尾静脈注射により投与し、連続して35日投与した。36日目にマウスを殺処分して臍臓を取り、4%パラホルムアルデヒド固定液において固定を行った。固定後の臍臓組織をアルコールで段階的に脱水させ及びキシレンで透徹化処理した後にパラフィンで包埋処理を行った。組織切片の厚みは3 μmであり、切片を脱パラフィンさせて浸水して1回水で洗った。PAPマーカーで組織を丸で囲み、3%過酸化水素水で15分間インキュベーションし、0.01M P B Sで2回洗い、毎回5分間であった。5%の健常ヒツジ血清液(VECTOR laboratories, Inc., USA)で30分間ブロッキングした；時間になった後、ヒツジ血清液を廃棄し、ウサギ抗マウスグルカゴン抗体(ABCAM)を滴加して4で終夜インキュベーションし、0.01M P B Sで2回洗い、毎回5分間であった。ヤギ抗ウサギIgG(HRP)抗体(ABCAM)二次抗体を室温で1時間インキュベーションし、0.01M P B Sで2回洗い、毎回5分間であった。DABキット(VECTOR laboratories, Inc., USA)で呈色させ、3回水洗いした後にヘマトキシリンで30秒複染色して、流水で5分間流した。アルコールで段階的に脱水させてキシレンで透徹にし、中性ゴムに封入させ、切片を光学顕微鏡下で200倍にて観察20した。

臍島細胞はグルカゴンを合成分泌し、主に臍島の周辺領域に分布されている。

その結果、プラスミノーゲン投与群(図22C)と比べ、溶媒P B S投与対照群(図22B)のグルカゴンの陽性細胞(矢印に表記される)は明らかに増え、陽性細胞は臍島の中央に浸潤し、しかも平均光学密度定量分析結果に統計学的に有意の差がある(＊＊は、P < 0.01を表す)(図22D)；プラスミノーゲン投与群のグルカゴンの陽性細胞は臍島周辺に散在的に分布し、P B S投与対照群と比べ、プラスミノーゲン投与群の臍島形態は正常対照群(22A)により近い。これは、プラスミノーゲンが26週齢の糖尿病マウスの臍島細胞の増殖およびグルカゴンの分泌を顕著に抑制でき、臍島細胞の分布の乱れを修正できることを示し、プラスミノーゲンが臍島損傷の修復を促進できることを示唆している。

### 【実施例23】

#### 【0181】

実施例23は、プラスミノーゲンがT1DMモデルにおけるPLG活性が正常であるマウスのグルカゴン分泌を減少させることに関するものである。

9～10週齢のPLG活性が正常であるオスマウスを15匹取り、ランダムに三つの群に分け、ブランク対照群、溶媒P B S投与対照群、及びプラスミノーゲン投与群で5匹ずつである。溶媒P B S投与対照群とプラスミノーゲン投与群マウスを4時間禁食した後、一回経腹腔で200mg / kgのSTZ(Sigma, ロット番号S0130)を注射してT1DMモデルを誘導し[43]、ブランク対照群に対して処置しなかった。注射して12日後から投薬し始め、投薬開始当日を一日目とし、プラスミノーゲン投与群に2mg / 0.2 mL / 匹 / 日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒P B S投与対照群にも同じ体積のP B Sを尾静脈注射により投与し、連続して28日投与した。29日目にマウスを殺処分して臍臓を取り、4%パラホルムアルデヒド固定液において固定を行った。固定後の臍臓組織をアルコールで段階的に脱水させ及びキシレンで透徹化処理した後にパラフィンで包埋処理を行った。組織切片の厚みは3 μmであり、切片を脱パラフィンさせて浸水して1回水で洗った。PAPマーカーで組織を丸で囲み、3%過酸化水素水で15分間インキュベーションし、0.01M P B Sで2回洗い、毎回5分間であった。5%の健常ヒツジ血清液(VECTOR laboratories, Inc., USA)で30分間ブロッキングした；時間になった後、ヒツジ血清液を廃棄し、ウ

10

20

30

40

50

サギ抗マウスグルカゴン抗体 (A b c a m) を滴加して 4 で終夜インキュベーションし、0.01M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。ヤギ抗ウサギ IgG (H R P) 抗体 (A b c a m) 二次抗体を室温で 1 時間インキュベーションし、0.01M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。D A B キット (Vector laboratories, Inc., U S A) で呈色させ、3 回水洗いした後にヘマトキシリンで 30 秒複染色して、流水で 5 分間流した。アルコールで段階的に脱水させてキシレンで透徹にし、中性ゴムに封入させ、切片を光学顕微鏡下で 200 倍にて観察した。

臍島 細胞はグルカゴンを合成分泌し、主に臍島の周辺領域に分布されている。

その結果、溶媒 PBS 投与対照群 (図 23 B) のグルカゴンの陽性発現はプラスミノーゲン投与群 (図 23 C) より明らかに多く、しかも平均光学密度定量分析結果の差が統計学的に有意であり (図 23 D)、しかも溶媒 PBS 投与対照群と比べ、プラスミノーゲン投与群の臍島形態は正常対照群 (23 A) により近い。これは、プラスミノーゲンが、STZ に誘導された糖尿病マウスの臍島 細胞のグルカゴンの分泌を顕著に減少させることができることを示している。

#### 【実施例 24】

##### 【0182】

実施例 24 は、プラスミノーゲンが 18 週齢の糖尿病マウスの臍島インスリン受容体基質 2 (I R S - 2) の発現を促進することに関するものである。

18 週齢の d b / d b オスマウスを 7 匹、d b / m オスマウスを 3 匹取り、実験開始当日を 0 日目とし、体重を計って体重によってランダムに二つの群に分け、プラスミノーゲン投与群に 3 匹、溶媒 PBS 投与対照群に 4 匹であり、d b / m マウスを正常対照群とした。一日目からプラスミノーゲンまたは溶媒 PBS を投与し、プラスミノーゲン投与群に 2 mg / 0.2 mL / 匹 / 日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒 PBS 投与対照群にも同じ体積の PBS を尾静脈注射により投与し、連続して 35 日投与した。36 日目にマウスを殺処分して臍臓を取り、4% パラホルムアルデヒド固定液において固定を行った。固定後の臍臓組織をアルコールで段階的に脱水させ及びキシレンで透徹化処理した後にパラフィンで包埋処理を行った。組織切片の厚みは 3  $\mu$ m であり、切片を脱パラフィンさせて浸水して 1 回水で洗った。P A P マーカーで組織を丸で囲み、3% 過酸化水素水で 15 分間インキュベーションし、0.01M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。5% の健常ヒツジ血清液 (Vector laboratories, Inc., U S A) で 30 分間プロッキングした；時間になった後、ヒツジ血清液を廃棄し、ウサギ抗マウス IRS - 2 抗体 (A b c a m) を滴加して 4 で終夜インキュベーションし、0.01M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。ヤギ抗ウサギ IgG (H R P) 抗体 (A b c a m) 二次抗体を室温で 1 時間インキュベーションし、0.01M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。D A B キット (Vector laboratories, Inc., U S A) で呈色させ、3 回水洗いした後にヘマトキシリンで 30 秒複染色して、流水で 5 分間流した。アルコールで段階的に脱水させてキシレンで透徹にし、中性ゴムに封入させ、切片を光学顕微鏡下で 200 倍にて観察した。

インスリン受容体基質 2 (Insulin Receptor Substrate - 2, IRS - 2) は活性され得るインスリン受容体チロシンキナーゼに作用される基質であり、インスリンシグナル伝達経路における重要な分子であり、しかも臍島 細胞の生存に対して極めて重要である。IRS - 2 は臍島 細胞の発現の増加時に保護作用があり、機能性臍島 細胞の維持に対して極めて重要である [46, 47]。

IRS - 2 免疫組織化学的結果によると、溶媒 PBS 投与対照群マウス (図 24 B) の臍島 IRS - 2 の陽性発現 (矢印に表記される) はプラスミノーゲン投与群 (図 24 C) より明らかに少なく、しかもその差が統計学的に極めて有意であり (図 24 D)、しかも溶媒 PBS 投与対照群と比べ、プラスミノーゲン投与群はプランク対照群 (図 24 A) により近い。これは、プラスミノーゲンが、18 週齢の糖尿病マウスの臍島細胞 IRS - 2 の発現を効果的に増加させることができることを示している。

#### 【実施例 25】

10

20

30

40

50

## 【0183】

実施例25は、プラスミノーゲンが24～25週齢の糖尿病マウスの膵島IRS-2の発現を促進することに関するものである。

24～25週齢のdb/dbオスマウスを11匹、db/mオスマウスを5匹取り、実験開始当日を0日目とし、体重を計って体重によってdb/dbマウスをランダムに二つの群に分け、プラスミノーゲン投与群に5匹、溶媒PBS投与対照群に6匹であり、db/mマウスを正常対照群とした。一日目からプラスミノーゲンまたは溶媒PBSを投与し、プラスミノーゲン投与群に2mg/0.2mL/匹/日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒PBS投与対照群にも同じ体積のPBSを尾静脈注射により投与するか何らの液体も注射せずに、連続して31日投与した。32日目にマウスを殺処分して膵臓を取り、4%パラホルムアルデヒド固定液において固定を行った。固定後の膵臓組織をアルコールで段階的に脱水させ及びキシレンで透徹化処理した後にパラフィンで包埋処理を行った。組織切片の厚みは3μmであり、切片を脱パラフィンさせて浸水して1回水で洗った。PAPマーカーで組織を丸で囲み、3%過酸化水素水で15分間インキュベーションし、0.01M PBSで2回洗い、毎回5分間であった。5%の健常ヒツジ血清液(Vector laboratories, Inc., USA)で30分間ブロッキングした；時間になった後、ヒツジ血清液を廃棄し、ウサギ抗マウスIRS-2抗体(Abcam)を滴加して4で終夜インキュベーションし、0.01M PBSで2回洗い、毎回5分間であった。DABキット(Vector laboratories, Inc., USA)で呈色させ、3回水洗いした後にヘマトキシリンで30秒複染色して、流水で5分間流した。アルコールで段階的に脱水させてキシレンで透徹にし、中性ゴムに封入させ、切片を光学顕微鏡下で200倍にて観察した。

IRS-2免疫組織化学的結果によると、溶媒PBS投与対照群マウス(図25B)の膵島IRS-2の陽性発現(矢印に表記される)はプラスミノーゲン投与群(図25C)より明らかに少なく、しかもその差が統計学的に有意であり(図25D)、しかも溶媒PBS投与対照群と比べ、プラスミノーゲン投与群は正常対照群(図25A)により近い。これは、プラスミノーゲンが、24～25週齢の糖尿病マウスの膵島細胞IRS-2の発現を効果的に増加させることができることを示している。

## 【実施例26】

## 【0184】

実施例26は、プラスミノーゲンが26週齢の糖尿病マウスの膵島IRS-2の発現を促進することに関するものである。

26週齢のdb/dbオスマウスを9匹、db/mオスマウスを3匹取り、実験開始当日を0日目とし、体重を計って体重によってdb/dbマウスをランダムに二つの群に分け、プラスミノーゲン投与群に4匹、溶媒PBS投与対照群に5匹であり、db/mマウスを正常対照群とした。一日目からプラスミノーゲンまたは溶媒PBSを投与し、プラスミノーゲン投与群に2mg/0.2mL/匹/日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒PBS投与対照群にも同じ体積のPBSを尾静脈注射により投与し、連続して35日投与した。36日目にマウスを殺処分して膵臓を取り、4%パラホルムアルデヒド固定液において固定を行った。固定後の膵臓組織をアルコールで段階的に脱水させ及びキシレンで透徹化処理した後にパラフィンで包埋処理を行った。組織切片の厚みは3μmであり、切片を脱パラフィンさせて浸水して1回水で洗った。PAPマーカーで組織を丸で囲み、3%過酸化水素水で15分間インキュベーションし、0.01M PBSで2回洗い、毎回5分間であった。5%の健常ヒツジ血清液(Vector laboratories, Inc., USA)で30分間ブロッキングした；時間になった後、ヒツジ血清液を廃棄し、ウサギ抗マウスIRS-2抗体(Abcam)を滴加して4で終夜インキュベーションし、0.01M PBSで2回洗い、毎回5分間であった。ヤギ抗ウサギIgG(HRP)抗体(Abcam)二次抗体を室温で1時間インキュベーションし、0.01M PBSで2回洗い、毎回5分間であった。DABキット(Vector laboratories, Inc., USA)で呈色させ、3回水洗いした後にヘマトキシリンで30秒複染色して、流水で5分間流した。アルコールで段階的に脱水させてキシレンで透徹にし、中性ゴムに封入させ、切片を光学顕微鏡下で200倍にて観察した。

10

20

30

40

50

ヨンし、0.01M PBSで2回洗い、毎回5分間であった。DABキット(VECTOR Laboratories, Inc., USA)で呈色させ、3回水洗いした後にヘマトキシリンで30秒複染色して、流水で5分間流した。アルコールで段階的に脱水させてキシレンで透徹にし、中性ゴムに封入させ、切片を光学顕微鏡下で200倍にて観察した。

IRS-2免疫組織化学的結果によると、溶媒PBS投与対照群マウス(図26B)の膵島IRS-2の陽性発現(矢印に表記される)はプラスミノーゲン投与群(図26C)より明らかに少ない；プラスミノーゲン投与群のIRS-2発現レベルは正常対照群マウス(図26A)に近い。これは、プラスミノーゲンが、26週齢の糖尿病マウスの膵島細胞IRS-2の発現を効果的に増加させることができることを示している。

#### 【実施例27】

##### 【0185】

実施例27は、プラスミノーゲンが、PLG活性が正常であるT1DMマウスの膵島IRS-2の発現を促進することに関するものである。

9～10週齢のPLG活性が正常であるオスマウスを15匹取り、ランダムに三つの群に分け、プランク対照群、溶媒PBS投与対照群、及びプラスミノーゲン投与群で5匹ずつである。溶媒PBS投与対照群とプラスミノーゲン投与群マウスを4時間禁食した後、一回経腹腔で200mg/kgのSTZ(Sigma, ロット番号S0130)を注射してI型糖尿病を誘導し<sup>[43]</sup>、プランク対照群に対して処置しなかった。注射して12日後から投薬し始め、投薬開始当日を1日目とし、プラスミノーゲン投与群に1mg/0.1mL/匹/日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒PBS投与対照群にも同じ体積のPBSを尾静脈注射により投与し、連続して28日投与した。29日目にマウスを殺処分して膵臓を取り、4%パラホルムアルデヒド固定液において固定を行った。固定後の膵臓組織をアルコールで段階的に脱水させ及びキシレンで透徹化処理した後にパラフィンで包埋処理を行った。組織切片の厚みは3μmであり、切片を脱パラフィンさせて浸水して1回水で洗った。PAPマーカーで組織を丸で囲み、3%過酸化水素水で15分間インキュベーションし、0.01M PBSで2回洗い、毎回5分間であった。5%の健常ヒツジ血清液(Vector Laboratories, Inc., USA)で30分間ブロッキングした；時間になった後、ヒツジ血清液を廃棄し、ウサギ抗マウスIRS-2抗体(Abcam)を滴加して4で終夜インキュベーションし、0.01M PBSで2回洗い、毎回5分間であった。ヤギ抗ウサギIgG(HRP)抗体(Abcam)二次抗体を室温で1時間インキュベーションし、0.01M PBSで2回洗い、毎回5分間であった。DABキット(Vector Laboratories, Inc., USA)で呈色させ、3回水洗いした後にヘマトキシリンで30秒複染色して、流水で5分間流した。アルコールで段階的に脱水させてキシレンで透徹にし、中性ゴムに封入させ、切片を光学顕微鏡下で200倍にて観察した。

IRS-2免疫組織化学的結果によると、溶媒PBS投与対照群マウス(図27B)の膵島IRS-2の陽性発現(矢印に表記される)はプラスミノーゲン投与群(図27C)より明らかに少なく、しかも溶媒PBS投与対照群と比べ、プラスミノーゲン投与群はプランク対照群(図27A)により近い。これは、プラスミノーゲンが、9～10週齢のPLG活性が正常であるマウスの膵島細胞IRS-2の発現を効果的に増加させることができることを示している。

#### 【実施例28】

##### 【0186】

実施例28は、プラスミノーゲンが24～26週齢の糖尿病マウスの膵島好中球の浸潤を減少させることに関するものである。

24～26週齢のdb/dbオスマウスを9匹、db/mオスマウスを3匹取り、db/dbオスマウスをランダムに二つの群に分け、プラスミノーゲン投与群に4匹、溶媒PBS投与対照群に5匹であり、db/mマウスを正常対照群とした。実験開始当日を0日目とし、体重を計って群分けをし、実験の2日目からプラスミノーゲンまたは溶媒PBS

10

20

30

40

50

を投与し、その日を 1 日目とした。プラスミノーゲン投与群に 2 mg / 0.2 mL / 匹 / 日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒 PBS 投与対照群にも同じ体積の PBS を尾静脈注射により投与し、連続して 35 日投与した。36 日目にマウスを殺処分して臍臓を取り、4% パラホルムアルデヒド固定液において固定を行った。固定後の臍臓組織をアルコールで段階的に脱水させ及びキシレンで透徹化処理した後にパラフィンで包埋処理を行った。組織切片の厚みは 3 μm であり、切片を脱パラフィンさせて浸水して 1 回水で洗った。PAP マーカーで組織を丸で囲み、3% 過酸化水素水で 15 分間インキュベーションし、0.01 M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。5% の健常ヒツジ血清液 (Vector laboratories, Inc., USA) で 30 分間ブロッキングした；時間になった後、ヒツジ血清液を廃棄し、ウサギ抗マウス好中球抗体 (Abcam) を滴加して 4 で終夜インキュベーションし、0.01 M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。DAB キット (Vector laboratories, Inc., USA) で呈色させ、3 回水洗いした後にヘマトキシリンで 30 秒複染色して、流水で 5 分間流した。アルコールで段階的に脱水させてキシレンで透徹にし、中性ゴムに封入させ、切片を光学顕微鏡下で 200 倍にて観察した。

好中球は非特異性細胞の免疫システムにおける重要なメンバーであり、炎症が発生する時、好中球は走化性物質により炎症部位に吸引される。

好中球の免疫組織化学的結果によると、プラスミノーゲン投与群 (図 28C) の陽性発現細胞は溶媒 PBS 投与対照群 (図 28B) より少なく、しかも溶媒 PBS 投与対照群と比べ、プラスミノーゲン投与群は正常対照群 (図 28A) により近い。

#### 【実施例 29】

#### 【0187】

実施例 29 は、プラスミノーゲンが、PLG 活性が損傷したマウスの T1DM モデルにおける臍島好中球の浸潤を減少させることに関するものである。

9 ~ 10 週齢の PLG 活性が損傷したオスマウスを 10 匹取り、ランダムに三つの群に分け、プランク対照群に 3 匹、溶媒 PBS 投与対照群に 3 匹、及びプラスミノーゲン投与群に 4 匹である。溶媒 PBS 投与対照群とプラスミノーゲン投与群マウスを 4 時間禁食した後、一回経腹腔で 200 mg / kg の STZ (Sigma S0130) を注射して I 型糖尿病を誘導し [43]、プランク対照群に対して処置しなかった。注射して 12 日後から投薬し始め、投薬開始当日を 1 日目とし、プラスミノーゲン投与群に 1 mg / 0.1 mL / 匹 / 日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒 PBS 投与対照群にも同じ体積の PBS を尾静脈注射により投与し、連続して 28 日投与した。29 日目にマウスを殺処分して臍臓を取り、4% パラホルムアルデヒド固定液において固定を行った。固定後の臍臓組織をアルコールで段階的に脱水させ及びキシレンで透徹化処理した後にパラフィンで包埋処理を行った。組織切片の厚みは 3 μm であり、切片を脱パラフィンさせて浸水して 1 回水で洗った。PAP マーカーで組織を丸で囲み、3% 過酸化水素水で 15 分間インキュベーションし、0.01 M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。5% の健常ヒツジ血清液 (Vector laboratories, Inc., USA) で 30 分間ブロッキングした；時間になった後、ヒツジ血清液を廃棄し、ウサギ抗マウス好中球抗体 (Abcam) を滴加して 4 で終夜インキュベーションし、0.01 M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。DAB キット (Vector laboratories, Inc., USA) で呈色させ、3 回水洗いした後にヘマトキシリンで 30 秒複染色して、流水で 5 分間流した。アルコールで段階的に脱水させてキシレンで透徹にし、中性ゴムに封入させ、切片を光学顕微鏡下で 400 倍にて観察した。

好中球の免疫組織化学的結果によると、プラスミノーゲン投与群 (図 29C) の陽性発現細胞 (矢印に表記される) は溶媒 PBS 投与対照群 (図 29B) より少なく、しかも溶

10

20

30

40

50

媒 PBS 投与対照群と比べ、プラスミノーゲン投与群はプランク対照群（図 29 A）により近い。

【実施例 30】

【0188】

実施例 30 は、プラスミノーゲンが、PLG 活性が正常であるマウスの T1DM モデルにおける脾島好中球の浸潤を減少させることに関するものである。

9 ~ 10 週齢の PLG 活性が正常であるオスマウスを 11 匹取り、ランダムに三つの群に分け、プランク対照群に 3 匹、溶媒 PBS 投与対照群に 4 匹、及びプラスミノーゲン投与群に 4 匹である。溶媒 PBS 投与対照群とプラスミノーゲン投与群マウスを 4 時間禁食した後、一回経腹腔で 200 mg / kg の STZ (Sigma S0130) を注射して 10  
I 型糖尿病を誘導し [43]、プランク対照群に対して処置しなかった。注射して 12 日後から投薬し始め、投薬開始当日を 1 日目とし、プラスミノーゲン投与群に 1 mg / 0.1 mL / 匹 / 日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒 PBS 投与対照群にも同じ体積の PBS を尾静脈注射により投与し、連続して 28 日投与した。29 日目にマウスを殺処分して脾臓を取り、4% パラホルムアルデヒド固定液において固定を行った。固定後の脾臓組織をアルコールで段階的に脱水させ及びキシレンで透徹化処理した後にパラフィンで包埋処理を行った。組織切片の厚みは 3 μm であり、切片を脱パラフィンさせて浸水して 1 回水で洗った。PAP マーカーで組織を丸で囲み、3% 過酸化水素水で 15 分間インキュベーションし、0.01M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。5% の健常ヒツジ血清液 (Vector laboratories, Inc., USA) で 30 分間ブロッキングした；時間になった後、ヒツジ血清液を廃棄し、ウサギ抗マウス好中球抗体 (Abcam) を滴加して 4 で終夜インキュベーションし、0.01M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。ヤギ抗ウサギ IgG (HRP) 抗体 (Abcam) 二次抗体を室温で 1 時間インキュベーションし、0.01M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。DAB キット (Vector laboratories, Inc., USA) で呈色させ、3 回水洗いした後にヘマトキシリンで 30 秒複染色して、流水で 5 分間流した。アルコールで段階的に脱水させてキシレンで透徹にし、中性ゴムに封入させ、切片を光学顕微鏡下で 400 倍にて観察した。

好中球の免疫組織化学的結果によると、プラスミノーゲン投与群（図 30 C）の陽性発現細胞（矢印に表記される）は溶媒 PBS 投与対照群（図 30 B）よりも少なく、しかも溶媒 PBS 投与対照群と比べ、プラスミノーゲン投与群はプランク対照群（図 30 A）により近い。

【実施例 31】

【0189】

実施例 31 は、プラスミノーゲンが、PLG 活性が損傷したマウスの T1DM モデルにおける脾島多方向核転写因子 NF-kB の発現を促進することに関するものである。

9 ~ 10 週齢の PLG 活性が損傷したオスマウスを 10 匹取り、ランダムに三つの群に分け、プランク対照群に 3 匹、溶媒 PBS 投与対照群に 3 匹、及びプラスミノーゲン投与群に 4 匹である。溶媒 PBS 投与対照群とプラスミノーゲン投与群マウスを 4 時間禁食した後、一回経腹腔で 200 mg / kg の STZ (Sigma S0130) を注射して 10  
I 型糖尿病を誘導し [43]、プランク対照群に対して処置しなかった。注射して 12 日後から投薬し始め、投薬開始当日を 1 日目とし、プラスミノーゲン投与群に 1 mg / 0.1 mL / 匹 / 日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒 PBS 投与対照群にも同じ体積の PBS を尾静脈注射により投与し、連続して 28 日投与した。29 日目にマウスを殺処分して脾臓を取り、4% パラホルムアルデヒド固定液において固定を行った。固定後の脾臓組織をアルコールで段階的に脱水させ及びキシレンで透徹化処理した後にパラフィンで包埋処理を行った。組織切片の厚みは 3 μm であり、切片を脱パラフィンさせて浸水して 1 回水で洗った。PAP マーカーで組織を丸で囲み、3% 過酸化水素水で 15 分間インキュベーションし、0.01M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。5% の健常ヒツジ血清液 (Vector laboratories, Inc., USA) 50

A) で 30 分間ブロッキングした；時間になった後、ヒツジ血清液を廃棄し、ウサギ抗マウス NF - k B 抗体 (C e 1 1 S i g n a l) を滴加して 4 で終夜インキュベーションし、0.01M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。ヤギ抗ウサギ Ig G (H R P) 抗体 (A b c a m) 二次抗体を室温で 1 時間インキュベーションし、0.01M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。D A B キット (V e c t o r l a b o r a t o r i e s, I n c ., U S A) で呈色させ、3 回水洗いした後にヘマトキシリンで 30 秒複染色して、流水で 5 分間流した。アルコールで段階的に脱水させてキシレンで透徹にし、中性ゴムに封入させ、切片を光学顕微鏡下で 200 倍にて観察した。

N F - k B は多方向核転写因子として、活性化された後に細胞の増殖、細胞のアポトーシス、及び炎症と免疫など多くの遺伝子の調節に寄与する [24]。 10

実験の結果、プラスミノーゲン投与群 (図 31 C) の N F - k B の発現 (矢印に表記される) は溶媒 PBS 投与対照群 (図 31 B) より明らかに高いことは示されている。これは、プラスミノーゲンが多方向核転写因子 N F - k B の発現を促進できることを示している。

#### 【実施例 32】

##### 【0190】

実施例 32 は、プラスミノーゲンが 18 週齢の糖尿病マウスの臍島多方向核転写因子 N F - k B の発現を促進することに関するものである。

18 週齢の d b / d b オスマウスを 7 匹取り、実験開始当日を 0 日目とし、体重を計って体重によってランダムに二つの群に分け、プラスミノーゲン投与群に 3 匹、溶媒 PBS 投与対照群に 4 匹である。一日目からプラスミノーゲンまたは溶媒 PBS を投与し、プラスミノーゲン投与群に 2 mg / 0.2 mL / 匹 / 日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒 PBS 投与対照群にも同じ体積の PBS を尾静脈注射により投与し、連続して 35 日投与した。36 日目にマウスを殺処分して臍臓を取り、4% パラホルムアルデヒド固定液において固定を行った。固定後の臍臓組織をアルコールで段階的に脱水させ及びキシレンで透徹化処理した後にパラフィンで包埋処理を行った。組織切片の厚みは 3 μm であり、切片を脱パラフィンさせて浸水して 1 回水で洗った。P A P マーカーで組織を丸で囲み、3% 過酸化水素水で 15 分間インキュベーションし、0.01M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。5% の健常ヒツジ血清液 (V e c t o r l a b o r a t o r i e s, I n c ., U S A) で 30 分間ブロッキングした；時間になった後、ヒツジ血清液を廃棄し、ウサギ抗マウス NF - k B 抗体 (C e 1 1 S i g n a l) を滴加して 4 で終夜インキュベーションし、0.01M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。ヤギ抗ウサギ Ig G (H R P) 抗体 (A b c a m) 二次抗体を室温で 1 時間インキュベーションし、0.01M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。D A B キット (V e c t o r l a b o r a t o r i e s, I n c ., U S A) で呈色させ、3 回水洗いした後にヘマトキシリンで 30 秒複染色して、流水で 5 分間流した。アルコールで段階的に脱水させてキシレンで透徹にし、中性ゴムに封入させ、切片を光学顕微鏡下で 200 倍にて観察した。 20

本発明の実験の結果、プラスミノーゲン投与群 (図 32 B) の N F - k B の発現 (矢印に表記される) は溶媒 PBS 投与対照群 (図 32 A) より明らかに高いことは示されている。これは、プラスミノーゲンが多方向核転写因子 N F - k B の発現を促進できることを示している。 30

#### 【実施例 33】

##### 【0191】

実施例 33 は、プラスミノーゲンが 26 週齢の糖尿病マウスの多方向核転写因子 N F - k B の発現を促進することに関するものである。

26 週齢の d b / d b オスマウスを 9 匹、d b / m オスマウスを 3 匹取り、実験開始当日を 0 日目とし、体重を計って体重によって d b / d b マウスをランダムに二つの群に分け、プラスミノーゲン投与群に 4 匹、溶媒 PBS 投与対照群に 5 匹であり、d b / m マウスを正常対照群とした。一日目からプラスミノーゲンまたは溶媒 PBS を投与し、プラス 40

ミノーゲン投与群に 2 mg / 0.2 mL / 匹 / 日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒 PBS 投与対照群にも同じ体積の PBS を尾静脈注射により投与し、連続して 35 日投与した。36 日目にマウスを殺処分して臍臓を取り、4% パラホルムアルデヒド固定液において固定を行った。固定後の臍臓組織をアルコールで段階的に脱水させ及びキシレンで透徹化処理した後にパラフィンで包埋処理を行った。組織切片の厚みは 3 μm であり、切片を脱パラフィンさせて浸水して 1 回水で洗った。PAP マーカーで組織を丸で囲み、3% 過酸化水素水で 15 分間インキュベーションし、0.01M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。5% の健常ヒツジ血清液 (Vector laboratories, Inc., USA) で 30 分間ブロッキングした；時間になった後、ヒツジ血清液を廃棄し、ウサギ抗マウス NF-kB 抗体 (Cell Signal) を滴加して 4 で終夜インキュベーションし、0.01M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。ヤギ抗ウサギ IgG (HRP) 抗体 (Abcam) 二次抗体を室温で 1 時間インキュベーションし、0.01M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。DAB キット (Vector laboratories, Inc., USA) で呈色させ、3 回水洗いした後にヘマトキシリンで 30 秒複染色して、流水で 5 分間流した。アルコールで段階的に脱水させてキシレンで透徹にし、中性ゴムに封入させ、切片を光学顕微鏡下で 200 倍にて観察した。

実験の結果、プラスミノーゲン投与群 (図 33C) の NF-kB の発現 (矢印に表記される) は溶媒 PBS 投与対照群 (図 33B) より明らかに高く、しかも溶媒 PBS 投与対照群と比べ、プラスミノーゲン投与群は正常対照群 (図 33A) により近いことは示されている。これは、プラスミノーゲンが比較的に老齢 (26 週齢) の糖尿病マウスの多方向核転写因子 NF-kB の発現を促進できることを示している。

#### 【実施例 34】

#### 【0192】

実施例 34 は、プラスミノーゲンが 24 ~ 25 週齢の糖尿病マウスの臍島 TNF- の発現を促進することに関するものである。

24 ~ 25 週齢の db / db オスマウスを 11 匹、db / m オスマウスを 5 匹取り、実験開始当日を 0 日目とし、体重を計って体重によって db / db マウスをランダムに二つの群に分け、プラスミノーゲン投与群に 5 匹、溶媒 PBS 投与対照群に 6 匹であり、db / m マウスを正常対照群とした。一日目からプラスミノーゲンまたは溶媒 PBS を投与し、プラスミノーゲン投与群に 2 mg / 0.2 mL / 匹 / 日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒 PBS 投与対照群にも同じ体積の PBS を尾静脈注射により投与するか何ら液体も注射せずに、連続して 31 日投与した。32 日目にマウスを殺処分して臍臓を取り、4% パラホルムアルデヒド固定液において固定を行った。固定後の臍臓組織をアルコールで段階的に脱水させ及びキシレンで透徹化処理した後にパラフィンで包埋処理を行った。組織切片の厚みは 3 μm であり、切片を脱パラフィンさせて浸水して 1 回水で洗った。PAP マーカーで組織を丸で囲み、3% 過酸化水素水で 15 分間インキュベーションし、0.01M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。5% の健常ヒツジ血清液 (Vector laboratories, Inc., USA) で 30 分間ブロッキングした；時間になった後、ヒツジ血清液を廃棄し、ウサギ抗マウス TNF- 抗体 (Abcam) を滴加して 4 で終夜インキュベーションし、0.01M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。ヤギ抗ウサギ IgG (HRP) 抗体 (Abcam) 二次抗体を室温で 1 時間インキュベーションし、0.01M PBS で 2 回洗い、毎回 5 分間であった。DAB キット (Vector laboratories, Inc., USA) で呈色させ、3 回水洗いした後にヘマトキシリンで 30 秒複染色して、流水で 5 分間流した。アルコールで段階的に脱水させてキシレンで透徹にし、中性ゴムに封入させ、切片を光学顕微鏡下で 200 倍にて観察した。

腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor - 、TNF-) は主に活性化した単核 / マクロファージにより発生し、炎症を促進する重要な因子である [48]。

本実験研究の結果、プラスミノーゲン投与群（図34C）のTNF- $\alpha$ の陽性発現は溶媒PBS投与対照群（図34B）より明らかに高く、しかも溶媒PBS投与対照群と比べ、プラスミノーゲン投与群は正常対照群（図34A）により近いことは示されている。これは、プラスミノーゲンが24～25週齢の糖尿病マウスのTNF- $\alpha$ の発現を促進できることを示している。

#### 【実施例35】

##### 【0193】

実施例35は、プラスミノーゲンが26週齢の糖尿病マウスの臍島TNF- $\alpha$ の発現を促進することに関するものである。

26週齢のdb/dbオスマウスを9匹、db/mオスマウスを3匹取り、実験開始当日を0日目とし、体重を計って体重によってdb/dbマウスをランダムに二つの群に分け、プラスミノーゲン投与群に4匹、溶媒PBS投与対照群に5匹であり、db/mマウスを正常対照群とした。一日目からプラスミノーゲンまたは溶媒PBSを投与し、プラスミノーゲン投与群に2mg/0.2mL/匹/日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒PBS投与対照群にも同じ体積のPBSを尾静脈注射により投与するか何ら液体も注射せずに、連続して35日投与した。36日目にマウスを殺処分して臍臓を取り、4%パラホルムアルデヒド固定液において固定を行った。固定後の臍臓組織をアルコールで段階的に脱水させ及びキシレンで透徹化処理した後にパラフィンで包埋処理を行った。組織切片の厚みは3μmであり、切片を脱パラフィンさせて浸水して1回水で洗った。PAPマーカーで組織を丸で囲み、3%過酸化水素水で15分間インキュベーションし、0.01M PBSで2回洗い、毎回5分間であった。5%の健常ヒツジ血清液（Vector laboratories, Inc., USA）で30分間プロッキングした；時間になった後、ヒツジ血清液を廃棄し、ウサギ抗マウスTNF- $\alpha$ 抗体（Abcam）を滴加して4で終夜インキュベーションし、0.01M PBSで2回洗い、毎回5分間であった。ヤギ抗ウサギIgG（HRP）抗体（Abcam）二次抗体を室温で1時間インキュベーションし、0.01M PBSで2回洗い、毎回5分間であった。DABキット（Vector laboratories, Inc., USA）で呈色させ、3回水洗いした後にヘマトキシリンで30秒複染色して、流水で5分間流した。アルコールで段階的に脱水させてキシレンで透徹にし、中性ゴムに封入させ、切片を光学顕微鏡下で200倍にて観察した。

研究の結果、プラスミノーゲン投与群（図35C）のTNF- $\alpha$ の陽性発現は溶媒PBS投与対照群（図35B）より明らかに高く、しかも溶媒PBS投与対照群と比べ、プラスミノーゲン投与群は正常対照群（図35A）により近いことは示されている。これは、プラスミノーゲンが26週齢の糖尿病マウスのTNF- $\alpha$ の発現を促進できることを示している。

#### 【実施例36】

##### 【0194】

実施例36は、プラスミノーゲンが、PLG活性が損傷したマウスのT1DMモデルにおける臍島TNF- $\alpha$ の発現を促進することに関するものである。

9～10週齢のPLG活性が損傷したオスマウスを7匹取り、ランダムに二つの群に分け、溶媒PBS投与対照群に3匹、プラスミノーゲン投与群に4匹である。二つの群のマウスを4時間禁食した後、一回経腹腔で200mg/kgのSTZ（Sigma S0130）を注射してI型糖尿病を誘導した<sup>[43]</sup>。注射して12日後から投薬し始め、投薬開始当日を1日目とし、プラスミノーゲン投与群に1mg/0.1mL/匹/日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒PBS投与対照群にも同じ体積のPBSを尾静脈注射により投与し、連続して28日投与した。29日目にマウスを殺処分して臍臓を取り、4%パラホルムアルデヒド固定液において固定を行った。固定後の臍臓組織をアルコールで段階的に脱水させ及びキシレンで透徹化処理した後にパラフィンで包埋処理を行った。組織切片の厚みは3μmであり、切片を脱パラフィンさせて浸水して1回水で洗った。PAPマーカーで組織を丸で囲み、3%過酸化水素水で15分間インキュベーションし、0.01M PBSで2回洗い、毎回5分間であった。5%の健常ヒツジ血清液（Vector laboratories, Inc., USA）で30分間プロッキングした；時間になった後、ヒツジ血清液を廃棄し、ウサギ抗マウスTNF- $\alpha$ 抗体（Abcam）を滴加して4で終夜インキュベーションし、0.01M PBSで2回洗い、毎回5分間であった。ヤギ抗ウサギIgG（HRP）抗体（Abcam）二次抗体を室温で1時間インキュベーションし、0.01M PBSで2回洗い、毎回5分間であった。DABキット（Vector laboratories, Inc., USA）で呈色させ、3回水洗いした後にヘマトキシリンで30秒複染色して、流水で5分間流した。アルコールで段階的に脱水させてキシレンで透徹にし、中性ゴムに封入させ、切片を光学顕微鏡下で200倍にて観察した。

10

20

30

40

50

ーションし、0.01M PBSで2回洗い、毎回5分間であった。5%の健常ヒツジ血清液 (Vector laboratories, Inc., USA) で30分間プロッキングした；時間になった後、ヒツジ血清液を廃棄し、ウサギ抗マウスTNF-<sub>α</sub>抗体 (Abcam) を滴加して40℃で終夜インキュベーションし、0.01M PBSで2回洗い、毎回5分間であった。ヤギ抗ウサギIgG (HRP) 抗体 (Abcam) 二次抗体を室温で1時間インキュベーションし、0.01M PBSで2回洗い、毎回5分間であった。DABキット (Vector laboratories, Inc., USA) で呈色させ、3回水洗いした後にヘマトキシリンで30秒複染色して、流水で5分間流した。アルコールで段階的に脱水させてキシレンで透徹にし、中性ゴムに封入させ、切片を光学顕微鏡下で200倍にて観察した。

本実験研究の結果、プラスミノーゲン投与群 (図36B) のTNF-<sub>α</sub>の陽性発現は溶媒PBS投与対照群 (図36A) より明らかに高いことは示されている。これは、プラスミノーゲンが、PLG活性が損傷したマウスのT1DMモデルにおけるTNF-<sub>α</sub>の発現を促進できることを示している。

#### 【実施例37】

##### 【0195】

実施例37は、プラスミノーゲンが、PLG活性が損傷したマウスのT1DMモデルにおける膵島の損傷を軽減することに関するものである。

9～10週齢のPLG活性が損傷したオスマウスを10匹取り、ランダムに三つの群に分け、プランク対照群に3匹、溶媒PBS投与対照群に3匹、プラスミノーゲン投与群に4匹である。溶媒PBS投与対照群とプラスミノーゲン投与群マウスを4時間禁食した後、一回経腹腔で200mg/kgのSTZ (Sigma S0130) を注射してI型糖尿病を誘導し<sup>[43]</sup>、プランク対照群に対して処置しなかった。注射して12日後から投薬し始め、投薬開始当日を1日目とし、プラスミノーゲン投与群に1mg/0.1mL/匹/日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒PBS投与対照群にも同じ体積のPBSを尾静脈注射により投与し、連続して28日投与した。29日目にマウスを殺処分して膵臓を取り、4%パラホルムアルデヒド固定液において固定を行った。固定後の膵臓組織をアルコールで段階的に脱水させ及びキシレンで透徹化処理した後にパラフィンで包埋処理を行った。組織切片の厚みは3μmであり、切片を脱パラフィンさせて浸水して1回水で洗った。PAPマーカーで組織を丸で囲み、3%過酸化水素水で15分間インキュベーションし、0.01M PBSで2回洗い、毎回5分間であった。5%の健常ヒツジ血清液 (Vector laboratories, Inc., USA) で30分間プロッキングした；時間になった後、ヒツジ血清液を廃棄し、ヤギ抗マウスIgM (HRP) 抗体 (Abcam) を滴加して室温で1時間インキュベーションし、0.01M PBSで2回洗い、毎回5分間であった。DABキット (Vector laboratories, Inc., USA) で呈色させ、3回水洗いした後にヘマトキシリンで30秒複染色して、流水で5分間流した。アルコールで段階的に脱水させてキシレンで透徹にし、中性ゴムに封入させ、切片を光学顕微鏡下で200倍にて観察した。

IgM抗体はアポトーシスと壊死細胞の除去過程において重要な役割を果たし、組織器官の損傷局所のIgM抗体のレベルは、損傷程度と正相関している<sup>[49, 50]</sup>。よって、組織器官局所のIgM抗体のレベルは、該組織器官の損傷状況を反映できる。

研究の結果、プラスミノーゲン投与群 (図37C) のIgMの陽性発現は溶媒PBS投与対照群 (図37B) より明らかに低く、溶媒PBS投与対照群と比べ、プラスミノーゲン投与群はプランク対照群 (図37A) により近いことは示されている。これは、プラスミノーゲンがIgMの発現を低下させることができることを示し、プラスミノーゲンが、PLG活性が損傷したマウスのT1DMモデルにおける膵島の損傷を軽減できることを示唆している。

#### 【実施例38】

##### 【0196】

実施例38は、プラスミノーゲンが24～25週齢の糖尿病マウスの膵島細胞のアポト

10

20

30

40

50

ーシスを減少させることに関するものである。

24～25週齢のdb/dbオスマウスを11匹、db/mオスマウスを5匹取り、実験開始当日を0日目とし、体重を計って体重によってdb/dbマウスをランダムに二つの群に分け、プラスミノーゲン投与群に5匹、溶媒PBS投与対照群に6匹であり、db/mマウスを正常対照群とした。一日目からプラスミノーゲンまたは溶媒PBSを投与し、プラスミノーゲン投与群に2mg/0.2mL/匹/日でヒト由来のプラスミノーゲンを尾静脈注射により投与し、溶媒PBS投与対照群にも同じ体積のPBSを尾静脈注射により投与するか何ら液体も注射せずに、連続して31日投与した。32日目にマウスを殺処分して臍臓を取り、4%パラホルムアルデヒド固定液において固定を行った。固定後の臍臓組織をアルコールで段階的に脱水させ及びキシレンで透徹化処理した後にパラフィンで包埋処理を行った。組織切片の厚みは3μmであり、切片を脱パラフィンさせて浸水して1回水で洗った。PAPマーカーで組織を丸で囲み、プロテアーゼK使用液を滴加して組織を覆い、室温で7分間インキュベーションし、0.01M PBSで3回洗い、毎回3分間であった。TUNELキット(Roche)試薬1と試薬2との混合液体(5:45)を滴加し、37恒温で40分間インキュベーションし、0.01M PBSで3回洗い、毎回3分間であった。メタノールで調製した3%過酸化水素水(過酸化水素:メタノール=1:9)を滴加して室温で遮光して20分間インキュベーションし、0.01M PBSで3回洗い、毎回3分間であった。TUNELキット試薬3を滴加し、37恒温で30分間インキュベーションし、0.01M PBSで3回洗い、DABキット(VECTOR laboratories, Inc., USA)で呈色させ、3回水洗いした後にヘマトキシリンで30秒複染色して、流水で5分間流した。アルコールで段階的に脱水させてキシレンで透徹にし、中性ゴムに封入させ、切片を光学顕微鏡下で200倍にて観察した。

TUNEL染色は、組織細胞がアポトーシスの末期における細胞核DNAの破断状況を検出するために用いることができる。

本実験研究の結果、プラスミノーゲン投与群(図38C)の陽性細胞数(矢印に表記される)は溶媒PBS投与対照群(図38B)より明らかに少ない。正常対照群のTUNEL陽性染色は極めて低い(図38A)。正常対照群のアポトーシス率は約8%であり、溶媒PBS投与対照群のアポトーシス率は約93%であり、プラスミノーゲン投与群のアポトーシス率は約16%である。これは、プラスミノーゲンが糖尿病マウスの臍島細胞のアポトーシスを顕著に減少させることができることを示している。

#### 【0197】

参考文献：

- [1] International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas [M]. 7th ed. Brussels: Karakas Print, 2015: 13.
- [2] Lopez AP, de Dios A, Chiesa I, et al. Analysis of mutations in the glucokinase gene in people clinically characterized as MODY2 without a family history of diabetes. Diabetes Res Clin Pract, 2016, 118: 38-43.
- [3] Fan M, Li W, Wang L, et al. Association of SLC30A8 gene polymorphism with type 2 diabetes, evidence from 46 studies: a meta-analysis. Endocrine, 2016, 53: 381-94.
- [4] Liang J, Slingerland JM. Multiple roles of the PI3K / PKB (Akt) pathway in cell cycle progression[J]. Cell Cycle, 2003, 2(4):339-451.
- [5] Dhand R, Hiles I, Panayotou G, et al. PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine/threonine kinase activity[J]. Embo J, 1994, 13(3):522-331.
- [6] Perrin AJ, Gunda M, Yu B, Yen K, Ito S, Forster S, Tissenbaum HA, Derry WB. Noncanonical control of *C. elegans* germline apoptosis by the insulin/IGF-1 and Ras/MAPK signaling pathways. Cell Death Differ. 2013 Jan;20(1):97-107.
- [7] Aguirre V, Uchida T, Yenush L, et al. The c-Jun N H(2)-terminikinase promotes insulin resistance by associating with insulin receptor substrate-1 and

10

20

30

40

50

- phosphorylation of ser(307)[J]. *J BiolChem*, 2000, 275:9047-9054.
- [8] Hirosumi J, Tuneman G, Chang L, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*[J]. 2002, 420:333-336.
- [9] Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance[J]. *Science*, 1993, 259(5091): 87-91.
- [10] Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders[J]. *Nature*, 2006, 444(7121): 860- 867.
- [11] Swaroop JJ, Rajarajeswari D, Naidu JN. Association of TNF-α with insulin resistance in type 2 diabetes mellitus[J]. *Indian J Med Res*, 2012, 135: 127-130. 10
- [12] Kentish SJ, O'Donnell TA, Isaacs NJ, et al. Gastric vagal afferent modulation by leptin is influenced by food intake status[J]. *J Physiol*, 2013, 591(7): 1921-1934.
- [13] Keane KN, Cruzat VF, Carlessi R, de Bittencourt PI Jr, Newsholme P. Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and β-Cell Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:181643
- [14] LUOTOLA K, PIETILÄ A, ZELLER T, et al. Associations between interleukin-1(IL-1) gene variations or IL-1 receptor antagonist levels and the development of type 2 diabetes [J]. *J Intern Med*, 2011, 269(3):322-332 .
- [15] DONATH M Y, SHOELSON S E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2011, 11(2):98-107 . 20
- [16] Reddy VP, Zhu X, Perry G, Smith MA. Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2009;16(4): 763-774.
- [17] Nishikawa T, Araki E. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(3): 343-353.
- [18] Ceretta LB, Reus GZ, Abelaira HM, Ribeiro KF, Zappellini G, Felisbino FF, Steckert AV, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Increased oxidative stress and imbalance in antioxidant enzymes in the brains of alloxan-induced diabetic rats. *Exp Diabetes Res* 2012; 2012: 302682. 30
- [19] Kajimoto Y, Kaneto H. Role of oxidative stress in pancreatic β-cell dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1011: 168-176.
- [20] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(1): 44-84.
- [21] Drews G, Krippeit-Drews P, Dufer M. Oxidative stress and β-cell dysfunction. *Pflugers Arch* 2010; 460(4): 703-718.
- [22] Patel S, Santani D. Role of NF-κB in the pathogenesis of diabetes and its associated complications. *Pharmacol Rep* 2009; 61: 595-603.
- [23] Hayden MR, Sowers JR. Isletopathy in type 2 diabetes mellitus: implications of islet RAS, islet fibrosis, islet amyloid, remodeling, and oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(7): 891-910. 40
- [24] Mariappan N, Elks CM, Sriramula S, Guggilam A, Liu Z, Borkhsenious O, Francis J. NF-κB-induced oxidative stress contributes to mitochondrial and cardiac dysfunction in type II diabetes. *Cardiovasc Res* 2010; 85(3): 473-483.
- [25] Hofmann MA, Schiekofer S, Isermann B, Kanitz M, Henkels M, Joswig M, Treusch A, Morcos M, Weiss T, Borcea V, Khalek A, Amiral J, Tritschler H, Ritz E, Wahl P, Ziegler R, Bierhaus A, Nawroth PP. Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF-κB. *Diabetologia* 50

1999; 42(2): 222-232.

[26]Eldor R, Yeffet A, Baum K, Doviner V, Amar D, Ben-Neriah Y, Christofori G, Peled A, Carel JC, Boitard C, Klein T, Serup P, Eizirik DL, Melloul D. Conditional and specific NF-kappaB blockade protects pancreatic beta cells from diabetogenic agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(13): 5072-5077.

[27]Caamano J, Hunter CA. NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(3): 414-429.

[28]Lacraz G, Giroix MH, Kassis N, Coulaud J, Galinier A, Noll C, Cornut M, Schmidlin F, Paul JL, Janel N, Irminger JC, Kerfoot M, Portha B, Donath MY, Ehes JA, Homo-Delarche F. Islet endothelial activation and oxidative stress gene expression is reduced by IL-1Ra treatment in the type 2 diabetic GK rat. *PLoS One* 2009; 4(9): e6963.

[29]Cheng CY, Hsieh HL, Sun CC, Lin CC, Luo SF, Yang CM. IL-1 beta induces urokinase-plasminogen activator expression and cell migration through PKC  $\alpha$ , JNK1/2, and NF-kappaB in A549 cells. *J Cell Physiol* 2009; 219(1):183-193.

[30]Mahadev K, Motoshima H, Wu X, Ruddy JM, Arnold RS, Cheng G, Lambeth JD, Goldstein BJ. The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and plays an integral role in insulin signal transduction. *Mol Cell Biol* 2004; 24(5): 1844-1854.

[31]Goldstein BJ, Mahadev K, Wu X. Insulin action is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets. *Diabetes* 2005; 54(2): 311-321.

[32]Mahadev K, Wu X, Zilberman A, Zhu L, Lawrence JTR, Goldstein BJ. Hydrogen peroxide generated during cellular insulin stimulation is integral to activation of the distal insulin signaling cascade in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 2001; 276: 48662-48669.

[33]Loh K, et al., Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity. *Cell Metab* 2009; 10(4): 260-272.

[34]Nishikawa T, Araki E. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(3): 343-353.

[35]Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 2003; 52(1): 1-8.

[36]Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005; 54(6): 1615-1625.

[37]Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, Marchionne EM. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med* 2011; 51(5): 993-999.

[38]Wang J, Ma H, Tong C, Zhang H, Lawlis GB, Li Y, Zang M, Ren J, Nijland MJ, Ford SP, Nathanielsz PW, Li J. Overnutrition and maternal obesity in sheep pregnancy alter the JNK-IRS-1 signaling cascades and cardiac function in the fetal heart. *FASEB J* 2010; 24(6): 2066-2076.

[39]Marder V J, Novokhatny V. Direct fibrinolytic agents: biochemical attributes, preclinical foundation and clinical potential [J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2010, 8(3): 433-444.

[40]Hunt J A, Petteway Jr S R, Scuderi P, et al. Simplified recombinant plasmin: production and functional comparison of a novel thrombolytic molecule with plasma-derived plasmin [J]. *Thromb Haemost*, 2008, 100(3): 413-419.

10

20

30

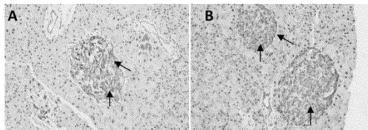
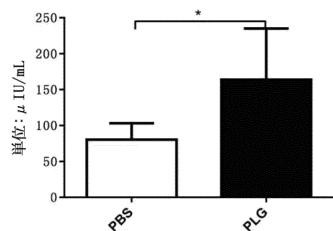
40

50

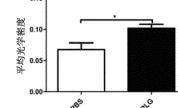
- [41] Sottrup-Jensen L, Claeys H, Zajdel M, et al. The primary structure of human plasminogen: Isolation of two lysine-binding fragments and one "mini"-plasminogen (MW, 38,000) by elastase-catalyzed-specific limited proteolysis [J]. *Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis*, 1978, 3: 191-209.
- [42] Nagai N, Demarsin E, Van Hoef B, et al. Recombinant human microplasmin: production and potential therapeutic properties [J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2003, 1(2): 307-313.
- [43] Brian L. Furman. Streptozotocin-Induced Diabetic Models UNIT 5.47 in Mice and Rats. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 70:5.47.1-5.47.20.
- [44] Parvesh Chaudhry, Mohan Singh, Sophie Parent et al. Prostate Apoptosis Response 4 (Par-4), a Novel Substrate of Caspase-3 during Apoptosis Activation. *Mol Cell Biol*. 2012 Feb; 32(4): 826-839. 10
- [45] Patrick Viatour, Marie-Paule Merville, Vincent Bours et al. Phosphorylation of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ Bproteins: implications in cancer and inflammation..TRENDS in Biochemical Sciences , 2005 , 30 (1) :43-52.
- [46] Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 1998;391:900-904.
- [47] Withers DJ, Burks DJ, Towery HH et al. White MF. Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling. *Nat Genet* 1999;23:32-40. 20
- [48] Jacob CO1, Also S, Michie SA, McDevitt HO et al. Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by tumor necrosis factor (TNF): similarities between TNF-alpha and interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Feb;87(3):968-72.
- [49] Zhang M, Takahashi K, Alicot EM, Vorup-Jensen T, Kessler B, et al. Activation of the lectin pathway by natural IgM in a model of ischemia/reperfusion injury. *J Immunol*. 2006. 177: 4727-4734.
- [50] Kim SJ, Gershov D, Ma X, Brot N, Elkon KB (2002) I-PLA2 Activation during Apoptosis Promotes the Exposure of Membrane Lysophosphatidylcholine Leading to Binding by Natural Immunoglobulin M Antibodies and Complement Activation. *The Journal of Experimental Medicine* 196: 655-665. 30

【図面】

【図 1】



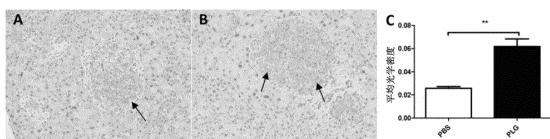
【図 2】



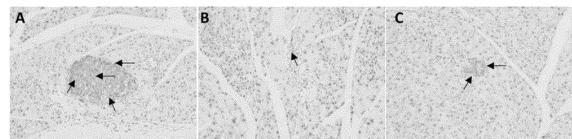
40

50

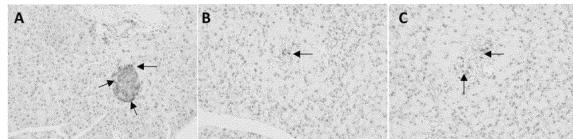
【図3】



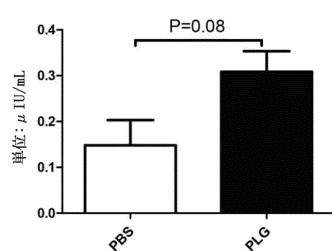
【図4】



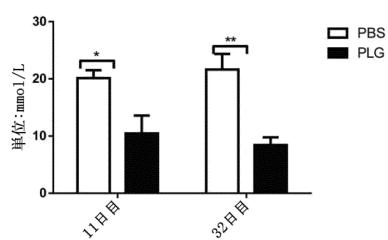
【図5】



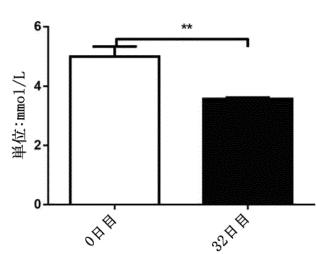
【図6】



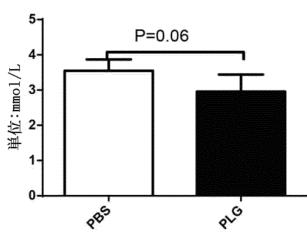
【図7】



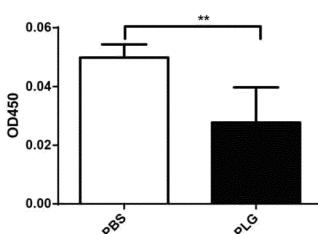
【図8】



【図9】



【図10】



10

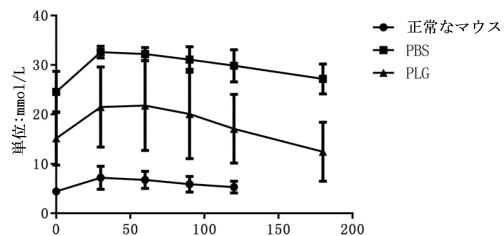
20

30

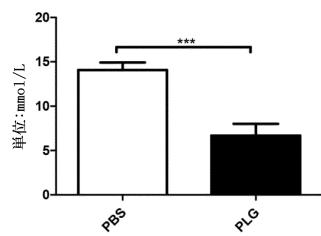
40

50

【図 1 1】

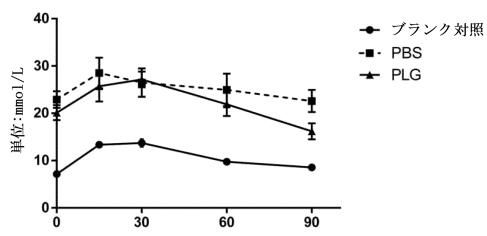


【図 1 2】

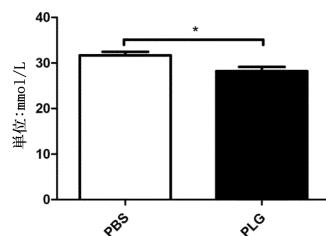


10

【図 1 3】

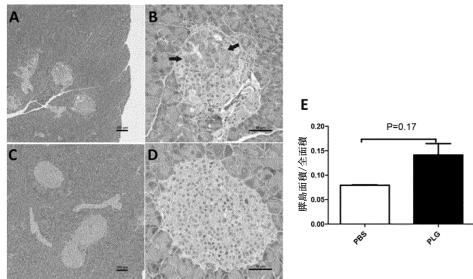


【図 1 4】

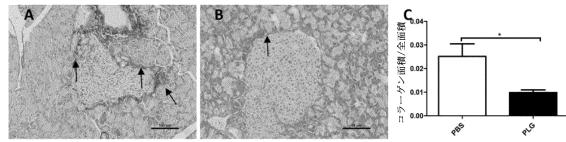


20

【図 1 5】



【図 1 6】

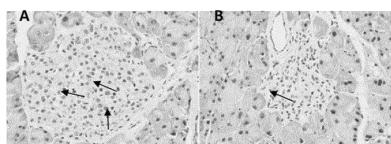


30

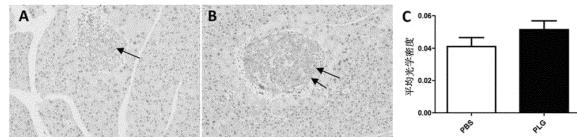
40

50

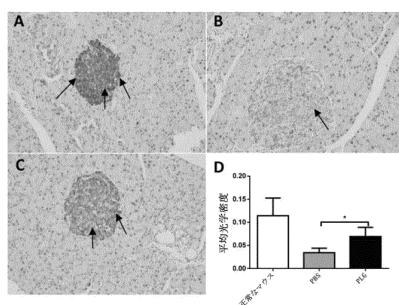
【図17】



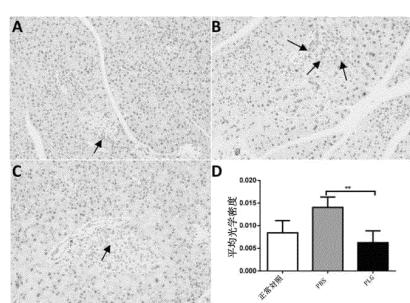
【図18】



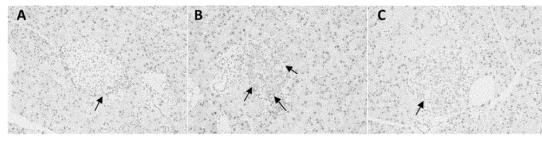
【図19】



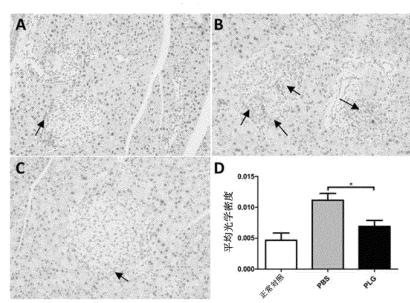
【図20】



【図21】



【図22】



10

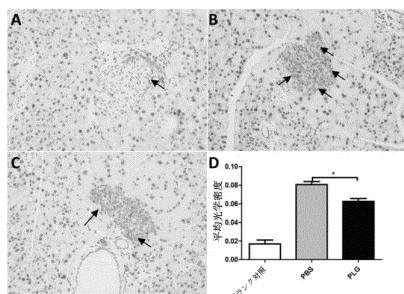
20

30

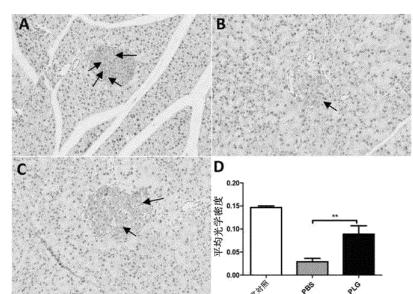
40

50

【図23】

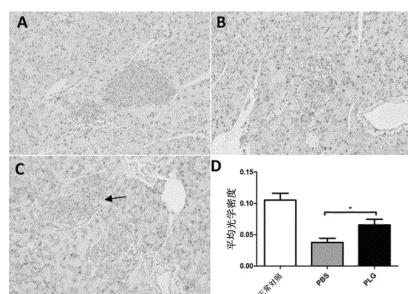


【図24】

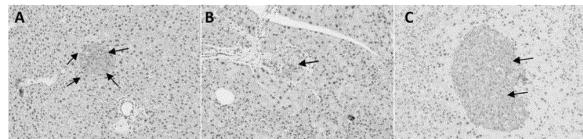


10

【図25】

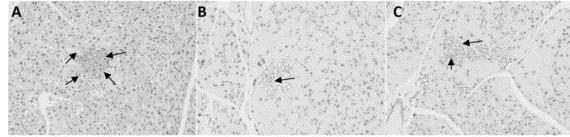


【図26】

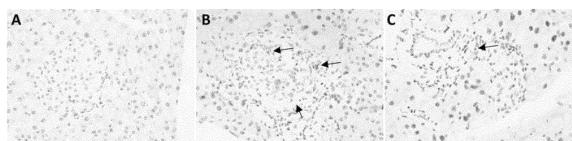


20

【図27】



【図28】

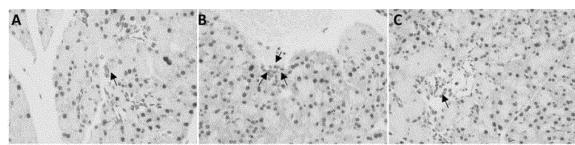


30

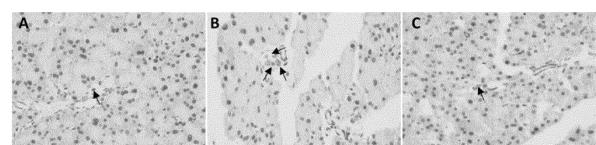
40

50

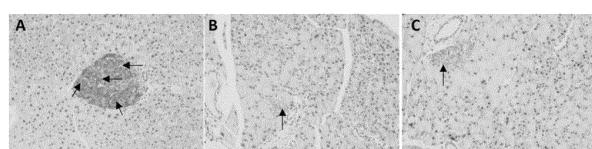
【図 2 9】



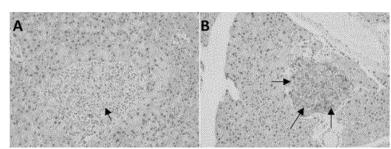
【図 3 0】



【図 3 1】

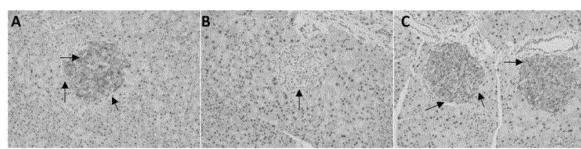


【図 3 2】

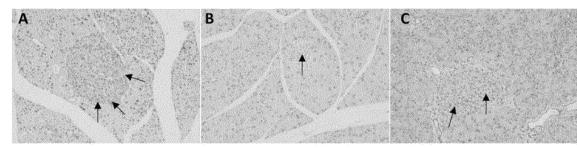


10

【図 3 3】

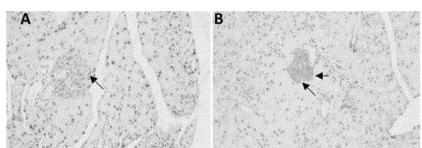
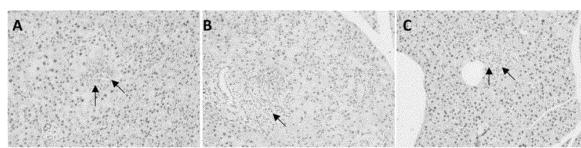


【図 3 4】



20

【図 3 5】

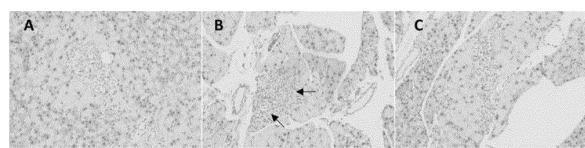


30

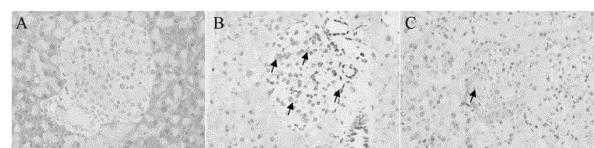
40

50

【図 3 7】



【図 3 8】



【配列表】

0007554048000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

	F I		
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
C 1 2 N 9/68 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
C 1 2 N 15/57 (2006.01)	C 1 2 N	9/68	Z N A
	C 1 2 N	15/57	

中国(CN)  
12, 510号室

## 合議体

審判長 松波 由美子

審判官 光本 美奈子

審判官 山村 祥子

## (56)参考文献

特表2002-510209 (JP, A)  
米国特許出願公開第2005/0250694 (US, A1)  
国際公開第2017/077380 WO, A1)  
特表2020-502150 (JP, A)  
特表2020-510628 (JP, A)  
特表2020-502140 (JP, A)  
BLOOD, 2012, VOL. 119, P. 5879 - 5887

## (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A61K38/00-38/58

CAPLUS / MEDLINE / MEDLINE / BIOSIS (STN)  
JSTPLUS / JMEDPLUS / JST7580 (JDreamIII)