

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年9月1日(01.09.2022)



(10) 国際公開番号
WO 2022/181797 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/06 (2006.01)	A61P 3/10 (2006.01)
A61K 31/165 (2006.01)	A61P 13/12 (2006.01)
A61K 31/27 (2006.01)	A61P 17/00 (2006.01)
A61K 31/395 (2006.01)	A61P 19/00 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)	A61P 25/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)	A61P 27/02 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)	A61P 43/00 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)	G01N 33/68 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)	

(71) 出願人: 国立大学法人滋賀医科大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION SHIGA UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCE) [JP/JP]; 〒5202192 滋賀県大津市瀬田月輪町 Shiga (JP).

(72) 発明者: 小島 秀人(KOJIMA, Hideto); 〒5202192 滋賀県大津市瀬田月輪町 国立大学法人滋賀医科大学内 Shiga (JP). 寺島 智也(TERASHIMA, Tomoya); 〒5202192 滋賀県大津市瀬田月輪町 国立大学法人滋賀医科大学内 Shiga (JP). 榎 美和子(KATAGI, Miwako); 〒5202192 滋賀県大津市瀬田月輪町 国立大学法人滋賀医科大学内 Shiga (JP).

(74) 代理人: 山本 秀策, 外(YAMAMOTO, Shusaku et al.); 〒5300011 大阪府大阪市北区大深町 3-1 グランフロント大阪 タワーC Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/008036

(22) 国際出願日: 2022年2月25日(25.02.2022)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

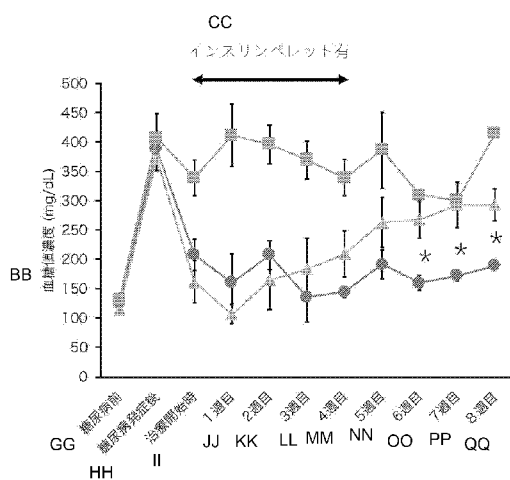
(30) 優先権データ:
特願 2021-030812 2021年2月26日(26.02.2021) JP

(54) Title: NOVEL METHOD AND AGENT FOR TREATING, DIAGNOSING AND DETECTING DIABETES AND COMPLICATIONS

(54) 発明の名称: 糖尿病および合併症の新規治療、診断および検出のための方法および剤

[図22]

図22



BB Blood glucose concentration (mg/dL)
 CC With insulin pellets
 DD Insulin pellets + trichostatin (n=3)
 EE Blanc pellets + trichostatin (n=3)
 FF Insulin pellets alone (n=4)
 GG Before diabetes
 HH After diabetes onset
 II Start of therapy
 JJ 1st week
 KK 2nd week
 LL 3rd week
 MM 4th week
 NN 5th week
 OO 6th week
 PP 7th week
 QQ 8th week

(57) Abstract: The present disclosure provides a therapy for diabetes that targets abnormal stem cells by using an HDAC inhibitor combined with stem cell migration. In one embodiment, the present disclosure provides a therapy for diabetes and/or diabetes-related diseases, disorders and/or symptoms, said therapy targeting abnormal stem cells, by using an HDAC inhibitor combined with stem cell migration. In one embodiment, the present disclosure provides a therapy for diabetes and/or diabetes-related diseases, disorders and/or symptoms, said therapy targeting abnormal stem cells, by using an HDAC inhibitor combined with stem cell migration in a subject having abnormal stem cells detected therein.



WO 2022/181797 A1

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類 :

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(57) 要約 : 本開示は、幹細胞の遊走と組み合わせたH D A C阻害剤による異常幹細胞を標的とする糖尿病治療を提供する。一つの実施形態では、本開示は、幹細胞の遊走と組み合わせたH D A C阻害剤による異常幹細胞を標的とする糖尿病および/または糖尿病に関連する疾患、障害および/もしくは症状の治療を提供する。一つの実施形態では、本開示は、異常幹細胞が検出された被験体における幹細胞の遊走と組み合わせたH D A C阻害剤による異常幹細胞を標的とする糖尿病および/または糖尿病に関連する疾患、障害および/もしくは症状の治療を提供する。

明 細 書

発明の名称：

糖尿病および合併症の新規治療、診断および検出のための方法および剤 技術分野

[0001] 本開示は、HDAC阻害に基づく異常幹細胞の抑制と幹細胞の遊走とを組み合わせた糖尿病および／またはその関連疾患の治療、ならびに異常幹細胞の存在、遊走および／または残留を指標とする糖尿病および／またはその関連疾患の診断に関する。より特定すると、本開示は、異常造血幹細胞を遊走させ抑制することによる糖尿病および／またはその関連疾患の治療、ならびに異常造血幹細胞の存在、特定ニッチからの遊走および／または特定ニッチにおける残留を検出することによる糖尿病および／またはその関連疾患の診断に関する。

背景技術

[0002] 糖尿病は、一般的に1型と2型とに分類される（非特許文献1）。しかし、両者ともに発症の詳細が不明であることから、1型および2型の分類そのものが、病因に基づくものとしての妥当性を欠いているといわざるを得ない。また、現在、糖尿病治療のために種々の薬物が開発されているが、多くは血糖コントロールを目的としたものであり、糖尿病の進行防止には有効であり得るが、糖尿病の治癒には不十分であり得る。さらに、神経障害、腎症、肝障害、網膜症、脂肪肝、胃腸障害、骨折治癒遅延、摂食障害、および皮膚障害などの糖尿病合併症も1型および2型に分類される糖尿病に共通して発症するが、一旦発症すると治癒は困難であり得る。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1：糖尿病診療ガイドライン2016、日本糖尿病学会、南江堂

発明の概要

課題を解決するための手段

[0004] 本発明者らは、幹細胞の遊走と組み合わせたHDAC阻害に基づく異常幹細胞の抑制による糖尿病および／またはその関連疾患の治療戦略が、非常に効果的であることを見出した。この新たな知見に基づき、本開示は、糖尿病および／またはその関連疾患の治療および診断のための手段を提供する。

[0005] したがって、本開示は以下を提供する。

(項目1)

異常造血幹細胞(HSC)の抑制剤を含む糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状を治療および／または予防するための組成物であって、該抑制剤はヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤を含み、該組成物は幹細胞遊走剤と組み合わせて投与されることを特徴とする、組成物。

(項目2)

前記異常HSCは、HDACの遺伝子またはタンパク質が通常のレベルで発現していないかおよび／または機能していないものである、上記項目のいずれかの組成物。

(項目3)

前記通常のレベルではない発現は過剰発現である、上記項目のいずれかの組成物。

(項目4)

糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状を治療するための、上記項目のいずれかの組成物。

(項目5)

前記抑制剤は、抗CD106抗体、抗TNF- α 抗体またはその機能的改変体からなる群より選択される少なくとも1つをさらに含む、上記項目のいずれかの組成物。

(項目6)

前記異常HSCは、さらに、腫瘍壊死因子アルファ(TNF- α)、CD106、およびプロインスリンからなる群より選択される遺伝子またはタンパ

ク質が通常のレベルで発現していないものである、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 7)

前記疾患、障害および／もしくは症状は、糖尿病合併症を含む、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 8)

前記疾患、障害および／もしくは症状は、神経障害、腎症、肝障害、網膜症、脂肪肝、胃腸障害、骨折治癒遅延、摂食障害、および皮膚障害からなる群より選択される、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 9)

前記幹細胞遊走剤は、前記異常HSCをニッチから遊走させる能力を有する、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 10)

前記幹細胞遊走剤は、CXCR4拮抗剤、CXCR2刺激剤、上皮成長因子受容体(EGFR)阻害剤、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)剤、からなる群より選択される少なくとも1つの薬剤を含む、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 11)

前記幹細胞遊走剤は、プレリキシサフォル、GROβ2(MIP2)、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、オシメルチニブ、フィルグラスチム、ナルトグラスチム、レノグラスチム、ペグフィルグラスチム、からなる群より選択される少なくとも1つを含む、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 12)

前記HDAC阻害剤は、TSA(トリコスタチンA)、VPA(バルプロ酸)、酪酸ナトリウム(NaBu)、SAHA(スベロイルアニリドヒドロキサム酸またはポリノスタット)、ナトリウムフェニルブチレート、デプシペプチド(FR901228、FK228)、トラポキシン(TPX)、環式ヒドロキサム酸含有ペプチド1(CHAP1)、MS-275、LBH58

9、ジビノスタット、フィンゴリモド（FTY720）およびPXD101からなる群より選択される少なくとも1つを含む、上記項目のいずれかの組成物。

（項目13）

HDAC阻害剤を含む異常造血幹細胞（HSC）の抑制剤と、幹細胞遊走剤との組み合わせを含む糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状を治療および／または予防するための医薬。

（項目14）

幹細胞遊走剤を含む糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状を治療および／または予防するための組成物であって、該幹細胞遊走剤は、HDAC阻害剤を含む異常造血幹細胞（HSC）の抑制剤と組み合わせて投与されることを特徴とする、組成物。

（項目15）

HDACの検出剤を含む異常造血幹細胞（HSC）検出剤を含む糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状あるいはそのリスクを診断するための組成物。

（項目16）

HDACの検出剤を含む異常造血幹細胞（HSC）の遊走および／または残留を検出する薬剤を含む糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状の治療および／または予防のための処置の選択のための組成物。

（項目17）

前記遊走および／または残留が、骨髄のニッチからの遊走および／または骨髄のニッチにおける残留である、上記項目のいずれかの組成物。

（項目18）

前記遊走の検出は、CD106または機能的等価物の検出により達成されることを特徴とする、上記項目のいずれかの記載の組成物。

（項目19）

前記組成物の使用によって糖尿病またはそのリスクを有すると診断された被験体は、HDAC阻害剤が投与されるべきことが示されることを特徴とする、上記項目のいずれかの組成物。

(項目20)

被験体において糖尿病または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状を治療および／または予防する方法であって、該被験体に対してHDAC阻害剤を含む異常造血幹細胞(HSC)を低減または消失させる薬剤および幹細胞遊走剤を有効量投与する工程を含む、方法。

(項目21)

被験体において糖尿病または糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状あるいはそのリスクを診断する方法であって、該被験体における異常造血幹細胞(HSC)をHDACの遺伝子またはタンパク質の発現に基づき検出する工程を含む、方法。

(項目22)

異常造血幹細胞(HSC)の遊走および／または残留を、被験体において糖尿病または糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状の治療および／または予防のための処置の指標とする方法であって、該被験体における異常造血幹細胞(HSC)の遊走および／または残留をHDACの遺伝子またはタンパク質の発現に基づき検出する工程を含む、方法。

(項目23)

被験体において糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状を処置する方法であって、

該被験体における異常造血幹細胞(HSC)をHDACの遺伝子またはタンパク質の発現に基づき検出する工程と

異常造血幹細胞(HSC)が検出された被験体に、上記項目のいずれかの組成物または医薬の有効量を投与する工程とを含む、方法。

(項目 24)

前記組成物は、薬学的組成物である、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 25)

薬学的に許容可能は賦形剤をさらに含む、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 26)

被験体における糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状を治療および／または予防する方法であって、有効量の異常造血幹細胞 (HSC) の抑制剤および幹細胞遊走剤を該被験体に投与する工程を含み、該抑制剤はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤を含む、方法。

(項目 27)

前記異常HSCは、HDACの遺伝子またはタンパク質が通常のレベルで発現していないかおよび／または機能していないものである、上記項目のいずれかの方法。

(項目 28)

前記通常のレベルではない発現は過剰発現である、上記項目のいずれかの方法。

(項目 29)

糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状を治療するための、上記項目のいずれかの方法。

(項目 30)

前記抑制剤は、抗CD106抗体、抗TNF- α 抗体またはその機能的改変体からなる群より選択される少なくとも1つをさらに含む、上記項目のいずれかの方法。

(項目 31)

前記異常HSCは、さらに、腫瘍壊死因子アルファ (TNF- α)、CD106、およびプロインスリンからなる群より選択される遺伝子またはタンパク質が通常のレベルで発現していないものである、上記項目のいずれかの方法。

法。

(項目32)

前記疾患、障害および／もしくは症状は、糖尿病合併症を含む、上記項目のいずれかの方法。

(項目33)

前記疾患、障害および／もしくは症状は、神経障害、腎症、肝障害、網膜症、脂肪肝、胃腸障害、骨折治癒遅延、摂食障害、および皮膚障害からなる群より選択される、上記項目のいずれかの方法。

(項目34)

前記幹細胞遊走剤は、前記異常HSCをニッチから遊走させる能力を有する、上記項目のいずれかの方法。

(項目35)

前記幹細胞遊走剤は、CXCR4拮抗剤、CXCR2刺激剤、上皮成長因子受容体(EGFR)阻害剤、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)剤、からなる群より選択される少なくとも1つの薬剤を含む、上記項目のいずれかの方法。

(項目36)

前記幹細胞遊走剤は、プレリキシサフォル、GROβ2(MIP2)、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、オシメルチニブ、フィルグラスチム、ナルトグラスチム、レノグラスチム、ペグフィルグラスチム、からなる群より選択される少なくとも1つを含む、上記項目のいずれかの方法。

(項目37)

前記HDAC阻害剤は、TSA(トリコスタチンA)、VPA(バルプロ酸)、酪酸ナトリウム(NaBu)、SAHA(スベロイルアニリドヒドロキサム酸またはボリノスタット)、ナトリウムフェニルブチレート、デプシペプチド(FR901228、FK228)、トラポキシン(TPX)、環式ヒドロキサム酸含有ペプチド1(CHAP1)、MS-275、LBH589、ジビノスタット、フィンゴリモド(FTY720)およびPXD101

からなる群より選択される少なくとも1つを含む、上記項目のいずれかの方法。

(項目38)

HDACを検出することを含む異常造血幹細胞(HSC)を検出する工程を含む、糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくはは症状あるいはそのリスクを診断する方法。

(項目39)

HDACを検出することを含む異常造血幹細胞(HSC)の遊走および／または残留を検出する工程を含む、糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくはは症状の治療および／または予防のための処置を選択する方法。

(項目40)

前記遊走および／または残留が、骨髓のニッチからの遊走および／または骨髓のニッチにおける残留である、上記項目のいずれかの方法。

(項目41)

CD106または機能的等価物を検出することを含む、上記項目のいずれかの方法。

(項目42)

前記方法によって糖尿病またはそのリスクを有すると診断された被験体は、HDAC阻害剤が投与されるべきことが示される、上記項目のいずれかの方法。

(項目43)

糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくはは症状を治療および／または予防するための医薬の製造における、異常造血幹細胞(HSC)の抑制剤および幹細胞遊走剤の使用であって、該抑制剤はヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤を含む、使用。

(項目44)

前記異常HSCは、HDACの遺伝子またはタンパク質が通常のレベルで発

現していないかおよび／または機能していないものである、上記項目のいずれかの使用。

(項目 4 5)

前記通常のレベルではない発現は過剰発現である、上記項目のいずれかの使用。

(項目 4 6)

糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状を治療するための、上記項目のいずれかの使用。

(項目 4 7)

前記抑制剤は、抗CD106抗体、抗TNF- α 抗体またはその機能的改変体からなる群より選択される少なくとも1つをさらに含む、上記項目のいずれかの使用。

(項目 4 8)

前記異常HSCは、さらに、腫瘍壊死因子アルファ (TNF- α)、CD106、およびプロインスリンからなる群より選択される遺伝子またはタンパク質が通常のレベルで発現していないものである、上記項目のいずれかの使用。

(項目 4 9)

前記疾患、障害および／もしくは症状は、糖尿病合併症を含む、上記項目のいずれかの使用。

(項目 5 0)

前記疾患、障害および／もしくは症状は、神経障害、腎症、肝障害、網膜症、脂肪肝、胃腸障害、骨折治癒遅延、摂食障害、および皮膚障害からなる群より選択される、上記項目のいずれかの使用。

(項目 5 1)

前記幹細胞遊走剤は、前記異常HSCをニッチから遊走させる能力を有する、上記項目のいずれかの使用。

(項目 5 2)

前記幹細胞遊走剤は、CXCR4拮抗剤、CXCR2刺激剤、上皮成長因子受容体(EGFR)阻害剤、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)剤、からなる群より選択される少なくとも1つの薬剤を含む、上記項目のいずれかの使用。

(項目53)

前記幹細胞遊走剤は、プレリキシサフォル、GROβ2(MIP2)、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、オシメルチニブ、フィルグラスチム、ナルトグラスチム、レノグラスチム、ペグフィルグラスチム、からなる群より選択される少なくとも1つを含む、上記項目のいずれかの使用。

(項目54)

前記HDAC阻害剤は、TSA(トリコスタチンA)、VPA(バルプロ酸)、酪酸ナトリウム(NaBu)、SAHA(スベロイルアニリドヒドロキサム酸またはポリノスタット)、ナトリウムフェニルブチレート、デプシペプチド(FR901228、FK228)、トラポキシン(TPX)、環式ヒドロキサム酸含有ペプチド1(CHAP1)、MS-275、LBH589、ジビノスタット、フィンゴリモド(FTY720)およびPXD101からなる群より選択される少なくとも1つを含む、上記項目のいずれかの使用。

(項目55)

糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状あるいはそのリスクを診断するための医薬の製造における、HDACの検出剤を含む異常造血幹細胞(HSC)検出剤の使用。

(項目56)

糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状の治療および／または予防のための医薬の製造における、HDACの検出剤を含む異常造血幹細胞(HSC)の遊走および／または残留を検出する薬剤の使用。

(項目57)

前記遊走および／または残留が、骨髄のニッチからの遊走および／または骨髄のニッチにおける残留である、上記項目のいずれかの使用。

(項目 5 8)

前記遊走検出剤は、CD 1 0 6 または機能的等価物の検出剤を含む、上記項目のいずれかの記載の使用。

(項目 5 9)

前記組成物の使用によって糖尿病またはそのリスクを有すると診断された被験体は、HDAC 阻害剤が投与されるべきことが示されることを特徴とする、上記項目のいずれかの使用。

(項目 1 A)

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤を含む糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状を治療および／または予防するための組成物であって、該組成物は幹細胞遊走剤と組み合わせて投与されることを特徴とする、組成物。

(項目 2 A)

HDAC の遺伝子またはタンパク質が通常のレベルで発現していないかおよび／または機能していない対象に対して投与されることを特徴とする、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 3 A)

前記通常のレベルではない発現は過剰発現である、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 4 A)

糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状を治療するための、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 5 A)

さらに抗 CD 1 0 6 抗体、抗 TNF - α 抗体またはその機能的改変体からなる群より選択される少なくとも 1 つ組み合わせて投与されることを特徴とする、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 6 A)

投与される対象がさらに、腫瘍壊死因子アルファ (TNF- α)、CD106、およびプロインスリンからなる群より選択される遺伝子またはタンパク質が通常のレベルで発現していないものである、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 7 A)

前記疾患、障害および／もしくは症状は、糖尿病合併症を含む、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 8 A)

前記疾患、障害および／もしくは症状は、神経障害、腎症、肝障害、網膜症、脂肪肝、胃腸障害、骨折治癒遅延、摂食障害、および皮膚障害からなる群より選択される、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 9 A)

前記幹細胞遊走剤は、前記異常HSCをニッチから遊走させる能力を有する、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 10 A)

前記幹細胞遊走剤は、CXCR4拮抗剤、CXCR2刺激剤、上皮成長因子受容体(EGFR)阻害剤、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)剤、からなる群より選択される少なくとも1つの薬剤を含む、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 11 A)

前記幹細胞遊走剤は、プレリキシサフォル、GRO β 2(MIP2)、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、オシメルチニブ、フィルグラスチム、ナルトグラスチム、レノグラスチム、ペグフィルグラスチム、からなる群より選択される少なくとも1つを含む、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 12 A)

前記HDAC阻害剤は、TSA(トリコスタチンA)、VPA(バルプロ酸)、酪酸ナトリウム(NaBu)、SAHA(スベロイルアニリドヒドロキ

サム酸またはポリノスタット)、ナトリウムフェニルブチレート、デプシペプチド (FR901228、FK228)、トラポキシン (TPX)、環式ヒドロキサム酸含有ペプチド1 (CHAP1)、MS-275、LBH589、ジビノスタット、フィンゴリモド (FTY720) およびPXD101 からなる群より選択される少なくとも1つを含む、上記項目のいずれかの組成物。

(項目13A)

HDAC阻害剤と、幹細胞遊走剤との組み合わせを含む糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状を治療および／または予防するための医薬。

(項目14A)

幹細胞遊走剤を含む糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状を治療および／または予防するための組成物であって、該幹細胞遊走剤は、HDAC阻害剤と組み合わせて投与されることを特徴とする、組成物。

(項目15A)

HDACの検出剤を含む糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状あるいはそのリスクを診断するための組成物。

(項目16A)

HDACの検出剤を含む糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状の治療および／または予防のための処置の選択のための組成物。

(項目17A)

異常造血幹細胞 (HSC) の遊走および／または残留を検出することにより前記選択がなされることを特徴とする、上記項目のいずれかの組成物。

(項目18A)

前記遊走および／または残留が、骨髄のニッチからの遊走および／または骨髄のニッチにおける残留である、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 19 A)

前記遊走の検出は、CD106 または機能的等価物の検出により行われることを特徴とする、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 20 A)

前記組成物の使用によって糖尿病またはそのリスクを有すると診断された被験体は、HDAC 阻害剤が投与されるべきことが示されることを特徴とする、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 21 A)

被験体において糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状を治療および／または予防する方法であって、該被験体にヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤および幹細胞遊走剤を有効量投与する工程を含む、方法。

(項目 22 A)

前記被験体が、HDAC の遺伝子またはタンパク質が通常のレベルで発現していないかおよび／または機能していない被験体である、上記項目のいずれかの方法。

(項目 23 A)

前記通常のレベルではない発現は過剰発現である、上記項目のいずれかの方法。

(項目 24 A)

糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状を治療する、上記項目のいずれかの方法。

(項目 25 A)

前記被験体にさらに抗CD106 抗体、抗TNF- α 抗体またはその機能的改変体からなる群より選択される少なくとも1つを投与する、上記項目のいずれかの方法。

(項目 26 A)

前記被験体がさらに、腫瘍壊死因子アルファ (TNF- α)、CD106、

およびプロインスリンからなる群より選択される遺伝子またはタンパク質が通常のレベルで発現していないものである、上記項目のいずれかの方法。

(項目 27A)

前記疾患、障害および／もしくは症状は、糖尿病合併症を含む、上記項目のいずれかの方法。

(項目 28A)

前記疾患、障害および／もしくは症状は、神経障害、腎症、肝障害、網膜症、脂肪肝、胃腸障害、骨折治癒遅延、摂食障害、および皮膚障害からなる群より選択される、上記項目のいずれかの方法。

(項目 29A)

前記幹細胞遊走剤は、前記異常HSCをニッチから遊走させる能力を有する、上記項目のいずれかの方法。

(項目 30A)

前記幹細胞遊走剤は、CXCR4拮抗剤、CXCR2刺激剤、上皮成長因子受容体(EGFR)阻害剤、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)剤、からなる群より選択される少なくとも1つの薬剤を含む、上記項目のいずれかの方法。

(項目 31A)

前記幹細胞遊走剤は、プレリキシサフォル、GROβ2(MIP2)、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、オシメルチニブ、フィルグラスチム、ナルトグラスチム、レノグラスチム、ペグフィルグラスチム、からなる群より選択される少なくとも1つを含む、上記項目のいずれかの方法。

(項目 32A)

前記HDAC阻害剤は、TSA(トリコスタチンA)、VPA(バルプロ酸)、酪酸ナトリウム(NaBu)、SAHA(スベロイルアニリドヒドロキサム酸またはポリノスタット)、ナトリウムフェニルブチレート、デプシペプチド(FR901228、FK228)、トラポキシン(TPX)、環式ヒドロキサム酸含有ペプチド1(CHAP1)、MS-275、LBH58

9、ジビノスタット、フィンゴリモド（FTY720）およびPXD101からなる群より選択される少なくとも1つを含む、上記項目のいずれかの方法。

（項目33A）

HDACを検出する工程を含む、糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状あるいはそのリスクを診断する方法。

（項目34A）

HDACを検出する工程を含む、糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状の治療および／または予防のための処置を選択する方法。

（項目35A）

異常造血幹細胞（HSC）の遊走および／または残留を検出することにより前記選択がなされることを特徴とする、上記項目のいずれかの方法。

（項目36A）

前記遊走および／または残留が、骨髄のニッチからの遊走および／または骨髄のニッチにおける残留である、上記項目のいずれかの方法。

（項目37A）

前記遊走の検出は、CD106または機能的等価物の検出により行われることを特徴とする、上記項目のいずれかの方法。

（項目38A）

糖尿病またはそのリスクを有すると診断された被験体にHDAC阻害剤を投与する工程をさらに含む、上記項目のいずれかの方法。

（項目39A）

糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状を治療および／または予防するための医薬の製造における、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤および幹細胞遊走剤の使用。

（項目40A）

前記医薬は、HDACの遺伝子またはタンパク質が通常のレベルで発現して

いないかおよび／または機能していない対象に対して投与されることを特徴とする、上記項目のいずれかの使用。

(項目 4 1 A)

前記通常のレベルではない発現は過剰発現である、上記項目のいずれかの使用。

(項目 4 2 A)

糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状を治療するための、上記項目のいずれかの使用。

(項目 4 3 A)

前記医薬は、さらに抗CD106抗体、抗TNF- α 抗体またはその機能的改変体からなる群より選択される少なくとも1つ組み合わせて投与されることを特徴とする、上記項目のいずれかの使用。

(項目 4 4 A)

投与される対象がさらに、腫瘍壊死因子アルファ (TNF- α)、CD106、およびプロインスリンからなる群より選択される遺伝子またはタンパク質が通常のレベルで発現していないものである、上記項目のいずれかの使用。

(項目 4 5 A)

前記疾患、障害および／もしくは症状は、糖尿病合併症を含む、上記項目のいずれかの使用。

(項目 4 6 A)

前記疾患、障害および／もしくは症状は、神経障害、腎症、肝障害、網膜症、脂肪肝、胃腸障害、骨折治癒遅延、摂食障害、および皮膚障害からなる群より選択される、上記項目のいずれかの使用。

(項目 4 7 A)

前記幹細胞遊走剤は、前記異常HSCをニッチから遊走させる能力を有する、上記項目のいずれかの使用。

(項目 4 8 A)

前記幹細胞遊走剤は、CXCR4拮抗剤、CXCR2刺激剤、上皮成長因子受容体(EGFR)阻害剤、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)剤、からなる群より選択される少なくとも1つの薬剤を含む、上記項目のいずれかの使用。

(項目49A)

前記幹細胞遊走剤は、プレリキシサフォル、GROβ2(MIP2)、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、オシメルチニブ、フィルグラスチム、ナルトグラスチム、レノグラスチム、ペグフィルグラスチム、からなる群より選択される少なくとも1つを含む、上記項目のいずれかの使用。

(項目50A)

前記HDAC阻害剤は、TSA(トリコスタチンA)、VPA(バルプロ酸)、酪酸ナトリウム(NaBu)、SAHA(スベロイルアニリドヒドロキサム酸またはポリノスタット)、ナトリウムフェニルブチレート、デプシペプチド(FR901228、FK228)、トラポキシン(TPX)、環式ヒドロキサム酸含有ペプチド1(CHAP1)、MS-275、LBH589、ジビノスタット、フィンゴリモド(FTY720)およびPXD101からなる群より選択される少なくとも1つを含む、上記項目のいずれかの使用。

(項目51A)

糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状あるいはそのリスクを診断するための医薬の製造におけるHDACの検出剤の使用。

(項目52A)

糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状の治療および／または予防のための処置の選択のための医薬の製造におけるHDACの検出剤の使用。

(項目53A)

異常造血幹細胞(HSC)の遊走および／または残留を検出することにより

前記選択がなされることを特徴とする、上記項目のいずれかの使用。

(項目 5 4 A)

前記遊走および／または残留が、骨髄のニッチからの遊走および／または骨髄のニッチにおける残留である、上記項目のいずれかの使用。

(項目 5 5 A)

前記遊走の検出は、CD 1 0 6 または機能的等価物の検出により行われることを特徴とする、上記項目のいずれかの使用。

(項目 5 6 A)

前記医薬の使用によって糖尿病またはそのリスクを有すると診断された被験体は、HDAC 阻害剤が投与されるべきことが示されることを特徴とする、上記項目のいずれかの使用。

(項目 5 7 A)

糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状を治療および／または予防するための、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤および幹細胞遊走剤の組み合わせにおける使用のための、HDAC 阻害剤または幹細胞遊走剤。

(項目 5 8 A)

HDAC の遺伝子またはタンパク質が通常のレベルで発現していないかおよび／または機能していない対象に対して投与されることを特徴とする、上記項目のいずれかの HDAC 阻害剤または幹細胞遊走剤。

(項目 5 9 A)

前記通常のレベルではない発現は過剰発現である、上記項目のいずれかの HDAC 阻害剤または幹細胞遊走剤。

(項目 6 0 A)

糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状を治療するための、上記項目のいずれかの HDAC 阻害剤または幹細胞遊走剤。

(項目 6 1 A)

さらに抗CD106抗体、抗TNF- α 抗体またはその機能的改変体からなる群より選択される少なくとも1つ組み合わせて投与されることを特徴とする、上記項目のいずれかのHDAC阻害剤または幹細胞遊走剤。

(項目62A)

投与される対象がさらに、腫瘍壊死因子アルファ(TNF- α)、CD106、およびプロインスリンからなる群より選択される遺伝子またはタンパク質が通常のレベルで発現していないものである、上記項目のいずれかのHDAC阻害剤または幹細胞遊走剤。

(項目63A)

前記疾患、障害および／もしくは症状は、糖尿病合併症を含む、上記項目のいずれかのHDAC阻害剤または幹細胞遊走剤。

(項目64A)

前記疾患、障害および／もしくは症状は、神経障害、腎症、肝障害、網膜症、脂肪肝、胃腸障害、骨折治癒遅延、摂食障害、および皮膚障害からなる群より選択される、上記項目のいずれかのHDAC阻害剤または幹細胞遊走剤。

(項目65A)

前記幹細胞遊走剤は、前記異常HSCをニッチから遊走させる能力を有する、上記項目のいずれかのHDAC阻害剤または幹細胞遊走剤。

(項目66A)

前記幹細胞遊走剤は、CXCR4拮抗剤、CXCR2刺激剤、上皮成長因子受容体(EGFR)阻害剤、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)剤、からなる群より選択される少なくとも1つの薬剤を含む、上記項目のいずれかのHDAC阻害剤または幹細胞遊走剤。

(項目67A)

前記幹細胞遊走剤は、プレリキシサフォル、GRO β 2(MIP2)、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、オシメルチニブ、フィルグラスチム、ナルトグラスチム、レノグラスチム、ペグフィルグラスチム、からなる

群より選択される少なくとも1つを含む、上記項目のいずれかのHDAC阻害剤または幹細胞遊走剤。

(項目68A)

前記HDAC阻害剤は、TSA(トリコスタチンA)、VPA(バルプロ酸)、酪酸ナトリウム(NaBu)、SAHA(スベロイルアニリドヒドロキサム酸またはポリノスタット)、ナトリウムフェニルブチレート、デプシペプチド(FR901228、FK228)、トラポキシン(TPX)、環式ヒドロキサム酸含有ペプチド1(CHAP1)、MS-275、LBH589、ジビノスタット、フィンゴリモド(FTY720)およびPXD101からなる群より選択される少なくとも1つを含む、上記項目のいずれかのHDAC阻害剤または幹細胞遊走剤。

(項目69A)

糖尿病ならびに/または糖尿病に関連する疾患、障害および/もしくは症状あるいはそのリスクを診断するためのHDACの検出剤。

(項目70A)

糖尿病ならびに/または糖尿病に関連する疾患、障害および/もしくは症状の治療および/または予防のための処置の選択のためのHDACの検出剤。

(項目71A)

異常造血幹細胞(HSC)の遊走および/または残留を検出することにより前記選択がなされることを特徴とする、上記項目のいずれかのHDACの検出剤。

(項目72A)

前記遊走および/または残留が、骨髄のニッチからの遊走および/または骨髄のニッチにおける残留である、上記項目のいずれかのHDACの検出剤。

(項目73A)

前記遊走の検出は、CD106または機能的等価物の検出により行われることを特徴とする、上記項目のいずれかのHDACの検出剤。

(項目74A)

前記H D A Cの検出剤の使用によって糖尿病またはそのリスクを有すると診断された被験体は、H D A C阻害剤が投与されるべきことが示されることを特徴とする、上記項目のいずれかのH D A Cの検出剤。

[0006] 本開示において、上記の1つまたは複数の特徴は、明示された組み合わせに加え、さらに組み合わせて提供され得ることが意図される。本開示のなおさらなる実施形態および利点は、必要に応じて以下の詳細な説明を読んで理解すれば、当業者に認識される。

発明の効果

[0007] 本開示は、糖尿病および/またはその関連疾患の新たな治療および診断を提供する。従

来、糖尿病患者においてインスリン分泌を回復させる方法である膵臓移植や膵島移植などで必要とされていたドナーを不要とし、レシピエントの数に対する供給能力の制限を克服し得る。また、レシピエントが受けていた手術などの患者負荷も回避し得る。このように、本開示の治療は、薬剤投与によって達成され得るため、はるかに簡便で低負荷であり得る。また、根本治療が可能であるため、予後も良いと期待される。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]非糖尿病（非DM）およびストレプトゾシン誘導糖尿病（STZ-DM）の単核細胞におけるc-k i t陽性S c a - 1陽性系統マーカー陰性細胞（K S L）画分中のプロインスリン陽性細胞の蛍光活性化セルソーティング（F A C S）分析である。左上の2つのパネル（左：非DM、右：STZ-DM）は、系統陰性細胞のうちK S L細胞（四角で囲まれる）を示し、縦軸はc-k i tの蛍光強度、横軸はS c a - 1の蛍光強度を示す。左下の2つのパネル（左：非DM、右：STZ-DM）は、プロインスリン陽性細胞（四角で囲まれる）の分布を示し、縦軸はK S L細胞数、横軸はプロインスリンの蛍光強度を示す。右のグラフ（左：非DM、右：STZ-DM）は、K S L細胞中のプロインスリン陽性細胞の割合を示す（1群あたりn = 3）。** : P < 0. 01。

[図2]非DMおよびSTZ-DMの単核細胞におけるKSL細胞中の腫瘍壊死因子アルファ (TNF- α) 陽性細胞のFACS分析である。左上の2つのパネル (左: 非DM、右: STZ-DM) は、系統陰性細胞のうちKSL細胞 (四角で囲まれる) を示し、縦軸はc-k i tの蛍光強度、横軸はS c a - 1の蛍光強度を示す。左下の2つのパネル (左: 非DM、右: STZ-DM) は、TNF- α 陽性細胞 (四角で囲まれる) の分布を示し、縦軸はKSL細胞数、横軸はTNF- α の蛍光強度を示す。右のグラフは、KSL細胞中のTNF- α 陽性細胞の割合を示す (1群あたりn=5)。データは平均±標準誤差として示す。** : P<0.01。

[図3]非DMおよびSTZ-DMの単核細胞におけるKSL細胞のCD106発現についてのFACS分析である。左の2つのパネル (上: 非DM、下: STZ-DM) は、系統陰性細胞のうちKSL細胞 (四角で囲まれる) を示し、縦軸はc-k i tの蛍光強度、横軸はS c a - 1の蛍光強度を示す。右の2つのパネル (上: 非DM、下: STZ-DM) は、CD106陽性細胞 (四角で囲まれる) の分布を示し、縦軸は側方散乱光 (SSC) の強度、横軸はCD106の蛍光強度を示す。右のグラフ (左: 非DM、右: STZ-DM) は、KSL細胞中のCD106陽性細胞の割合 (1目盛りは1%である) を示す (1群あたりn=4)。** : P<0.01。

[図4]ICRマウスおよびNODマウスの単核細胞のFACS分析である。2つのパネル (左: ICR、右: NOD) は、系統陰性細胞のうちKSL細胞 (四角で囲まれる) を示し、縦軸はc-k i tの蛍光強度、横軸はS c a - 1の蛍光強度を示す。

[図5]ICRマウスおよびNODマウスの単核細胞におけるKSL細胞中の腫瘍壊死因子アルファ (TNF- α) 陽性細胞およびCD106陽性細胞のFACS分析である。上の2つのパネル (左: ICR、右: NOD) は、TNF- α 陽性細胞 (四角で囲まれる) の分布を示し、縦軸は前方散乱光 (FSC) の強度、横軸はTNF- α の蛍光強度を示す。下の2つのパネル (左: ICR、右: NOD) は、CD106陽性細胞 (四角で囲まれる) の分布を

示し、縦軸は前方散乱光（FSC）の強度、横軸はCD106の蛍光強度を示す。

[図6]非DMおよびSTZ-DMのKSL細胞中のサイドポピュレーション（SP）画分および非SP画分のFACS分析である。左の2つのパネル（上：非DM、下：STZ-DM）は、KSL細胞のうちのSP画分（左下の丸囲み）および非SP画分（右上の丸囲み）を示し、縦軸はHoechst Blueの蛍光強度、横軸はHoechst Redの蛍光強度を示す。右のグラフ（左：SP、右：非SP）は、非DM（左のバー）およびSTZ-DM（右のバー）のKSL細胞中のSP画分および非SP画分の割合を示す（ $n=3$ ）。データは平均値±標準誤差として示す。**： $P<0.01$ 。

[図7] a) 非DMおよびSTZ-DMのKSL-非SP細胞におけるCD106陽性細胞のFACS分析である。2つのパネル（上：非DM、下：STZ-DM）は、CD106陽性細胞（四角で囲まれる）の分布を示し、縦軸は側方散乱光（SSC）の強度、横軸はCD106の蛍光強度を示す。グラフ（左：非DM、右：STZ-DM）は、KSL-非SP細胞中のCD106陽性細胞の割合を示す（1群あたり $n=3$ ）。 b) 非DMおよびSTZ-DMのKSL-SP細胞におけるCD106陽性細胞のFACS分析である。2つのパネル（上：非DM、下：STZ-DM）は、CD106陽性細胞（四角で囲まれる、0%であった）の分布を示し、縦軸は側方散乱光（SSC）の強度、横軸はCD106の蛍光強度を示す。グラフ（左：非DM、右：STZ-DM）は、KSL-SP細胞中のCD106陽性細胞の割合を示す（1群あたり $n=3$ ）。 c) 非DMおよびSTZ-DMのKSL-非SP細胞におけるTNF- α 陽性細胞のFACS分析である。2つのパネル（上：非DM、下：STZ-DM）はTNF- α 陽性細胞（四角で囲まれる）の分布を示し、縦軸は側方散乱光（SSC）の強度、横軸はTNF- α の蛍光強度を示す。グラフ（左：非DM、右：STZ-DM）は、KSL-非SP細胞中のTNF- α 陽性細胞の割合を示す（1群あたり $n=3$ ）。

d) 非DMおよびSTZ-DMのKSL-SP細胞におけるTNF- α 陽

性細胞のFACS分析である。2つのパネル（上：非DM、下：STZ-DM）はTNF- α 陽性細胞（四角で囲まれる、0%であった）の分布を示し、縦軸は側方散乱光（SSC）の強度、横軸はTNF- α の蛍光強度を示す。グラフ（左：非DM、右：STZ-DM）は、KSL-SP細胞中のTNF- α 陽性細胞の割合を示す（1群あたりn=3）。データは平均値±標準誤差として示す。*：P<0.05。

[図8]非DMおよびSTZ-DMマウスのKSL細胞におけるヒストン脱アセチル化酵素遺伝子群（HDACs）の遺伝子発現比較を示す。左から、Hdac3、Hdac4、Hdac8、およびHdac9の発現量を示し、各棒グラフにおいて、左は、非DMマウスの結果であり、右は、STZ-DMマウスの結果である。縦軸は、非DMマウスにおけるmRNA発現量を1とした場合の両マウスにおけるmRNA発現量の相対量を示す。*：P<0.05。

[図9]正常血糖マウスへの非DMまたはSTZ-DMマウス由来KSL細胞の移植のための実験の概略を示す。グリーン蛍光タンパク質を遺伝子導入したトランスジェニックマウス（GFP-Tgマウス）をSTZで処置して糖尿病を誘発したマウス（STZ-DM GFP）、および静脈内クエン酸緩衝液注射の対照処置を施した非DMマウスを用意した（非DM GFP）。3ヵ月後、非DMマウスおよびSTZ-DMマウスのそれぞれから得たKSL細胞を、9 Gyの致死量照射正常血糖野生型マウスに移植した（非DM由来KSL-T、STZ-DM由来KSL-T）。

[図10]非DM由来KSL-T（n=9）およびSTZ-DM由来KSL-T（n=10）における血糖濃度（mg/gL）（左）および非DM由来のKSL-Tにおける測定値を1とした場合の坐骨神経における知覚神経伝達速度（SNCV）の相対比（右）を示す。N.Sは有意差がないことを示し、**はP<0.01を示す。

[図11]後根神経節（DRG）におけるMAP2、プロインスリン、およびTNF- α の免疫蛍光染色像である。左から4列はSTZ-DM由来KSL-

Tの結果であり、左から、核（青）、GFP（緑）、標的分子（上段：MAP2、中段：プロインスリン、下段：TNF- α ）（赤）、マージの画像である。右列は非DM由来KSL-Tの結果であり、核（青）、GFP（緑）、および標的分子（上段：MAP2、中段：プロインスリン、下段：TNF- α ）（赤）のマージ画像である。矢頭は融合細胞を示す。スケールバー＝10 μ m。

[図12]非DM由来KSL-TおよびSTZ-DM由来KSL-Tの単核細胞におけるKSL画分中のプロインスリン陽性細胞のFACS分析である。左上の2つのパネル（左：非DM由来KSL-T、右：STZ-DM由来KSL-T）は、系統陰性細胞のうちKSL細胞（四角で囲まれる）を示し、縦軸はc-k i tの蛍光強度、横軸はS c a - 1の蛍光強度を示す。左下の2つのパネル（左：非DM由来KSL-T、右：STZ-DM由来KSL-T）は、プロインスリン陽性細胞（四角で囲まれる）の分布を示し、縦軸はKSL細胞数、横軸はプロインスリンの蛍光強度を示す。右のグラフ（左：非DM由来KSL-T、右：STZ-DM由来KSL-T）は、KSL細胞中のプロインスリン陽性細胞の割合を示す（1群あたりn=3）。*：P<0.05。

[図13]非DM由来KSL-TおよびSTZ-DM由来KSL-Tの単核細胞におけるKSL画分中のTNF- α 陽性細胞のFACS分析である。左上の2つのパネル（左：非DM由来KSL-T、右：STZ-DM由来KSL-T）は、系統陰性細胞のうちKSL細胞（四角で囲まれる）を示し、縦軸はc-k i tの蛍光強度、横軸はS c a - 1の蛍光強度を示す。左下の2つのパネル（左：非DM由来KSL-T、右：STZ-DM由来KSL-T）は、TNF- α 陽性細胞（四角で囲まれる）の分布を示し、縦軸はKSL細胞数、横軸はTNF- α の蛍光強度を示す。右のグラフ（左：非DM由来KSL-T、右：STZ-DM由来KSL-T）は、KSL細胞中のTNF- α 陽性細胞の割合を示す（1群あたりn=3）。**：P<0.01。

[図14]ヒト糖尿病患者（DM）および健常ヒト被験者（non-DM）の血

液試料における各遺伝子の発現量の比較。パネルは、それぞれ、インスリン（左上）、CD34（右上）、TNF- α （左下）、CD106（右下）を示す。各パネルにおいて、左のバーは健常ヒト被験者の結果を、右のバーはヒト糖尿病患者の結果を示す。縦軸は、健常ヒト被験者の平均結果を1とした場合の、相対的なmRNA発現量を示す。

[図15]DMなしの患者（DM（-））とDMありの患者（DM（+））の骨髓のプロインスリン染色。プロインスリン抗体で染色された骨髓細胞（矢印）は、DM（+）例では観察されるが、DM（-）例では観察されない。スケールバーは50 μ mを示す。

[図16]STZ糖尿病マウスの骨髓移植治療の概要を示す模式図である。インスリンペレットまたはブランクペレット処置下で非糖尿病または糖尿病由来の骨髓をSTZ糖尿病マウスに移植する概要を示す。

[図17]図16に示す治療を行なった場合の血糖値の変化を示す。縦軸は、各時点における血糖値（mg/dL）の平均を標準誤差とともに示す。横軸は、骨髓移植した時点を0週目と設定した処置の時間経過を示す。インスリンペレットの有効期間も図示している。** $P < 0.01$ を示す。8週目時点での血糖値が高い順に、ブランクペレットおよび糖尿病骨髓移植で処置したSTZ糖尿病マウス、ブランクペレットおよび非糖尿病骨髓移植で処置したSTZ糖尿病マウス、インスリンペレットおよび糖尿病骨髓移植で処置したSTZ糖尿病マウス、ならびにインスリンペレットおよび非糖尿病骨髓移植で処置したSTZ糖尿病マウスの結果である。

[図18]図16に示す治療を行なった場合の膵臓凍結切片の結果である。（上のパネル）凍結切片のインスリンおよび核の染色像である。各切片を取得したマウスの条件をそれぞれの画像の上に表示する。スケールバーは10 μ mを示す。（下のパネル）各マウスにおいて膵島をランダムに選び、膵島の大きさに対するインスリン陽性細胞の割合（%）をImage Jソフトウェアで算出した結果である。左から、非糖尿病マウス、STZ糖尿病マウス、ブランクペレットおよび糖尿病骨髓移植で処置したSTZ糖尿病マウス、ブ

ランクペレットおよび非糖尿病骨髄移植で処置したS T Z糖尿病マウス、インスリンペレットおよび糖尿病骨髄移植で処置したS T Z糖尿病マウス、ならびにインスリンペレットおよび非糖尿病骨髄移植で処置したS T Z糖尿病マウスの結果を示す。** $P < 0.01$ を示す。

[図19]図16に示す治療を行なった場合の膵臓凍結切片の結果である。(上のパネル)凍結切片のグルカゴンおよび核の染色像である。各切片を取得したマウスの条件をそれぞれの画像の上に表示する。スケールバーは $10\mu\text{m}$ を示す。(下のパネル)各マウスにおいて膵島をランダムに選び、膵島の大きさに対するグルカゴン陽性細胞の割合(%)をImage Jソフトウェアで算出した結果である。左から、非糖尿病マウス、S T Z糖尿病マウス、blankペレットおよび糖尿病骨髄移植で処置したS T Z糖尿病マウス、blankペレットおよび非糖尿病骨髄移植で処置したS T Z糖尿病マウス、インスリンペレットおよび糖尿病骨髄移植で処置したS T Z糖尿病マウス、ならびにインスリンペレットおよび非糖尿病骨髄移植で処置したS T Z糖尿病マウスの結果を示す。** $P < 0.01$ を示す。

[図20]図16に示す治療を行なった場合の代表的な摘出胸腺の大きさの比較を示す。左から、非糖尿病マウス、S T Z糖尿病マウス、blankペレットおよび糖尿病骨髄移植で処置したS T Z糖尿病マウス、blankペレットおよび非糖尿病骨髄移植で処置したS T Z糖尿病マウス、インスリンペレットおよび糖尿病骨髄移植で処置したS T Z糖尿病マウス、ならびにインスリンペレットおよび非糖尿病骨髄移植で処置したS T Z糖尿病マウスから摘出した胸腺を示す。

[図21]S T Z糖尿病マウスの薬物治療の概要を示す模式図である。S T Z糖尿病マウスに、インスリンペレットまたはblankペレット処置下でトリコスタチン(幹細胞遊走剤+トリコスタチンA)処置を行う概要を示す。

[図22]図21に示す治療を行なった場合の血糖値の変化を示す。縦軸は、各時点における血糖値(mg/dL)の平均を標準誤差とともに示す。横軸は、糖尿病治療開始時点をもとに0週目と設定した処置の時間経過を示す。インスリ

ンペレットの有効期間も図示している。* $P < 0.05$ を示す。8週目時点での血糖値が高い順に、blankペレットおよびトリコスタチンで処置したSTZ糖尿病マウス、インスリンペレットのみで処置したSTZ糖尿病マウス、ならびにインスリンペレットおよびトリコスタチンで処置したSTZ糖尿病マウスの結果である。

[図23]図21に示す治療を行なった場合の膵臓凍結切片の結果である。(上のパネル)凍結切片のインスリンおよび核の染色像である。各切片を取得したマウスの条件をそれぞれの画像の上に表示する。スケールバーは $10\mu\text{m}$ を示す。(下のパネル)各マウスにおいて膵島をランダムに選び、膵島の大きさに対するインスリン陽性細胞の割合(%)をImage Jソフトウェアで算出した結果である。左から、非糖尿病マウス、STZ糖尿病マウス、インスリンペレットのみで処置したSTZ糖尿病マウス、blankペレットおよびトリコスタチンで処置したSTZ糖尿病マウス、ならびにインスリンペレットおよびトリコスタチンで処置したSTZ糖尿病マウスの結果を示す。** $P < 0.01$ を示す。

[図24]図21に示す治療を行なった場合の膵臓凍結切片の結果である。(上のパネル)凍結切片のグルカゴンおよび核の染色像である。各切片を取得したマウスの条件をそれぞれの画像の上に表示する。スケールバーは $10\mu\text{m}$ を示す。(下のパネル)各マウスにおいて膵島をランダムに選び、膵島の大きさに対するグルカゴン陽性細胞の割合(%)をImage Jソフトウェアで算出した結果である。左から、非糖尿病マウス、STZ糖尿病マウス、インスリンペレットのみで処置したSTZ糖尿病マウス、blankペレットおよびトリコスタチンで処置したSTZ糖尿病マウス、ならびにインスリンペレットおよびトリコスタチンで処置したSTZ糖尿病マウスの結果を示す。** $P < 0.01$ を示す。

[図25]図21に示す治療を行なった場合の代表的な摘出胸腺の大きさの比較を示す。左から、非糖尿病マウス、STZ糖尿病マウス、インスリンペレットおよびトリコスタチンで処置したSTZ糖尿病マウス、インスリンペレ

トのみで処置したS T Z糖尿病マウス、ならびにblankペレットおよびトリコスタチンで処置したS T Z糖尿病マウスから抽出した胸腺を示す。なお、非糖尿病マウス、S T Z糖尿病マウスから抽出した胸腺の画像は図20のものと同じである。

[図26] NODマウスの骨髄移植治療の概要を示す模式図である。インスリンペレットまたはblankペレット処置下で非糖尿病または糖尿病由来の骨髄をNODマウスに移植する概要を示す。

[図27] 図26に示す治療を行なった場合の血糖値の変化の予想を示す。縦軸は、各時点における血糖値 (mg/dL) を示す。横軸は、骨髄移植した時点を0週目と設定した処置の時間経過を示す。インスリンペレットの有効期間も図示している。

[図28] 図26に示す治療を行なった場合の膵臓凍結切片の観察結果を示す。

(上のパネル) 凍結切片のインスリンおよび核の染色像である。各切片を取得したマウスの条件をそれぞれの画像の上に表示する。ICRマウスおよび糖尿病発症NODマウスの画像は実際の画像である。スケールバーは10 μ mを示す。(下のパネル) 各マウスにおいて膵島をランダムに選び、膵島の大きさに対するインスリン陽性細胞の割合 (%) をImage Jソフトウェアで算出した結果である。左から、ICRマウス、糖尿病発症NODマウス、blankペレットおよび糖尿病骨髄移植で処置したNOD糖尿病マウス、インスリンペレットおよび糖尿病骨髄移植で処置したNOD糖尿病マウス、blankペレットおよび非糖尿病骨髄移植で処置したNOD糖尿病マウス、ならびにインスリンペレットおよび非糖尿病骨髄移植で処置したNOD糖尿病マウスの結果を示す。

[図29] 図26に示す治療を行なった場合の膵臓凍結切片の観察結果を示す。

(上のパネル) 凍結切片のグルカゴンおよび核の染色像である。各切片を取得したマウスの条件をそれぞれの画像の上に表示する。(下のパネル) 各マウスにおいて膵島をランダムに選び、膵島の大きさに対するグルカゴン陽性細胞の割合 (%) をImage Jソフトウェアで算出した結果である。左

から、ICRマウス、糖尿病発症NODマウス、空白ペレットおよび糖尿病骨髄移植で処置したNOD糖尿病マウス、インスリンペレットおよび糖尿病骨髄移植で処置したNOD糖尿病マウス、空白ペレットおよび非糖尿病骨髄移植で処置したNOD糖尿病マウス、ならびにインスリンペレットおよび非糖尿病骨髄移植で処置したNOD糖尿病マウスの結果を示す。

[図30]図26に示す治療を行なった場合の代表的な摘出胸腺の大きさ比較を示す。上段のICRマウス（左）、糖尿病未発症NODマウス（中央）、および糖尿病発症NODマウス（右）から摘出した胸腺の画像は実際のものであり、スケールは合わせている。スケールバーは200 μ mを示す。下段は、左から、空白ペレットおよび糖尿病骨髄移植で処置したNOD糖尿病マウス、空白ペレットおよび非糖尿病骨髄移植で処置したNOD糖尿病マウス、インスリンペレットおよび糖尿病骨髄移植で処置したNOD糖尿病マウス、ならびにインスリンペレットおよび非糖尿病骨髄移植で処置したNOD糖尿病マウスから摘出した胸腺の予想図を示す。

[図31]NODマウスの薬物治療の概要を示す模式図である。NODマウスに、インスリンペレットまたは空白ペレット処置下でトリコスタチン（幹細胞遊走剤+トリコスタチンA）処置を行う概要を示す。

[図32]図31に示す治療を行なった場合の血糖値の変化の予想を示す。縦軸は、各時点における血糖値（mg/dL）を示す。横軸は、糖尿病治療開始時点を0週目と設定した処置の時間経過を示す。インスリンペレットの有効期間も図示している。

[図33]図31に示す治療を行なった場合の膵臓凍結切片の観察結果を示す。

（上のパネル）凍結切片のインスリンおよび核の染色像である。各切片を取得したマウスの条件をそれぞれの画像の上に表示する。ICRマウスおよび糖尿病発症NODマウスの画像は実際の画像である。スケールバーは10 μ mを示す。（下のパネル）各マウスにおいて膵島をランダムに選び、膵島の大きさに対するインスリン陽性細胞の割合（%）をImage Jソフトウェアで算出した結果である。左から、ICRマウス、糖尿病発症NODマウ

ス、インスリンペレットのみで処置したNOD糖尿病マウス、空白ペレットおよびトリコスタチンで処置したNOD糖尿病マウス、ならびにインスリンペレットおよびトリコスタチンで処置したNOD糖尿病マウスの結果を示す。

[図34]図31に示す治療を行なった場合の膵臓凍結切片の観察結果を示す。

(上のパネル)凍結切片のグルカゴンおよび核の染色像である。各切片を取得したマウスの条件をそれぞれの画像の上に表示する。(下のパネル)各マウスにおいて膵島をランダムに選び、膵島の大きさに対するグルカゴン陽性細胞の割合(%)をImage Jソフトウェアで算出した結果である。左から、ICRマウス、糖尿病発症NODマウス、インスリンペレットのみで処置したNOD糖尿病マウス、空白ペレットおよびトリコスタチンで処置したNOD糖尿病マウス、ならびにインスリンペレットおよびトリコスタチンで処置したNOD糖尿病マウスの結果を示す。

[図35]図26に示す治療を行なった場合の代表的な摘出胸腺の大きさ比較を示す。上段のICRマウス(左)、糖尿病未発症NODマウス(中央)、および糖尿病発症NODマウス(右)から摘出した胸腺の画像は実際のものであり、スケールは合わせている。スケールバーは200 μ mを示す。下段は、左から、インスリンペレットのみで処置したNOD糖尿病マウス、空白ペレットおよびトリコスタチンで処置したNOD糖尿病マウス、ならびにインスリンペレットおよびトリコスタチンで処置したNOD糖尿病マウスから摘出した胸腺の予想図を示す。

[図36]糖尿病に関与する骨髓細胞の模式図を糖尿病と正常とを比較して示す。

[図37]2型糖尿病で骨髓由来細胞が異常を引き起こすメカニズムを示す模式図である。

[図38]1型糖尿病で骨髓由来細胞が異常を引き起こすメカニズムを示す模式図である。

発明を実施するための形態

[0009] 以下、本開示を最良の形態を示しながら説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本開示の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

[0010] 以下に本明細書において特に使用される用語の定義および／または基本的技術内容を適宜説明する。

[0011] （定義）

本明細書において、「糖尿病」は当該分野において使用される通常の意味で用いられ、妊娠に伴うものや特異な遺伝子異常によるものを除き、通常は、膵臓のβ細胞の破壊によってインスリンが枯渇して生じる1型糖尿病、および肥満などを原因として、膵臓のランゲルハンス島（膵島）のβ細胞からのインスリン分泌量が減少し、筋肉、脂肪組織へのグルコースの取り込み能が低下して生じる2型糖尿病に分類される。なお、本研究の結果によると、1型糖尿病および2型糖尿病の両者はこれまで成因と考えられていたものとは全く異なる、免疫異常を介した共通の細胞成因によって起こると推察される。糖尿病は、例えば、2回以上の検査で、空腹時血糖 ≥ 126 mg/dL、HbA1c $\geq 6.5\%$ 、経口ブドウ糖負荷試験（75g OGTT）で2時間値が200 mg/dL以上などによって診断され得る。本明細書における「糖尿病」には若年発症成人型糖尿病、境界型糖尿病も含まれる。

[0012] 本明細書において「糖尿病の関連疾患」または「糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状」は、糖尿病に関連する任意の疾患、障害および症状が包含され得、それらの例として、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症

、糖尿病性腎症、続発性糖尿病、糖尿病性昏睡、意識障害、腹痛、こむら返り、神経障害、高浸透圧高血糖症候群、アルブミン尿、浮腫、腎不全、失明、アルツハイマー型認知症、心筋梗塞、閉塞性動脈硬化症、脳梗塞、脂肪肝、皮膚症状（糖尿病性リポイド類壊死など）、創傷治癒能力の低下、易感染性（敗血症など）、がん（肝がん、腎臓がん、膵がん、結腸がん、胃がん、肝がん、卵巣がん、大腸がん、結腸がんなど）、糖尿病性ケトアシドーシス、心臓病、脳血管障害、ステロイド糖尿病、便秘、立ちくらみ（起立性低血圧）、勃起不全、心筋梗塞、胸痛、重症虫垂炎、腹膜刺激症状、低温やけど、妊娠糖尿病、口渇、多飲、多尿などが挙げられる。

- [0013] 特に断らない限り、本明細書において「非糖尿病被験体」とは、糖尿病もその関連疾患も有しない被験体を意味する。
- [0014] 本明細書において「治療」とは、ある疾患または障害について、そのような状態になった場合に、そのような疾患または障害の悪化を防止、好ましくは、現状維持、より好ましくは、軽減、さらに好ましくは治癒することをいい、患者の疾患、もしくは疾患に伴う1つ以上の症状の、症状改善効果あるいは予防効果を発揮しうることを含む。本明細書において「軽減」とは、ある疾患または障害について、そのような状態になった場合に、そのような疾患または障害の重症度を低減させることをいい、「治癒」とは、もはやそのような疾患または障害を有すると診断されなくなることをいう。事前に診断を行って適切な治療を行うことは「コンパニオン治療」といい、そのための診断薬を「コンパニオン診断薬」ということがある。
- [0015] 本明細書において「予防」とは、ある疾患または障害について、そのような状態になる前に、そのような状態にならないようにすることをいう。本開示の薬剤を用いて、診断を行い、必要に応じて本開示の薬剤を用いて例えば、糖尿病等の予防をするか、あるいは予防のための対策を講じることができる。
- [0016] 本明細書において「診断」とは、被験体における状態（例えば、疾患、障害）などに関連する種々のパラメータを同定し、そのような状態の現状また

は未来を判定することをいう。本開示の方法、組成物、システムを用いることによって、体内の状態を調べることができ、そのような情報を用いて、被験体における状態、投与すべき処置または予防のための処方物または方法などの種々のパラメータを選定することができる。本明細書において、狭義には、「診断」は、現状を診断することをいうが、広義には「早期診断」、「予測診断」、「事前診断」等を含む。本開示の診断方法は、原則として、身体から出たものを利用することができ、医師などの医療従事者の手を離れて実施することができることから、産業上有用である。本明細書において、医師などの医療従事者の手を離れて実施することができることを明確にするために、特に「予測診断、事前診断もしくは診断」を「支援」と称することがある。本開示の技術は、このような診断技術に応用可能である。

[0017] 本明細書において標的細胞の「抑制」は、標的細胞の増殖速度の低下、標的細胞の傷害、標的細胞の減少および／または標的細胞の死滅をもたらすことを意味する。標的細胞の抑制は直接的作用および／または間接的作用によって達成され得る。例えば、標的細胞を抑制する直接的作用は、この細胞が有する任意の特徴（例えば、発現分子）を標的化して、標的細胞の傷害、標的細胞の減少および／または標的細胞の死滅をもたらすことによって達成され、例えば、放射線照射、アポトーシスの誘導、免疫細胞による攻撃の誘導などの機構が挙げられるが、これらに限定されない。標的細胞を抑制する間接的作用は、この標的細胞を認識して抑制するように免疫系に学習させる方法などが挙げられるが、これに限定されない。

[0018] 本明細書において標的細胞の「抑制剤」は、任意の手段で標的細胞を抑制する薬剤を意味する。本明細書に記載される抑制剤において、標的細胞を抑制する手段は任意であり得、例えば、標的細胞における分子機構に介入することによるアポトーシスの促進、標的細胞と標的化分子（例えば、抗体）との結合によって引き起こされる免疫細胞による攻撃、放射線発生分子の使用などが挙げられるが、これに限定されない。

[0019] 本明細書において細胞の「遊走」とは、細胞が生体内のある場所から別の

場所へと移動することを意味するが、典型的には、細胞が末梢血液および／または循環血液中に移動することを意味する。より具体的な実施形態では、遊走は、細胞が、骨髄（またはその中の特定の部位）から末梢血液および／または循環血液中に移動することを意味する。このような骨髄中の特定の部位は、ニッチ(niche)または特定ニッチということがあり、特定ニッチとは、生体内で幹細胞がその性質を維持するために必要な微小環境をいう。したがって、本明細書では、特定の実施形態では、ニッチから幹細胞を遊走させることを言うがこれに限定されない。

[0020] 本明細書において細胞の「遊走剤」は、任意の手段で標的細胞を遊走させる薬剤を意味する。

[0021] 本明細書において「造血幹細胞」または「HSC」とは、血球系細胞に分化可能な幹細胞を指す。ヒト成体では主に骨髄に存在し、白血球（好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球、単球、マクロファージ）、赤血球、血小板、肥満細胞、樹状細胞を生み出す。ヒト造血幹細胞は、例えば、CD34陽性Thy-1陽性によって特徴付けられ得、また、Lineage陰性CD34陽性CD38陰性CD90陽性CD45RA陰性（すなわち、Lin-CD34⁺CD38⁻CD90⁺CD45RA⁻）によっても特徴付けられ得る（例えば、Proc Natl Acad Sci USA, 2011 Dec 13;108(50):20012-20017参照）。マウス造血幹細胞は、c-kit陽性Sca-1陽性系統マーカー陰性(KSL)細胞として特徴付けられ得る。また、造血幹細胞は、Hoechst 33342色素で染色した骨髄細胞を、紫外光(350nm)で励起し、Hoechst blueおよびHoechst redの2種類の光学フィルターで展開した場合に両方とも陰性であることによっても特徴付けられ得る。造血幹細胞は、長期造血幹細胞(LT-HSC)、短期造血幹細胞(ST-HSC)などに細分類され得る。例えば、造血幹細胞の特徴は、Cytometry Research 19(2):25-32, 2009を参照することができる。

[0022] 本明細書において「長期造血幹細胞(LT-HSC)」とは長期骨髄細胞

再建能を持つ造血幹細胞をいう。LT-HSCは、通常、表面抗原マーカーにより特定され、（例えば、マウスにおいては）CD34陰性、CD150陽性、CD48陰性、Lin陰性、sca1陽性、c-kit陽性（あるいは、Lineage⁻c-Kit⁺Sca-1⁺CD34^{-/low}CD150⁺細胞）と表現され得る。また、LT-HSCは、（例えば、ヒトにおいては）CD34陰性、CD38陰性（あるいは、CD34⁻CD38⁻細胞）と表現され得る（例えば、Nat Immunol, 2010 Jul;11(7):585-93; Blood 108, 2446-2454, 2006）。

[0023] 本明細書において「短期造血幹細胞（ST-HSC）」とは、短期骨髓再建能を持つ造血幹細胞をいう。ST-HSCは、通常、表面抗原マーカーにより特定され、（例えば、マウスにおいては）CD34陽性、CD150陽性、CD48陰性、Lin陰性、sca-1陽性、c-kit陽性と表現され得る。また、ST-HSCは、（例えば、ヒトにおいては）CD34陽性、CD38陰性（あるいは、CD34⁺CD38⁻細胞）と表現され得る（例えば、Nat Immunol, 2010 Jul;11(7):585-93; Blood 108, 2446-2454, 2006）。

[0024] 本明細書において「異常造血幹細胞」または「異常HSC」とは、異常な機能を発現しているか、および／または正常な機能を少なくとも一部欠いている造血幹細胞をいう。代表的には、異常HSCは、HDAC、TNF- α 、CD106またはその機能的等価物の遺伝子またはタンパク質が通常レベルで発現していないかおよび／または機能していない細胞をいう。

[0025] 本明細書において、遺伝子またはタンパク質が「通常のレベルで発現していない」とは、正常な機能を有する細胞において見られる発現量ではない量やレベルで当該遺伝子またはタンパク質が発現していることをいう。例えば、CD106についていうと、CD106が通常発現している（正常細胞で見られる通常の値）から外れる場合に異常であると判断し得、好ましくは、CD106が通常よりも多く発現している場合に異常と判定し得る。例えば、非糖尿病および糖尿病のマウスからKSL細胞をFACSで分取し、RN

Aを抽出した後、Q T - P C Rを用いて遺伝子発現量の比較解析を行うことで遺伝子の通常のレベルでない発現（例えば、過剰発現）を試験することができる。例えば、F A C S解析を実施し、異常な造血幹細胞の表面抗原を検出し、糖尿病被験体と非糖尿病被験体とを比較することでタンパク質の通常のレベルでない発現を試験することができる。

[0026] 本明細書において、遺伝子またはタンパク質が「通常のレベルで機能していない」とは、正常な機能を有する細胞において見られるレベルの機能が当該遺伝子またはタンパク質についてみられないことをいう。例えば、C D 1 0 6についていうと、C D 1 0 6が通常機能するレベル（正常細胞で見られる通常のレベルまたは値）から外れる場合に異常であると判断し得、好ましくは、C D 1 0 6が通常よりも多いレベルで機能が観察される場合に異常と判定し得る。例えば、F A C S解析を実施し、異常な造血幹細胞の表面抗原を検出し、糖尿病被験体と非糖尿病被験体とを比較してタンパク質の活性化を観察することで、タンパク質が通常のレベルで機能していないことを試験することができる。

[0027] 本明細書において「C X C R 4」とは、C D 1 8 4またはF u s i nとしても知られる7回膜貫通型のGタンパク共役受容体（G P C R）である。C X C R 4の生理的リガンドは、C X C ケモカインの一つで、単球およびリンパ球の遊走を強く誘導するstromal cell-derived factor-1（S D F - 1）である。C X C R 4の阻害によって造血幹細胞の遊走が生じ得る（Future Oncol. 2007 Feb;3(1):19-27）。

[0028] 本明細書において「C D 1 0 6」とは、表面抗原の一種であり、接着分子V C A M - 1（Vascular cell adhesion molecule-1）またはI N C A M - 1 0 0としても知られる、I gスーパーファミリーのメンバーのI型膜タンパク質であり、サイトカイン活性化内皮によって発現される細胞表面シアロ糖タンパク質であり、白血球-内皮細胞接着およびシグナル伝達を媒介することが知られる。ヒトでは、V C A M - 1アイソフォームaプリカーサー（核酸配列：NM_001078.4、アミノ酸配列：NP_001069.1）、V C A M - 1アイ

ソフォームbプリカーサー（核酸配列：NM_080682.2、アミノ酸配列：NP_542413.1）、VCAM-1アイソフォームcプリカーサー（核酸配列：NM_001199834.1、アミノ酸配列：NP_001186763.1）が代表的である。

[0029] 本明細書において「CD34」とは、幹細胞の骨髄細胞外マトリックスまたは間質細胞への付着に関与すると考えられている表面タンパク質であり、高度にグリコシル化され、プロテインキナーゼCによってリン酸化されることが知られる。ヒトでは、CD34転写バリエーション1（核酸配列：NM_001025109.2、アミノ酸配列：NP_001020280.1）、CD34転写バリエーション2（核酸配列：NM_001773.3、アミノ酸配列：NP_001764.1）、が代表的である。

[0030] 本明細書において「腫瘍壊死因子アルファ」またはその省略形である「TNF- α 」とは、TNF、DIF、TNFA、TNFSF2、TNLG1Fとしても知られる腫瘍壊死因子（TNF）スーパーファミリーに属する多機能炎症誘発性サイトカインであり、主にマクロファージによって分泌されるタンパク質を指す。TNF- α は、受容体TNFRSF1A/TNFR1およびTNFRSF1B/TNFRを介して機能することができ、細胞増殖、分化、アポトーシス、脂質代謝、および凝血など広範な生物学的プロセスの調節に関与する。ヒトでは、核酸配列：NM_000594.4、アミノ酸配列：NP_000585.2が代表的である。

[0031] 本明細書において「プロインスリン」とは、インスリンの前駆体タンパク質を指す。プロインスリンは、膵 β 細胞の小胞体においてプロセッシングされ、未成熟の分泌顆粒内でCペプチド領域が除去されることでA鎖およびB鎖から構成されるインスリンが生成される。ヒトでは、プロインスリン転写バリエーション1（核酸配列：NM_000207.3、アミノ酸配列：NP_000198.1）、プロインスリン転写バリエーション2（核酸配列：NM_001185097.2、アミノ酸配列：NP_001172026.1）、プロインスリン転写バリエーション3（核酸配列：NM_001185098.1、アミノ酸配列：NP_001172027.1）、プロインスリン転写バリエーション4（核酸配列：NM_001291897.2、アミノ酸配列：NP_001278826.1）が代表的である。

- [0032] 本明細書において「c-K i t」とは、P B T、S C F R、K I T、C D 1 1 7またはM A S T Cとしても知られるM G F（肥満細胞増殖因子、幹細胞因子としても知られる）の3型膜貫通受容体を指す。ヒトでは、K i t アイソフォーム1プリカーサー（核酸配列：NM_000222.2、アミノ酸配列：NP_000213.1）、K i t アイソフォーム2プリカーサー（核酸配列：NM_001093772.1、アミノ酸配列：NP_001087241.1）が代表的である。
- [0033] 本明細書において「C D 2 0」とは、M S 4 A 1、B 1、S 7、B p 3 5、C D 2 0、C V I D 5、M S 4 A 2またはL E U - 1 6としても知られる膜貫通型4 A遺伝子ファミリーのメンバーであり、B細胞の形質細胞への発達および分化において役割を果たすBリンパ球表面分子を指す。ヒトでは、C D 2 0転写バリエーション1（核酸配列：NM_152866.2、アミノ酸配列：NP_690605.1）、C D 2 0転写バリエーション3（核酸配列：NM_021950.3、アミノ酸配列：NP_068769.2）が代表的である。
- [0034] 本明細書において「ヒストン脱アセチル化酵素（H D A C）」とは、ヒストンなどのタンパク質上のリジンアセチル化修飾を解除する酵素活性を有するとされるタンパク質のファミリーであり、そのメンバーとしてH D A C 1、2、3、6、8、9などが知られる。ヒトでは、H D A C 1（核酸配列：NM_004964.2、アミノ酸配列：NP_004955.2）、H D A C 2（核酸配列：NM_001527.3、アミノ酸配列：NP_001518.3）、H D A C 3（核酸配列：NM_003883.3、アミノ酸配列：NP_003874.2）、H D A C 4（核酸配列：NM_006037.3、アミノ酸配列：NP_006028.2）、H D A C 6（核酸配列：NM_001321226.1、アミノ酸配列：NP_001308155.1）、H D A C 8（核酸配列：NM_001166418.1、アミノ酸配列：NP_001159890.1）、H D A C 9（核酸配列：NM_001204144.2、アミノ酸配列：NP_001191073.1）が代表的である。
- [0035] 特に断らない限り、本明細書において、各タンパク質に関する言及は、特定のアクセッション番号に記載されるアミノ酸配列を有するタンパク質（あるいはそれをコードする核酸）のみならず、その機能的等価物もまた企図されることが理解される。

[0036] 本明細書において、ある分子の「機能的等価物」には、その分子の変異体または改変体（例えば、アミノ酸配列改変体等）であって、本明細書に記載される特徴（例えば、マーカー）としての機能を有するもの、その分子の生物学的機能と同様の機能（同じ程度でなくてもよい）を発揮するもの、ならびに、作用する時点において、その分子自体に変化することができるものが包含されることが理解される。

[0037] 本明細書において、ある分子の「機能的改変体」には、その分子の機能を維持した（程度は変更されてもよい）ままその分子を改変した物質が包含される。例えば、抗体などの結合分子の機能的改変体には、標的分子との結合機能を維持するように、他の部分（標識、他の機能性分子（タンパク質など）など）とコンジュゲート化したもの、フラグメント化したものなどが含まれる。このように、本明細書で使用される場合、機能的改変体は、改変前の基本となる機能を維持するものである。

[0038] 本開示の機能的等価物としては、アミノ酸配列において、1もしくは複数個のアミノ酸の挿入、置換もしくは欠失、またはその一方もしくは両末端への付加されたものを用いることができる。本明細書において、「アミノ酸配列において、1もしくは複数個のアミノ酸の挿入、置換もしくは欠失、またはその一方もしくは両末端への付加」とは、部位特異的突然変異誘発法等の周知の技術的方法により、あるいは天然の変異により、天然に生じ得る程度の複数個の数のアミノ酸の置換等により改変がなされていることを意味する。

[0039] 本明細書において「生物学的機能」とは、ある遺伝子またはそれに関する核酸分子もしくはポリペプチドについて言及するとき、その遺伝子、核酸分子またはポリペプチドが生体内において有し得る特定の機能をいい、これには、例えば、特異的な抗体の生成、酵素活性、抵抗性の付与等を挙げることができるがそれらに限定されない。このような生物学的活性は、上述した表の中で言及されるアクセッション番号、Entrez番号等において引用される文献等を参照することができ、本明細書においてそのような文献等もまた参考

として援用する。本明細書において、生物学的機能は、「生物学的活性」によって発揮され得る。本明細書において「生物学的活性」とは、ある因子（例えば、ポリヌクレオチド、タンパク質など）が、生体内において有し得る活性のことをいい、種々の機能（例えば、転写促進活性）を発揮する活性が包含され、例えば、ある分子との相互作用によって別の分子が活性化または不活化される活性も包含される。2つの因子が相互作用する場合、その生物学的活性は、その二分子との間の結合およびそれによって生じる生物学的変化、例えば、一つの分子を抗体を用いて沈降させたときに他の分子も共沈するとき、2分子は結合していると考えられる。従って、そのような共沈を見ることが一つの判断手法として挙げられる。例えば、ある因子が酵素である場合、その生物学的活性は、その酵素活性を包含する。別の例では、ある因子がリガンドである場合、そのリガンドが対応するレセプターへの結合を包含する。そのような生物学的活性は、当該分野において周知の技術によって測定することができる。

[0040] 本明細書で使用されるタンパク質または核酸の「誘導体」または「類似体」または「変異体」は、限定を意図するものではないが、タンパク質または核酸に実質的に相同な領域を含む分子を含み、このような分子は、種々の実施形態において、同一サイズのアミノ酸配列または核酸配列にわたり、または当該分野で公知のコンピュータ相同性プログラムによってアラインメントを行ってアラインされる配列と比較した際、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%または99%同一であるか、あるいはこのような核酸の「誘導体」または「類似体」または「変異体」は、ストリンジентな条件、中程度にストリンジентな条件、またはストリンジентでない条件下で、元の核酸にハイブリダイズ可能である。代表的には、タンパク質の「誘導体」または「類似体」または「変異体」は、天然存在タンパク質にアミノ酸置換、欠失および付加などの修飾が生じた産物であって、なお天然存在タンパク質の生物学的機能を、必ずしも同じ度合いでなくてもよいが示すタンパク質を意味する。例えば、本明細書

において記載されあるいは当該分野で公知の適切で利用可能な *in vitro* アッセイによって、このようなタンパク質の生物学的機能を調べることも可能である。本開示では、ヒトについて主に論じられるが、他の種例えば霊長類内の他の種あるいはこのほかの属の動物の種のものにも当てはまることが理解され、これらの哺乳動物についても、本開示の範囲内に入ることが理解される。

[0041] 本明細書で使用される用語「活性」は、最も広い意味での分子の機能を指す。活性は、限定を意図するものではないが、概して、分子の生物学的機能、生化学的機能、物理的機能または化学的機能を含む。活性は、例えば、酵素活性、他の分子と相互作用する能力、および他の分子の機能を活性化するか、促進するか、安定化するか、阻害するか、抑制するか、または不安定化する能力、安定性、特定の細胞内位置に局在する能力を含む。適用可能な場合、この用語はまた、最も広い意味でのタンパク質複合体の機能にも関する。

[0042] 本明細書で使用される「機能的に活性な」タンパク質、ポリペプチド、フラグメントまたは誘導体は、生物学的活性などの、タンパク質の構造的機能、制御機能、または生化学的機能を有する。

[0043] 本明細書において「遺伝子」とは、遺伝形質を規定する因子をいう。通常染色体上に一定の順序に配列している。タンパク質の一次構造を規定する遺伝子を構造遺伝子といい、その発現を左右する遺伝子を調節遺伝子という。本明細書では、「遺伝子」は、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」（ここでは、DNA、RNAなどを含む）を指すことがある。「遺伝子産物」とは、遺伝子に基づいて産生された物質でありタンパク質、mRNAなどを指す。したがって、mRNAは遺伝子の概念にも入り得、遺伝子産物にも該当し得る。また「遺伝子の発現」という場合は、mRNAなどの転写レベルを指すことが多い。

[0044] 本明細書において「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長

さのアミノ酸のポリマーをいう。このポリマーは、直鎖であっても分岐していてもよく、環状であってもよい。アミノ酸は、天然のものであっても非天然のものであってもよく、改変されたアミノ酸であってもよい。この用語はまた、複数のポリペプチド鎖の複合体へとアセンブルされたものを包含し得る。この用語はまた、天然または人工的に改変されたアミノ酸ポリマーも包含する。そのような改変としては、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化または任意の他の操作もしくは改変（例えば、標識成分との結合体化）が包含される。この定義にはまた、例えば、アミノ酸の1または2以上のアナログを含むポリペプチド（例えば、非天然アミノ酸などを含む）、ペプチド様化合物（例えば、ペプチド）および当該分野において公知の他の改変が包含される。

[0045] 本明細書において「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーをいう。この用語はまた、「オリゴヌクレオチド誘導体」または「ポリヌクレオチド誘導体」を含む。「オリゴヌクレオチド誘導体」または「ポリヌクレオチド誘導体」とは、ヌクレオチドの誘導体を含むか、またはヌクレオチド間の結合が通常とは異なるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをいい、互換的に使用される。そのようなオリゴヌクレオチドとして具体的には、例えば、2'-O-メチル-リボヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスホロアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合とがペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリ

ゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、DNA中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体およびオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体などが例示される。他にそうではないと示されなければ、特定の核酸配列はまた、明示的に示された配列と同様に、その保存的に改変された改変体（例えば、縮重コドン置換体）および相補配列を包含することが企図される。具体的には、縮重コドン置換体は、1またはそれ以上の選択された（または、すべての）コドンの3番目の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作成することにより達成され得る (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:508-511(1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608(1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98(1994))。本明細書において「核酸」はまた、遺伝子、cDNA、mRNA、オリゴヌクレオチド、およびポリヌクレオチドと互換可能に使用される。本明細書において「ヌクレオチド」は、天然のものでも非天然のものでもよい。

[0046] 本明細書において遺伝子の「相同性」とは、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいい、一般に「相同性」を有するとは、同一性または類似性の程度が高いことをいう。従って、ある2つの遺伝子の相同性が高いほど、それらの配列の同一性または類似性は高い。2種類の遺伝子が相同性を有するか否かは、配列の直接の比較、または核酸の場合ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーション法によって調べられ得る。2つの遺伝子配列を直接比較する場合、その遺伝子配列間でDNA配列が、代表的には少なくとも50%同一である場合、好ましくは少なくとも70%同一である場合、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である場合、それらの遺伝子は相同性を有する。従って本明細書において「相同体」または「相同遺伝子産物」は、本明細書にさらに記載する複合体のタンパク質構成要素と同じ生物学的機能を発揮

する、別の種、好ましくは哺乳動物におけるタンパク質を意味する。このような相同体はまた、「オルソログ遺伝子産物」とも称されることもある。

[0047] アミノ酸は、その一般に公知の3文字記号か、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionにより推奨される1文字記号のいずれかにより、本明細書中で言及され得る。ヌクレオチドも同様に、一般に認知された1文字コードにより言及され得る。本明細書では、アミノ酸配列および塩基配列の類似性、同一性および相同性の比較は、配列分析用ツールであるBLASTを用いてデフォルトパラメータを用いて算出される。同一性の検索は例えば、NCBIのBLAST 2.2.9 (2004. 5.12発行)を用いて行うことができる。本明細書における同一性の値は通常は上記BLASTを用い、デフォルトの条件でアラインした際の値をいう。ただし、パラメータの変更により、より高い値が出る場合は、最も高い値を同一性の値とする。複数の領域で同一性が評価される場合はそのうちの最も高い値を同一性の値とする。類似性は、同一性に加え、類似のアミノ酸についても計算に入れた数値である。

[0048] 本明細書において「ストリンジェント(な)条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、当該分野で慣用される周知の条件をいう。本開示のポリヌクレオチド中から選択されたポリヌクレオチドをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法などを用いることにより、そのようなポリヌクレオチドを得ることができる。具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC (saline-sodium citrate) 溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸ナトリウムである)を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるポリヌクレオチドを意味する。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning 2nd ed., Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, DNA Cloning 1:Core Techniques, A Practical Appr

oach, Second Edition, Oxford University Press(1995)などの実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。低ストリンジェンシー条件は、35%ホルムアミド、5×SSC、50mM Tris-HCl (pH7.5)、5mM EDTA、0.02%ポリビニルピロリドン (PVP)、0.02%BSA、100μg/ml変性サケ精子DNA、および10% (重量/体積) デキストラン硫酸を含む緩衝液中、40℃で18~20時間ハイブリダイゼーションし、2×SSC、25mM Tris-HCl (pH7.4)、5mM EDTA、および0.1%SDSからなる緩衝液中、55℃で1~5時間洗浄し、そして2×SSC、25mM Tris-HCl (pH7.4)、5mM EDTA、および0.1%SDSからなる緩衝液中、60℃で1.5時間洗浄することを含む。

[0049] 本明細書において「精製された」物質または生物学的因子（例えば、核酸またはタンパク質など）とは、その生物学的因子に天然に随伴する因子の少なくとも一部が除去されたものをいう。従って、通常、精製された生物学的因子におけるその生物学的因子の純度は、その生物学的因子が通常存在する状態よりも高い（すなわち濃縮されている）。本明細書中で使用される用語「精製された」は、好ましくは少なくとも75重量%、より好ましくは少なくとも85重量%、よりさらに好ましくは少なくとも95重量%、そして最も好ましくは少なくとも98重量%の、同型の生物学的因子が存在することを意味する。本開示で用いられる物質は、好ましくは「精製された」物質である。

[0050] 本明細書において「対応する」アミノ酸または核酸とは、あるポリペプチド分子またはポリヌクレオチド分子において、比較の基準となるポリペプチドまたはポリヌクレオチドにおける所定のアミノ酸またはヌクレオチドと同様の作用を有するか、または有することが予測されるアミノ酸またはヌクレオチドをいい、特に酵素分子にあっては、活性部位中の同様の位置に存在し触媒活性に同様の寄与をするアミノ酸をいう。例えば、アンチセンス分子であれば、そのアンチセンス分子の特定の部分に対応するオルソログにおける

同様の部分であり得る。対応するアミノ酸は、例えば、システイン化、グルタチオン化、S-S結合形成、酸化（例えば、メチオニン側鎖の酸化）、ホルミル化、アセチル化、リン酸化、糖鎖付加、ミリスチル化などがされる特定のアミノ酸であり得る。あるいは、対応するアミノ酸は、二量体化を担うアミノ酸であり得る。このような「対応する」アミノ酸または核酸は、一定範囲にわたる領域またはドメインであってもよい。従って、そのような場合、本明細書において「対応する」領域またはドメインと称される。

[0051] 本明細書において「対応する」遺伝子（例えば、ポリヌクレオチド配列または分子）とは、ある種において、比較の基準となる種における所定の遺伝子と同様の作用を有するか、または有することが予測される遺伝子（例えば、ポリヌクレオチド配列または分子）をいい、そのような作用を有する遺伝子が複数存在する場合、進化学的に同じ起源を有するものをいう。従って、ある遺伝子に対応する遺伝子は、その遺伝子のオルソログであり得る。そのような対応する遺伝子は、当該分野において周知の技術を用いて同定することができる。従って、例えば、ある動物（例えば、マウス、ラット）における対応する遺伝子は、対応する遺伝子（例えば、ヒトのもの）の基準となる遺伝子の配列をクエリ配列として用いてその動物の配列データベースを検索することによって見出すことができる。

[0052] 本明細書において「フラグメント（断片）」とは、全長のポリペプチドまたはポリヌクレオチド（長さが n ）に対して、 $1 \sim n-1$ までの配列長さを有するポリペプチドまたはポリヌクレオチドをいう。フラグメントの長さは、その目的に応じて、適宜変更することができ、例えば、その長さの下限としては、ポリペプチドの場合、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50およびそれ以上のアミノ酸が挙げられ、ここの具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11など）もまた、下限として適切であり得る。また、ポリヌクレオチドの場合、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100およびそれ以上のヌクレオチドが挙げられ、ここの具体的に列挙していない整

数で表される長さ（例えば、11など）もまた、下限として適切であり得る。本明細書において、このようなフラグメントは、例えば、全長のものがマーカ―として機能する場合、そのフラグメント自体もまたマーカ―としての機能を有する限り、本開示の範囲内に入ることが理解される。本開示において、分子のフラグメントとは、この分子の任意の領域を含む物質（代表的にはポリペプチド）であり、本開示の目的（例えば、治療、検出、診断等）に用いることができる限り、天然の分子の生物学的機能を有していなくてもよい。

[0053] 本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなどの「発現」とは、その遺伝子などがインビボで一定の作用を受けて、別の形態になることをいう。好ましくは、遺伝子、ポリヌクレオチドなどが、転写および翻訳されて、ポリペプチドの形態になることをいうが、転写されてmRNAが作製されることもまた発現の一態様であり得る。より好ましくは、そのようなポリペプチドの形態は、翻訳後プロセッシングを受けたもの（本明細書にいう誘導体）であり得る。例えば、分子の発現レベルは、任意の方法によって決定することができる。具体的には、この分子のmRNAの量、タンパク質の量、またはタンパク質の生物学的な活性を評価することによって発現レベルを知ることができる。

[0054] 本明細書において「発現量」とは、目的の細胞、組織などにおいて、ポリペプチドまたはmRNA等が発現される量をいう。そのような発現量としては、本開示の抗体を用いてELISA法、RIA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法などの免疫学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本開示ポリペプチドのタンパク質レベルでの発現量、またはノーザンブロット法、ドットブロット法、PCR法などの分子生物学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本開示において使用されるポリペプチドのmRNAレベルでの発現量が挙げられる。「発現量の変化」とは、上記免疫学的測定方法または分子生物学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本開示において使用されるポリペプチドのタン

パク質レベルまたはmRNAレベルでの発現量が増加あるいは減少することを意味する。あるマーカーの発現量を測定することによって、マーカーに基づく種々の検出または診断を行うことができる。

[0055] 本明細書において「マーカー（物質、タンパク質または遺伝子（核酸）」とは、ある状態（例えば、細胞の種類、正常細胞状態、疾患状態、障害状態、あるいは増殖能、分化状態のレベル等）にあるかまたはその危険性があるかどうかを追跡する示標となる物質をいう。このようなマーカーとしては、遺伝子（核酸＝DNAレベル）、遺伝子産物（mRNA、タンパク質など）、代謝物質、酵素などを挙げることができる。本開示において、ある状態（糖尿病など）についての検出、診断、予備的検出、予測または事前診断は、その状態に関連するマーカーに特異的な薬剤、剤、因子または手段、あるいはそれらを含む組成物、キットまたはシステム等を用いて実現することができる。

[0056] 本明細書において「抗体」は、広義にはポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、キメラ抗体、および抗イディオタイプ抗体、ならびにそれらのフラグメント、例えばFvフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂およびFabフラグメント、ならびにその他の組換えにより生産された結合体または機能的等価物（例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、多機能抗体、二重特異性またはオリゴ特異性（oligospecific）抗体、単鎖抗体、scFv、ダイアボディー、sc(Fv)₂（single chain (Fv)₂）、scFv-Fc）を含む。さらにこのような抗体を、酵素、例えばアルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 α ガラクトシダーゼなど、に共有結合させまたは組換えにより融合させてよい。本開示で用いられる抗体は、その由来、種類、形状などは問われない。具体的には、非ヒト動物の抗体（例えば、マウス抗体、ラット抗体、ラクダ抗体）、ヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体などの公知の抗体が使用できる。本開示においては、モノクローナル、あるいはポリクローナルを抗体として利用することができるが好ましくはモノクローナル抗体である。抗体の標的タンパク質への結

合は特異的な結合であることが好ましい。

[0057] 本明細書において「手段」とは、ある目的（例えば、検出、診断、治療、予防、遊走）を達成する任意の道具となり得るものをいい、特に、本明細書では、「選択的に認識（検出）する手段」とは、ある対象を他のものとは異なって認識（検出）することができる手段をいう。

[0058] 本明細書においてポリヌクレオチドまたはポリペプチド発現の「検出」または「定量」は、例えば、マーカー検出剤への結合または相互作用を含む、mRNAの測定および免疫学的測定方法を含む適切な方法を用いて達成され得る。分子生物学的測定方法としては、例えば、ノーザンブロット法、ドットブロット法またはPCR法などが例示される。免疫学的測定方法としては、例えば、方法としては、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、RIA法、蛍光抗体法、発光イムノアッセイ（LIA）、免疫沈降法（IP）、免疫拡散法（SRID）、免疫比濁法（TIA）、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法などが例示される。また、定量方法としては、ELISA法またはRIA法などが例示される。アレイ（例えば、DNAアレイ、プロテインアレイ）を用いた遺伝子解析方法によっても行われ得る。DNAアレイについては、（秀潤社編、細胞工学別冊「DNAマイクロアレイと最新PCR法」）に広く概説されている。プロテインアレイについては、Nat Genet. 2002 Dec ; 32 Suppl : 526-32に詳述されている。遺伝子発現の分析法としては、上述に加えて、RT-PCR、RACE法、SSCP法、免疫沈降法、two-hybridシステム、in vitro翻訳などが挙げられるがそれらに限定されない。そのようなさらなる分析方法は、例えば、ゲノム解析実験法・中村祐輔ラボ・マニュアル、編集・中村祐輔羊土社（2002）などに記載されており、本明細書においてそれらの記載はすべて参考として援用される。

[0059] 本開示の検出剤または検出手段は、検出可能とする部分（例えば、抗体等）に他の物質（例えば、標識等）を結合させた複合体または複合分子であってもよい。本明細書において使用される場合、「複合体」または「複合分子

」とは、2以上の部分を含む任意の構成体を意味する。例えば、一方の部分がポリペプチドである場合は、他方の部分は、ポリペプチドであってもよく、それ以外の物質（例えば、基材、糖、脂質、核酸、他の炭化水素等）であってもよい。本明細書において複合体を構成する2以上の部分は、共有結合で結合されていてもよくそれ以外の結合（例えば、水素結合、イオン結合、疎水性相互作用、ファンデルワールス力等）で結合されていてもよい。2以上の部分がポリペプチドの場合は、キメラポリペプチドとも称しうる。従って、本明細書において「複合体」は、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、脂質、糖、低分子などの分子が複数種連結してできた分子を含む。

[0060] 本開示の検出剤またはその他医薬は、プローブおよびプライマーの形態を採ることができる。本開示のプローブおよびプライマーは、標的の核酸分子と特異的にハイブリダイズすることができる。本開示のプローブおよびプライマーは、標的核酸分子の発現を検出することができればよく、複数のデオキシリボ核酸（DNA）またはリボ核酸（RNA）等の塩基または塩基対からなる重合体であり得る。二本鎖cDNAも組織*in situ*ハイブリダイゼーションにおいて利用可能であることが知られており、本開示のプローブおよびプライマーにはそのような二本鎖cDNAも含まれる。組織中のRNAの検出において特に好ましいプローブおよびプライマーとしては、RNAプローブ（リボプローブ）を挙げることができる。

[0061] 本開示によるプライマーおよびプライマーセットは、PCR法、RT-PCR法、リアルタイムPCR法、*in situ* PCR法、LAMP法等の核酸増幅法を利用して目的遺伝子を検出する公知の方法において、常法に従ってプライマーおよびプライマーセットとして利用することができる。

[0062] 本明細書において「プローブ」とは、インビトロおよび／またはインビボなどのスクリーニングなどの生物学的実験において用いられる、検索の手段となる物質をいい、例えば、特定の塩基配列を含む核酸分子または特定のアミノ酸配列を含むペプチド、特異的抗体またはそのフラグメントなどが挙げられるがそれに限定されない。本明細書においてプローブは、マーカー検出

手段としてもちいられる。

[0063] 通常プローブとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸配列と相同なまたは相補的な、少なくとも8の連続するヌクレオチド長の核酸配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも9の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは少なくとも10の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは少なくとも11の連続するヌクレオチド長の、少なくとも12の連続するヌクレオチド長の、少なくとも13の連続するヌクレオチド長の、少なくとも14の連続するヌクレオチド長の、少なくとも15の連続するヌクレオチド長の、少なくとも20の連続するヌクレオチド長の、少なくとも25の連続するヌクレオチド長の、少なくとも30の連続するヌクレオチド長の、少なくとも40の連続するヌクレオチド長の、少なくとも50の連続するヌクレオチド長の、少なくとも核酸配列であり得る。プローブとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも約70%相同な、より好ましくは、少なくとも約80%相同な、さらに好ましくは、少なくとも約90%相同な、少なくとも約95%相同な核酸配列が含まれる。

[0064] 1つの実施形態において、本開示の検出剤は、標識されたものでありうる。あるいは、本開示の検出剤は、タグを結合させたものであってもよい。

[0065] 本明細書において「標識」とは、目的となる分子または物質を他から識別するための存在（例えば、物質、エネルギー、電磁波など）をいう。そのような標識方法としては、R I（ラジオアイソトープ）法、蛍光法、ビオチン法、化学発光法等を挙げることができる。本開示のマーカ―またはそれを捕捉する因子または手段を複数、蛍光法によって標識する場合には、蛍光発光極大波長が互いに異なる蛍光物質によって標識を行う。蛍光発光極大波長の差は、10nm以上であることが好ましい。リガンドを標識する場合、機能に影響を与えないものならば何れも用いることができるが、蛍光物質としては、Alexa™Fluorが望ましい。Alexa™Fluorは、クマリン、ローダミン、フルオレセイン、シアニンなどを修飾して得られた水溶

性の蛍光色素であり、広範囲の蛍光波長に対応したシリーズであり、他の該当波長の蛍光色素に比べ、非常に安定で、明るく、またpH感受性が低い。蛍光極大波長が10nm以上ある蛍光色素の組み合わせとしては、Alexa™555とAlexa™633の組み合わせ、Alexa™488とAlexa™555との組み合わせ等を挙げることができる。核酸を標識する場合は、その塩基部分と結合できるものであれば何れも用いることができるが、シアニン色素（例えば、CyDye™シリーズのCy3、Cy5等）、ローダミン6G試薬、N-アセトキシ-N2-アセチルアミノフルオレン（AAAF）、AAIF（AAAFのヨウ素誘導体）等を使用することが好ましい。蛍光発光極大波長の差が10nm以上である蛍光物質としては、例えば、Cy5とローダミン6G試薬との組み合わせ、Cy3とフルオレセインとの組み合わせ、ローダミン6G試薬とフルオレセインとの組み合わせ等を挙げることができる。本開示では、このような標識を利用して、使用される検出手段に検出され得るように目的とする対象を改変することができる。そのような改変は、当該分野において公知であり、当業者は標識におよび目的とする対象に応じて適宜そのような方法を実施することができる。

[0066] 本明細書において使用される場合、「タグ」とは、受容体ーリガンドのような特異的認識機構により分子を選別するための物質、より具体的には、特定の物質を結合するための結合パートナーの役割を果たす物質（例えば、ビオチンーアビジン、ビオチンーストレプトアビジンのような関係を有する）をいい、「標識」の範疇に含まれる。よって、例えば、タグが結合した特定の物質は、タグ配列の結合パートナーを結合させた基材を接触させることで、この特定の物質を選別することができる。このようなタグまたは標識は、当該分野で周知である。代表的なタグ配列としては、mycタグ、Hisタグ、HA、Aviタグなどが挙げられるが、これらに限定されない。本開示のマーカ―またはマーカ―検出剤にはこのようなタグを結合させてもよい。

[0067] 本明細書において「薬剤」、「剤」または「因子」（いずれも英語ではage

ntに相当する)は、広義には、交換可能に使用され、意図する目的を達成することができる限りどのような物質または他の要素(例えば、光、放射能、熱、電気などのエネルギー)でもあってもよい。そのような物質としては、例えば、細胞(例えば、T細胞)、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、核酸(例えば、cDNA、ゲノムDNAのようなDNA、mRNAのようなRNAを含む)、ポリサッカリド、オリゴサッカリド、脂質、有機低分子(例えば、ホルモン、リガンド、情報伝達物質、有機低分子、コンビナトリアルケミストリで合成された分子、医薬品として利用され得る低分子(例えば、低分子リガンドなど)など)、これらの複合分子が挙げられるがそれらに限定されない。

[0068] 本明細書において「キット」とは、通常2つ以上の区画に分けて、提供されるべき部分(例えば、検査薬、診断薬、治療薬、抗体、標識、説明書など)が提供されるユニットをいう。安定性等のため、混合されて提供されるべきでなく、使用直前に混合して使用することが好ましいような組成物の提供を目的とするときに、このキットの形態は好ましい。そのようなキットは、好ましくは、提供される部分(例えば、検査薬、診断薬、治療薬をどのように使用するか、あるいは、試薬をどのように処理すべきかを記載する指示書または説明書を備えていることが有利である。本明細書においてキットが試薬キットとして使用される場合、キットには、通常、検査薬、診断薬、治療薬、抗体等の使い方などを記載した指示書などが含まれる。

[0069] 本明細書において「指示書」は、本開示を使用する方法を医師または他の使用者に対する説明を記載したものである。この指示書は、本開示の検出方法、診断薬の使い方、または医薬などを投与することを指示する文言が記載されている。また、指示書には、投与部位として、経口、食道への投与(例えば、注射などによる)することを指示する文言が記載されていてもよい。この指示書は、本開示が実施される国の監督官庁(例えば、日本であれば厚生労働省、米国であれば食品医薬品局(FDA)など)が規定した様式に従

って作成され、その監督官庁により承認を受けた旨が明記される。指示書は、いわゆる添付文書 (package insert) であり、通常は紙媒体で提供されるが、それに限定されず、例えば、電子媒体 (例えば、インターネットで提供されるホームページ、電子メール) のような形態でも提供され得る。

[0070] 本明細書で使用されるとき、試料中の分析物等の「量」は、一般には、試料の体積中で検出し得る分析物の質量を反映する絶対値を指す。しかし、量は、別の分析物量と比較した相対量も企図する。例えば、試料中の分析物の量は、試料中に通常存在する分析物の対照の値または正常の値より大きい量であってもよい。

[0071] 本明細書で使用されるとき、試料中の分析物等の「レベル」は、一般には、分析物が酵素などの機能を発揮する対象である場合に、その分析物の活性等の値を反映する絶対値を指す。しかし、レベルは、別の分析物レベルと比較した相対レベルも企図する。例えば、試料中の分析物のレベルは、試料中に通常存在する分析物の対照の値または正常の値より大きいレベルであってもよい。

[0072] 用語「約」は、本明細書で使用されるとき、示された値プラスまたはマイナス10%を指す。なお、「約」と明示的に示されない場合でも「約」があると同義で解釈されうる。

[0073] (本開示の概要)

本発明者らは、CD106などの異常発現によって特徴付けられる異常幹細胞を標的とする糖尿病治療の効果が、幹細胞の遊走と組み合わせることで改善され得るという新たな局面を見出した。本開示は、この新たな糖尿病治療戦略に基づき糖尿病および／またはその関連疾患について新たな治療戦略および診断を提供するものである。

[0074] (好ましい実施形態)

以下に本開示の好ましい実施形態を説明する。以下に提供される実施形態は、本開示のよりよい理解のために提供されるものであり、本開示の範囲は以下の記載に限定されるべきでないことが理解される。従って、当業者は、

本明細書中の記載を参酌して、本開示の範囲内で適宜改変を行うことができることは明らかである。また、本開示の以下の実施形態は単独でも使用されあるいはそれらを組み合わせて使用することができることが理解される。

[0075] (糖尿病および／またはその関連疾患に係る異常幹細胞の特徴)

一つの実施形態において、本開示が対象とする異常幹細胞は、造血幹細胞であり得る。一つの実施形態において、本開示の異常幹細胞は、CD106、ヒストン脱アセチル化酵素(HDACs)、CD34、TNF- α 、およびプロインスリンのうちの少なくとも1つを通常のレベルで発現していないかおよび／または機能していないことによって特徴付けられ、必要に応じて、本明細書に記載の異常幹細胞の他の特徴(例えば、c-Kit陽性、Sc α -1陽性、造血幹細胞の系統マーカー陰性、上記短期造血幹細胞の特徴(CD38陰性など))を有することによってさらに特徴付けられ得る。一つの実施形態において、本開示の異常幹細胞は、CD106を通常のレベルで発現していないことによって特徴付けられ得る。一つの実施形態において、本開示の異常幹細胞は、(a)CD106を通常のレベルで発現しておらず、(b)CD34異常発現、TNF- α 異常発現、ヒストン脱アセチル化酵素(HDACs)異常発現、およびプロインスリン異常発現のうちの少なくとも1つを通常のレベルで発現していないことによって特徴付けられ、必要に応じて、本明細書に記載の異常幹細胞の他の特徴(例えば、c-Kit陽性、Sc α -1陽性、造血幹細胞の系統マーカー陰性、上記短期造血幹細胞の特徴(CD38陰性など))を有することによってさらに特徴付けられ得る。

[0076] 一つの代表的な実施形態において、本開示が対象とする異常幹細胞(例えば、造血幹細胞)は、CD106の異常発現によって特徴付けられ得る。一つの実施形態において、本開示の異常幹細胞は、非糖尿病被験体集団の全骨髓細胞または造血幹細胞(例えば、CD34陽性Thy-1陽性細胞)におけるCD106発現量より高いCD106発現量により特徴づけられ得る。一つの実施形態において、本開示の異常幹細胞は、細胞1個あたり 1×10^2

以上、 2×10^2 以上、 5×10^2 以上、 1×10^3 以上、 2×10^3 以上、 5×10^3 以上、 1×10^4 以上、 2×10^4 以上、 5×10^4 以上、 1×10^5 以上、 2×10^5 以上、 5×10^5 以上、 1×10^6 以上、 2×10^6 以上、 5×10^6 以上、または 1×10^7 以上のCD106分子を細胞表面に発現することによって特徴付けられ得る。具体的な実施形態において、本開示の異常幹細胞は、細胞1個あたり約 1×10^4 以上のCD106分子を細胞表面に発現することによって特徴付けられ得る。一つの実施形態において、本開示の異常幹細胞は、正常な被験体（例えば、ヒト）の全骨髄細胞または造血幹細胞（例えば、CD34陽性Thy-1陽性細胞）をCD106に対する蛍光色素コンジュゲート化抗体で標識してFACSで分析した場合に、全骨髄細胞または造血幹細胞について観察されるこの蛍光色素由来の蛍光強度の中央値の1倍以上、2倍以上、5倍以上、10倍以上、20倍以上、50倍以上、100倍以上、200倍以上、500倍以上、または1000倍以上の蛍光強度を呈する発現量によって示され得る。一つの実施形態において、本開示の異常幹細胞は、非糖尿病被験体集団由来の造血幹細胞（例えば、CD34陽性細胞）よりも10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、100%以上、150%以上または200%以上高いCD106のmRNA発現量によって特徴付けられ得る。

[0077] 一つの実施形態において、本開示が対象とする異常幹細胞は、ヒストン脱アセチル化酵素遺伝子群（HDACs）の発現によって特徴付けられ得る。一つの実施形態において、本開示の異常幹細胞は、非糖尿病被験体集団由来の造血幹細胞（例えば、c-Kit陽性系統マーカー陰性細胞）よりも10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、100%以上、150%以上、200%以上、300%以上、400%以上または500%以上高いヒストン脱アセチル化酵素遺伝子群（HDACs）（例えば、Hdac3、Hdac4、Hdac8、Hdac9）の1つまたは複数の発現量によって特徴付けら

れ得る。

[0078] 一つの実施形態において、本開示が対象とする異常幹細胞は、 $TNF-\alpha$ の発現によって特徴付けられ得る。一つの実施形態において、本開示の異常幹細胞は、 $TNF-\alpha$ の発現について陽性であることによって特徴付けられ得る。一つの実施形態において、 $TNF-\alpha$ の発現について陽性であることは、正常な被験体（例えば、ヒト）の全骨髄細胞または造血幹細胞（例えば、 $CD34$ 陽性 $Thy-1$ 陽性細胞）を $TNF-\alpha$ に対する蛍光色素コンジュゲート化抗体で標識してFACSで分析した場合に、全骨髄細胞または造血幹細胞について観察されるこの蛍光色素由来の蛍光強度の中央値の1倍以上、2倍以上、5倍以上、10倍以上、20倍以上、50倍以上、100倍以上、200倍以上、500倍以上、または1000倍以上の蛍光強度を呈する発現量によって示され得る。一つの実施形態において、本開示の異常幹細胞は、非糖尿病被験体集団由来の造血幹細胞（例えば、 $CD34$ 陽性細胞）よりも10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、100%以上、150%以上または200%以上高い $TNF-\alpha$ のmRNA発現量によって特徴付けられ得る。

[0079] 一つの実施形態において、本開示が対象とする異常幹細胞は、プロインスリンの異常な発現によって特徴付けられ得る。一つの実施形態において、本開示の異常幹細胞は、プロインスリンの発現について陽性であることによって特徴付けられ得る。一つの実施形態において、プロインスリンの発現について陽性であることは、非糖尿病被験体（例えば、ヒト）の全骨髄細胞または造血幹細胞（例えば、 $CD34$ 陽性 $Thy-1$ 陽性細胞）をプロインスリンに対する蛍光色素コンジュゲート化抗体で標識してFACSで分析した場合に、全骨髄細胞または造血幹細胞について観察されるこの蛍光色素由来の蛍光強度の中央値の1倍以上、2倍以上、5倍以上、10倍以上、20倍以上、50倍以上、100倍以上、200倍以上、500倍以上、または1000倍以上の蛍光強度を呈する発現量によって示され得る。一つの実施形態

において、本開示の異常幹細胞は、非糖尿病被験体集団由来の造血幹細胞（例えば、CD34陽性細胞）よりも10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、100%以上、150%以上、200%以上、300%以上、400%以上、500%以上、700%以上または1000%以上高いインスリン（またはプロインスリン）のmRNA発現量によって特徴付けられ得る。

[0080] 一つの実施形態において、本開示が対象とする異常幹細胞は、c-Ki tの発現によって特徴付けられ得る。一つの実施形態において、本開示の異常幹細胞は、c-Ki tの発現について陽性であることによって特徴付けられ得る。一つの実施形態において、c-Ki tの発現について陽性であることは、非糖尿病被験体（例えば、ヒト）の全骨髄細胞または造血幹細胞（例えば、CD34陽性Thy-1陽性細胞）をc-Ki tに対する蛍光色素コンジュゲート化抗体で標識してFACSで分析した場合に、全骨髄細胞または造血幹細胞について観察されるこの蛍光色素由来の蛍光強度の中央値の0.1倍以上、0.2倍以上、0.5倍以上、1倍以上、2倍以上、5倍以上、10倍以上、20倍以上、50倍以上、100倍以上、200倍以上、500倍以上、または1000倍以上の蛍光強度を呈する、かつ／またはこの蛍光色素由来の蛍光強度の大きい順に細胞を並べた場合に上位70%以内、60%以内、50%以内、40%以内、30%以内、20%以内または10%以内に属する蛍光強度を呈する発現量によって示され得る。

[0081] 一つの実施形態において、本開示が対象とする異常幹細胞は、Sca-1の発現によって特徴付けられ得る。一つの実施形態において、本開示の異常幹細胞は、Sca-1の発現について陽性であることによって特徴付けられ得る。一つの実施形態において、Sca-1の発現について陽性であることは、非糖尿病被験体（例えば、ヒト）の全骨髄細胞をSca-1に対する蛍光色素コンジュゲート化抗体で標識してFACSで分析した場合に、全骨髄細胞について観察されるこの蛍光色素由来の蛍光強度の中央値の0.1倍以上、0.2倍以上、0.5倍以上、1倍以上、2倍以上、5倍以上、10倍

以上、20倍以上、50倍以上、100倍以上、200倍以上、500倍以上、または1000倍以上の蛍光強度を呈する、かつ/またはこの蛍光色素由来の蛍光強度の大きい順に全骨髄細胞を並べた場合に上位70%以内、60%以内、50%以内、40%以内、30%以内、20%以内または10%以内に属する蛍光強度を呈する発現量によって示され得る。

[0082] 一つの実施形態において、本開示が対象とする異常幹細胞は、造血幹細胞の系統マーカーの発現によって特徴付けられ得る。造血幹細胞の系統マーカーとしては、CD3 (T細胞)、CD19 (B細胞)、NK1.1 (NK細胞)、CD11c (樹状細胞)、CD11b (単球)、FcεR1 (マスト細胞)、Gr-1 (顆粒球) などが挙げられる。一つの実施形態において、本開示の異常幹細胞は、CD3、CD19、NK1.1、CD11c、CD11b、FcεR1、およびGr-1のうちの1つまたは複数 (例えば、全て) の発現について陰性であることによって特徴付けられ得る。一つの実施形態において、CD3、CD19、NK1.1、CD11c、CD11b、FcεR1、およびGr-1のそれぞれの発現について陰性であることは、非糖尿病被験体 (例えば、ヒト) の全骨髄細胞をCD3、CD19、NK1.1、CD11c、CD11b、FcεR1またはGr-1に対する蛍光色素コンジュゲート化抗体で標識してFACSで分析した場合に、全骨髄細胞について観察されるこの蛍光色素由来の蛍光強度の中央値の1000%以下、500%以下、200%以下、100%以下、50%以下、20%以下、10%以下、5%以下、2%以下、または1%以下の蛍光強度を呈する、かつ/またはこの蛍光色素由来の蛍光強度の大きい順に全骨髄細胞を並べた場合に下位50%以内、20%以内、10%以内、5%以内、2%以内、または1%以内に属する蛍光強度を呈する発現量によって示され得る。一つの実施形態において、本開示の異常幹細胞は、非糖尿病被験体集団由来の造血幹細胞よりも10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、100%以上、150%以上または200%以上高いCD34のmRNA発現量によって特徴付

けられ得る。

[0083] 一つの実施形態において、本開示が対象とする異常幹細胞は、造血幹細胞であることによって特徴付けられ得る。一つの実施形態において、ヒト造血幹細胞であることは、CD34陽性Thy-1陽性であるか、またはLineage陰性CD34陽性CD38陰性CD90陽性CD45RA陰性であることによって特徴付けられ得る。一つの実施形態において、マウス造血幹細胞は、ckit陽性Sca-1陽性系統マーカー陰性(KSL)であることによって特徴付けられ得る。一つの実施形態において、造血幹細胞であることは、Hoechst 33342色素で染色した骨髓細胞を、紫外光(350nm)で励起し、Hoechst blueおよびHoechst redの2種類の光学フィルターで展開した場合に両方とも陰性であることによって特徴付けられ得る。

[0084] 一つの実施形態において、本開示が対象とする異常幹細胞は、造血幹細胞の細胞段階によって特徴付けられ得る。一つの実施形態において、本開示の異常幹細胞は、短期造血幹細胞であり得る。

[0085] 一つの実施形態において、プロインスリンおよび/またはTNF- α は、本開示が対象とする異常幹細胞が骨髓に局在することを示すマーカーとなり得る。

[0086] (治療および/または予防の機構)

発明者らが糖尿病発症に係ると同定した骨髓細胞の種類と、その代表的な特徴および糖尿病との関与を模式的に図36に示す。一般に、TNF- α を産生する細胞は血液由来の細胞であり、臓器の主細胞が直接産生することは考えにくい。TNF- α を生産する異常細胞の起源を調べていくと、造血幹細胞(HSC)がTNF- α を発現しており、TNF- α は、最も未分化なlong term(LT)-HSCでは発現されず、short term(ST)-HSCにおいて発現されており、ST-HSCのCD106陽性分画において発現が限局されていた。このCD106およびTNF- α を発現するST-HSCは、HDAC(HDAC3、4、8、9など)の発現

も向上していた。CD106およびTNF- α は重要な機能を有する正常細胞においても発現され得るため、HDACの阻害が有利であり得る。異常細胞は、通常、薬物の送達が困難な骨髄内の特定のニッチにも存在し得るため、異常細胞を骨髄から遊走させることが異常細胞の根絶に有効であり得る。

[0087] いずれの理論に束縛されることを望むものでもないが、異常細胞が2型糖尿病を発症させるメカニズムを図37に模式的に示す。STZマウスで見られたCD106/TNF- α 陽性の異常な造血幹細胞は、種類の異なる2型糖尿病モデルである高脂肪食マウスでも見られた。STZマウスでも高脂肪食マウスでも、インスリン感受性の低下によりインスリン分泌障害が生じ（1）、これにより高血糖が生じ、骨髄内でのCD106/TNF- α 陽性の異常幹細胞の生産を促進する。異常幹細胞ではヒストン脱アセチル化酵素群の発現異常が生じ、これに伴い、さまざまな遺伝子発現異常が生じると考えられる。その一つとして、プロインスリン（ホルモンとしての作用を持たないインスリンの前駆体）とTNF- α とを同時に発現する異常な幹細胞が出現する（2）。この細胞は、胸腺にも遊走し、そこでプロインスリンとTNF- α とを同時に抗原提示する異常な自己抗原呈示細胞となる（3）。これにより、胸腺におけるTNF- α の発現が胸腺の萎縮をもたらし、CD106/TNF- α /プロインスリンを同時発現する異常な細胞を殺傷するべきT細胞はネガティブセレクションで消去され（4）、免疫寛容を受けたCD106/TNF- α /プロインスリン陽性の異常造血幹細胞は骨髄内で増加し、全身に遊走する。骨髄内で一旦幹細胞として定着したこの異常は半永久的に消えることがない。結果、この異常幹細胞が、骨髄から脾臓へと遊走して、細胞融合を介してCD106/TNF- α /プロインスリン陽性の血管内皮細胞を脾臓の毛細血管内に発生させ（5）、そこでTNF- α が発現されることで、 β 細胞の前駆細胞が傷害され、さらなるインスリン分泌細胞の減少を招く（6）。また、異常幹細胞が様々な臓器に遊走する結果、様々な臓器内で内皮細胞の機能異常およびTNF- α 生産を引き起こし（7）、合併症の発症と進行につながる（8）。そして、骨髄内の異常幹細胞は、2型

糖尿病の記憶を維持するメモリーとしてニッチに居座り、難治性の病態を作り出していると考えられる（2）。これらの一連の異常は、（A）骨髄内の異常幹細胞を除去することと、（B）新たな異常幹細胞の出現を防止するために、血糖値を正常化できるまでインスリン分泌機能が回復するまでの一定期間、外部からインスリンを投与し血糖値を正常化することで抑制することができ、2型糖尿病を治癒することが可能と考えられる。

[0088] 同様に、異常細胞が1型糖尿病を発症させるメカニズムを図38に模式的に示す。1型糖尿病マウスモデル（NODマウス）では2型でも出現したCD106/TNF- α 陽性の細胞が出現している。さらに、B細胞系列の前駆細胞からは β 細胞を傷害する自己抗体を産生する細胞が出現する（1）。この細胞から放出される自己抗体により、 β 細胞は次第に減少する（2）。またこの異常B細胞の一部が胸腺に遊走し、そこでも自己抗体を産生し、プロインスリンやGADなど膵島自己抗原提示細胞を攻撃し消失させる（3）。これにより、胸腺は膵島攻撃型T細胞のネガティブセレクションの能力を失い、このT細胞の末梢への遊走を許すことになる（4）。膵島内へと遊走した自己攻撃型T細胞は β 細胞を傷害し、一挙にインスリン分泌を枯渇させ1型糖尿病が発症する（5）。同時に、このT細胞により骨髄内に存在するインスリンmRNAを発現する自己抗原提示細胞の前駆細胞も攻撃を受け完全に消失し（6）、プロインスリンやGADを提示する細胞は胸腺に供給されなくなる（7）。持続性高血糖は骨髄内でST-HSP分画にCD106/TNF- α 陽性細胞を爆発的に増加させ（8）、胸腺（9）や膵島（10）においては、この細胞由来の異常な血管内皮の増生と β 細胞前駆細胞の壊滅的な組織破壊（11）を誘導する。また、その他の末梢臓器内でも2型同様に内皮の機能不全（12）をきたし、細胞融合（13）などにより糖尿病に特異的な様々な合併症が進行すると考えられる。この1型糖尿病と2型糖尿病の決定的な違いは胸腺内と膵島内からインスリンあるいはプロインスリンのタンパク質を発現する細胞が徹底的に壊されることである。これらの一連の異常は、（A）骨髄内の異常幹細胞を除去することと、（B）新たな異

常幹細胞の出現を防止するために、血糖値を正常化できるまでインスリン分泌機能が回復するまでの一定期間、外部からインスリンを投与し血糖値を正常化することで抑制でき、1型糖尿病を治癒することが可能と考えられる。ここで、(A)の異常幹細胞の除去は、(C)出現している遺伝子的に自己抗体を発現する細胞の原因である異常造血幹細胞の除去ももたすため、2型糖尿病と同様の治療で1型糖尿病の寛解が導けると考えられる。

[0089] (幹細胞の遊走と組み合わせた異常幹細胞を標的とした糖尿病および／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状の治療および／または予防)

一つの局面において、本開示は、本明細書に記載の特徴を有する異常幹細胞を遊走させ、抑制することによる糖尿病および／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状の治療および／または予防を提供する。この治療および／または予防は、方法の実施、この目的のための組成物、組合せ物、キット、またはシステムの提供など、任意の手段によって達成され得る。例えば、抗体などの抑制剤を使用する場合、骨髄中に存在する細胞に対する抑制効果は限定的であり得る（例えば、実施例を参照のこと）そのため、本開示のように、異常幹細胞を抑制する前に、異常幹細胞を遊走させることで、異常幹細胞の抑制効果が向上し得る。

[0090] 一つの実施形態において、本開示の治療および／または予防は、本明細書に記載の異常幹細胞の少なくとも一つの特徴を有する全細胞を遊走させ、抑制することで実施され得る。すなわち、この実施形態において、遊走し、抑制される細胞は、本明細書に記載の異常幹細胞に限定されない。本明細書に記載の異常幹細胞のみを遊走・抑制することは技術的に困難であり得、異常幹細胞の遊走・抑制により得られる利益と、その他の細胞の遊走・抑制による影響とを考慮に入れて治療および／または予防が選択され得る。他方、本明細書に記載の異常幹細胞のうちの一部の細胞の遊走・抑制では、糖尿病および／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状の治療および／または予防が不十分となり得るため、本明細書に記載の異常幹細胞は全

て遊走・抑制することが好ましくあり得る。本開示の治療および／または予防において、遊走のために利用する異常幹細胞の特徴と、抑制のために利用する異常幹細胞の特徴とは、同じであってもよいし、異なってもよい。例えば、一つの実施形態において、本開示の治療および／または予防は、異常幹細胞が造血幹細胞であるという特徴を遊走のために利用し（例えば、CXCR4拮抗薬および／またはCXCR2刺激薬を使用して）、異常幹細胞が特定のタンパク質（HDACなど）を異常に発現するという特徴を抑制のために利用してもよい。

[0091] 一つの実施形態において、本開示の治療および／または予防における遊走は、本明細書に記載の任意の特徴を有する異常幹細胞を遊走させることで実施することができる。一つの実施形態において、本明細書に記載の異常幹細胞の遊走は、造血幹細胞を遊走させる処置により実施することができる。一つの実施形態において、造血幹細胞を遊走させる処置には、CXCR4の阻害 (Future Oncol. 2007 Feb;3(1):19-27)、上皮成長因子受容体 (EGFR) の阻害 (Nature Medicine volume 16, pages 1141-1146 (2010))、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 刺激の惹起 (Blood. 1995 Dec 15;86(12):4437-45)、およびCXCR2刺激の惹起 (Cell. 2018 Jan 11;172(1-2):191-204. e10) などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0092] 一つの実施形態において、本開示の治療および／または予防における遊走は、本明細書に記載の任意の特徴を有する異常幹細胞の遊走剤を使用して実施され得る。当業者は、本開示の治療および／または予防における遊走において使用することができる遊走剤を適宜選択することができ、例えば、遊走剤の投与前後で、実際に骨髓内および／または血液中における幹細胞（例えば、本明細書に記載の特徴を有する異常幹細胞）の比率を測定し、遊走効果を調べることによって、本開示の治療および／または予防に利用可能な遊走剤を選択することができる。一つの実施形態において、本開示の治療および／または予防における遊走は、造血幹細胞の遊走剤を使用して実施され得る。一つの実施形態において、造血幹細胞の遊走剤は、

CXCR4の阻害（例えば、プレリキサフォル（AMD3100））、上皮成長因子受容体（EGFR）の阻害（例えば、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、オシメルチニブなど）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）刺激の惹起（例えば、フィルグラスチム、ナルトグラスチム、レノグラスチム、ペグフィルグラスチムなど）、およびCXCR2刺激の惹起（例えば、GROβ（MIP2））などの機能を有するものであり得るが、これらに限定されない。一つの実施形態において、造血幹細胞の遊走剤は、任意の組み合わせで使用することができ、例えば、CXCR4の阻害剤（例えば、プレリキサフォル（AMD3100））およびCXCR2刺激惹起剤（例えば、GROβ（MIP2））の組み合わせであり得る。

[0093] 一つの実施形態において、本明細書に記載の異常幹細胞の抑制は、本明細書に記載の異常幹細胞の任意の特徴を標的とし、標的となった細胞を遊走させて、抑制することで実施することができる。例えば、本明細書に記載の異常幹細胞が細胞表面に発現する分子（CD106、CD34、TNF-α、プロインスリン、c-Kit、Sca-1など）を標的とする場合、細胞表面発現分子に特異的に結合する分子（抗体、T細胞受容体、低分子化合物など）を使用することができる。また、複数種類の分子を同時発現する細胞を標的とする場合、例えば、多特異的抗体など複数種類の分子に結合する分子を使用して目的の細胞を標的化することができる。

[0094] 一つの実施形態において、本開示の治療および／または予防における抑制は、CD106異常発現、ヒストン脱アセチル化酵素（HDACs）異常発現、CD34異常発現、TNF-α異常発現、およびプロインスリン異常発現のうちの少なくとも1つを特徴とする異常幹細胞を遊走させて、抑制することで実施され得る。一つの実施形態において、本開示の治療および／または予防における抑制は、CD106異常発現を特徴とする異常幹細胞を遊走させて、抑制することで実施され得る。一つの実施形態において、本開示の治療および／または予防における抑制は、（a）CD106異常発現と、（b）ヒストン脱アセチル化酵素（HDACs）異常発現、CD34異常発現、

TNF- α 異常発現、およびプロインスリン異常発現のうちの少なくとも1つとを特徴とする異常幹細胞を遊走させて、抑制することで実施され得る。

[0095] 一つの実施形態において、本開示の治療および／または予防における抑制は、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDACs)、CD106、CD34、TNF- α 、およびプロインスリンの少なくとも1つを標的とする1つまたは複数の抑制剤を使用して実施され得る。一つの実施形態において、本開示の治療および／または予防における抑制は、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDACs) を標的とする抑制剤を使用して実施され得る。一つの実施形態において、本開示の治療および／または予防における抑制は、(a) ヒストン脱アセチル化酵素 (HDACs) と、(b) CD106、CD34、TNF- α 、およびプロインスリンのうちの少なくとも1つとを標的とする1つまたは複数の抑制剤を使用して実施され得る。抑制剤は本明細書に記載の任意の抑制剤を使用することができ、例えば、上記分子と結合する抗体である。一つの実施形態において、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDACs) を標的とする抑制剤は、HDAC阻害剤であり得、例えば、TSA (トリコスタチンA)、VPA (バルプロ酸)、酪酸ナトリウム (NaBu)、SAHA (スベロイルアニリドヒドロキサム酸またはボリノスタット)、ナトリウムフェニルブチレート、デプシペプチド (FR901228、FK228)、トラポキシシン (TPX)、環式ヒドロキサム酸含有ペプチド1 (CHAP1)、MS-275、LBH589、ジビノスタット、フィンゴリモド (FTY720) およびPXD101などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0096] 一つの実施形態において、本開示の治療および／または予防は、糖尿病の治療および／または予防であり得る。一つの実施形態において、本開示の治療および／または予防は、糖尿病の合併症、例えば、神経障害、腎症、肝障害、網膜症、脂肪肝、胃腸障害、骨折治癒遅延、摂食障害または皮膚障害の治療および／または予防であり得る。

[0097] 本開示の治療および／または予防は、任意の公知の治療および／または予防処置または手段 (例えば、糖尿病および／または糖尿病に関連する疾患、

障害および／もしくは症状の治療および／または予防処置または手段）と組み合わせられてもよい。

[0098] 一つの実施形態において、本明細書に記載される異常造血幹細胞の除去は、高血糖を抑制する処置と組み合わせられ得る。本明細書に記載される方法により異常造血幹細胞を除去した直後は、膵臓の β 細胞（またはさらに β 細胞の傷害を防ぐ胸腺）がまだ回復していない場合があるため、血糖制御が不十分となり、高血糖が生じ得る。本明細書に記載されるように、高血糖は再度の異常造血幹細胞の出現を促進し得るので、膵臓の β 細胞（またはさらに β 細胞の傷害を防ぐ胸腺）が回復するまで高血糖を抑制することが有利であり得る。高血糖を抑制する処置として、インスリン投与、食事コントロールなどが挙げられるが、これらに限定されない。高血糖を抑制する処置は、本明細書に記載される異常造血幹細胞の除去と平行して行われてもよいし、異常造血幹細胞の除去の後に行われてもよく、血糖の自己制御が可能な程度に膵臓の β 細胞（またはさらに β 細胞の傷害を防ぐ胸腺）が回復するまで持続してもよい。

[0099] 一つの実施形態において、本開示は、糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状の治療を提供する。本明細書に記載される治療方法は、糖尿病の遅延だけでなく、治癒も可能にし得る。一つの実施形態において、糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状の治療は、当該疾患、障害および／もしくは症状が処置終了後少なくとも1カ月、3カ月、6カ月、1年、2年、または5年間診断されない状態をもたらす。糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状の治療は、糖尿病の診断基準を提供している糖負荷試験による血糖値の反応、ならびに補助的診断価値を持つインスリン分泌能、グルカゴン負荷試験によるC-ペプチド分泌反応において正常化がもたらされることに基づいて判断されてもよい。

[0100] 一つの実施形態において、本明細書に記載される異常造血幹細胞の除去は、萎縮した胸腺を回復させ得る。胸腺の形態学的変化は胸部のMR I検査に

より観察することができ、リンパ球のサブセットおよびCD5抗原陽性の白血球を測定することにより、胸腺の機能を推計することが可能であるため、糖尿病および／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状、あるいはそのリスクの評価のために、これらの胸腺についての試験を行ってもよい。例えば、本開示の糖尿病および／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状の治療の後に、予後観察の項目としてこれらの胸腺に関する試験を行ってもよい。

[0101] (異常幹細胞の存在、遊走および／または残留に基づく糖尿病および／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状、あるいはそのリスクの診断)

一つの局面において、本開示は、本明細書に記載の異常幹細胞の存在、遊走および／または残留に基づく糖尿病および／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状、あるいはそのリスクの診断を提供する。この診断は、方法の実施、この目的のための組成物、組合せ物、キット、またはシステムの提供など、任意の手段によって達成され得る。異常幹細胞の存在、遊走および／または残留が示された被験体は、本開示の治療法の好適な対象であり得る。

[0102] 一つの実施形態において、本開示の診断は、本明細書に記載の異常幹細胞の少なくとも1つの特徴を有する少なくとも一部の細胞の特定の部位における存在および／または存在量を検出することで実施され得る。本明細書において、特に断らない限り、細胞の「存在量」とは、細胞の数（または細胞の数を示す任意の指標）だけでなく、細胞集団中の特定の細胞の割合（または特定の細胞の割合を示す任意の指標）も意味する。一つの実施形態において、本開示の診断は、本明細書に記載の異常幹細胞の骨髄および／または骨髄のニッチにおける存在および／または存在量を検出することで実施され得る。一つの実施形態において、本開示の診断は、本明細書に記載の異常幹細胞の循環血における存在および／または存在量を検出することで実施され得る。一つの実施形態において、本開示の診断は、本明細書に記載の遊走剤を投

与した被験体における異常幹細胞の特定の部位における存在および／または存在量を検出することで実施することができ、例えば、遊走剤の投与の前後における異常幹細胞の特定の部位（例えば、骨髄）における存在および／または存在量の変化に基づいて実施され得る。この実施形態において、例えば、遊走剤の投与後に被験体の骨髄において異常幹細胞の存在量が低下した場合、被験体が、糖尿病および／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状、あるいはそのリスクを有すると診断してもよく、一つの実施形態において、この被験体は、この遊走剤を用いた本開示の治療および／または予防処置に供され得る。

[0103] 一つの実施形態において、本開示の診断は、本明細書に記載の異常幹細胞の少なくとも1つの特徴の定量的指標（例えば、細胞表面タンパク質発現量、mRNA発現量）に基づいて実施され得る。一つの実施形態において、被験体由来の試料（例えば、血液試料、骨髄試料）またはそこに含まれる造血幹細胞（例えば、CD34陽性細胞）が、非糖尿病被験体集団の対応する試料またはそこに含まれる造血幹細胞（例えば、CD34陽性細胞）よりも10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、100%以上、150%以上または200%以上高い異常幹細胞マーカー（CD106、HDAC、TNF- α など）のmRNA発現量を示す場合に、被験体は、糖尿病および／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状、あるいはそのリスクを有する、あるいは本開示の異常細胞遊走処置に適すると判断され得る。

[0104] 一つの実施形態において、本開示の診断は、本明細書に記載の異常幹細胞の少なくとも1つの特徴（定量的指標を含む）を示す細胞の割合に基づいて実施され得る。一つの実施形態において、本開示の診断は、被験体の造血幹細胞のうちの正常でないレベルの異常幹細胞マーカー（CD106、HDAC、TNF- α など）発現を示す細胞の割合に基づいて実施することができ、必要に応じて非糖尿病被験体集団または糖尿病被験体集団の造血幹細胞のうちの正常でないレベルのCD106発現を示す細胞の割合と比較すること

で実施され得る。一つの実施形態において、特定の部位（例えば、骨髄）において、被験体の造血幹細胞のうちの正常でないレベルの異常幹細胞マーカー（CD106、HDAC、TNF- α など）発現を示す細胞の割合が、非糖尿病被験体集団の造血幹細胞のうちの正常でないレベルの異常幹細胞マーカー（CD106、HDAC、TNF- α など）発現を示す細胞の割合の1.1倍以上、1.2倍以上、1.3倍以上、1.4倍以上、1.5倍以上、1.6倍以上、1.7倍以上、1.8倍以上、1.9倍以上、2倍以上、2.1倍以上、2.2倍以上、2.3倍以上、2.4倍以上、2.5倍以上、2.6倍以上、2.7倍以上、2.8倍以上、2.9倍以上、3倍以上、3.5倍以上、4倍以上、4.5倍以上、または5倍以上である場合に、被験体は、糖尿病および／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状、あるいはそのリスクを有する、あるいは本開示の異常細胞遊走処置に適すると判断され得る。

[0105] 一つの実施形態において、本開示の診断は、本明細書に記載の異常幹細胞の任意の特徴を検出することで実施することができる。一つの実施形態において、本開示の診断は、CD106異常発現、CD34異常発現、TNF- α 異常発現、プロインスリン異常発現、およびヒストン脱アセチル化酵素（HDACs）異常発現のうちの少なくとも1つの特徴を有し、必要に応じて、本明細書に記載の異常幹細胞の他の特徴（例えば、c-Kit陽性、Sc α -1陽性、造血幹細胞の系統マーカー陰性、上記短期造血幹細胞の特徴（CD38陰性など））をさらに有する細胞を検出することで実施され得る。一つの実施形態において、本開示の診断は、CD106異常発現を特徴とする細胞を検出することで実施され得る。一つの実施形態において、本開示の診断は、（a）CD106異常発現と、（b）ヒストン脱アセチル化酵素（HDACs）異常発現、CD34異常発現、TNF- α 異常発現、およびプロインスリン異常発現のうちの少なくとも1つとを特徴とし、必要に応じて、本明細書に記載の異常幹細胞の他の特徴（例えば、c-Kit陽性、Sc α -1陽性、造血幹細胞の系統マーカー陰性、上記短期造血幹細胞の特徴（

- CD38陰性など)) をさらに有する細胞を検出することで実施され得る。
- [0106] 一つの実施形態において、本開示の診断は、CD106、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDACs)、CD34、TNF- α 、およびプロインスリンの少なくとも1つを標的とする1つまたは複数の検出剤を使用して実施され得る。一つの実施形態において、本開示の診断は、CD106を標的とする検出剤を使用して実施され得る。一つの実施形態において、本開示の診断は、(a) CD106と、(b) ヒストン脱アセチル化酵素 (HDACs)、CD34、TNF- α 、およびプロインスリンのうちの少なくとも1つとを標的とする1つまたは複数の検出剤を使用して実施され得る。検出剤は本明細書に記載の任意の検出剤を使用することができ、例えば、上記分子と結合する抗体を含む。
- [0107] 一つの実施形態において、本開示の診断は、被験体に対する検出剤の投与によって実施してもよいし、被験体由来の試料を試験することで実施してもよい。例えば、本開示の診断は、被験体に本開示の検出剤を投与して、骨髓 (またはその特定のニッチ) における本開示の異常幹細胞の存在および/または存在量を検出することで実施され得る。例えば、本開示の診断は、被験体の細胞を含む試料 (例えば、血液試料、骨髓試料) を取得して、本開示の異常幹細胞の少なくとも1つの特徴および/または骨髓 (またはその特定のニッチ) における存在を示すマーカーを有する細胞が存在するかどうかを確認することで実施され得る。
- [0108] 一つの実施形態において、本開示の診断は、糖尿病の診断であり得る。一つの実施形態において、本開示の診断は、糖尿病の合併症、例えば、神経障害、腎症、肝障害、網膜症、脂肪肝、胃腸障害、骨折治癒遅延、摂食障害または皮膚障害、あるいはそのリスクの診断であり得る。
- [0109] 本開示の診断は、任意の公知の診断 (例えば、糖尿病および/または糖尿病に関連する疾患、障害および/もしくは症状の診断) と組み合わせられてもよい。
- [0110] 一つの実施形態において、本開示の治療および/または予防は、本開示の

診断に基づいて（例えば、本開示の診断の結果、異常幹細胞が骨髄に存在することが予測された被験体に対して）実施され得る。

[0111] 本明細書に記載されるように、発明者らは、異常造血幹細胞が糖尿病および/または糖尿病に関連する疾患、障害および/もしくは症状の原因となり得ることを見出したため、異常造血幹細胞の検出に基づいて糖尿病および/または糖尿病に関連する疾患、障害および/もしくは症状を治療するコンパニオン治療は、本開示において企図される好適な実施形態の一つである。同様に、本開示は、糖尿病および/または糖尿病に関連する疾患、障害および/もしくは症状の治療または予防に繋げるための、異常造血幹細胞を検出する薬剤を含むコンパニオン診断薬も提供する。異常造血幹細胞を検出するための方法および薬剤の詳細については本明細書の他の箇所に詳述されるが、そのようにして異常造血幹細胞が検出された被験体は、本明細書に記載される糖尿病および/または糖尿病に関連する疾患、障害および/もしくは症状の任意の治療または予防が好適に施される被験体であり得る。治療または予防の詳細は、異常造血幹細胞の検出レベル、検出部位、その他の被験体の状態（糖尿病の進行レベル、年齢、性別など）に応じて適宜調整され得る。このように、異常造血幹細胞の検出は、糖尿病および/または糖尿病に関連する疾患、障害および/もしくは症状の治療または予防の方針を左右する重要な要因であり得る。

[0112] 本開示の治療、予防および/または診断は、任意の被験体において実施することができる。一つの実施形態において、被験体は、哺乳動物、例えば、ヒト、マウス、モルモット、ハムスター、ラット、ネズミ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、マーモセット、サル、またはチンパンジー等である。具体的な実施形態において、被験体は、ヒトである。

[0113] (医薬品、剤型等)

本明細書に記載される異常幹細胞の抑制剤、遊走剤および異常幹細胞の検出剤は、種々の形態の組成物または医薬として提供され得る。

[0114] 本明細書に記載される異常幹細胞の抑制剤、遊走剤および異常幹細胞の検

出剤の投与経路は、糖尿病および/または糖尿病に関連する疾患、障害および/もしくは症状の治療、予防または検出に際して効果的なものを使用するのが好ましく、例えば、静脈内、皮下、筋肉内、腹腔内、または経口投与等であってもよい。投与形態としては、例えば、注射剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤等であってもよい。注射用の水溶液は、例えば、バイアル、またはステンレス容器で保存してもよい。また注射用の水溶液は、例えば生理食塩水、糖（例えばトレハロース）、NaCl、またはNaOH等を配合してもよい。また治療薬は、例えば、緩衝剤（例えばリン酸塩緩衝液）、安定剤等を配合してもよい。

[0115] 一般的に、本開示の組成物、医薬、抑制剤、遊走剤、検出剤等は、治療有効量の有効成分または検出可能量の検出手段、および薬学的に許容しうるキャリアもしくは賦形剤を含む。本明細書において「薬学的に許容しうる」は、動物、そしてより詳細にはヒトにおける使用のため、政府の監督官庁に認可されたか、あるいは薬局方または他の一般的に認められる薬局方に列挙されていることを意味する。本明細書において使用される「キャリア」は、治療剤または検出剤と一緒に投与する、希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指す。このようなキャリアは、無菌液体、例えば水および油であることも可能であり、石油、動物、植物または合成起源のものが含まれ、限定されるわけではないが、ピーナツ油、ダイズ油、ミネラルオイル、ゴマ油等が含まれる。医薬を経口投与する場合は、水が好ましいキャリアである。医薬組成物を静脈内投与する場合は、生理食塩水および水性デキストロースが好ましいキャリアである。好ましくは、生理食塩水溶液、並びに水性デキストロースおよびグリセロール溶液が、注射可能溶液の液体キャリアとして使用される。適切な賦形剤には、軽質無水ケイ酸、結晶セルロース、マンニトール、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、モルト、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール、カルメロースカルシウム

、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖脂肪酸トリグリセライド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、白糖、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩等が含まれる。組成物は、望ましい場合、少量の湿潤剤または乳化剤、あるいはpH緩衝剤もまた含有することも可能である。これらの組成物は、溶液、懸濁物、エマルジョン、錠剤、ピル、カプセル、粉末、持続放出配合物等の形を取ることも可能である。伝統的な結合剤およびキャリア、例えばトリグリセリドを用いて、組成物を座薬として配合することも可能である。経口配合物は、医薬等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリン・ナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準的キャリアを含むことも可能である。適切なキャリアの例は、E. W. Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences (Mark Publishing Company, Easton, U.S.A) に記載される。このような組成物は、患者に適切に投与する形を提供するように、適切な量のキャリアと一緒に、治療有効量の療法剤、好ましくは精製型のものを含有する。配合物は、投与様式に適していなければならない。これらのほか、例えば、界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等を含んでいてもよい。

[0116] 本開示の一実施形態において「塩」は、例えば、任意の酸性（例えばカルボキシル）基で形成されるアニオン塩、または任意の塩基性（例えばアミノ）基で形成されるカチオン塩を含む。塩類には無機塩または有機塩を含み、例えば、Berge et al., J. Pharm. Sci., 1977, 66, 1-19に記載されている塩が含まれる。また例えば、金属塩、アンモニウム塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩等が挙げられる。本開示の一実施形態において「溶媒和物」は、溶質および溶媒によって形成される化合物である。溶媒和物については例えば、J. Honig et al., The Van Nostrand Ch

emist' s Dictionary P650(1953)を参照できる。溶媒が水であれば形成される溶媒和物は水和物である。この溶媒は、溶質の生物活性を妨げないものが好ましい。そのような好ましい溶媒の例として、特に限定するものではないが、水、または各種バッファーが挙げられる。

[0117] 本開示において、医薬を投与する場合、種々の送達（デリバリー）系をともに使用することができ、そしてこのような系を用いて、本開示の抑制剤および/または遊走剤を適切な部位に投与することも可能である。このような系には、例えばリポソーム、微小粒子、および微小カプセル中の被包：受容体が仲介するエンドサイトーシスの使用；レトロウイルスベクターまたは他のベクターの一部としての療法核酸の構築などがある。導入法には、限定されるわけではないが、皮内、筋内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻内、硬膜外、および経口経路が含まれる。好適な経路いずれによって、例えば注入によって、ボラス（bolus）注射によって、上皮または皮膚粘膜裏打ち（例えば口腔、直腸および腸粘膜など）を通じた吸収によって、医薬を投与することも可能であるし、必要に応じてエアロゾル化剤を用いて吸入器または噴霧器を使用しうるし、そして他の生物学的活性剤と一緒に投与することも可能である。投与は全身性または局所であることも可能である。

[0118] 好ましい実施形態において、公知の方法に従って、ヒトへの投与に適応させた医薬組成物として、組成物を配合することができる。このような組成物は注射により投与することができる。代表的には、注射投与のための組成物は、無菌等張水性緩衝剤中の溶液である。必要な場合、組成物はまた、可溶化剤および注射部位での疼痛を和らげるリドカインなどの局所麻酔剤も含むことも可能である。一般的に、成分を別個に供給するか、または単位投薬型中で一緒に混合して供給し、例えば活性剤の量を示すアンプルまたはサシェなどの密封容器中、凍結乾燥粉末または水不含濃縮物として供給することができる。組成物を注入によって投与しようとする場合、無菌薬剤等級の水または生理食塩水を含有する注入ピンを用いて、分配することも可能である。組成物を注射によって投与しようとする場合、投与前に、成分を混合可能で

あるように、注射用の無菌水または生理食塩水のアンプルを提供することも可能である。

[0119] 本開示の組成物、医薬、遊走剤、抑制剤を中性型または塩型あるいは他のプロドラッグ（例えば、エステル等）で配合することも可能である。薬学的に許容しうる塩には、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来する遊離型のカルボキシル基とともに形成されるもの、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するものなどの遊離型のアミン基とともに形成されるもの、並びにナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、および水酸化第二鉄などに由来するものが含まれる。

[0120] 本開示の抑制剤および/または遊走剤の量は、障害または状態の性質によって変動しうるが、当業者は本明細書の記載に基づき標準的臨床技術によって決定可能である。さらに、場合によって、*in vitro*アッセイを使用して、最適投薬量範囲を同定するのを補助することも可能である。配合物に使用しようとする正確な用量はまた、投与経路、および疾患または障害の重大性によっても変動しうるため、担当医の判断および各患者の状況に従って、決定すべきである。しかし、投与量は特に限定されないが、例えば、1回あたり0.001、1、5、10、15、100、または1000 mg/kg体重であってもよく、それらいずれか2つの値の範囲内であってもよい。投与間隔は特に限定されないが、例えば、1、7、14、21、または28日あたりに1または2回投与してもよく、それらいずれか2つの値の範囲あたりに1または2回投与してもよい。投与量、投与間隔、投与方法は、患者の年齢や体重、症状、対象臓器等により、適宜選択してもよい。また治療薬は、治療有効量、または所望の作用を発揮する有効量の有効成分を含むことが好ましい。有効用量は、*in vitro*または動物モデル試験系から得られる用量-反応曲線から推定可能である。

[0121] 本開示の医薬組成物または治療剤もしくは予防剤はキットとして提供する

ことができる。

[0122] 特定の実施形態では、本開示は、本開示の組成物または医薬の1以上の成分が充填された、1以上の容器を含む、薬剤パックまたはキットを提供する。場合によって、このような容器に付随して、医薬または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関によって規定された形で、政府機関による、ヒト投与のための製造、使用または販売の認可を示す情報を示すことも可能である。

[0123] 本開示の治療薬、予防薬等の医薬等としての製剤化手順は、当該分野において公知であり、例えば、日本薬局方、米国薬局方、他の国の薬局方などに記載されている。従って、当業者は、本明細書の記載があれば、過度な実験を行うことなく、使用すべき量等の実施形態を決定することができる。

[0124] 本明細書において「または」は、文章中に列挙されている事項の「少なくとも1つ以上」を採用できるときに使用される。「もしくは」も同様である。本明細書において「2つの値」の「範囲内」と明記した場合、その範囲には2つの値自体も含む。

[0125] 本明細書において引用された、科学文献、特許、特許出願などの参考文献は、その全体が、各々具体的に記載されたのと同じ程度に本明細書において参考として援用される。

[0126] 以上、本開示を、理解の容易のために好ましい実施形態を示して説明してきた。以下に、実施例に基づいて本開示を説明するが、上述の説明および以下の実施例は、例示の目的のみに提供され、本開示を限定する目的で提供したのではない。従って、本開示の範囲は、本明細書に具体的に記載された実施形態にも実施例にも限定されず、特許請求の範囲によってのみ限定される。

実施例

[0127] 必要な場合、以下の実施例で用いる動物の取り扱いは、滋賀医科大学の動物実験ガイドラインに従って実施した。試薬類は具体的には実施例中に記載した製品を使用した。他メーカー（Sigma-Aldrich、和光純薬、ナカライ

、R&D Systems、USCN Life Science INC等)の同等品でも代用可能である。

[0128] 以下の実施例において、それぞれの略語は以下の意味を示す。

DM 糖尿病
STZ-DM ストレプトゾトシン誘導性糖尿病
KSL細胞 c-Kit陽性Sca-1陽性Lineage (系統マーカー)陰性細胞
SNCV 知覚神経伝達速度

[0129] (実施例1：糖尿病に関与する異常幹細胞の特定)

糖尿病に関与する異常細胞を特定するために、糖尿病モデルマウスから取得した幹細胞を分析した。

[0130] 方法

マウスおよび骨髄細胞の取得

試験には、C57BL/6Jマウス(野生型、日本クレア、大阪)を使用した。ストレプトゾトシン(STZ)(150mg/kg)(ナカライテスク、京都)の静脈内注射によって糖尿病を誘導して、2型糖尿病モデル(STZマウス)を作成した。8週齢のマウスから骨髄細胞を単離した。

[0131] FACS

Ficoll-Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden)を用いて全骨髄から単核細胞を単離した。

[0132] TNF- α およびCD106の発現を評価するために、単核細胞を、PE-Cy7コンジュゲート化ストレプトアビジン抗体(BD Biosciences, San Jose, CA)、ビオチンマウス系統パネル染色(BD Biosciences)、APCコンジュゲート化抗c-kit抗体(BD Biosciences)、APC-Cy7コンジュゲート化抗Ly6A/E抗体(Sca-1)(BD Biosciences)、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)コンジュゲート化抗CD106抗体(BD Biosciences)およびフィコエリトリン(PE)コンジュゲート化抗TNF- α 抗体(eBiosciences)と免疫反応させた。

[0133] プロインスリン発現を評価するために、単核細胞を、PE-Cy7コンジュゲート化ストレプトアビジン抗体、APCコンジュゲート化抗c-kit抗体、APC-Cy7コンジュゲート化抗Ly6A/E抗体 (Sca-1)、およびビオチンマウス系統パネルと反応させた後、BD Cytotfix/CytoPerm (BD Biosciences) で固定した。次に、ウサギ抗インスリンモノクローナル抗体 (Cell signaling technology) およびPEコンジュゲート化抗ウサギIgG抗体 (Cell signaling technology) を単核細胞に適用した。この染色の前に、死細胞を枯渇させるために、LIVE/DEAD固定可能死細胞ブルー染色キット (ThermoFisher Scientific Inc., 米国マサチューセッツ州ウォルサム) を使用した。

[0134] 染色の4時間後、FACS DIVAソフトウェア (BD Biosciences) でFACS Canto IIを使用して細胞を分析した。

[0135] 結果

プロインスリン陽性細胞はSTZ-DMマウス由来の単核細胞のKSL画分において見出されたが、非DMマウスのKSL画分では観察されなかった (図1)。同様に、TNF- α 陽性細胞も、STZ-DMマウス由来の単核細胞のKSL画分において見出されたが、非DMマウスのKSL画分では観察されなかった (図2)。CD106陽性細胞はSTZ-DMマウスおよび非DMマウス両方の単核細胞のKSL画分において見出されたが、STZ-DMマウスにおいてより多く発現していた (図3)。

[0136] 糖尿病マウスでは、KSL細胞において、TNF- α 陽性細胞、およびプロインスリン陽性細胞が存在し、CD106発現細胞が増大しており、これらの特徴を有する造血幹細胞が、糖尿病の慢性疾患としての特徴を出現させる原因となっていると考えられる。

[0137] (実施例2: 1型糖尿病に関与する異常幹細胞の特定)

実施例1と同様に、1型糖尿病モデルマウスから取得した幹細胞についても糖尿病に関与する異常細胞を特徴付けた。

[0138] 方法

マウスおよび骨髓細胞の取得

試験には、ICRマウス（日本クレア、大阪）およびNODマウス（日本クレア、大阪）を使用した。実施例1と同様に単核細胞を単離した。

[0139] 実施例1と同様に、単核細胞を、TNF- α 、CD106、c-kit、Sca-1、およびマウス系統（Lineage）について染色して、FACS分析を行った。

[0140] 結果

ICRマウスと比較して、NODマウスでは、KSL細胞の割合が約25%に減少していた（図4）。KSL細胞集団に含まれるTNF- α 陽性細胞、およびCD106発現細胞の割合は、ICRマウスと比較してNODマウスにおいて顕著に増大していた（図5）。

[0141] 1型糖尿病マウスのKSL細胞においても、TNF- α 陽性細胞、およびCD106発現細胞が増大しており、これらの特徴を有する造血幹細胞が、糖尿病の慢性疾患としての特徴を出現させる原因となっていると考えられる。

[0142] （実施例3：糖尿病に関与する異常幹細胞の細胞段階）

異常幹細胞が、造血幹細胞のどの段階の細胞であるかを試験した。

[0143] 方法

KSL細胞のサイドポピュレーション（SP）を、Goode11によって報告された方法に従ってFACSによって分析した（J Exp Med, 1996 Apr 1;183(4):1797-806; Nat Med, 1997 Dec;3(12):1337-45を参照のこと）。Hoechst 33342色素は細胞透過性がありDNAと結合するが、造血幹細胞ではこの色素が効率的に細胞外に排出され得る。この性質を用いて、この色素で染色した骨髓細胞を、紫外光（350nm）で励起し、Hoechst blueおよびHoechst redの2種類の光学フィルターで展開した場合、造血幹細胞分画が、染色されていない細胞集団（SP細胞）に含まれることが報告されている。全骨髓細胞を、色素としてHoechst 33342（Sigma-Aldrich Japan K.K.、東京、

日本) を用いて 37℃ で正確に 90 分間染色した。ゲート設定のために Hoechst 33342 陽性細胞を塩酸ベラパミル (Tocris bioscience、Bristol、UK) と共にインキュベートし、単核細胞を Ficolle-Plus によって分離した。次に、ビオチンマウス系統パネル染色した後、これらの細胞を、PE-Cy7 コンジュゲート化ストレプトアビジン、APC コンジュゲート化抗 c-kit、APC-Cy7 コンジュゲート化抗 Ly6A/E (Sca-1)、および PE コンジュゲート化抗 TNF- α または FITC コンジュゲート化抗 CD106 とインキュベートした。死細胞枯渴のために、ヨウ化プロピジウム (Sigma-Aldrich) を試料に添加して死細胞を除去し、FACS DIVA ソフトウェア (BD Biosciences) を用いた FACS Aria Fusion を用いた分析を行った。Hoechst 33342 で染色した細胞を 350 nm の紫外光で励起し、450 BP20 (450/20 nm バンドパスフィルター) (Hoechst blue) および 675 EFLP (675 nm ロングパスエッジフィルター) (Hoechst red) の 2 種類の光学フィルターを使用した。

[0144] 結果

非 DM マウスと比較して STZ-DM マウスにおいて KSL 細胞中の SP 細胞の割合が増大し、非 SP 細胞の割合が減少していた (図 6)。非 DM および STZ-DM のいずれのマウスの SP 細胞においても CD106 陽性細胞も TNF- α 陽性細胞も検出されなかった (図 7 b、d)。他方、非 SP 細胞においては、非 DM 由来の TNF- α 陽性細胞は検出されなかったが、STZ-DM 由来の TNF- α 陽性細胞が検出され、非 DM マウスと比較して STZ-DM マウスにおいてより多くの CD106 陽性細胞が観察された (図 7 a、c)。そのため、CD106 陽性細胞および TNF- α 陽性細胞は、STZ-DM 中の KSL 細胞の非 SP 画分に存在する。

[0145] 造血幹細胞の異常を特徴付ける CD106 陽性細胞および TNF- α 陽性細胞は、KSL 細胞中の非 SP 細胞 (短期造血幹細胞: ST-HSC) に含まれていたが、より早期の分化段階にある KSL 細胞中の SP 細胞 (長期造

血幹細胞：L T-H S C)には含まれていなかった。このことは、糖尿病におけるH S Cの異常は幹細胞の中でも前駆細胞の段階でとどまって、いわゆる「幹細胞中の幹細胞」には異常が生じておらず、前駆細胞を除去することで、糖尿病およびその関連疾患の治療が可能であることを示唆し得る。「幹細胞中の幹細胞」が治療対象となると、骨髄移植が必要であり得るが、前駆細胞の除去で治療が可能となると、薬物治療が可能であると考えられる。

このように、糖尿病において見出される異常幹細胞はS T-H S Cに存在し得ることが明らかとなった。

[0146] (実施例4：異常幹細胞のさらなる特徴付け)

糖尿病に関与する異常幹細胞のさらなる特徴付けを行った。

[0147] 方法

実施例1と同様の非DMおよびS T Z-DMマウスのF A C S s o r t によって得られたK S L細胞からR N Aを抽出し、Q T-PCR法を用いてヒストン脱アセチル化酵素遺伝子群(H d a c s)の遺伝子発現を解析した。

[0148] 結果

結果を図8に示す。非DMマウスと比較して、S T Z-DMマウスでは、H d a c 3、H d a c 4、H d a c 8、およびH d a c 9のm R N A発現が有意に増加していることが明らかとなった。

[0149] 糖尿病のK S L細胞では、ヒストン修飾などにより遺伝子発現を調節するのに重要なエピゲノム関連遺伝子(H d a c s)の発現が増加していたことから、高血糖は幹細胞に対して遺伝子レベルで異常な性質を授けていることが考えられた。一過性の高血糖に暴露された細胞は正常血糖値の環境下に戻しても、高血糖で生じた細胞の異常が維持されることが報告されているが(E l-Osta et.al. J Exp Med. 2008 Sep 29;205(10):2409-17)、このことから、K S L細胞で生じたヒストン脱アセチル化酵素遺伝子の発現増加が、C D 1 0 6やT N F- α 、プロインスリン陽性細胞の出現に関与し得ると考えられる。これを明らかにするために、H d a c 阻害剤(例えば、トリ

コスタチンA)により治療が可能かどうかを検討することが考えられる。

[0150] (実施例5：異常幹細胞による糖尿病発症)

上記で見出された異常幹細胞が、糖尿病を引き起こす原因となるかを試験した。

[0151] 方法

非DMまたはSTZ-DM KSL細胞を正常血糖マウスに移植する試験の概略を図9に示す。GFP-Tgマウス(The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)に対して、実施例1と同様にSTZ処置(STZ-DM GFP)、または静脈内クエン酸緩衝液注射の対照処置(非DM GFP)を施した。3ヵ月後、非DMマウスまたはSTZ-DMマウスのそれぞれから得られたKSL細胞を、9 Gyの致死量の放射線を照射した正常血糖野生型C57BL/6Jマウス(クレア、大阪)に移植した(それぞれ、非DM由来KSL-TまたはSTZ-DM由来KSL-T)(図10、左)。移植から3ヶ月後の血糖値を観察した(非DM由来KSL-T(n=9)、STZ-DM由来KSL-T(n=10))。移植から3ヶ月後に坐骨神経におけるSNCVを測定した((非DM由来KSL-T(n=5)、STZ-DM由来KSL-T(n=6))(図10、右)。移植から3ヶ月後にそれぞれのマウスから後根神経節(DRG)を取得し、核、GFP、MAP2、プロインスリン、およびTNF- α (PEコンジュゲート化)について免疫蛍光染色を行った(図11、図12、図13)。

[0152] 上記のSNCV測定は以下の手順で行った。30℃~32℃において麻酔下(ペントバルビタールナトリウム、5mg/kg i.p.)でMedelec Sapphire EMG(Medelec, Woking, UK)を使用して、マウスの感覚神経伝導試験を行った。大腿部の左背面表面から皮膚を切り取り、坐骨神経を露出させた。感覚神経活動電位(SNAP)を記録し、感覚神経伝導速度(SNVC)を、刺激部位から記録部位までの距離をSNAPの初期潜時で割ることで算出した。

[0153] 結果

STZ-DM由来KSL-TマウスのKSL細胞画分中にはTNF- α やプロインスリンなど異常幹細胞の特徴が見出されたが、非DM由来KSL-TマウスのKSL細胞画分は異常幹細胞の特徴は見出されなかった。

[0154] 糖尿病マウスにおいて見出された異常なKSL細胞を正常マウスに移植した結果、血糖値が正常にもかかわらず糖尿病性神経障害類似症状を呈した。このことから糖尿病マウスの血糖値は正常化された場合であっても、異常幹細胞は消失するわけではないことが明らかとなった。このことは異常細胞が異常なまま骨髓内に定着した、すなわち病的幹細胞として定着したことを示す。また、その異常幹細胞から派生した細胞が神経組織に遊走し、神経障害を発症させたと理解されることから、この幹細胞が残っている限り、糖尿病は血糖コントロールを行っても治らないことが明らかになった。さらに、この糖尿病マウスの異常幹細胞を含む骨髓を正常マウスに移植したところ、耐糖能障害が観察され、骨髓移植により糖尿病の本体である糖代謝異常も再現された。

[0155] このことは、高血糖を改善しても糖尿病および糖尿病合併症が治らないという臨床症状と合致するものであり、糖尿病の究極の治療標的は異常な造血幹細胞であることを示唆する。このように、糖尿病の造血幹細胞を正常マウスに移植することによって、糖代謝異常並びに糖尿病神経障害を正常マウスに再現することができた。

[0156] (実施例6：ヒト糖尿病患者における異常幹細胞の特徴)

滋賀医科大学附属病院 集中治療室に入室した患者を調査した。試料を取得した被験者は、糖尿病であると診断された患者(3名)(男性3/女性0、平均年齢72.0 \pm 14.2)、および健常な被験者(4名)(男性3/女性1、平均年齢76.5 \pm 8.5)であった。

[0157] これらの被験者から血液試料を取得し、血液試料からRNAを抽出した。具体的には、血液を1.5ml採取し、DNAse(Qiagen, Hilden, ドイツ)にてDNAを分解した後、QIAamp RNA blood mini kit(Qiagen, Hilden, ドイツ)を用いてRNAを抽出した。得られ

たRNAからSuperScript (登録商標) III First-Strand Synthesis System (Invitrogen/ThermoFisher scientific, MA, アメリカ) を用いてcDNAを作製した。Power SYBR Green PCR Master Mix in a real-time PCR system (Applied Biosystems/ThermoFisher scientific, MA, アメリカ) を用いて定量的PCRを行い、発現しているmRNAを定量化した。2群間の比較はt検定にて行った。結果を図14に示す。

[0158] マウスの結果と同様に、ヒトにおいても、糖尿病患者においてインスリン、TNF- α 、およびCD106の発現の上昇傾向が確認された。また、糖尿病患者においてCD34の発現の上昇傾向が確認されたが、ヒトにおいてCD34は幹細胞の特徴を表すため、マウスの結果と同様に、ヒトにおいても、糖尿病患者において異常幹細胞が存在することが示唆された。

[0159] (実施例7：ヒト糖尿病患者骨髄における異常細胞)

ヒト糖尿病患者においても骨髄に異常細胞が存在することを確認した。

[0160] 滋賀医科大学に入院した2型糖尿病(DM)患者において、2000年1月1日~2010年12月31日の間に病理解剖した例について、骨髄におけるプロインスリン陽性細胞の出現の有無を検討した。組織は、滋賀医科大学解剖学センターでパラフィンに包埋した。パラフィン包埋試料の5 μ m厚の切片をアビジン-ビオチンペルオキシダーゼ複合体(ABC)法およびジアミノベンジジン(DAB)-ニッケル反応を用いて免疫組織化学のために処理した。キシレンおよびアルコール中で脱パラフィン化した後、切片をマイクロ波(10mmol/Lクエン酸緩衝液中、pH6.0、0.5kWで10分間)で処理した後、プロインスリンに対する抗体(マウスモノクローナル、Abcam、UK)を0.3%Triton X-100(PBST)を含む0.1%PBS中で1:1,000希釈したもので一晩インキュベートした後、4 $^{\circ}$ Cで免疫組織化学のための処理を行った。DAB-ニッケル反応後、切片を核ファストレッド溶液でカウンター染色した。

[0161] 結果を図15に示す。DMなしの患者由来の骨髄細胞ではプロインスリン

発現は観察されなかったが、DMありの患者由来の骨髄細胞ではプロインスリン発現が観察された。マウスにおいて観察された異常幹細胞の知見はヒトにおいても適用可能だと考えられる。

[0162] (実施例8：STZ-DMマウスの骨髄移植治療)

骨髄移植によってSTZ-DMマウス(2型糖尿病モデル)における糖尿病を治療した。

[0163] 処置の概要を図16に示す。C57BL/6Jマウス(野生型、日本クレア、大阪)に対してストレプトゾトシン(150mg/kg)を尾静脈投与し糖尿病を発症させたマウスに対して、4週間効果が持続するインスリンペレット(LINSHIN CANADA, INC., Cat No: Pr-1-B)投与によって血糖値を正常化させた後、9Gy放射線照射を行った。このマウスに、非糖尿病マウスから採取した全骨髄細胞(4×10^6 個/100 μ l)、または糖尿病マウスから採取した全骨髄細胞(4×10^6 個/100 μ l)を移植して骨髄移植マウスを作製した。インスリンペレット投与の1週間以内に9Gy放射線を照射し、その当日に骨髄移植をした。また、投与しても高血糖が維持されるままとなるブランクペレットを投与したマウスに対して、9Gy放射線照射を行い、非糖尿病マウスから採取した全骨髄細胞(4×10^6 個/100 μ l)、または糖尿病マウスから採取した全骨髄細胞(4×10^6 個/100 μ l)を移植した対照骨髄移植マウスを作製した。インスリンペレットおよびブランクペレットは、骨髄移植前の投与のみで、追加投与はしなかった。

[0164] STZ投与前、糖尿病発症後、骨髄移植時とそれ以降1週間ごとに8週目まで血糖値および体重を測定した。また、骨髄移植8週間後のマウスを0.1M PBS中4%PFAの液で灌流固定し、採取した膵臓組織を0.1M PBS中15%スクロースの液に一晩浸漬したのち、クリオスタットで8 μ mの凍結切片を作製した。凍結切片をPBS(-)で10分間3回洗浄したのち、切片の内因性ペルオキシダーゼを不活性化するために0.3%過酸化水素液(PBS(-)中0.3% H_2O_2)中で30分間室温で反応させ、P

BS (-) で5分間3回洗浄した。その後、非特異反応を防止するため、切片を0.3% Triton Xを補充したPBS (-) 中5%正常ヤギ血清と反応させ、1時間室温でブロッキングした。ブロッキング後、1次抗体(抗インスリン抗体: CST社または抗グルカゴン抗体: CST社) と4℃で一晩反応させた。その後、PBS (-) で5分間3回洗浄し、ImmpRESS reagent (Vector laboratory) 中で室温にて30分間反応させ、さらに洗浄した。その後、DAB発色を行い、対比染色として、ヘマトキシリンで核染色を行ったのち、脱水・封入を行った。作製した切片を顕微鏡下で観察し、膵島をランダムに5~8個程度選び、膵島の大きさに対するインスリン陽性細胞の割合をImage J ソフトウェアで算出した。また、各実験群のマウスを灌流固定後、解剖し、胸腺を採取した。

[0165] インスリンペレットを投与して非糖尿病骨髄を移植したマウスでは、インスリンペレットの効果が減弱した後も、正常血糖値を維持し続けたが、インスリンペレットを投与して糖尿病骨髄を移植したマウスでは、移植後死亡する個体が3/5を占め、たとえ生存しても、インスリンペレットの効果減弱後は血糖値の上昇が見られた(図17)。なお、インスリンペレットを投与して糖尿病骨髄を移植したマウスでは、血糖値が高値で測定不能な例、および衰弱が著しい例では動物愛護の面から安楽死を選択した。実験期間中に、インスリンペレットおよび糖尿病骨髄移植群において2匹のマウスを安楽死させ、ブランクペレットおよび糖尿病骨髄移植群において2匹のマウスを安楽死させた。また、ブランクペレットを投与して骨髄移植したマウスでは、非糖尿病骨髄細胞を移植しても、血糖値は正常化せず、高血糖を維持し続けた(図17)。

[0166] 膵臓のインスリンDAB染色(図18)の結果、インスリンペレット投与した非糖尿病骨髄移植群では、STZ糖尿病群に比べてインスリン陽性細胞の割合が増加し、インスリン産生が改善していることが示唆された。ブランクペレット投与した非糖尿病骨髄移植群、インスリンペレット投与した糖尿病骨髄移植群、ブランクペレット投与した糖尿病骨髄移植群はいずれもイン

スリン産生の改善を示さなかった。

[0167] 膵臓のグルカゴンD A B染色（図19）の結果、インスリンペレット投与した非糖尿病骨髄移植群では、S T Z糖尿病群に比べてグルカゴン陽性細胞の割合が減少し、グルカゴン産生が非糖尿病状態まで改善していた。ブランクペレット投与した非糖尿病骨髄移植群、インスリンペレット投与した糖尿病骨髄移植群、ブランクペレット投与した糖尿病骨髄移植群では、いずれもS T Z糖尿病のグルカゴン陽性細胞の割合と同等で、グルカゴン産生は改善されていなかった。

[0168] 採取した胸腺の大きさを比較したところ（図20）、糖尿病マウスでは非糖尿病と比較して胸腺が著しく萎縮していた。一方、インスリンペレットを投与して非糖尿病マウスの骨髄を移植したものは非糖尿病マウスと同等に胸腺の大きさが回復し、それ以外のマウスでは改善が見られなかった。

[0169] （実施例9：S T Z - D Mマウスの薬物治療）

幹細胞遊走剤およびH D A C阻害剤を使用してS T Z - D Mマウスにおける糖尿病を治療した。

[0170] 処置の概要を図21に示す。実施例8と同様に野生型マウスに対してストレプトゾトシン（150mg/kg）を尾静脈投与し糖尿病を発症させたマウスに対して、インスリンペレット投与によって血糖値を正常化させた。その後、幹細胞遊走剤としてプレリキサファー（abcam、製品番号：ab120718）（5mg/kg）とC X C L 2アゴニスト（PEPROTECH、製品番号：250-15）（0.1mg/kg）との混合液100μlを生理食塩水と共に皮下注射した直後、200μlのトリコスタチンA（TCI、製品番号：T2477）（1mg/kg）を尾静脈投与した。対照としてブランクペレット投与で高血糖が持続した状態でプレリキサファー（5mg/kg）およびC X C L 2アゴニスト（0.1mg/kg）の混合液100μlを生理食塩水と共に皮下注射した直後、200μlのトリコスタチンA（1mg/kg）を尾静脈投与する群と、インスリンペレット投与のみで血糖値を正常化する群とを作製した。マウスへの投与は、3日ごとに実施し、その都度血糖値と体重を測定した。治療開

始後 8 週間後に、灌流固定を実施した。

[0171] 実施例 8 と同様に、血糖値および体重を測定し、膵臓組織の抗体染色を行い、胸腺を採取した。

[0172] 結果

図 2 2 に示すように、インスリンペレットを投与し、幹細胞遊走剤およびトリコスタチンで治療したマウスでは、インスリンペレットの効果が減弱した後も、正常血糖値を維持し続けたが、インスリンペレットのみを投与した群では、効果の減弱と同時に血糖値が上昇し始め、8 週目では、インスリンペレットを投与し、幹細胞遊走剤およびトリコスタチンで治療したマウスの血糖値は、インスリンペレットのみを投与した群の血糖値と比べて、有意に低くなった。なお、ブランクペレットを投与してトリコスタチンで治療したマウスでは、血糖値が高値で測定不能な例、および衰弱が著しい例では動物愛護の面から安楽死を選択した。その結果、6 週目以降は、ブランクペレットおよびトリコスタチン処置群のマウスは 1 匹だった。

[0173] 膵臓のインスリン D A B 染色 (図 2 3) の結果、インスリンペレットを投与し、幹細胞遊走剤およびトリコスタチンで治療した群では、S T Z 糖尿病群やインスリンペレットのみの投与群、ブランクペレットを投与し、幹細胞遊走剤およびトリコスタチン治療した群と比べて、有意にインスリン陽性細胞の割合が増加し、インスリン産生が改善されていることが示唆された。インスリンペレットのみの投与群、ブランクペレットを投与し、幹細胞遊走剤およびトリコスタチンで治療した群は、S T Z 投与群とインスリン陽性細胞の割合がほとんど変わらず、改善は見られなかった。

[0174] 膵臓のグルカゴン D A B 染色 (図 2 4) の結果、インスリンペレットを投与し、幹細胞遊走剤およびトリコスタチンで治療した群では、S T Z 糖尿病群やインスリンペレットのみの投与群、ブランクペレットを投与し、幹細胞遊走剤およびトリコスタチンで治療した群と比べて、有意にグルカゴン陽性細胞の割合が減少し、グルカゴン産生が改善されていることが示唆された。インスリンペレットのみの投与群、ブランクペレットを投与し、幹細胞遊走

剤およびトリコスタチンで治療した群は、グルカゴン陽性細胞の割合がSTZ糖尿病群とほとんど変わらず、改善は見られなかった。

[0175] 採取した胸腺の大きさを比較したところ（図25）、インスリンペレットのみの投与群、ブランクペレットを投与し、幹細胞遊走剤およびトリコスタチンで治療した群では胸腺が著しく萎縮していたが、インスリンペレットを投与し、幹細胞遊走剤およびトリコスタチンで治療した群では胸腺の大きさが回復していた。

[0176] （実施例10：NODマウスの骨髄移植治療）

骨髄移植によってNODマウス（1型糖尿病モデル）における糖尿病を治療する。

[0177] 処置の概要を図26に示す。高血糖を呈したNODマウスに対して、インスリンペレット投与によって血糖値を正常化させた後、9 Gy放射線照射を行い、対照マウスであるICRマウスから採取した全骨髄細胞（ 4×10^6 個/100 μ l）、または上記とは別の高血糖を呈したNODマウスから採取した全骨髄細胞（ 4×10^6 個/100 μ l）を移植する骨髄移植マウスを作製する。また、ブランクペレットを投与したNODマウスに対して、9 Gy放射線照射を行い、ICRマウスから採取した全骨髄細胞（ 4×10^6 個/100 μ l）、または高血糖を呈したNODマウスから採取した全骨髄細胞（ 4×10^6 個/100 μ l）を移植する対照骨髄移植マウスを作製する。なお、インスリンペレットまたはブランクペレットは、骨髄移植前の投与のみで、追加投与はしない。

[0178] 実施例8と同様に、血糖値および体重を測定し、膵臓組織の抗体染色を行い、胸腺を採取する。

[0179] 血糖値の変化図を図27に示す。インスリンペレット投与した非糖尿病骨髄移植群においてのみ、インスリンペレットの効果終了後も血糖値が低く維持されると考えられる。膵臓凍結切片のインスリンDAB染色の結果（一部実際の画像）を図28に示し、グルカゴンDAB染色の結果を図29に示す。インスリンペレット+非糖尿病骨髄移植の処置群のみにおいて、インスリ

ンまたはグルカゴン陽性細胞の割合が非糖尿病と同様に回復する傾向が観察されると予想される。摘出胸腺のサイズ比較を図30に示す。糖尿病未発症のNODマウスでは胸腺の萎縮はわずかにとどまっているが、糖尿病を発症した瞬間に激しい萎縮が見られた。インスリンペレット＋非糖尿病骨髄移植の処置群のみ非糖尿病と同様の胸腺サイズが観察されると予想される。

[0180] インスリンペレット＋非糖尿病骨髄移植の処置により糖尿病が治療されると予想される。

[0181] (実施例11：NODマウスにおける糖尿病治療)

幹細胞遊走剤およびHDAC阻害剤を使用してNODマウスにおける糖尿病を治療する。

[0182] 処置の概要を図31に示す。高血糖を呈したNODマウスに対して、インスリンペレット投与によって血糖値を正常化させた後、幹細胞遊走剤としてプレリキサファー(5mg/kg)とCXCL2アゴニスト(0.1mg/kg)の混合液を生理食塩水と共に100 μ l、皮下注射した直後、200 μ lのトリコスタチンA(1mg/kg)を尾静脈投与する。対照としてブランクペレット投与で高血糖が持続した状態でプレリキサファー(5mg/kg)とCXCL2アゴニスト(0.1mg/kg)の混合液を生理食塩水と共に100 μ l、皮下注射した直後、200 μ lのトリコスタチンA(1mg/kg)を尾静脈投与する群と、インスリンペレット投与のみで血糖値を正常化する群を作成した。マウスへの投与は、3日ごと実施し、その都度血糖値と体重を測定する。治療開始後8週間後に、灌流固定を実施する。

[0183] 実施例8と同様に、血糖値および体重を測定し、膵臓組織の抗体染色を行い、胸腺を採取する。

[0184] 血糖値の変化図を図31に示す。インスリンペレットを投与し、幹細胞遊走剤およびトリコスタチンで治療した群においてのみ、インスリンペレットの効果終了後も血糖値が低く維持されると考えられる。膵臓凍結切片のインスリンDAB染色の結果(一部実際の画像)を図32に示し、グルカゴンDAB染色の結果を図33に示す。インスリンペレットを投与し、幹細胞遊走

剤およびトリコスタチンで治療した群のみにおいて、インスリンまたはグルカゴン陽性細胞の割合が非糖尿病と同様に回復する傾向が観察されると予想される。摘出胸腺のサイズ比較を図35に示す。インスリンペレットを投与し、幹細胞遊走剤およびトリコスタチンで治療した群のみ非糖尿病と同様の胸腺サイズが観察されると予想される。

[0185] インスリンペレット+幹細胞遊走剤およびH D A C阻害剤の処置により糖尿病が治療されると予想される。

[0186] (実施例12:ヒトへの適用)

ヒト糖尿病患者において骨髓由来異常造血幹細胞を同定し、それを標的として糖尿病を治療する。

[0187] 研究計画1. 糖尿病患者における骨髓由来異常造血幹細胞の同定
(対象)

非糖尿病群については、滋賀医科大学および附属病院職員において、耐糖能障害の既往がなく、現在も糖尿病治療を受けていないボランティアを募り、随時血糖値およびH b A 1 cを測定し、随時血糖値 $<140\text{mg/dl}$ かつH b A 1 c $<6.0\%$ を満たした者を非糖尿病と定義し、コントロール群として20名登録する。糖尿病群については、H b A 1 cが 6.5% 以上もしくは糖尿病治療中と定義し、滋賀医科大学附属病院糖尿病内分泌内科外来通院患者の中から電子カルテより非糖尿病群と性・年齢をマッチさせたリストを作成し、無作為に80名(1型糖尿病40名、2型糖尿病40名)を登録する。

[0188] (研究方法)

被験者の問診を行い、身長、体重を測定し、血液検査、尿検査を行い、糖尿病の有無を判定する。採取した血液から単核細胞を抽出し、C D 3 4標識骨髓前駆細胞を採取して固定し、免疫染色により形態や発現タンパク質を同定する。また、m R N Aを抽出した後、c D N Aを調製し、定量的P C Rによりm R N Aの発現量を定量する。具体的には、末梢血中のC D 3 4陽性かつC D 1 0 6陽性(C D 3 4 / C D 1 0 6)骨髓前駆細胞において、T N F

- α mRNAおよびインスリンmRNAの発現量などを測定する。これらの細胞におけるタンパク質の発現の有無も測定する。また、糖尿病患者における糖尿病合併症の有無と血糖コントロールとの関連性を分析する。代表的な合併症である糖尿病性神経障害、網膜症、腎症、脂肪肝、脂質異常症の有無ならびに大血管障害を知るために、神経伝導速度検査、心電図R-R間隔検査、眼底網膜検査、尿中アルブミン排出率、腹部CTを用いた腹腔内脂肪量の定量、血液脂質検査、心電図、頸動脈エコー検査、下肢動脈エコー検査を行う。

[0189] (結果)

(1) 非糖尿病群ならびに2型糖尿病群では末梢血中のCD34/CD106骨髄前駆細胞において、TNF- α mRNAおよびインスリンmRNAの発現が見られるが、2型糖尿病群での発現量が増加する。一方、1型糖尿病群ではCD34/CD106骨髄前駆細胞において、TNF- α mRNAの発現は非糖尿病に比較して増加するが、インスリンmRNAは全く発現しない。

(2) 非糖尿病群では末梢血中のCD34/CD106骨髄前駆細胞において、TNF- α およびプロインスリンのタンパク質を発現している細胞はほとんどない。これに比し、2型糖尿病ではどちらも発現している細胞が増加する。一方、1型糖尿病ではTNF- α タンパク質を発現する細胞は増加するが、プロインスリンを発現している細胞は皆無である。

(3) 1型糖尿病患者において、代表的な合併症である糖尿病性神経障害、網膜症、腎症、脂肪肝、脂質異常症の発症は末梢血中のCD34/CD106骨髄前駆細胞におけるTNF- α タンパク質陽性細胞の増加に関連する。一方、2型糖尿病患者においては糖尿病性神経障害、網膜症、腎症、脂肪肝、脂質異常症の発症は末梢血中のCD3/CD106骨髄前駆細胞におけるTNF- α タンパク質陽性細胞の増加ならびにプロインスリン陽性細胞の増加に関連する。

[0190] (考察と結論の予想)

1) 非糖尿病ではわずかではあるが血中にインスリン mRNA および TNF- α mRNA を発現する CD34 / CD106 骨髄前駆細胞が存在する。この細胞は膵島および胸腺にホーミングした際に自己抗原を提示する内皮細胞として機能しているのではないかと想定される。

2) 2型糖尿病では高血糖によりこの細胞（インスリン mRNA および TNF- α mRNA を発現する CD34 / CD106 骨髄前駆細胞）が骨髄内および血中にある状態で、すでにプロインスリンならびに TNF- α タンパク質を発現すると同時に、異常な機能を持った血管内皮として分化したり、異常な細胞融合能を持つことによりインスリン抵抗性や様々な合併症の原因となるのではないかと想定される。本来なら、この細胞は異常細胞であることから、胸腺由来の細胞障害性 T 細胞に異常細胞として認識され、破壊される運命にある。しかし、胸腺にホーミングしたプロインスリンならびに TNF- α タンパク質を同時に発現する胸腺内皮細胞の働きで、これを攻撃するはずの細胞障害性 T 細胞は負の選択を受け、その結果、骨髄、血中、膵島、さらに様々な臓器に遊走した全てのプロインスリンならびに TNF- α タンパク質を発現する異常細胞は自己細胞として認識され、T 細胞による破壊を免れることになる。そのため、異常細胞が発現する TNF- α により、インスリン分泌障害、インスリン抵抗性が生じ、合併症が出現する。また、CD34 / CD106 / TNF- α あるいは CD34 / CD106 / プロインスリン陽性細胞は骨髄内で幹細胞として残存し続けるので糖尿病は自然寛解することはないのである。

3) 1型糖尿病では骨髄より生じる B 細胞の機能障害により、膵島関連の自己抗原に対して自己抗体（抗 GAD 抗体、抗 IA-2 抗体、抗インスリン抗体など）が生じている。この自己抗体は膵島を攻撃するだけでなく、胸腺の自己抗原提示細胞も攻撃している。この自己抗原提示細胞とは先ほど言及した、膵島ならびに胸腺の血管内皮細胞も含まれる。自己抗体による自己の細胞の攻撃は慢性に持続し傷害と補修が繰り返されている。しかし、ウイルス感染症や様々なストレスなどにより急激な炎症が惹起されると、抗体による

傷害がピークに達し、胸腺内の自己抗原提示細胞が完全に壊されてしまう。この時点で自己抗原である膵島関連抗原に反応する細胞障害性T細胞の攻撃により膵島は急激に破壊され、インスリン分泌が低下する。これにより血糖値が上昇する。この血糖上昇により2型同様に骨髄内ではCD34/CD106陽性プロインスリンならびにTNF- α 陽性細胞が作られる。しかし、プロインスリンを産生する異常細胞もことごとく細胞障害性T細胞に破壊されることになり、インスリン、プロインスリンを産生する細胞は生体から完全に消失する。しかし、CD34/CD106/TNF- α 異常造血幹細胞は骨髄内に残存し続け、胸腺の破壊、膵島の破壊は永続することになる。

[0191] 研究計画2. 骨髄由来異常造血幹細胞を標的とした糖尿病の治療

(対象)

研究計画1に従い、滋賀医科大学ならびに共同研究施設において、糖尿病患者280名(1型糖尿病140名、2型糖尿病140名)を登録する。1型、2型いずれにおいても糖尿病は一旦発症すると治癒することはないとされている。しかし、1型糖尿病においてはインスリンを使用した厳重な血糖管理により一時的な寛解を示すハネムーン期が出現することが知られている。その期間は報告により様々ではあるが、一般的には1ヶ月から13年(Wallensteen M, Dahlquist G, Persson B, Landin-Olsson M, Lernmark A, Sundkvist G, Thalme B (1988) Factors influencing the magnitude, duration, and rate of all of β -cell function in type 1 (insulin-dependent) diabetic children followed for two years from their clinical diagnosis. Diabetologia 31: 664-669)との報告がある。従って、本治療計画を施行したことで、ハネムーン期が発来したのか、疾患自体が治癒したのかの区別が困難となることが考えられる。また、2型糖尿病においても、厳格なコントロールによってインスリン抵抗性は軽度になることが報告されているH.E. Lebovitz (2001) Insulin resistance: definition and consequences. Clin Endocrinol Diabetes 109 Suppl 2: S135-S148)。これにより、インスリンや経口剤などの

治療薬量、ならびに内因性のインスリン分泌能の改善が見られる可能性がある。従って、1型および2型のどちらにおいても、今回の治療研究では、インスリン単独により治療する群と新規治療法をする群を作製し、比較検討する必要がある。

[0192] (研究方法)

被験者の問診を行い、身長、体重を測定し、血液検査、尿検査を行い、糖尿病の有無を判定する。採取した血液から単核細胞を抽出し、CD34標識骨髓前駆細胞を採取して固定し、免疫染色により形態や発現タンパク質を同定する。また、mRNAを抽出した後、cDNAを調製し、定量的PCRによりmRNAの発現量を定量する。具体的には、末梢血中のCD34陽性かつCD106陽性骨髓前駆細胞において、TNF- α mRNAおよびインスリンmRNAの発現量を測定する。これらの細胞におけるタンパク質の発現の有無も測定する。また、糖尿病患者における糖尿病合併症の有無と血糖コントロールとの関連性を分析する。代表的な合併症である糖尿病性神経障害、網膜症、腎症、脂肪肝、脂質異常症の有無ならびに大血管障害を知るために、神経伝導速度検査、心電図R-R間隔検査、眼底網膜検査、尿中アルブミン排出率、腹部CTを用いた腹腔内脂肪量の定量、血液脂質検査、頸動脈エコー検査、下肢動脈エコー検査を行う。

[0193] 1型例を無作為に20例ずつの7群、2型例を20例ずつの7群に、それぞれ分類する。1型および2型において、それぞれ20例はインスリン治療のみで3ヶ月間コントロールし（コントロール群）、残りの120例のうち60例はインスリン治療を開始すると同時に以下の2種類の治療をそれぞれ20例について開始する（遊走剤なしの治療群）。1）抗TNF- α 抗体（アダリムマブ40mgあるいはインフリキシマブ3mg/kg）、2）トリコスタチン（0.5mg/kg）を、1週間に1回静脈内投与し、これらを12週間継続する。残りの60例はインスリン治療を開始すると同時に以下の2種類の治療をそれぞれ20例について開始する（遊走剤ありの治療群）。細胞遊走剤であるGro β （100 μ g/kg）+プレリキサフォル（0.

24 mg/kg) とともに、1) 抗TNF- α 抗体 (アダリムマブ40 mg あるいはインフリキシマブ3 mg/kg)、2) トリコスタチン (0.5 mg/kg) を、1週間に1回静脈内投与し、これらを12週間継続する。

[0194] (治療効果の判定方法)

患者は1日6回の自己血糖測定を行う。血糖コントロールの目標はインスリン治療により食前血糖値140 mg/dl以下、食後2時間血糖値200 mg/dl以下とする。コントロール基準を満たすように積極的にインスリン量の増減を図り、最終的に12週目における血糖コントロールのためのインスリン必要量をもって、治療研究期間を終了する。治療効果の判定は、治療前、治療終了時、治療終了後3、6、9、12ヶ月目において、下記の判定項目を治療効果として追跡判定する。

[0195] (判定項目)

(A) 異常造血幹細胞を消失させる効果

末梢血液中にあるCD34/CD106骨髄前駆細胞中における発現タンパク質 (CD34、プロインスリン、TNF- α 、CD106等) および発現遺伝子 (CD34 mRNA、インスリンmRNA、TNF- α mRNA、CD106 mRNA等) を定量する。

(B) 糖尿病を治癒させる効果

血糖値、HbA1c、尿中CPR、脂質、グルカゴン負荷試験を用いたインスリン分泌能を治療前後で行う。膵島関連抗体の測定ならびにその消失の有無を明らかにする。

(C) 合併症に対する治療効果

代表的な合併症として糖尿病性神経障害、網膜症、腎症、脂肪肝、脂質異常症、大血管障害の有無ならびに変化を治療前後で比較検討する。

[0196] (結果)

1) インスリン単独での治療により以下のことが明らかとなる。

(A) 1型糖尿病、2型糖尿病ともに、異常造血幹細胞は消失しない。

(B) 糖尿病を治癒させる効果は見られない。

(C) 合併症に対する治療効果は多少見られるが、治癒することはない。

[0197] 2) 細胞遊走剤の有無にかかわらず新規治療により以下のことが明らかとなる。

(A) 1型糖尿病、2型糖尿病ともに異常造血幹細胞が消失する。

(B) 1型糖尿病、2型糖尿病ともに一旦治癒する。

(C) 1型糖尿病、2型糖尿病ともに合併症の進行が停止し、明らかな治療効果が見られる。

[0198] 3) 細胞遊走剤を加えた新規治療により以下のことが明らかとなる。

(A) 遊走剤なしに比較して遊走剤を加えた新規治療により、1型糖尿病、2型糖尿病ともに異常造血幹細胞がより早期に消失する。

(B) 遊走剤なしに比較して遊走剤を加えた新規治療により、1型糖尿病、2型糖尿病ともに治癒率の向上が見られる。

(C) 遊走剤なしに比較して遊走剤を加えた新規治療により、1型糖尿病、2型糖尿病ともに合併症の治癒率の向上が見られる。

[0199] (考察と結論の予想)

1) 1型ではインスリン単独治療であっても、血糖コントロール効果によりハネムーン期が発来する可能性がある。しかし、この場合、いずれは再度寛解が終了し、インスリン分泌能は再度欠乏してくる。

2) 2型糖尿病ではインスリン単独治療により、血糖コントロールがよくなり、インスリン治療が必要なくなる可能性があるが、異常造血幹細胞が消失することはないので、糖尿病が治癒することはない。

3) 細胞遊走剤を加えた新規治療により、1型糖尿病が治癒しても、自己抗体を産生する原因となった自己免疫が再燃すると、可能性は残っている。しかし、再度細胞遊走剤を加えた新規治療を行えばよい。

4) 2型糖尿病で細胞遊走剤を加えた新規治療により完全に治癒しても、エネルギーの過剰摂取や運動不足により再び高血糖が起こってくると異常造血幹細胞が出現してくる可能性がある。この場合も細胞遊走剤を加えた新規治療を再度行えば治療可能である。

[0200] (実施例13：その他の療法)

上記の異常造血幹細胞の抑制のためにHDAC阻害剤として、経口投与が可能なジビノスタットを1日2回服用により投与する。治療期間は真性多血症およびデュシャン型筋ジストロフィー症の治験に準ずる。

[0201] (実施例14：異なるHDAC阻害剤の使用)

上記異常造血幹細胞の抑制のためにHDAC阻害剤として、経口投与が可能なフィンゴリモド塩酸塩を1日1回服用により投与する。治療期間は多発性硬化症の治験に準ずる。なお、HDAC阻害剤としてフィンゴリモド塩酸塩は、免疫抑制剤として多発性硬化症の適応が取れている。従って、投与量ならびに治療期間は基礎研究の進行により変更させる必要性が生じ得る。

[0202] (注記)

以上のように、本開示の好ましい実施形態を用いて本開示を例示してきたが、本開示は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において本明細書において引用した特許、特許出願、PCT/JP2020/039044(2020年10月16日出願)、PCT/JP2020/039045(2020年10月16日出願)及び他の文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

[0203] 本出願は、2021年2月26日に日本国特許庁に出願された特願2021-30812号に対する優先権の利益を主張し、その内容全体が本明細書に援用される。

産業上の利用可能性

[0204] 本開示は、幹細胞を標的とする糖尿病治療の改善を提供し、この知見に基づき、糖尿病および/または糖尿病に関連する疾患、障害および/もしくは症状の治療や予防、ならびに糖尿病および/または糖尿病に関連する疾患、障害および/もしくは症状、あるいはそのリスクの診断を行うための新たな手法が提供される。

請求の範囲

- [請求項1] 異常造血幹細胞（HSC）の抑制剤を含む糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状を治療および／または予防するための組成物であって、該抑制剤はヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤を含み、該組成物は幹細胞遊走剤と組み合わせて投与されることを特徴とする、組成物。
- [請求項2] 前記異常HSCは、HDACの遺伝子またはタンパク質が通常のレベルで発現していないかおよび／または機能していないものである、請求項1に記載の組成物。
- [請求項3] 前記通常のレベルではない発現は過剰発現である、請求項2に記載の組成物。
- [請求項4] 糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状を治療するための、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項5] 前記抑制剤は、抗CD106抗体、抗TNF- α 抗体またはその機能的改変体からなる群より選択される少なくとも1つをさらに含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項6] 前記異常HSCは、さらに、腫瘍壊死因子アルファ（TNF- α ）、CD106、およびプロインスリンからなる群より選択される遺伝子またはタンパク質が通常のレベルで発現していないものである、請求項2～5のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項7] 前記疾患、障害および／もしくは症状は、糖尿病合併症を含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項8] 前記疾患、障害および／もしくは症状は、神経障害、腎症、肝障害、網膜症、脂肪肝、胃腸障害、骨折治癒遅延、摂食障害、および皮膚障害からなる群より選択される、請求項1～6のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項9] 前記幹細胞遊走剤は、前記異常HSCをニッチから遊走させる能力を

有する、請求項1～8のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項10] 前記幹細胞遊走剤は、CXCR4拮抗剤、CXCR2刺激剤、上皮成長因子受容体(EGFR)阻害剤、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)剤、からなる群より選択される少なくとも1つの薬剤を含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項11] 前記幹細胞遊走剤は、プレリキシサフォル、GROβ2(MIP2)、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、オシメルチニブ、フィルグラスチム、ナルトグラスチム、レノグラスチム、ペグフィルグラスチム、からなる群より選択される少なくとも1つを含む、請求項1～10のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項12] 前記HDAC阻害剤は、TSA(トリコスタチンA)、VPA(バルプロ酸)、酪酸ナトリウム(NaBu)、SAHA(スベロイルアニリドヒドロキサム酸またはポリノスタット)、ナトリウムフェニルブチレート、デプシペプチド(FR901228、FK228)、トラポキシシン(TPX)、環式ヒドロキサム酸含有ペプチド1(CHAP1)、MS-275、LBH589、ジビノスタット、フィンゴリモド(FTY720)およびPXD101からなる群より選択される少なくとも1つを含む、請求項1～11のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項13] HDAC阻害剤を含む異常造血幹細胞(HSC)の抑制剤と、幹細胞遊走剤との組み合わせを含む糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状を治療および／または予防するための医薬。

[請求項14] 幹細胞遊走剤を含む糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状を治療および／または予防するための組成物であって、該幹細胞遊走剤は、HDAC阻害剤を含む異常造血幹細胞(HSC)の抑制剤と組み合わせて投与されることを特徴とする、組成物。

- [請求項15] HDACの検出剤を含む異常造血幹細胞（HSC）検出剤を含む糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状あるいはそのリスクを診断するための組成物。
- [請求項16] HDACの検出剤を含む異常造血幹細胞（HSC）の遊走および／または残留を検出する薬剤を含む糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状の治療および／または予防のための処置の選択のための組成物。
- [請求項17] 前記遊走および／または残留が、骨髓のニッチからの遊走および／または骨髓のニッチにおける残留である、請求項16に記載の組成物。
- [請求項18] 前記遊走の検出は、CD106または機能的等価物の検出により達成されることを特徴とする、請求項16または17に記載の組成物。
- [請求項19] 前記組成物の使用によって糖尿病またはそのリスクを有すると診断された被験体は、HDAC阻害剤が投与されるべきことが示されることを特徴とする、請求項15～18のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項20] 被験体において糖尿病または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状を治療および／または予防する方法であって、該被験体に対してHDAC阻害剤を含む異常造血幹細胞（HSC）を低減または消失させる薬剤および幹細胞遊走剤を有効量投与する工程を含む、方法。
- [請求項21] 被験体において糖尿病または糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状あるいはそのリスクを診断する方法であって、該被験体における異常造血幹細胞（HSC）をHDACの遺伝子またはタンパク質の発現に基づき検出する工程を含む、方法。
- [請求項22] 異常造血幹細胞（HSC）の遊走および／または残留を、被験体において糖尿病または糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状の治療および／または予防のための処置の指標とする方法であって、該被験体における異常造血幹細胞（HSC）

の遊走および／または残留をHDACの遺伝子またはタンパク質の発現に基づき検出する工程を含む、方法。

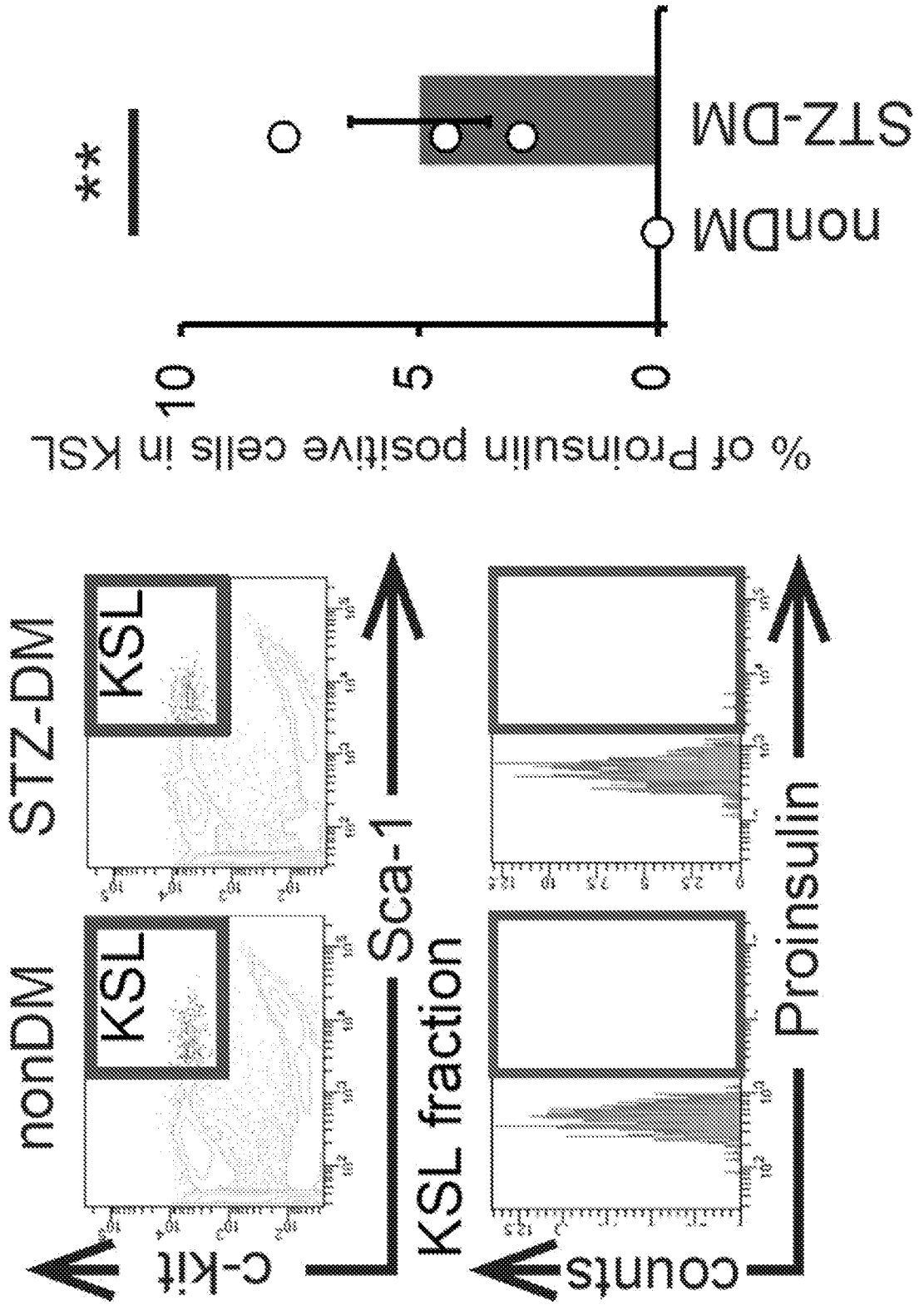
[請求項23] 被験体において糖尿病ならびに／または糖尿病に関連する疾患、障害および／もしくは症状を処置する方法であって、

該被験体における異常造血幹細胞（HSC）をHDACの遺伝子またはタンパク質の発現に基づき検出する工程と

異常造血幹細胞（HSC）が検出された被験体に、請求項1～12もしくは14に記載の組成物または請求項13に記載の医薬の有効量を投与する工程とを含む、方法。

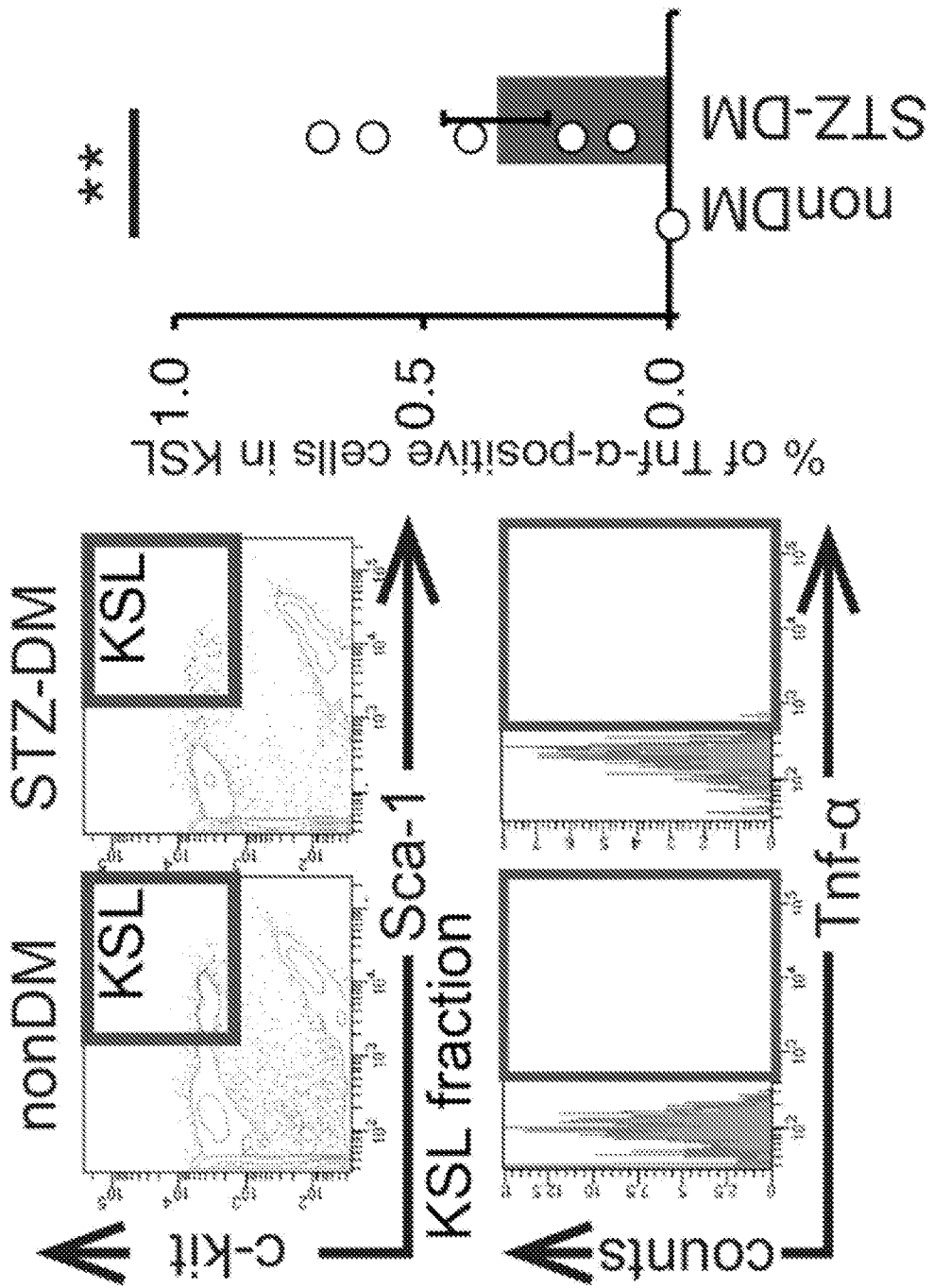
[図1]

図1



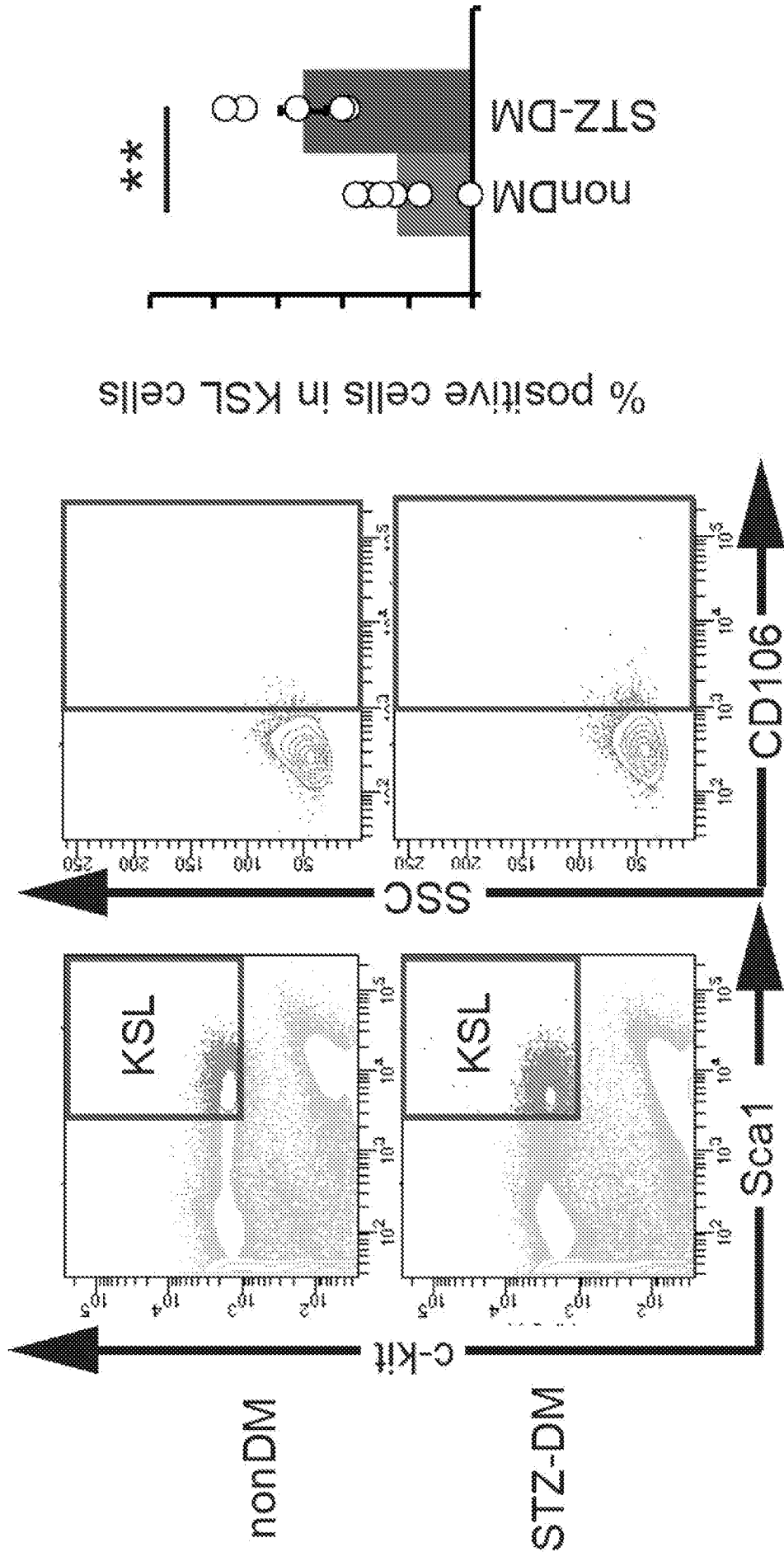
[図2]

2



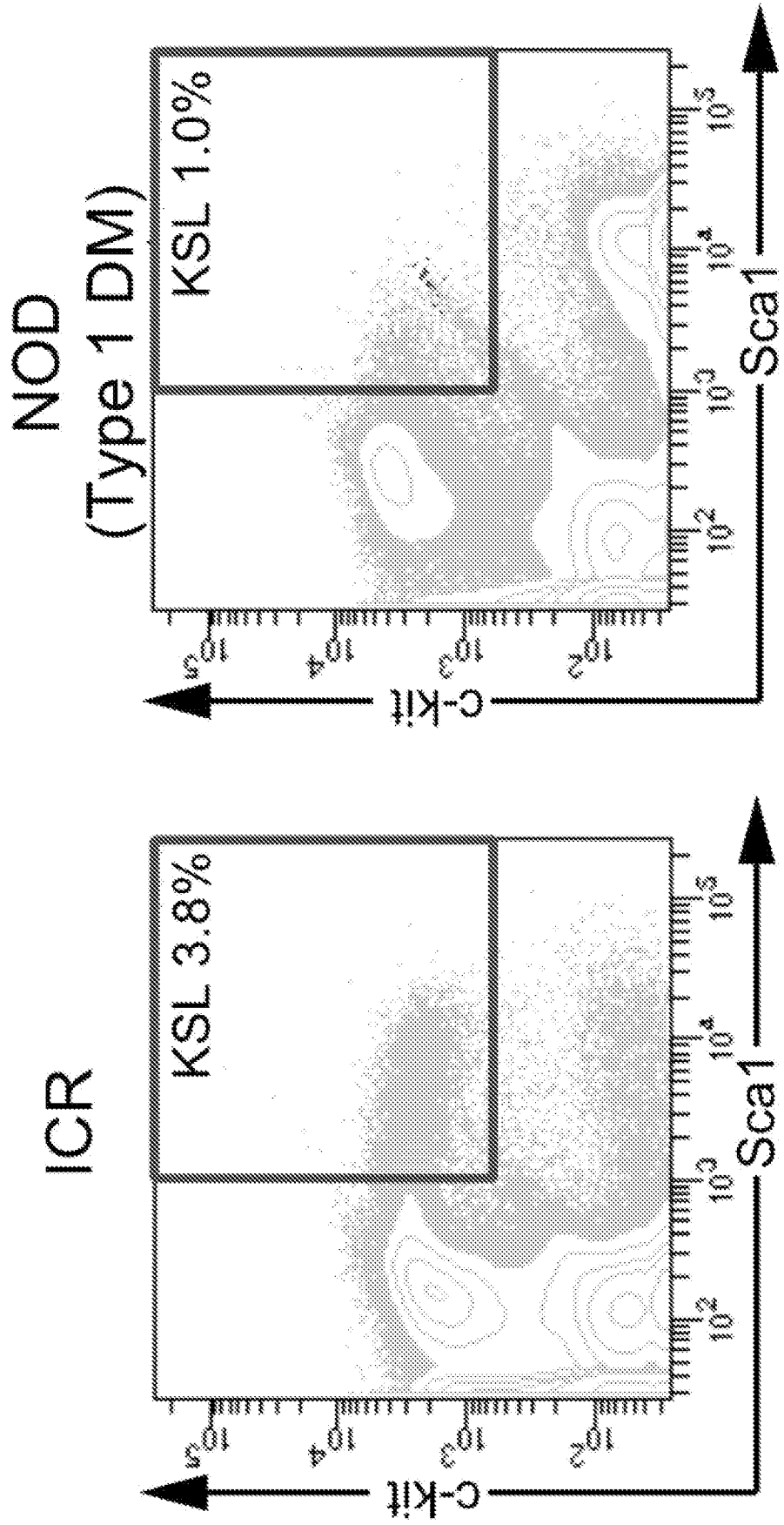
[3]

3



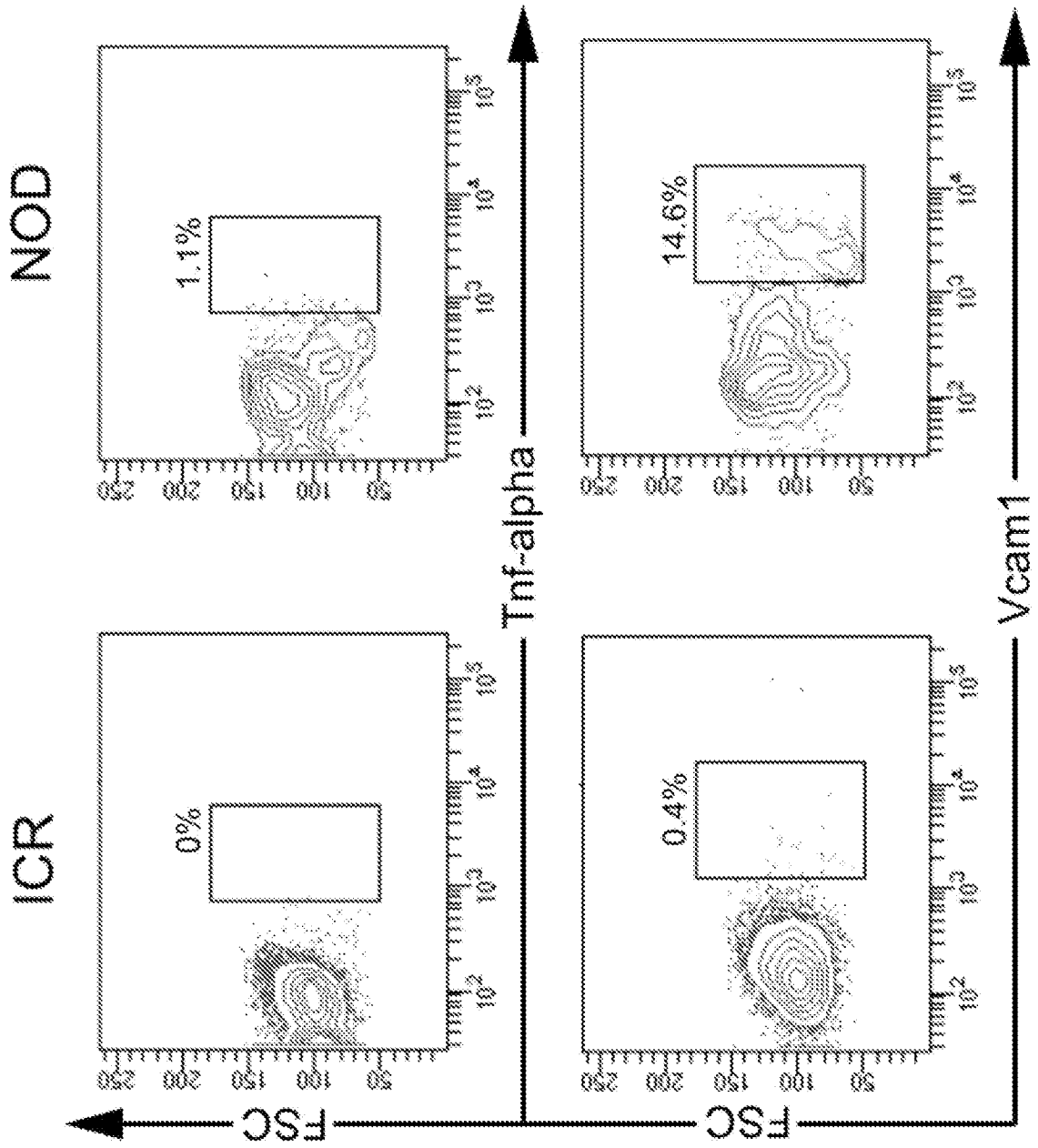
[図4]

図4



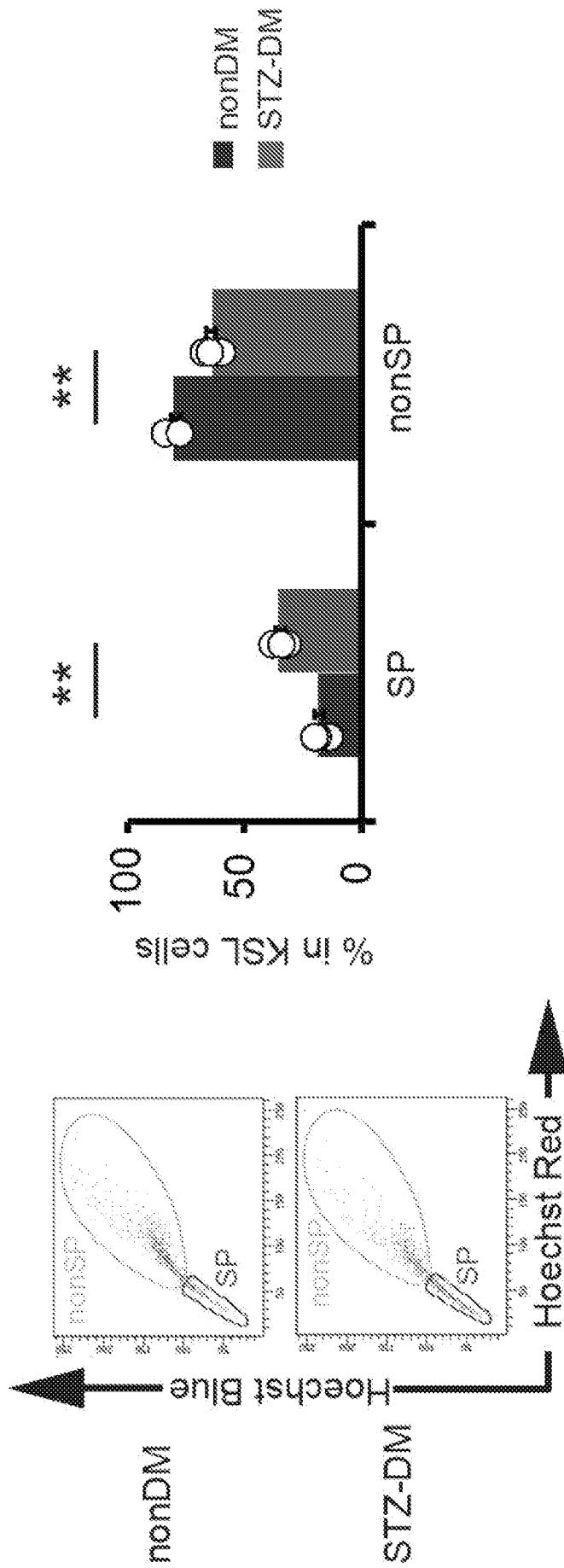
[図5]

5



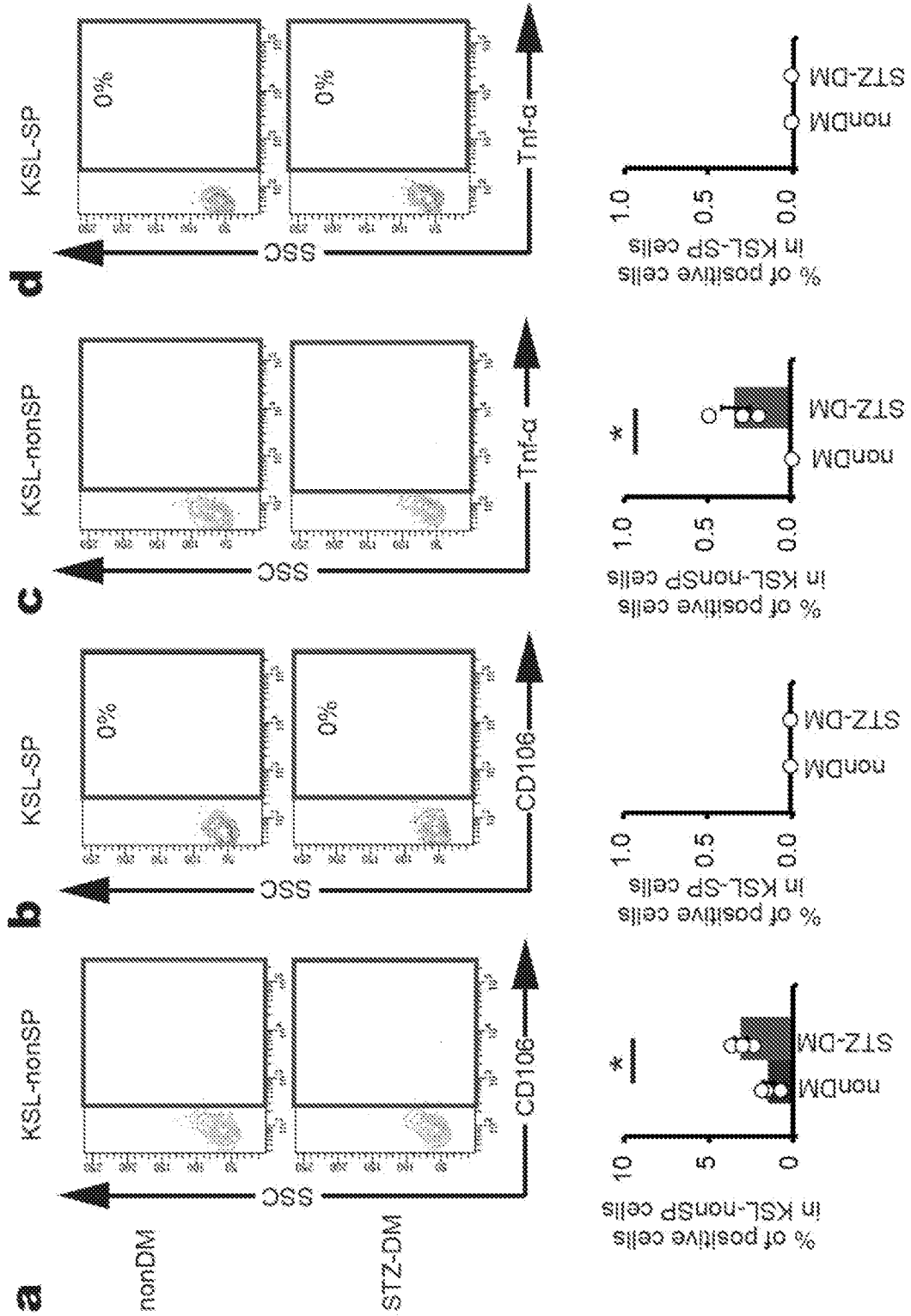
[図6]

6



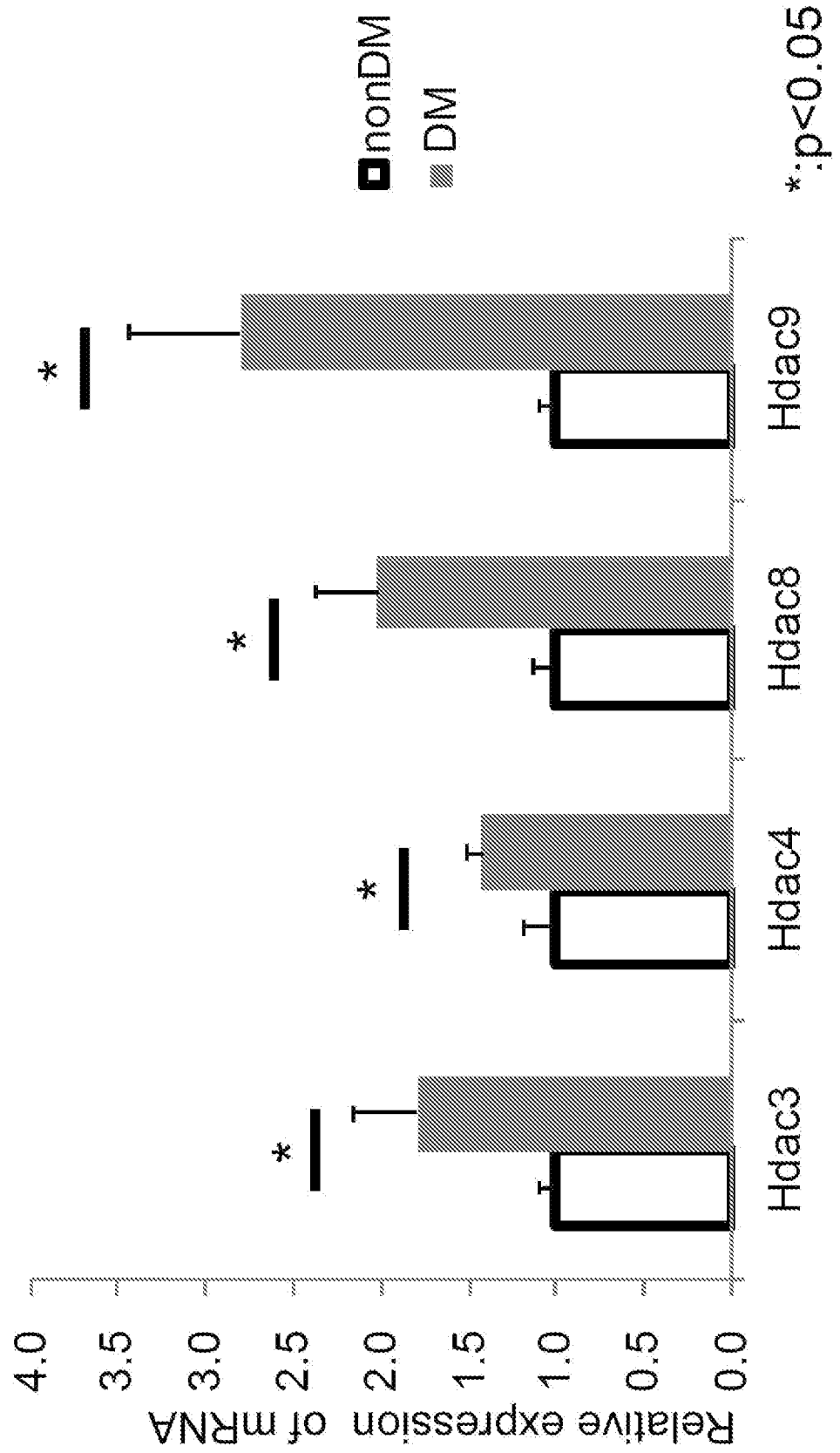
[7]

7



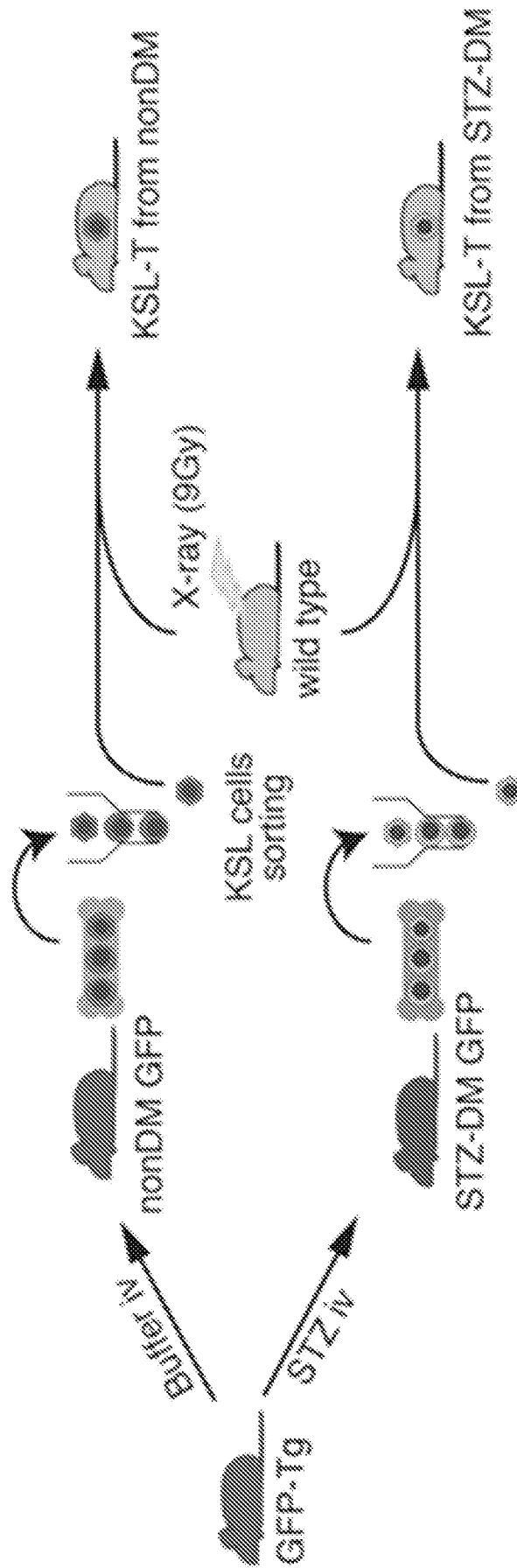
[図8]

8



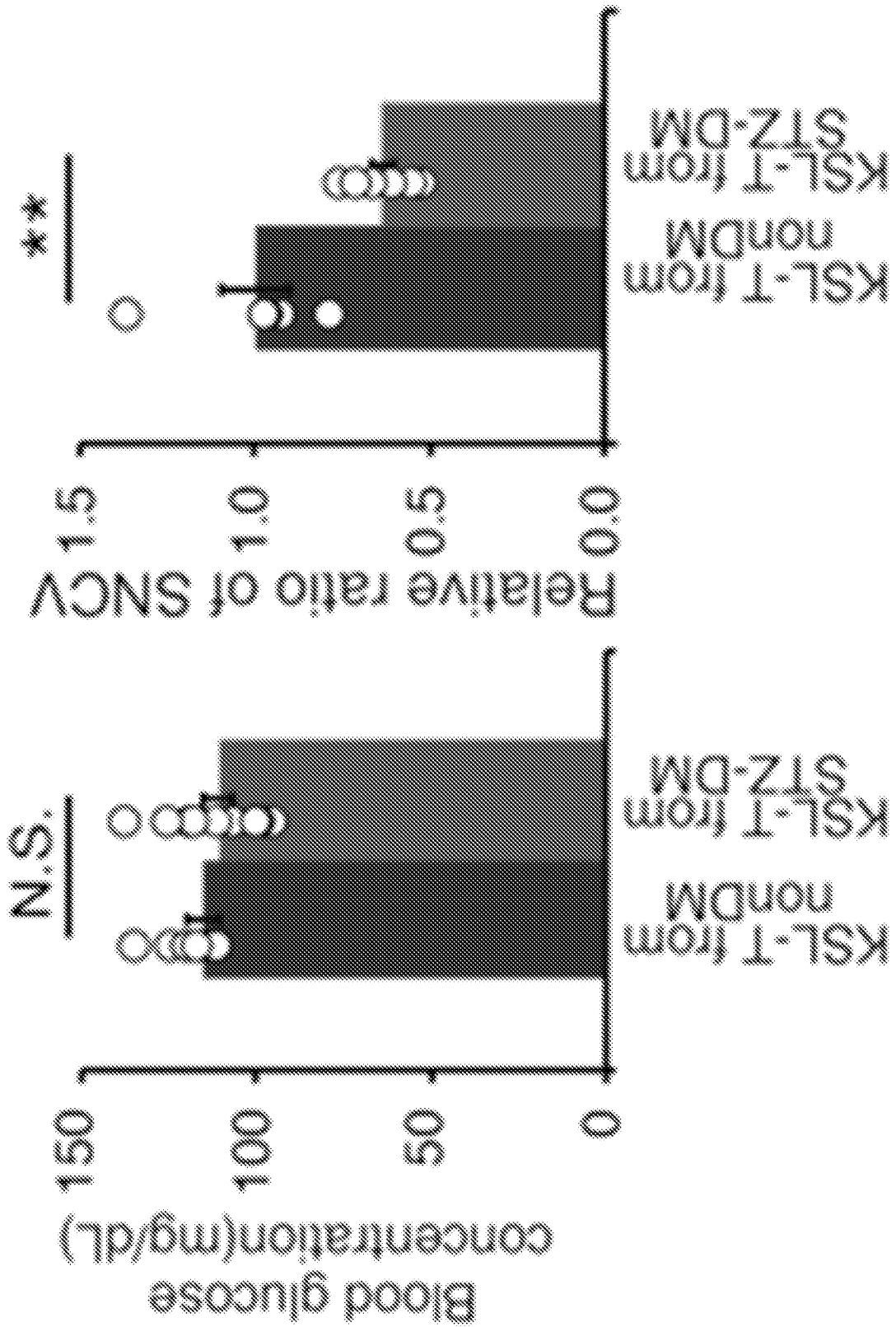
[9]

9



[図10]

10

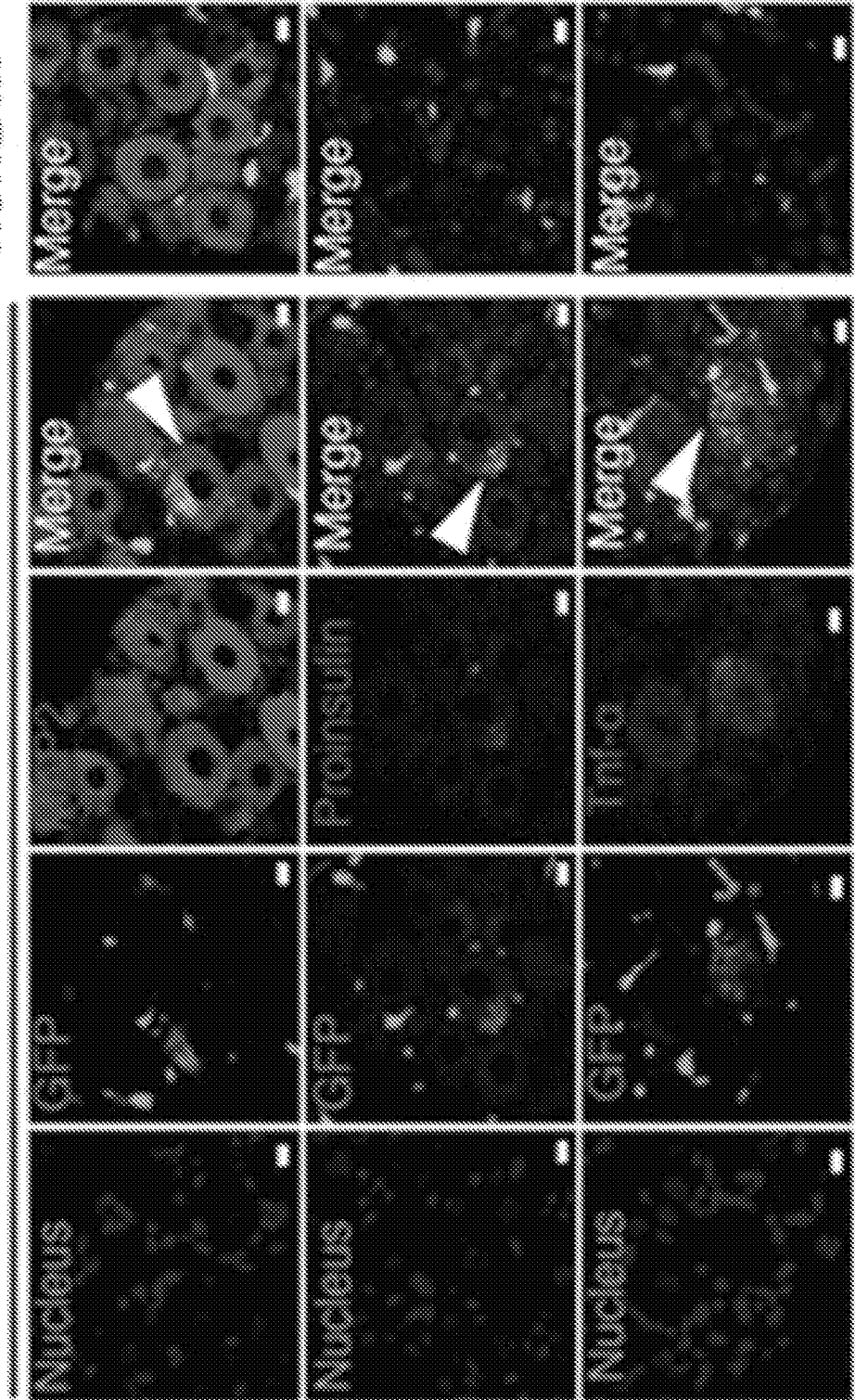


[図11]

図11

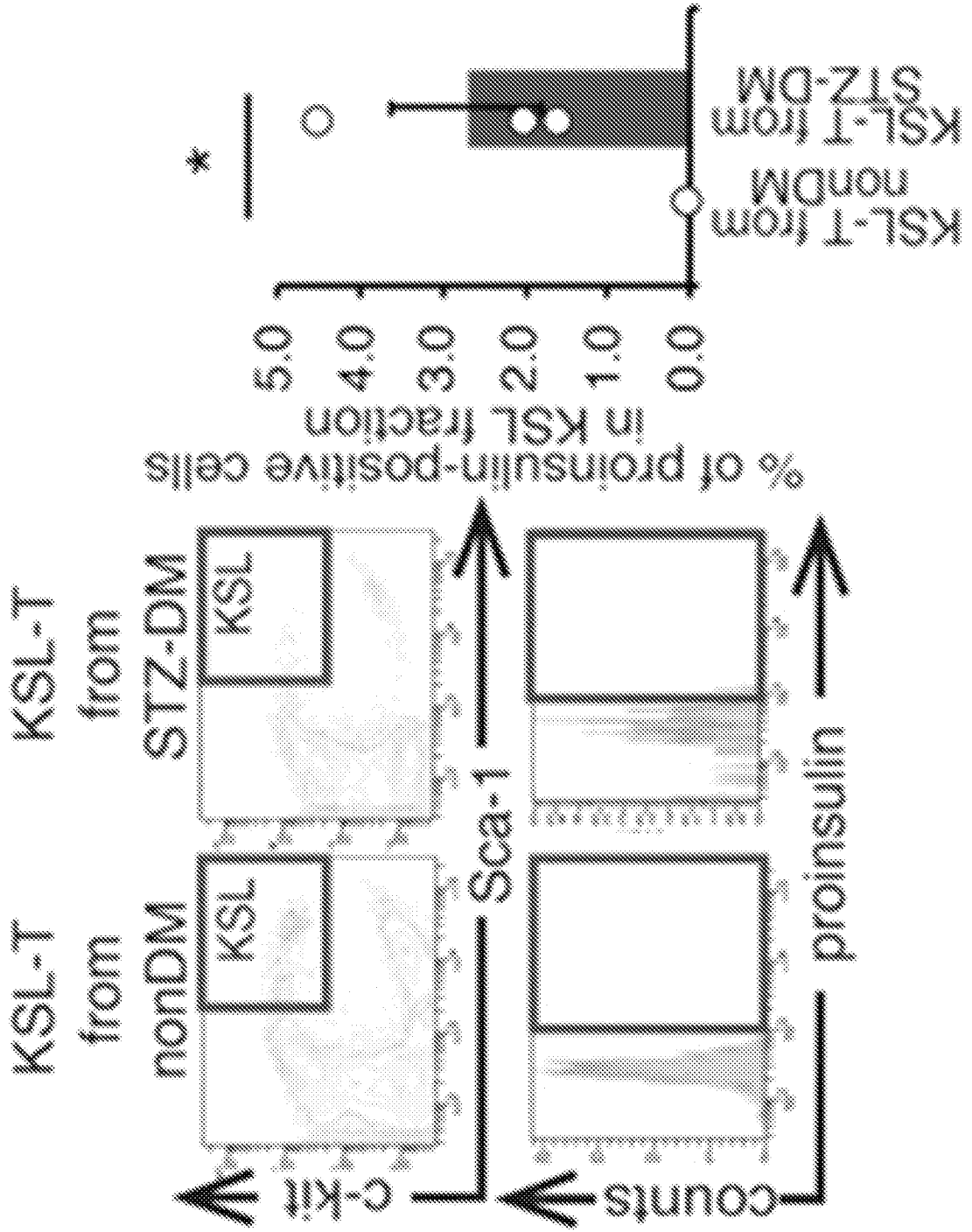
KSL-T
from
nonDM

KSL-T from STZ-DM

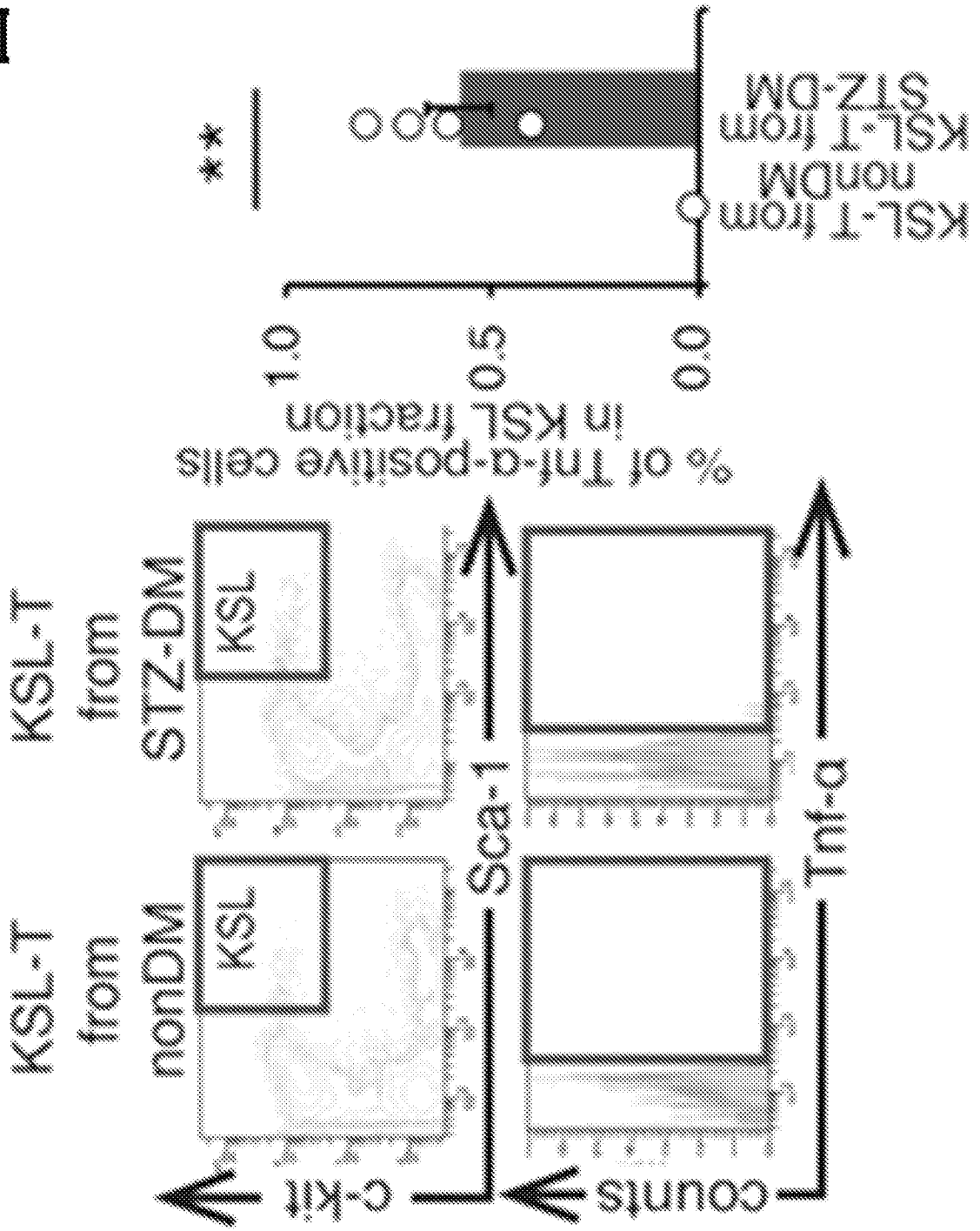


[図12]

図12

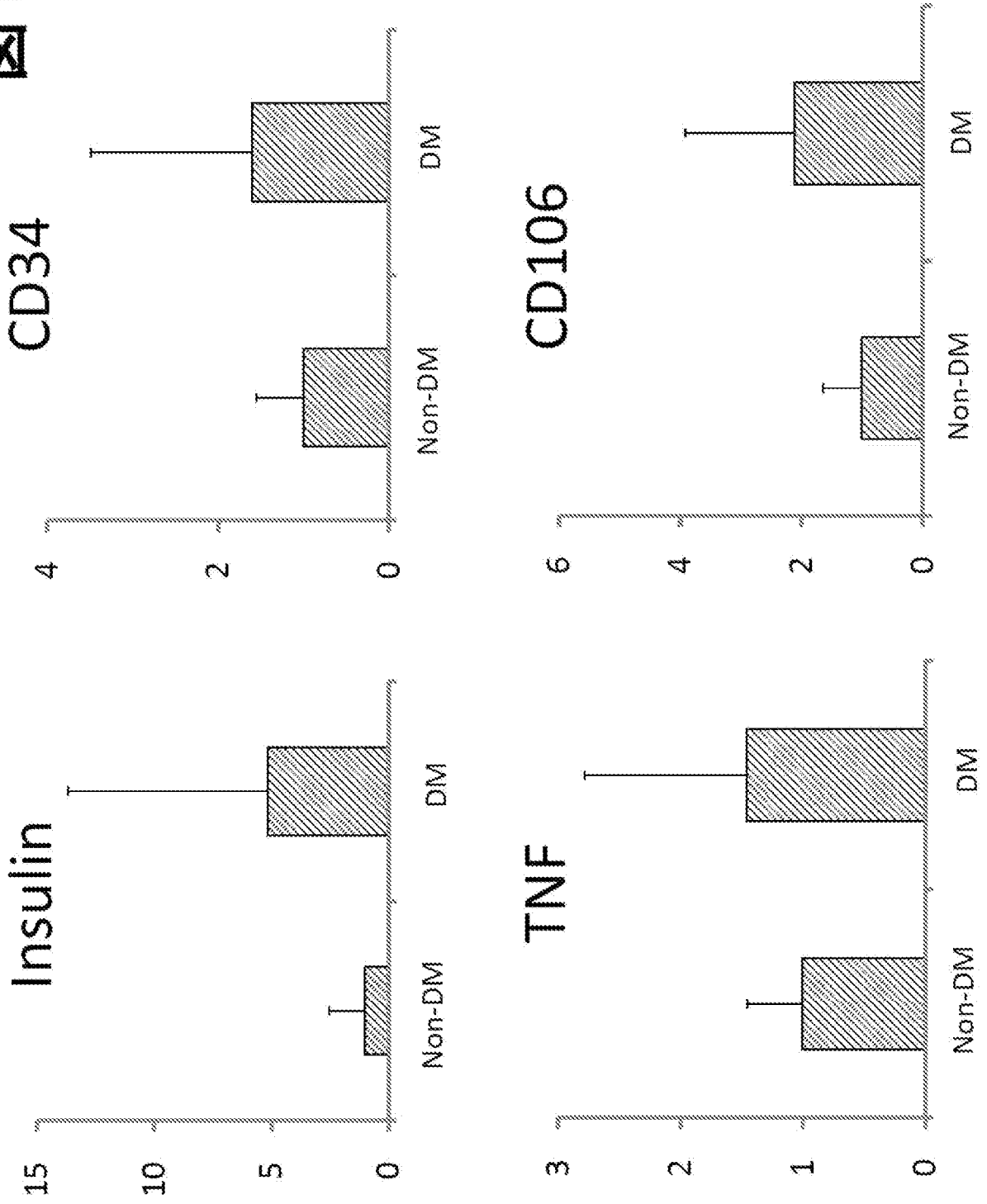


13



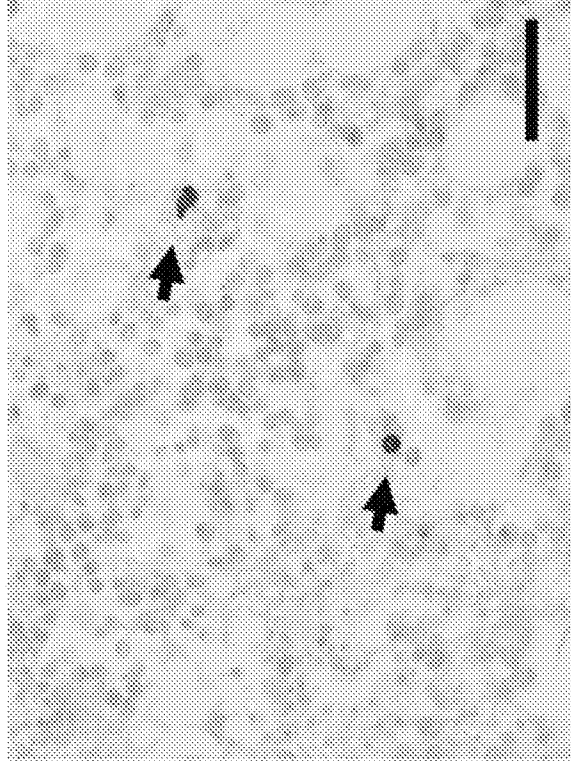
[図14]

図14

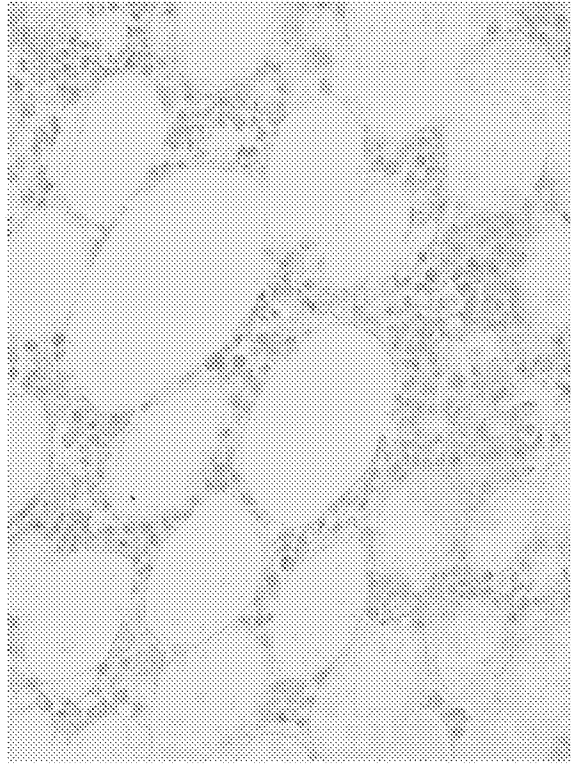


[15]

DM (+)



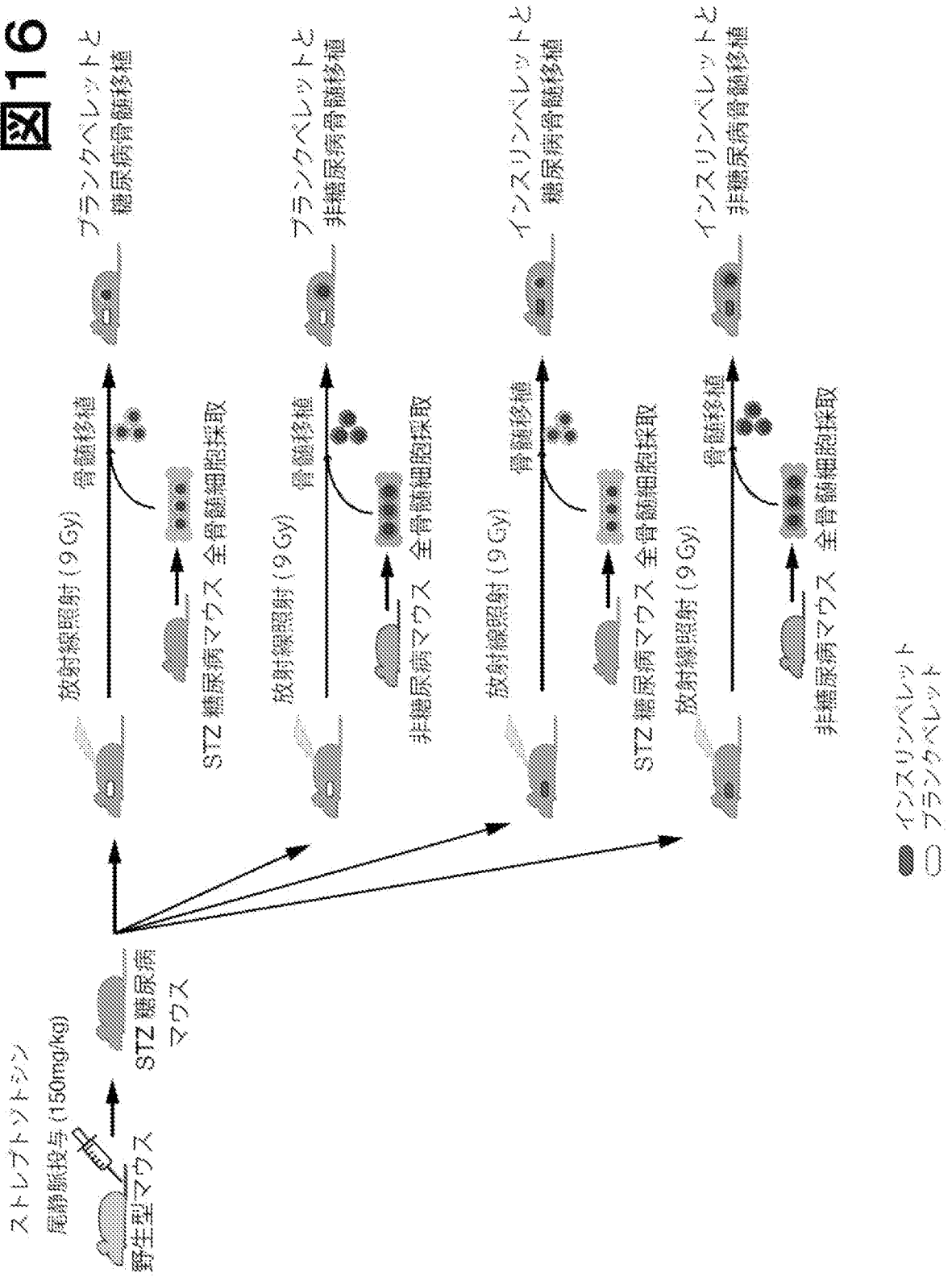
DM (-)



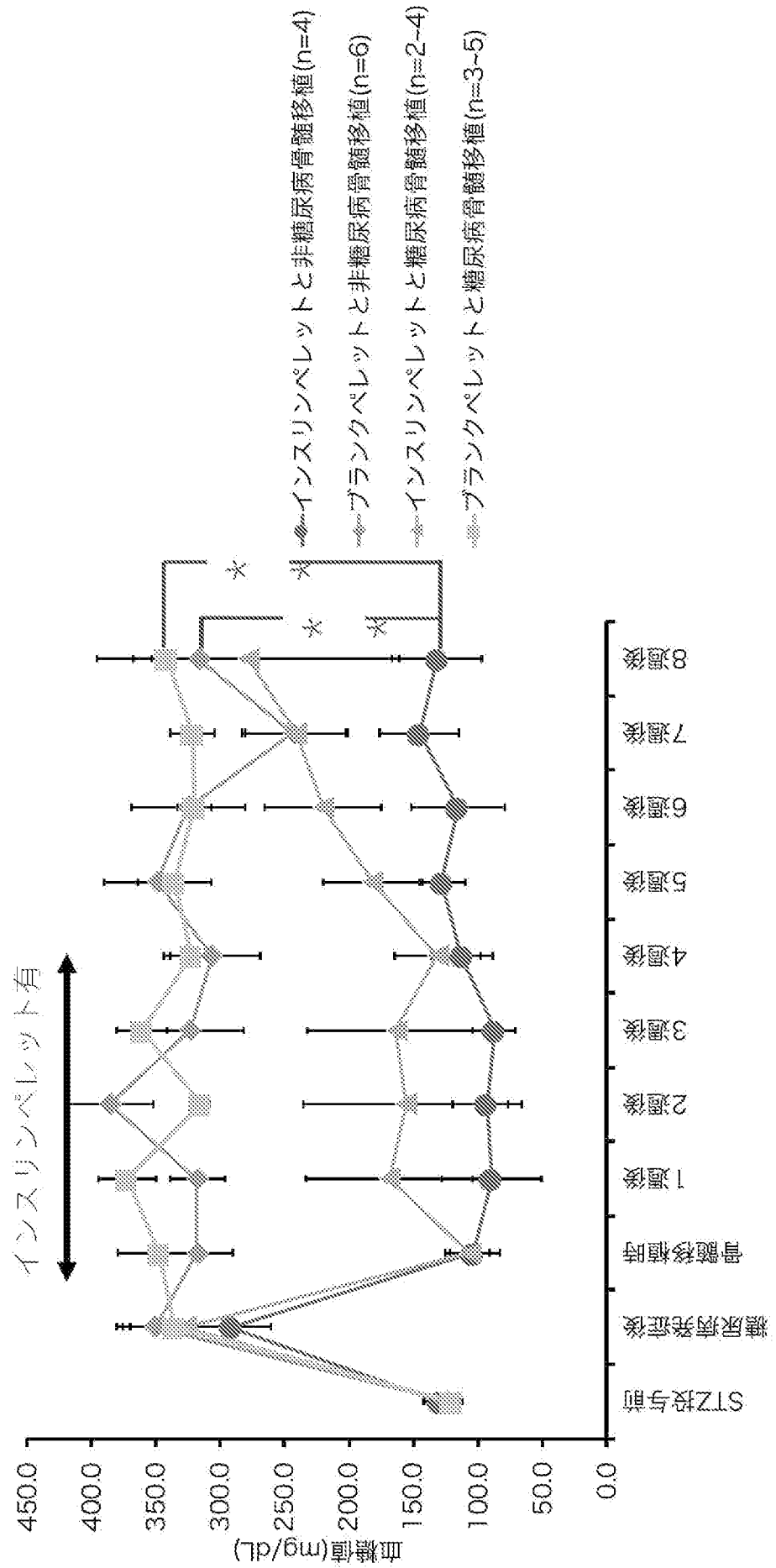
Bone marrow

[図16]

図16

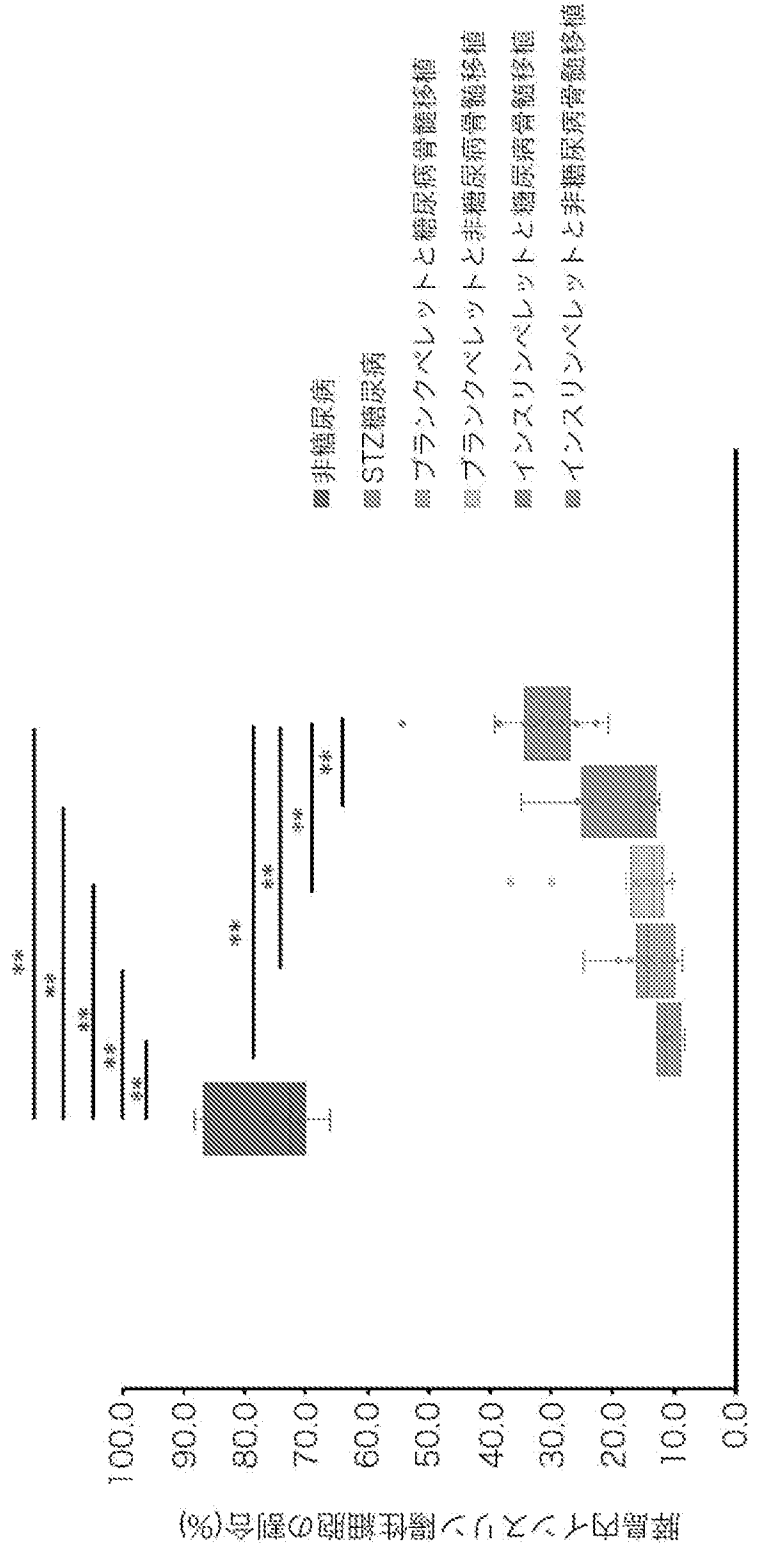
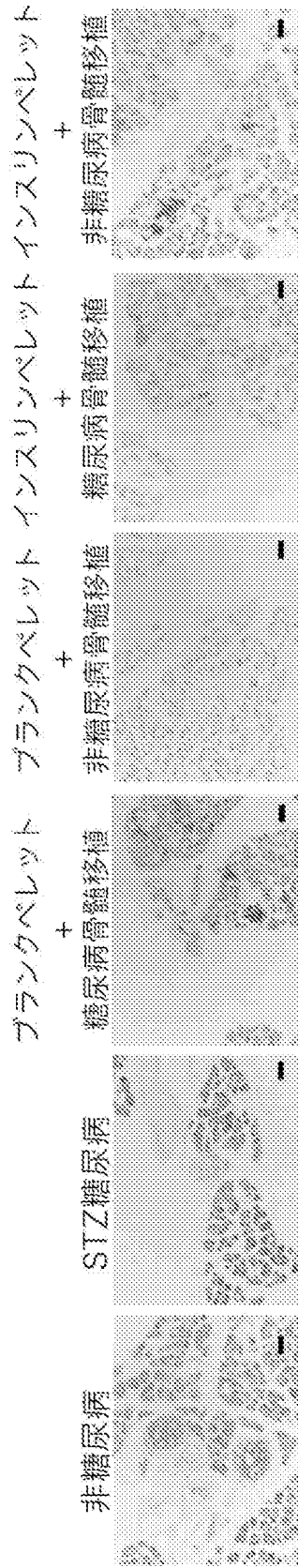


[図17]



・インスリン染色

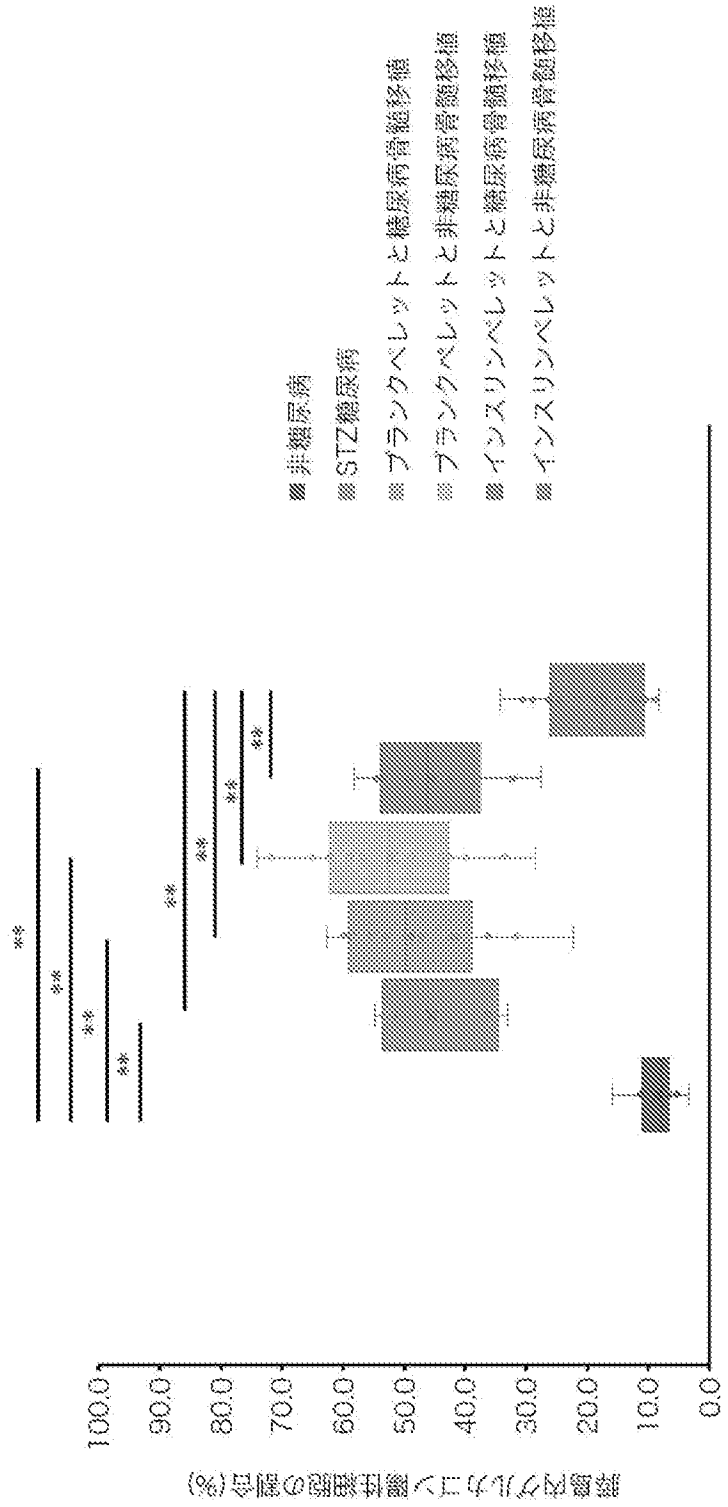
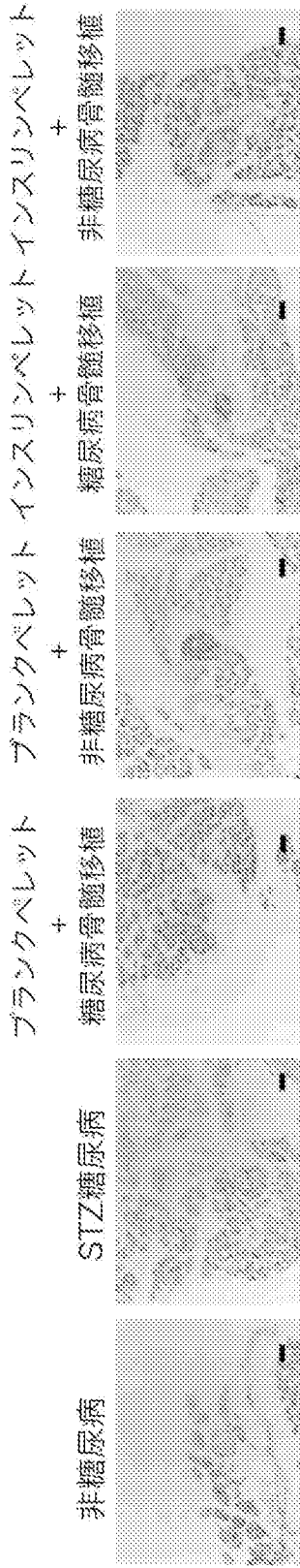
[図18]



[図19]

図19

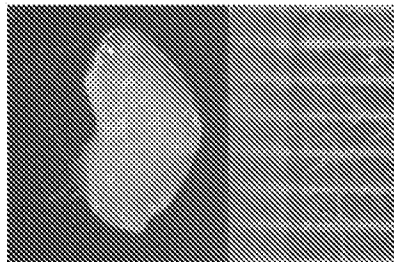
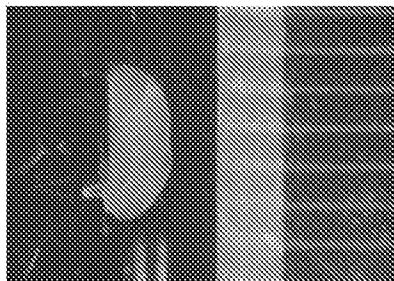
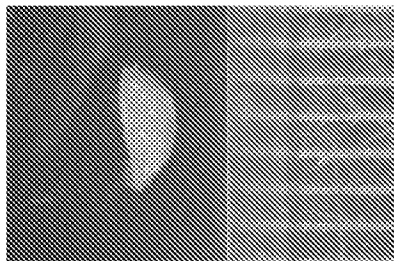
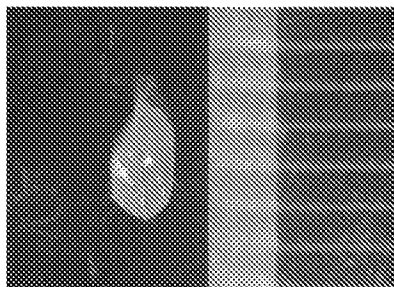
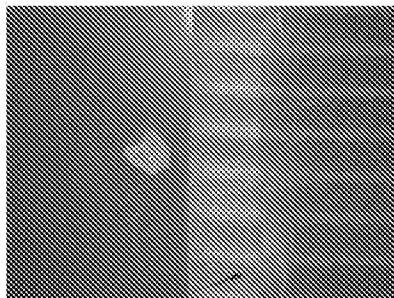
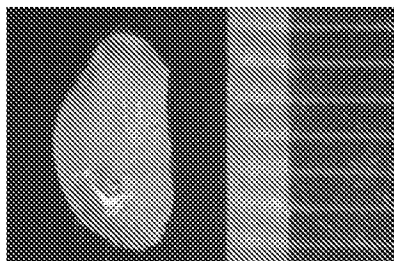
・グルカゴン染色



[図20]

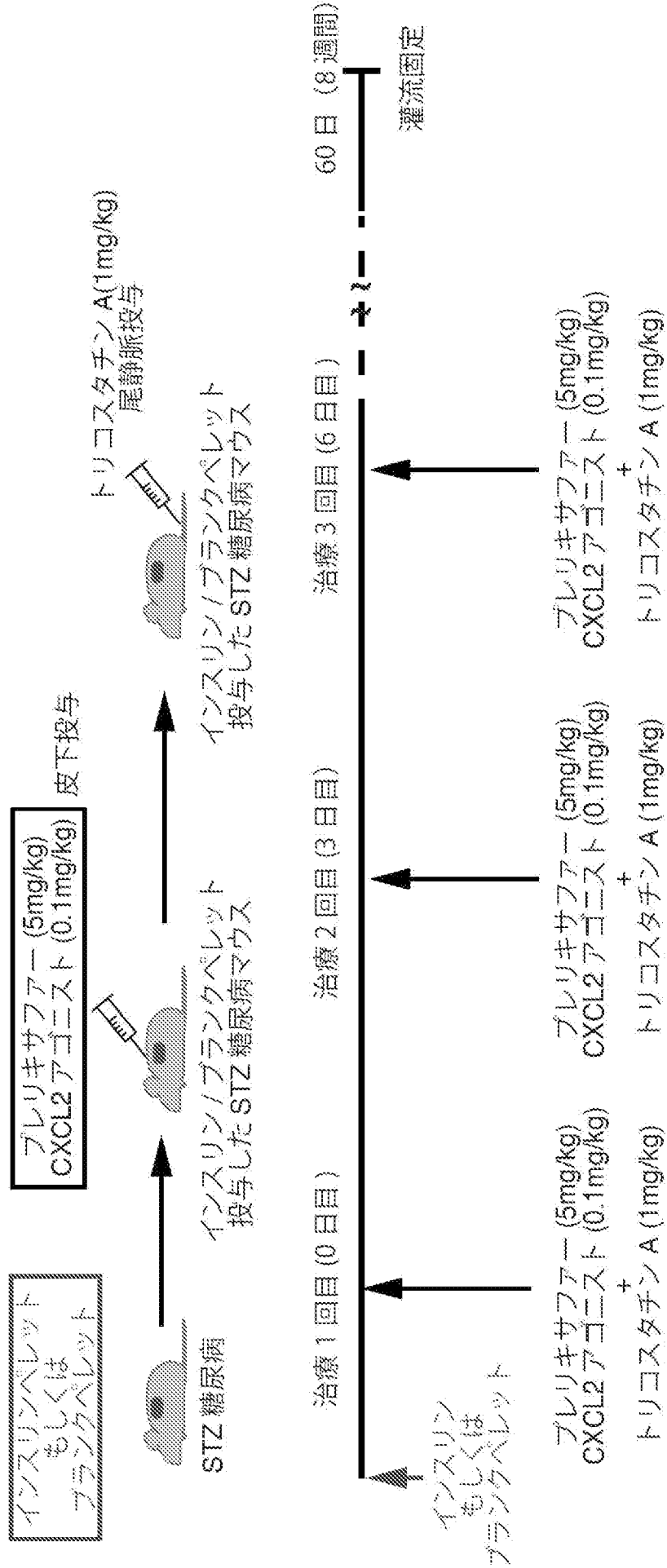
図20

ブランクペレット + 糖尿病
 + 非糖尿病骨髄移植
 ブランクペレット + 非糖尿病骨髄移植
 + 糖尿病骨髄移植
 + 非糖尿病骨髄移植
 インスリンペレット + 非糖尿病骨髄移植
 + 糖尿病骨髄移植
 + 非糖尿病骨髄移植



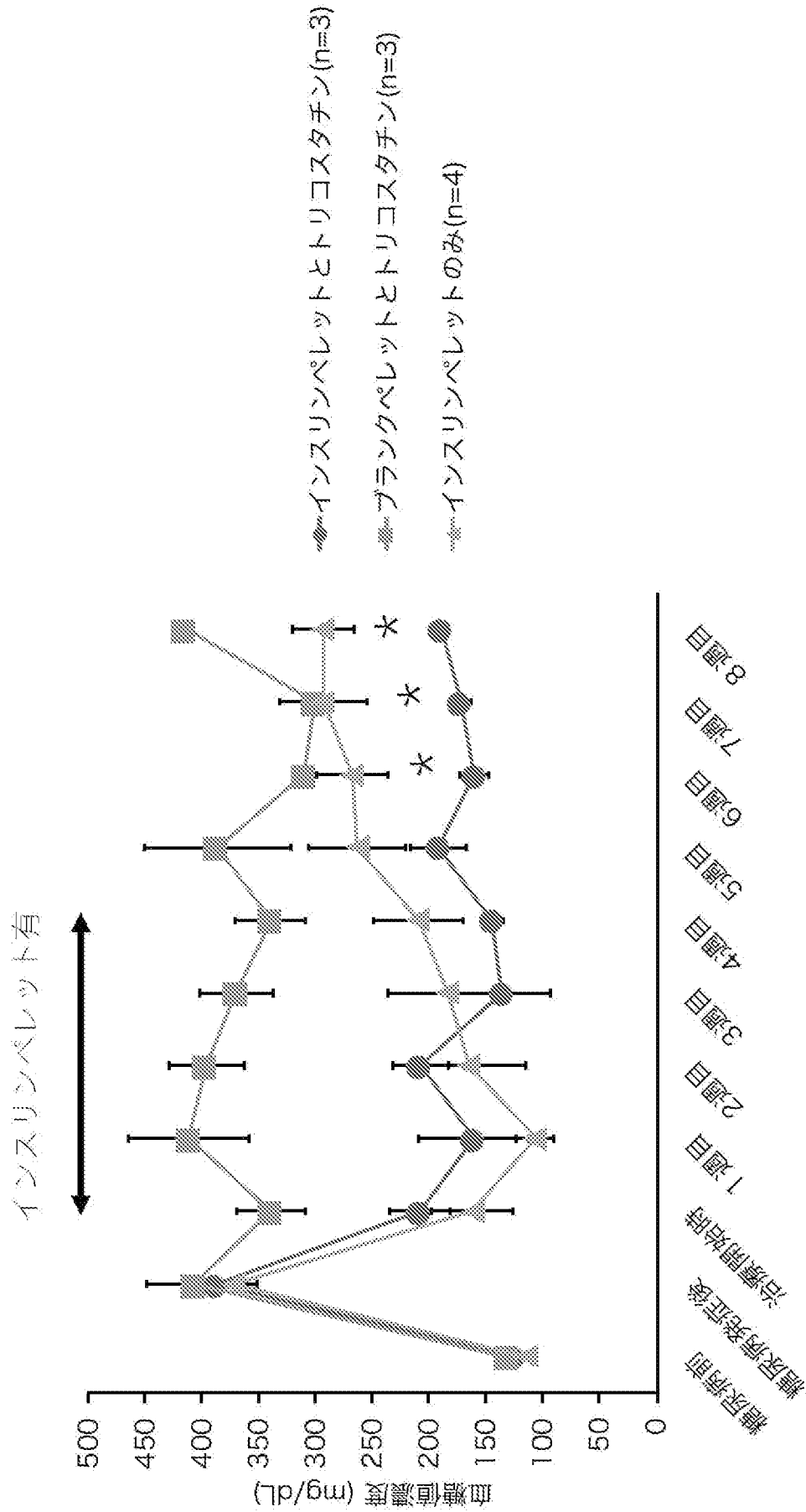
[図21]

図21



[図22]

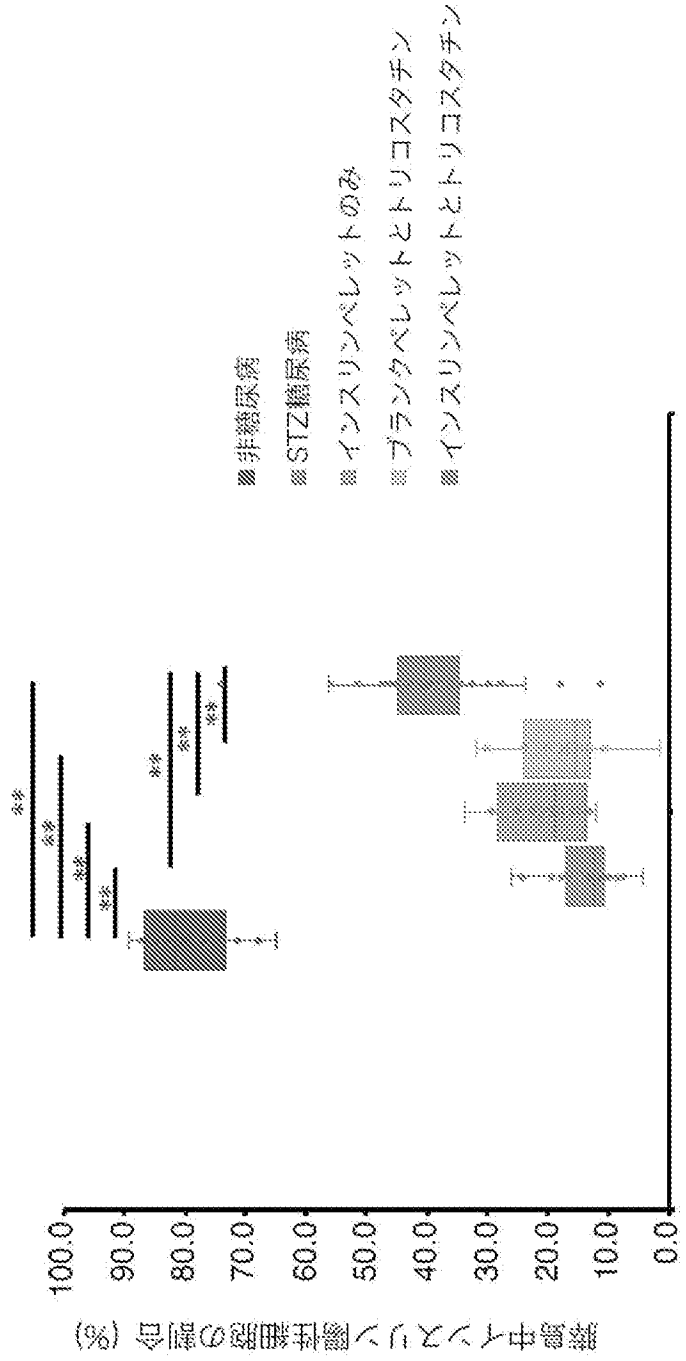
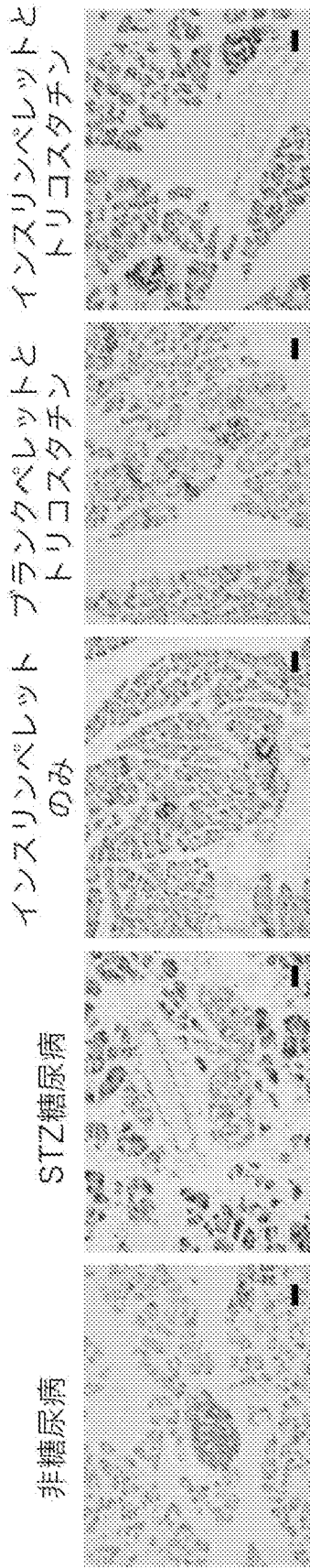
図22



[図23]

図23

・インスリン染色



・ゲルカゴン染色

[図24]

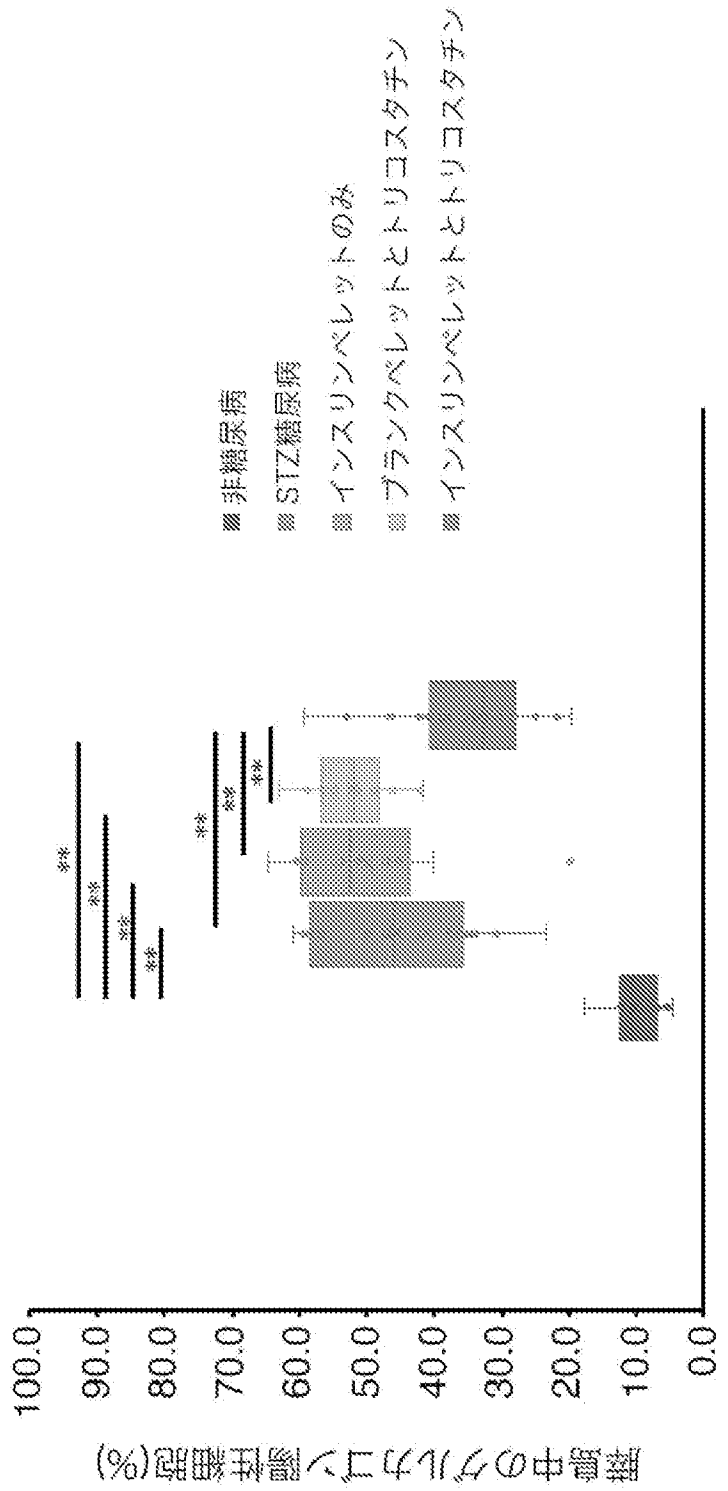
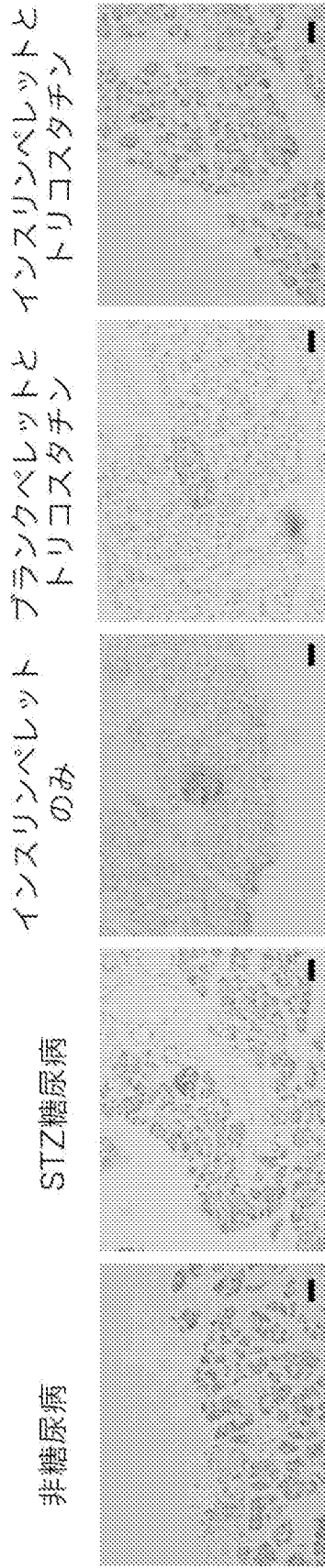
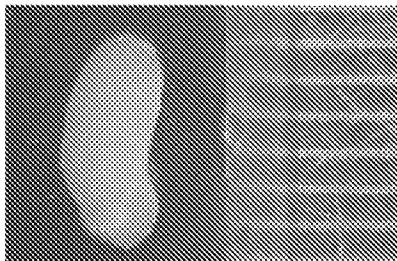


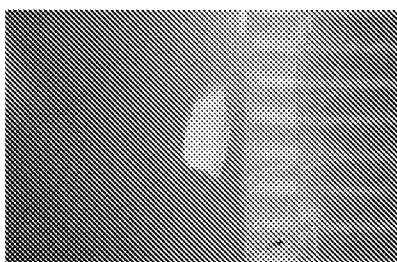
図25

[図25]

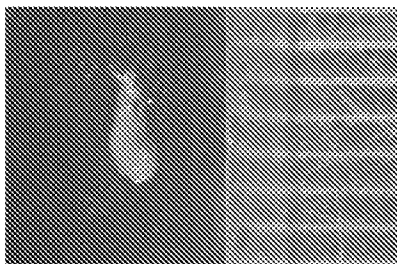
インスリンペレットと
トリコスタチン



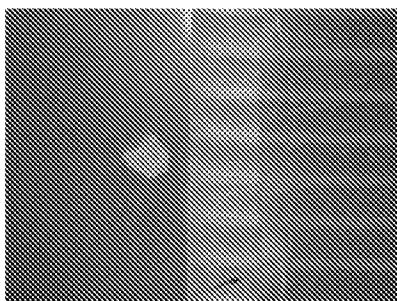
ブランクペレットと
トリコスタチン



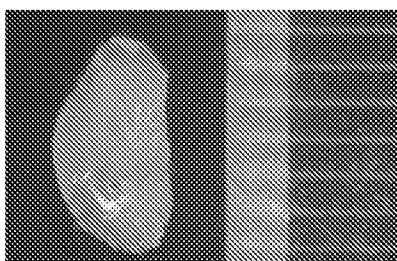
インスリンペレット
のみ



糖尿病

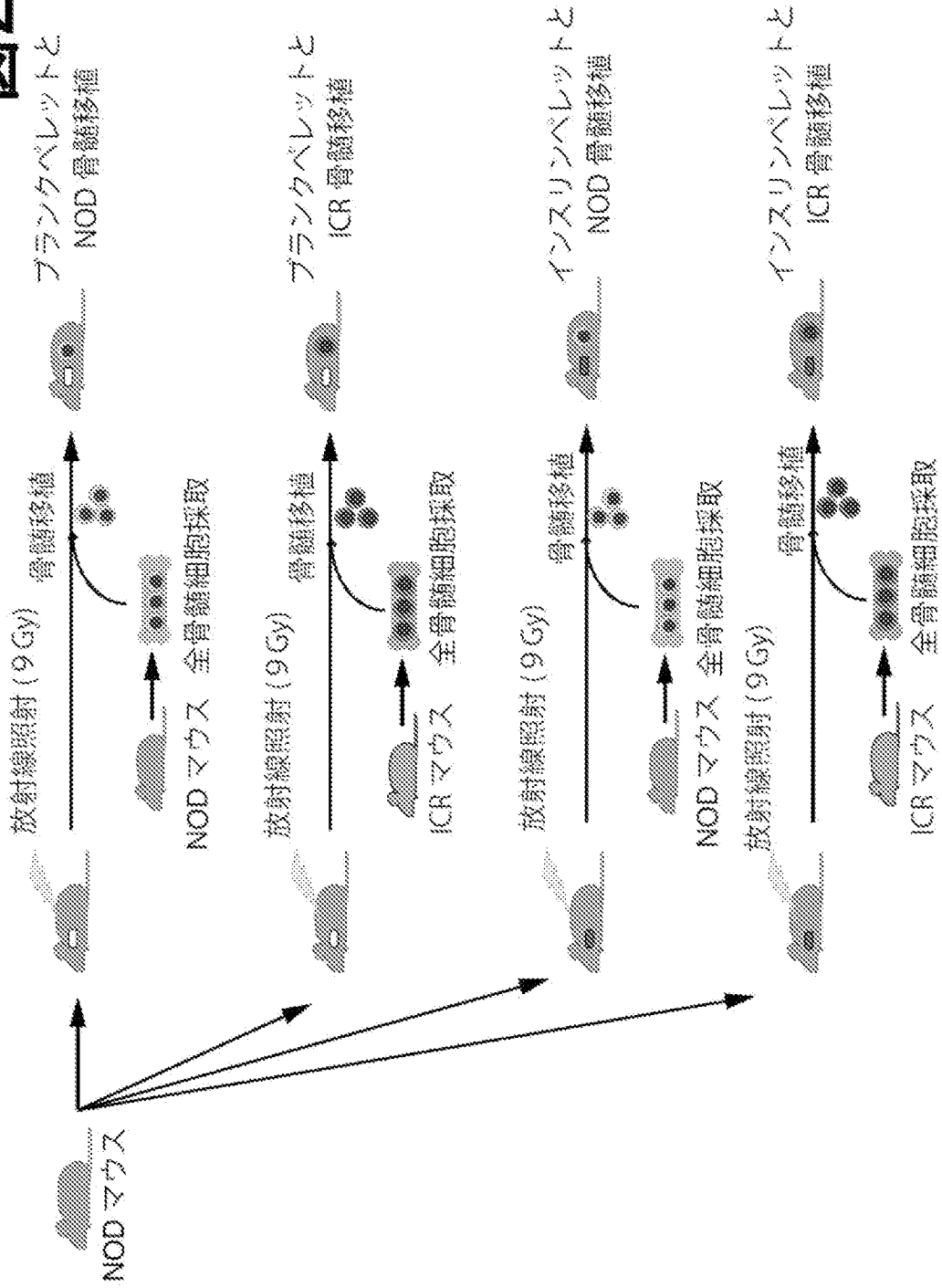


非糖尿病



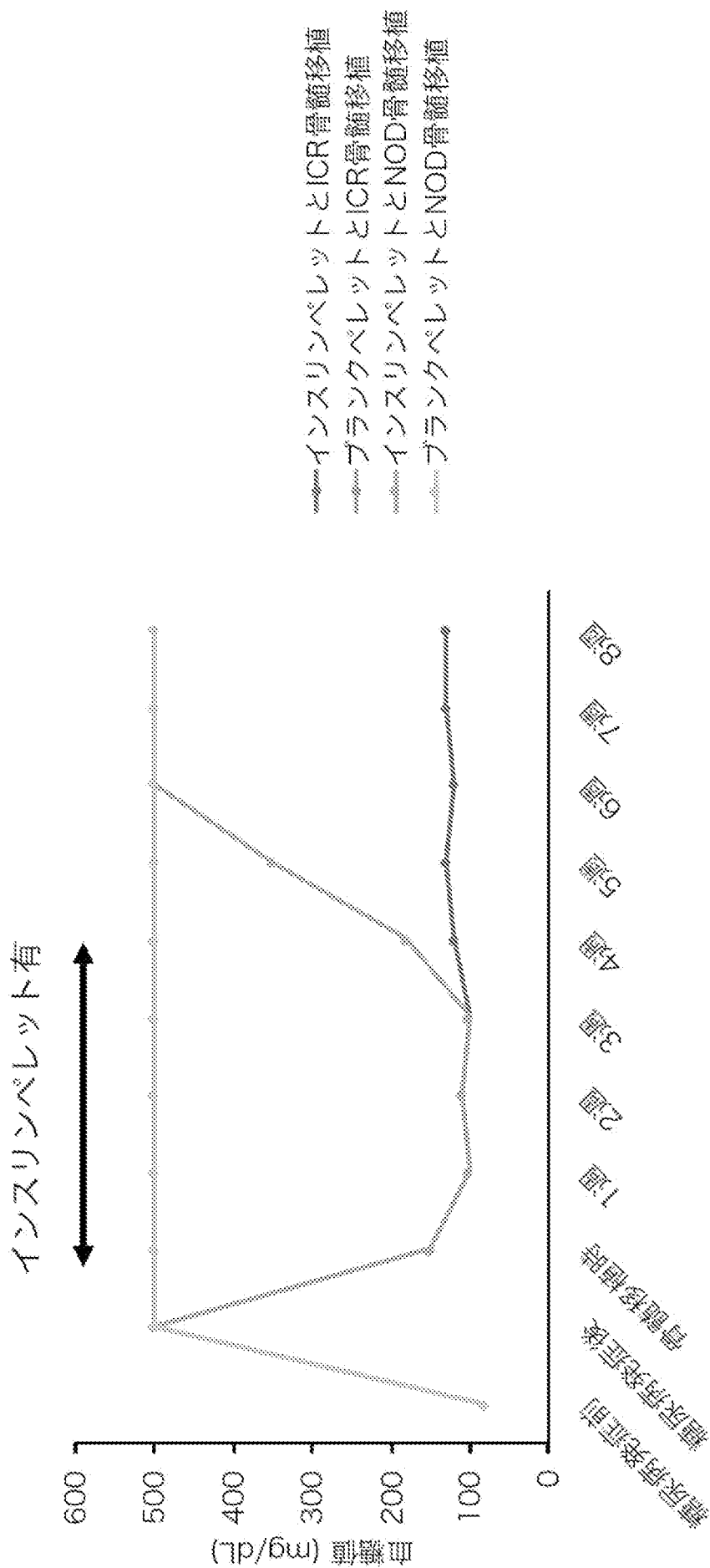
[図26]

図26



[図27]

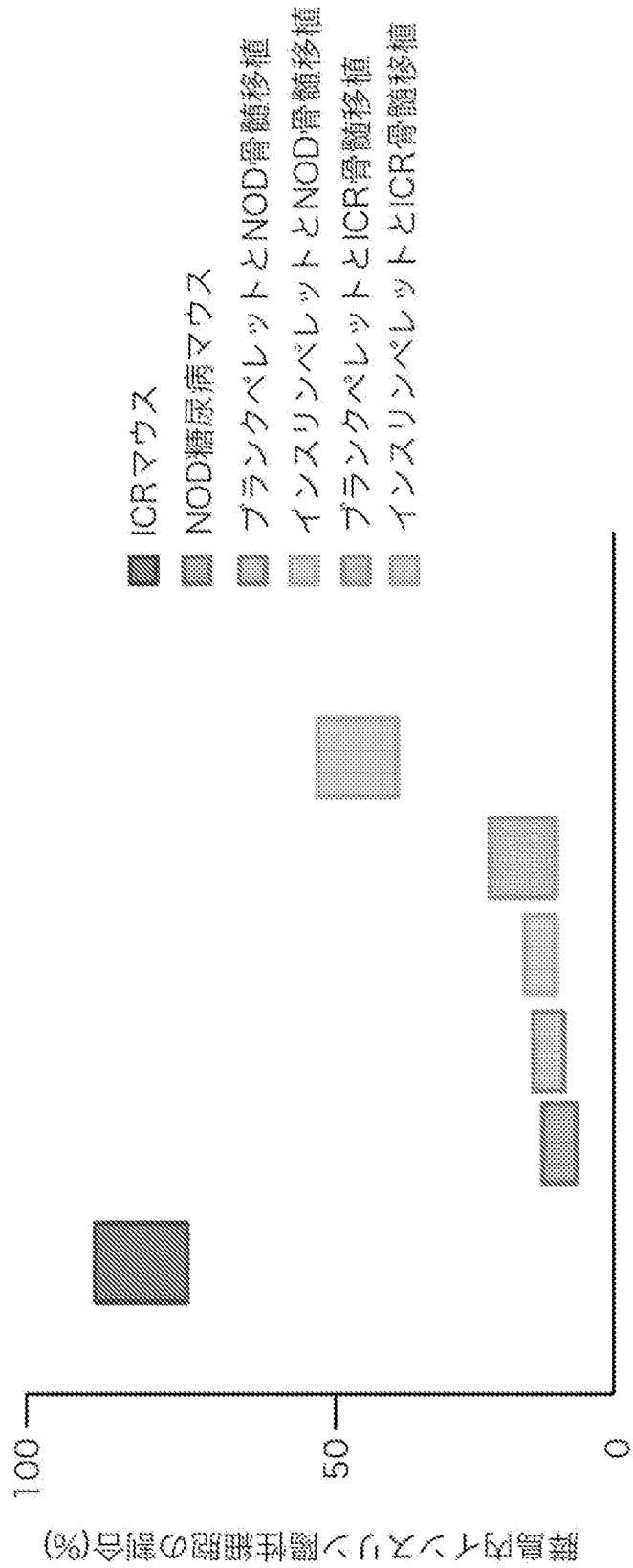
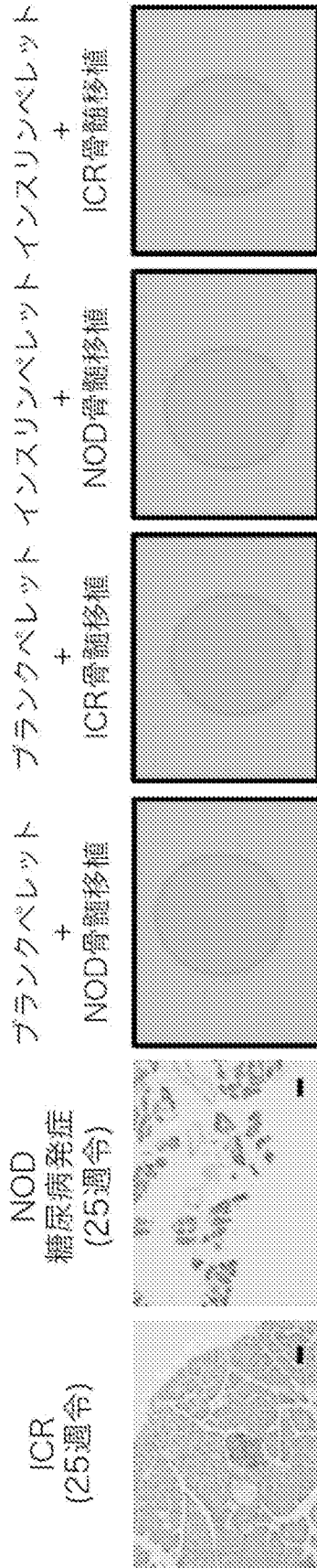
図27



[図28]

図28

・インスリン染色



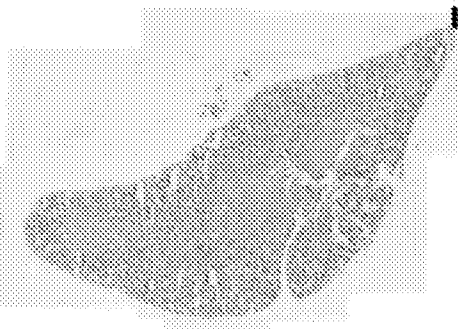
[図30]

図30

NOD
糖尿病未発症
(25週令)

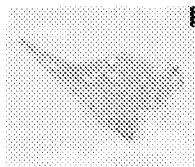


ICR
(25週令)

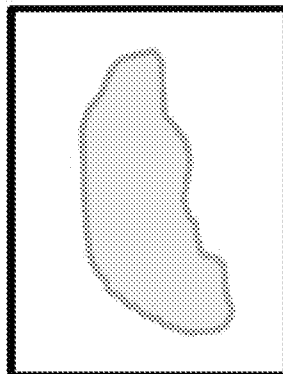
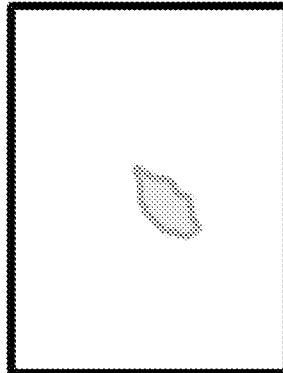
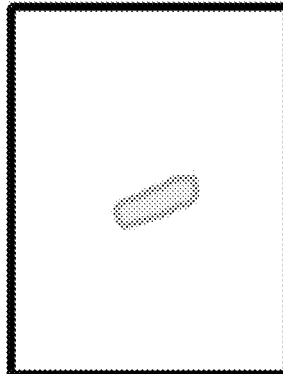
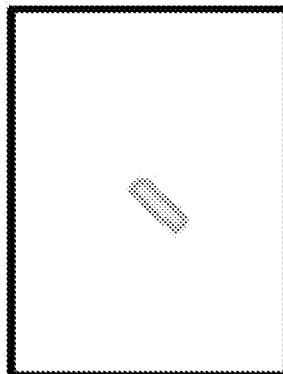


NOD

糖尿病発症
(25週令)

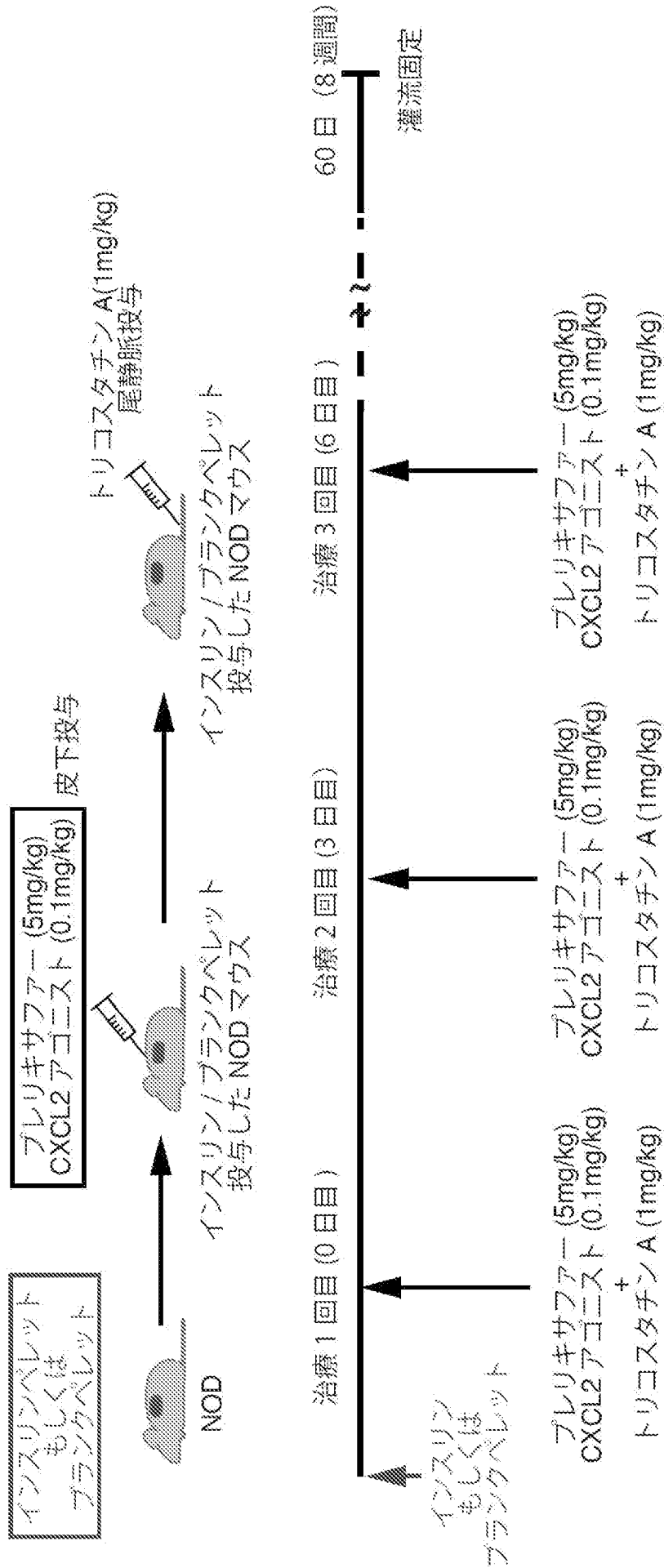


空白ペレット + ICR骨髄移植
+
NOD骨髄移植
空白ペレット + NOD骨髄移植
+
ICR骨髄移植



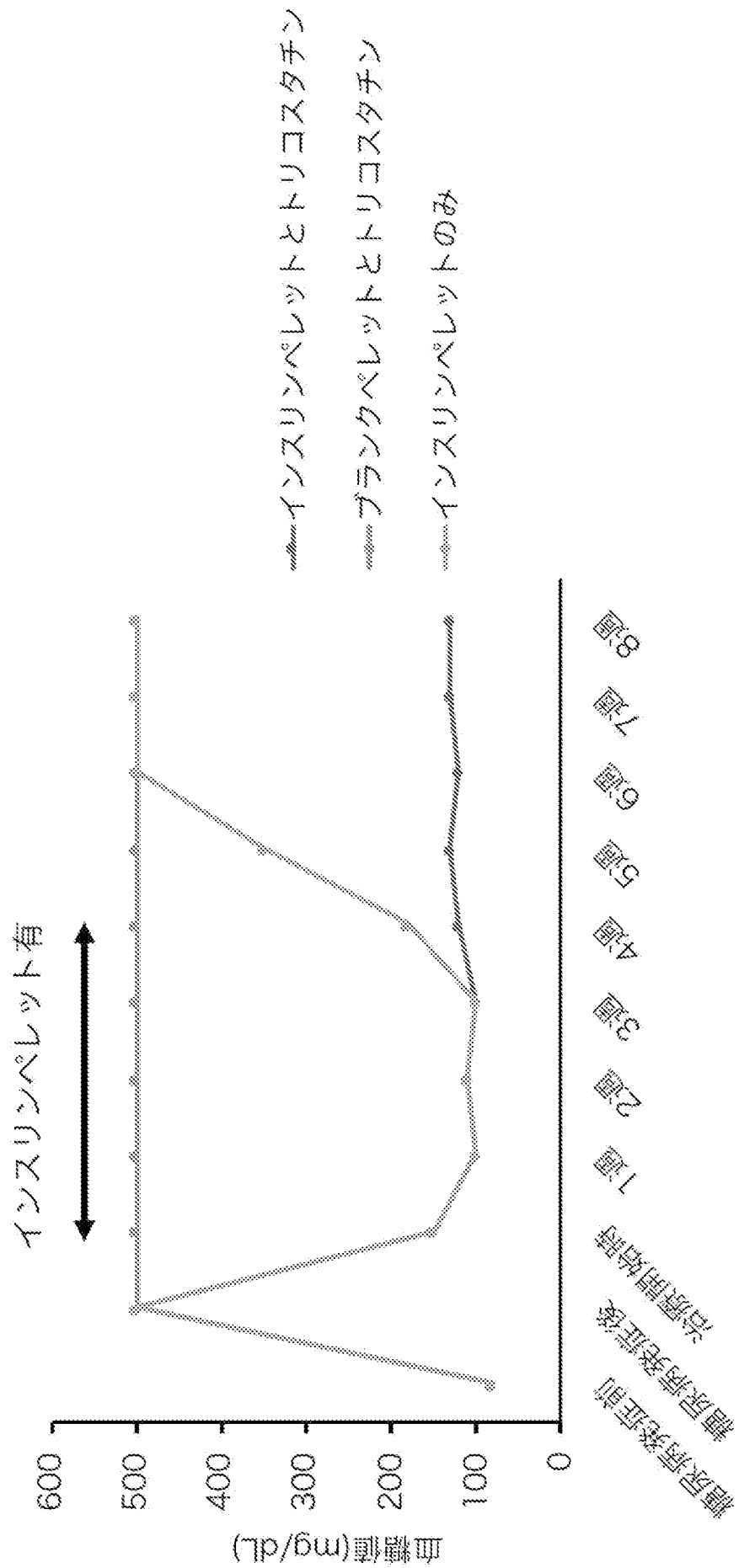
[図31]

図31



[図32]

図32

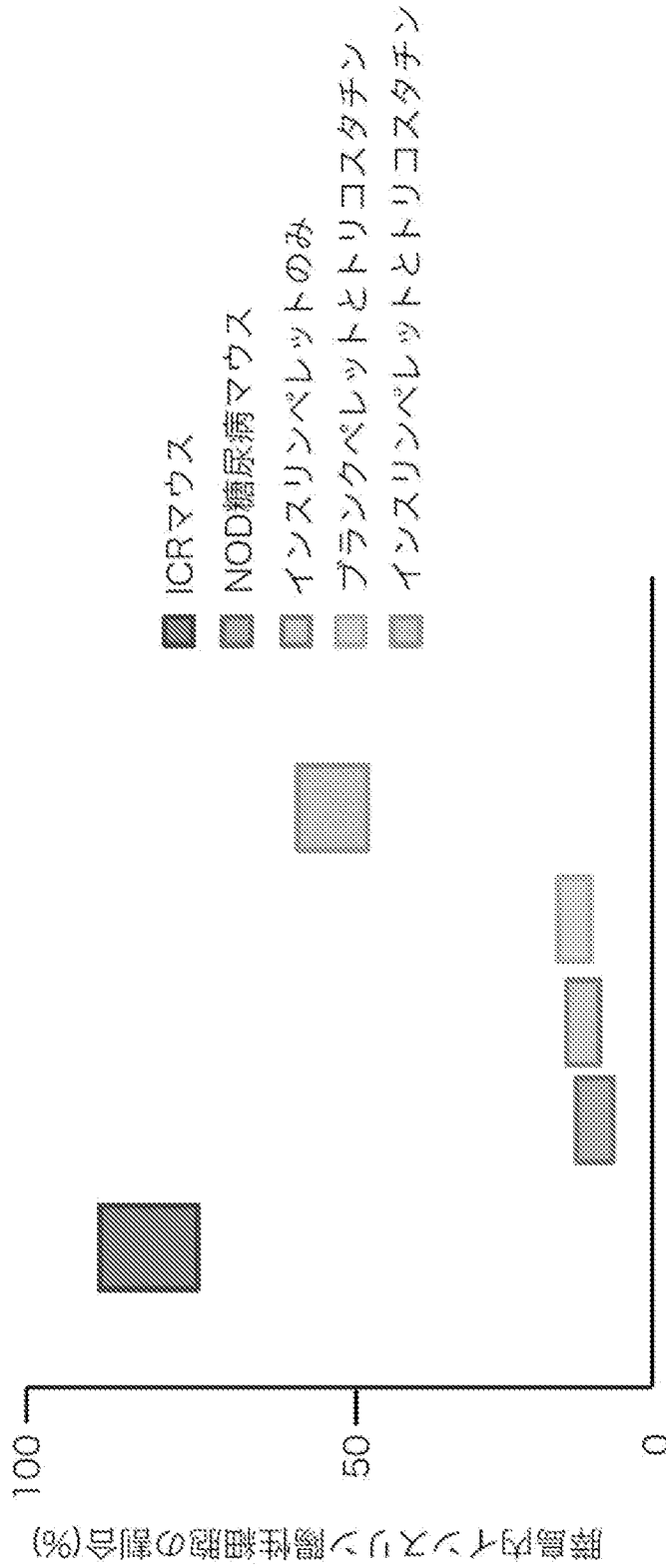
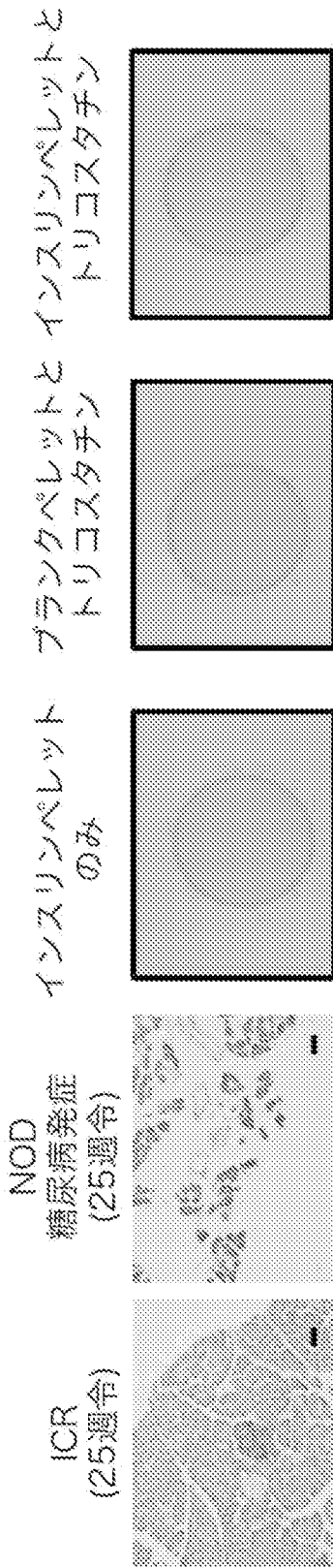


糖尿病発症前
 糖尿病発症後
 治療開始時

[図33]

図33

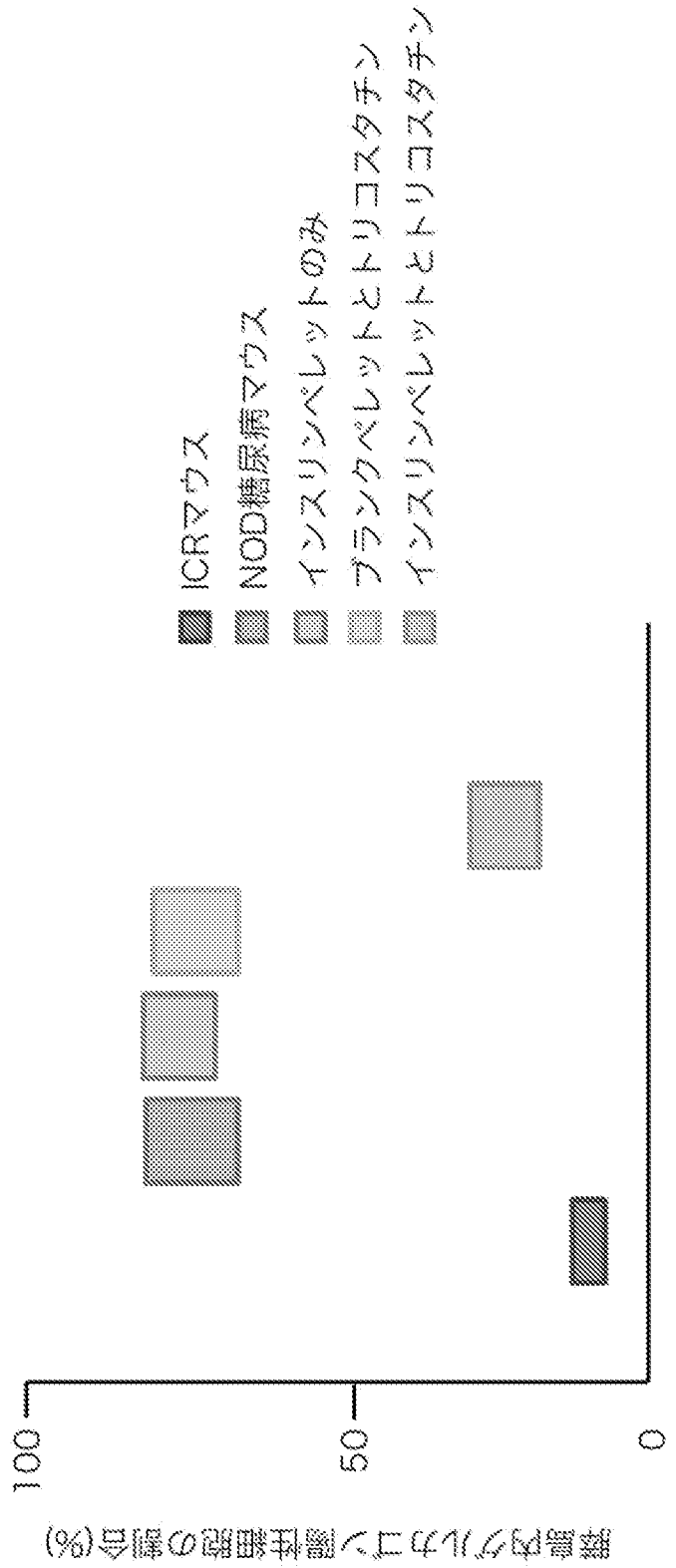
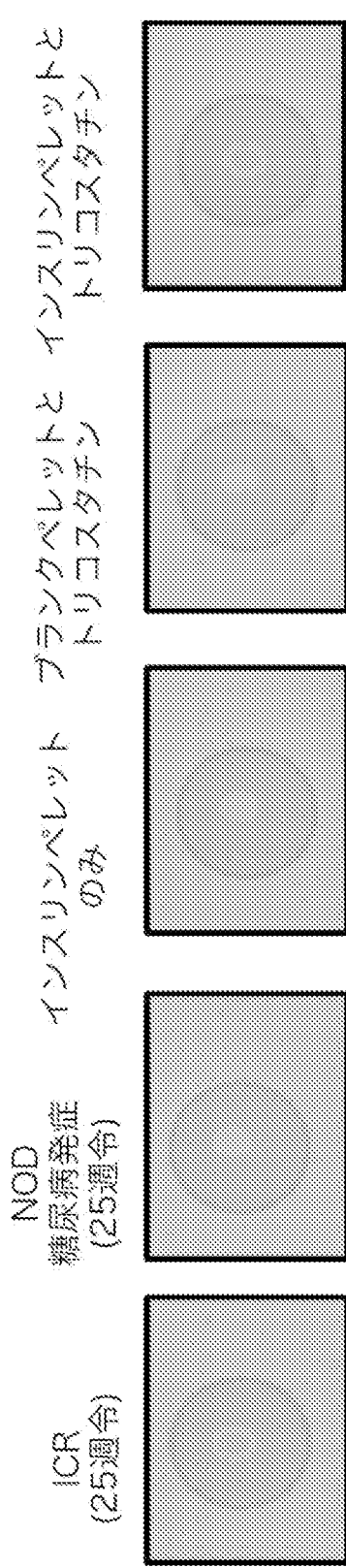
・インスリン染色



[図34]

図34

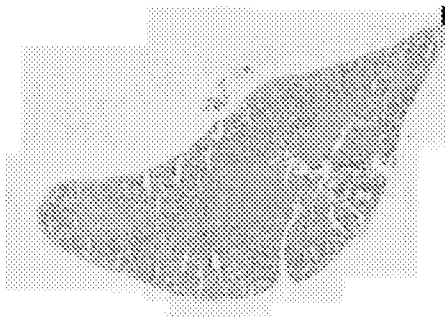
α-グルカゴニン染色



[図35]

図35

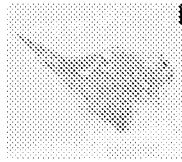
ICR
(25週令)



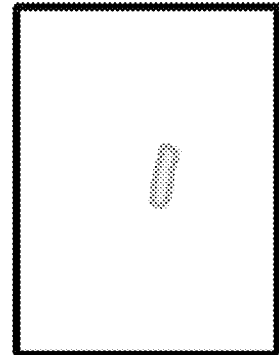
NOD
糖尿病未発症
(25週令)



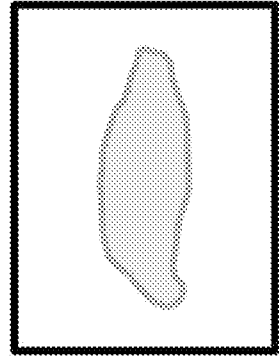
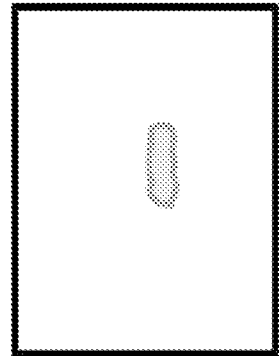
NOD
糖尿病発症
(25週令)



インスリンペレット
のみ



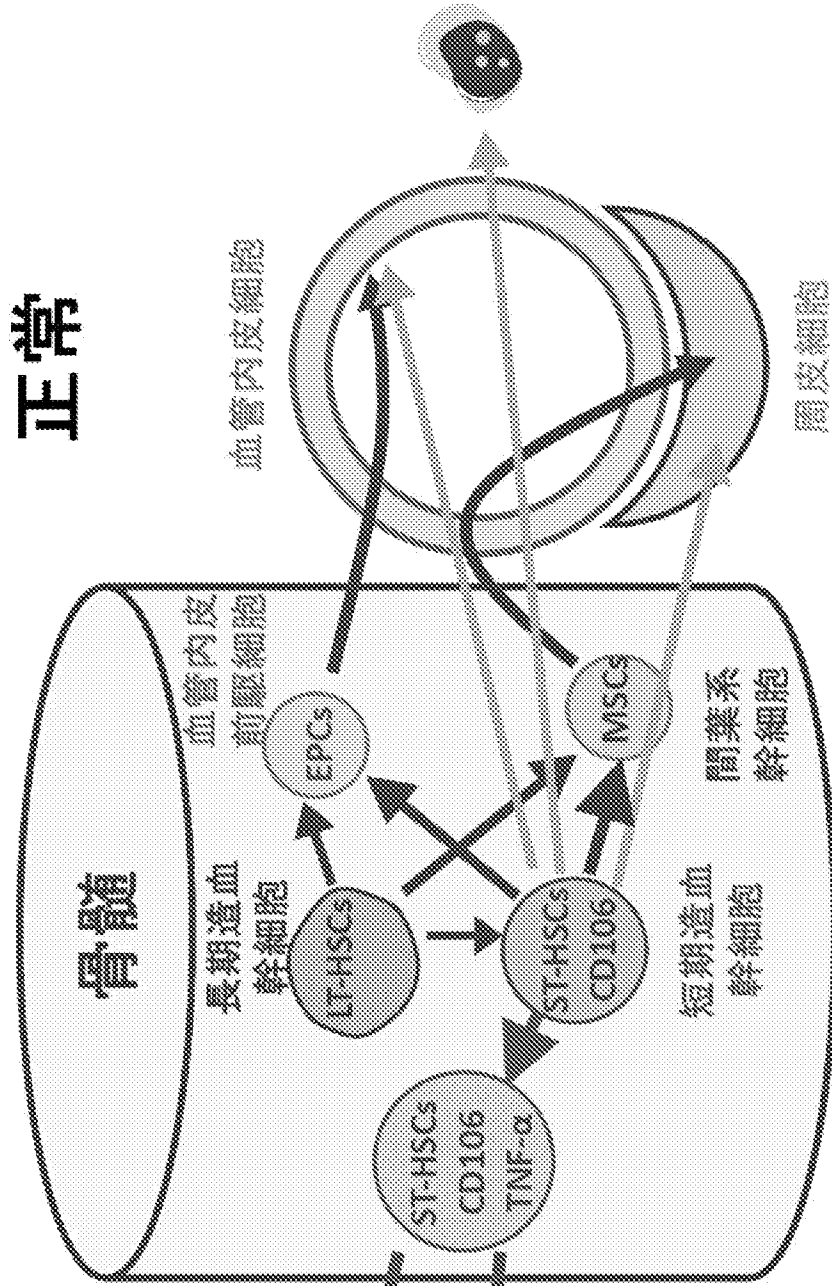
ブランクペレットとインスリンペレットと
トリコスタチン



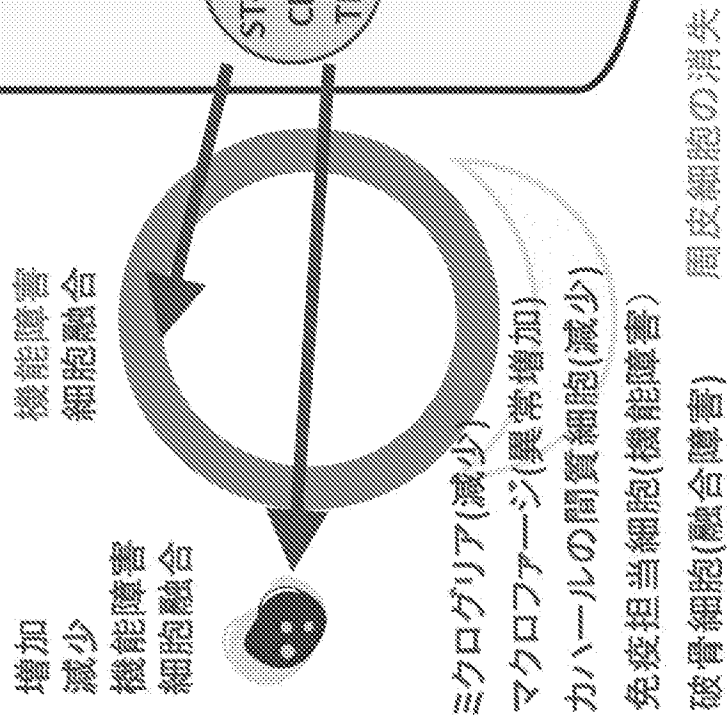
[図36]

図36

正常



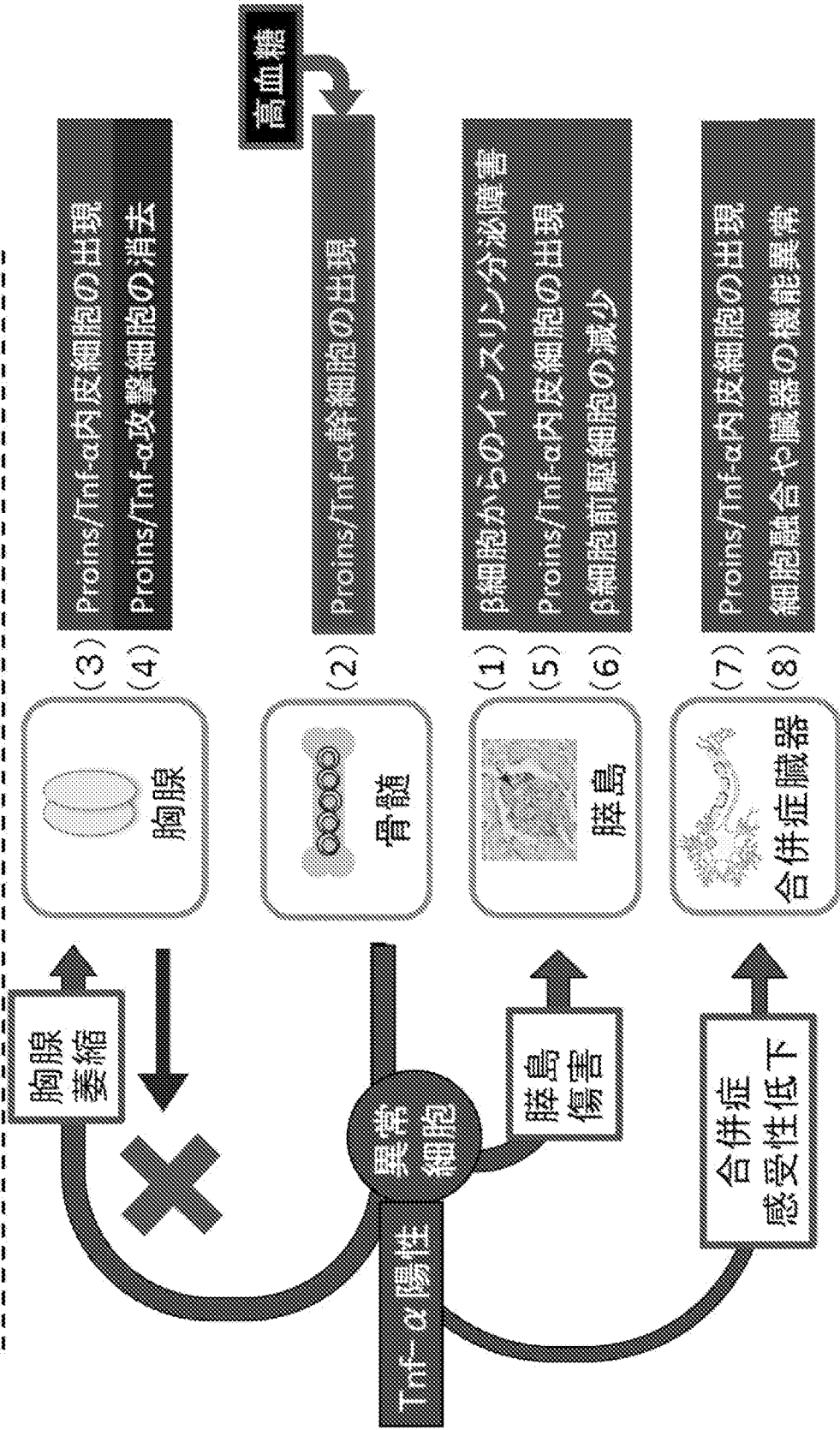
糖尿病



[図37]

図37

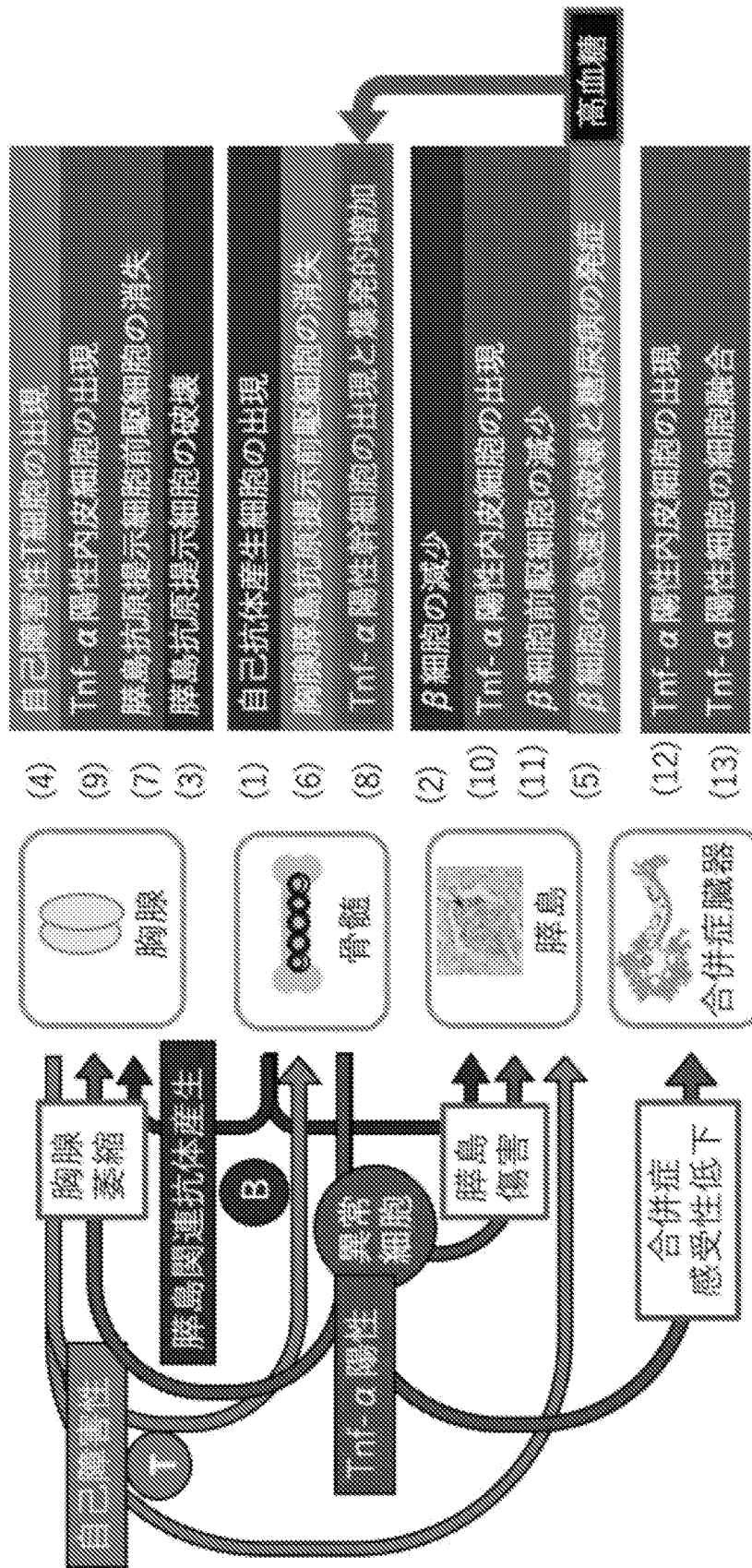
2型糖尿病で骨髄由来細胞が異常を引き起こすメカニズム



[図38]

図38

1型糖尿病で骨髄由来細胞が異常を引き起こすメカニズム



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/008036

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p>A61K 45/06(2006.01)i; A61K 31/165(2006.01)i; A61K 31/27(2006.01)i; A61K 31/395(2006.01)i; A61K 38/19(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 1/00(2006.01)i; A61P 1/16(2006.01)i; A61P 3/06(2006.01)i; A61P 3/10(2006.01)i; A61P 13/12(2006.01)i; A61P 17/00(2006.01)i; A61P 19/00(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i</p> <p>FI: A61K45/06; A61P3/10; A61P43/00 121; A61P43/00 111; A61K39/395 D; A61K39/395 U; A61P17/00; A61P19/00; A61P1/16; A61P3/06; A61P1/00; A61P25/00; A61P27/02; A61P13/12; A61K38/19; A61K31/395; A61K31/165; A61K31/27; G01N33/68</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K45/06; A61K31/165; A61K31/27; A61K31/395; A61K38/19; A61K39/395; A61P1/00; A61P1/16; A61P3/06; A61P3/10; A61P13/12; A61P17/00; A61P19/00; A61P25/00; A61P27/02; A61P43/00; G01N33/68		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
<p>Published examined utility model applications of Japan 1922-1996</p> <p>Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022</p> <p>Registered utility model specifications of Japan 1996-2022</p> <p>Published registered utility model applications of Japan 1994-2022</p>		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	小島秀人, 外5名, 糖尿病の過食には骨髄由来脳内ミクログリアの分化異常が関与する, 再生医療, 2016, vol. 15, Suppl., p. 248, ISSN 1347-7919 column O-34-2, (KOJIMA, Hideto et al. Regenerative Medicine.), non-official translation (Abnormal differentiation of bone marrow-derived microglia is involved in diabetic overeating)	1-23
Y	EL-SERAFAI, A. et al. The potentiality of histone deacetylase inhibitors for diabetes and obesity. Histone Modification in Therapy. 1st Edition. Chapter 14. 2020, pp. 361-371, ISBN 9780128164228 pp. 364-369	1-14, 20, 23
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
20 April 2022		10 May 2022
Name and mailing address of the ISA/JP		Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/008036

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ELGAMAL, D. A. et al. Ultrastructure characterization of pancreatic beta-cells is accompanied by modulatory effects of the HDAC inhibitor sodium butyrate on the PI3/AKT insulin signaling pathway in juvenile diabetic rats. Mol Cell Endocrinol. 2020, vol. 503, Article No. 110700, pp. 1-12, ISSN 0303-7207 abstract, etc.	1-14, 20, 23
Y	SHARMA, S. et al. Histone deacetylase inhibitors: Future therapeutics for insulin resistance and type 2 diabetes. Pharmacol Res. 2016, vol. 113, pp. 320-326, ISSN 1043-6618 abstract, future scope and conclusion, etc.	1-20, 23
Y	AN, J. et al. Trichostatin A increases BDNF protein expression by improving XBP-1s/ATF6/GRP78 axis in Schwann cells of diabetic peripheral neuropathy. Biomed Pharmacother. January 2021, vol. 133, Article No. 111062, pp. 1-14, ISSN 0756-3322 abstract, etc.	1-20, 23
Y	JP 2010-538275 A (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 09 December 2010 (2010-12-09) claims, examples, etc.	1-14, 20, 23
Y	WO 2013/073698 A1 (TOKYO METROPOLITAN INSTITUTE OF MEDICAL SCIENCE) 23 May 2013 (2013-05-23) claims, examples, etc.	1-14, 20, 23
Y	COSTA, D. B. et al. Improvement of Type 2 Diabetes in a Lung Cancer Patient Treated With Erlotinib. Diabetes Care. 2006, vol. 29, no. 7, p. 1711, ISSN 0149-5992 p. 1711	1-14, 20, 23
Y	BROOKS, M. B. Erlotinib and Gefitinib, Epidermal Growth Factor Receptor Kinase Inhibitors, May Treat Non-Cancer-Related Tumor Necrosis Factor-alpha Mediated Inflammatory Diseases. Oncologist. 2013, vol. 18, pp. e3-e5, ISSN 1083-7259 p. e4, right column, last paragraph to p. e5, left column	1-14, 20, 23
Y	JP 2010-508265 A (DONG-A PHARM. CO., LTD.) 18 March 2010 (2010-03-18) claims, examples, etc.	1-14, 20, 23
Y	JP 2009-542197 A (MERCK SERONO SA) 03 December 2009 (2009-12-03) claims, paragraph [0009], etc.	1-14, 20, 23
Y	TSUKAMOTO, K. et al. Administration of Monoclonal Antibodies against Vascular Cell Adhesion Molecule-1/Very Late Antigen-4 Abrogates Predisposing Autoimmune Diabetes in NOD Mice. Cell Immunol. 1995, vol. 165, pp. 193-201, ISSN 0008-8749 abstract, p. 194, left column, discussion, etc.	5-12, 18-19, 23
Y	JP 8-509203 A (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC) 01 October 1996 (1996-10-01) claims, examples, etc.	5-12, 23
Y	JP 2019-509988 A (JANSSEN BIOTECH, INC) 11 April 2019 (2019-04-11) claims, paragraphs [0307]-[0313], etc.	5-12, 23
X	樫美和子, 外2名, 糖尿病における骨髄幹細胞の分化異常と糖毒性メモリー, 再生医療, 2013, vol. 12, Suppl., p. 155, ISSN 1347-7919 column O-6-3, (KASHI, Miwako et al. Regenerative Medicine.), non-official translation (Abnormal differentiation of bone marrow stem cells and glucotoxicity memory in diabetes)	15-17, 19, 21-22
Y		15-19, 21-23
X	樫美和子, 外2名, 糖尿病における骨髄幹細胞の分化異常ーヒストンデアセチラーゼ遺伝子の発現異常についてー, 再生医療, 2011, vol. 10, Suppl., p. 208, ISSN 1347-7919 column 1P-067, (KASHI, Miwako et al. Regenerative Medicine.), non-official translation (Abnormal differentiation of bone marrow stem cells in diabetes -About abnormal expression of histone deacetylase gene-)	15-17, 19, 21-22
Y		15-19, 21-23

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>樫美和子, 外5名, 糖尿病性神経障害の完治に向けた新規治療標的の同定, 第18回日本再生医療学会総会 プログラム抄録, 2019, p. 109 column O-06-6, (KATAGI, Miwako, et al.), non-official translation (Identification of novel therapeutic targets for the complete recovery of diabetic neuropathy. Programs and abstracts of the 18th Congress of the Japanese Society for Regenerative Medicine.)</p>	18-19
P, X	<p>樫美和子, 外7名, 骨髄細胞を標的とした糖尿病の完治を目指した治療法の開発, 第20回日本再生医療学会総会 プログラム抄録, 26 February 2021, p. 220 column O-11-4, (KATAGI, Miwako et al.), non-official translation (Development of a treatment method aiming at the complete recovery of diabetes by targeting bone marrow cells. Programs and abstracts of the 20th Congress of the Japanese Society for Regenerative Medicine.)</p>	1-23
P, X	<p>WO 2021/075536 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORP. SHIGA UNIV. OF MEDICAL SCIENCE) 22 April 2021 (2021-04-22) claims, examples, etc</p>	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/008036

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2010-538275	A	09 December 2010	WO 2009/029885 A1 claims, examples	
				US 2010/0298214 A1	
				EP 2182976 A1	
WO	2013/073698	A1	23 May 2013	JP 2015-24960 A	
JP	2010-508265	A	18 March 2010	US 2010/0048869 A1 claims, examples	
				US 2011/0076247 A1	
				WO 2008/054098 A1	
				EP 2077852 A1	
JP	2009-542197	A	03 December 2009	WO 2008/003763 A1 claims, p. 3	
				US 2010/0004167 A1	
				EP 2046830 A1	
JP	8-509203	A	01 October 1996	WO 1994/008609 A1 claims, examples	
				US 5730975 A	
				US 6015558 A	
				EP 671936 A1	
JP	2019-509988	A	11 April 2019	WO 2017/136524 A2 claims, paragraphs [0323]-[0329]	
				US 2017/0247444 A1	
				US 2019/0092849 A1	
				US 2019/0375836 A1	
				EP 3411504 A2	
WO	2021/075536	A1	22 April 2021	(Family: none)	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K 45/06(2006.01)i; A61K 31/165(2006.01)i; A61K 31/27(2006.01)i; A61K 31/395(2006.01)i; A61K 38/19(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 1/00(2006.01)i; A61P 1/16(2006.01)i; A61P 3/06(2006.01)i; A61P 3/10(2006.01)i; A61P 13/12(2006.01)i; A61P 17/00(2006.01)i; A61P 19/00(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i FI: A61K45/06; A61P3/10; A61P43/00 121; A61P43/00 111; A61K39/395 D; A61K39/395 U; A61P17/00; A61P19/00; A61P1/16; A61P3/06; A61P1/00; A61P25/00; A61P27/02; A61P13/12; A61K38/19; A61K31/395; A61K31/165; A61K31/27; G01N33/68</p>														
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K45/06; A61K31/165; A61K31/27; A61K31/395; A61K38/19; A61K39/395; A61P1/00; A61P1/16; A61P3/06; A61P3/10; A61P13/12; A61P17/00; A61P19/00; A61P25/00; A61P27/02; A61P43/00; G01N33/68</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2022年</td> </tr> </table> <p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2022年	日本国実用新案登録公報	1996-2022年	日本国登録実用新案公報	1994-2022年				
日本国実用新案公報	1922-1996年													
日本国公開実用新案公報	1971-2022年													
日本国実用新案登録公報	1996-2022年													
日本国登録実用新案公報	1994-2022年													
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>小島秀人, 外5名, 糖尿病の過食には骨髄由来脳内ミクログリアの分化異常が関与する, 再生医療, 2016, Vol. 15, Suppl., p. 248, ISSN 1347-7919 0-34-2欄</td> <td>1-23</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>EL-SERAFLI, A. et al., The potentiality of histone deacetylase inhibitors for diabetes and obesity, Histone Modification in Therapy, 1st Edition, Chapter 14, 2020, pp. 361-371, ISBN 9780128164228 pp. 364-369</td> <td>1-14, 20, 23</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	Y	小島秀人, 外5名, 糖尿病の過食には骨髄由来脳内ミクログリアの分化異常が関与する, 再生医療, 2016, Vol. 15, Suppl., p. 248, ISSN 1347-7919 0-34-2欄	1-23	Y	EL-SERAFLI, A. et al., The potentiality of histone deacetylase inhibitors for diabetes and obesity, Histone Modification in Therapy, 1st Edition, Chapter 14, 2020, pp. 361-371, ISBN 9780128164228 pp. 364-369	1-14, 20, 23			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号												
Y	小島秀人, 外5名, 糖尿病の過食には骨髄由来脳内ミクログリアの分化異常が関与する, 再生医療, 2016, Vol. 15, Suppl., p. 248, ISSN 1347-7919 0-34-2欄	1-23												
Y	EL-SERAFLI, A. et al., The potentiality of histone deacetylase inhibitors for diabetes and obesity, Histone Modification in Therapy, 1st Edition, Chapter 14, 2020, pp. 361-371, ISBN 9780128164228 pp. 364-369	1-14, 20, 23												
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>														
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</td> <td>“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</td> <td>“&” 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	“&” 同一パテントファミリー文献	“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献	
* 引用文献のカテゴリー	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの													
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの													
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの													
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	“&” 同一パテントファミリー文献													
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献														
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献														
<p>国際調査を完了した日</p> <p>20.04.2022</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>10.05.2022</p>													
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>伊藤 基章 4U 4146</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3439</p>													

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	ELGAMAL, D.A. et al., Ultrastructure characterization of pancreatic beta-cells is accompanied by modulatory effects of the HDAC inhibitor sodium butyrate on the PI3/AKT insulin signaling pathway in juvenile diabetic rats, Mol Cell Endocrinol, 2020, Vol. 503, Article No. 110700, pp. 1-12, ISSN 0303-7207 Abstract、等	1-14, 20, 23
Y	SHARMA, S. et al., Histone deacetylase inhibitors: Future therapeutics for insulin resistance and type 2 diabetes, Pharmacol Res, 2016, Vol. 113, pp. 320-326, ISSN 1043-6618 Abstract、Future scope and conclusion、等	1-20, 23
Y	AN, J. et al., Trichostatin A increases BDNF protein expression by improving XBP-1s/ATF6/GRP78 axis in Schwann cells of diabetic peripheral neuropathy, Biomed Pharmacother, 2021.01, Vol. 133, Article No. 111062, pp. 1-14, ISSN 0756-3322 Abstract、等	1-20, 23
Y	JP 2010-538275 A (マサチューセッツ インステテュート オブ テクノロジー) 09.12.2010 (2010 - 12 - 09) 特許請求の範囲、実施例、等	1-14, 20, 23
Y	WO 2013/073698 A1 (公益財団法人東京都医学総合研究所) 23.05.2013 (2013 - 05 - 23) 特許請求の範囲、実施例、等	1-14, 20, 23
Y	COSTA, D.B. et al., Improvement of Type 2 Diabetes in a Lung Cancer Patient Treated With Erlotinib, Diabetes Care, 2006, Vol. 29, No. 7, p.1711, ISSN 0149-5992 p. 1711	1-14, 20, 23
Y	BROOKS, M.B., Erlotinib and Gefitinib, Epidermal Growth Factor Receptor Kinase Inhibitors, May Treat Non-Cancer-Related Tumor Necrosis Factor-alpha Mediated Inflammatory Diseases, Oncologist, 2013, Vol. 18, pp. e3-e5, ISSN 1083-7259 p. e4右欄最終段落-p. e5左欄	1-14, 20, 23
Y	JP 2010-508265 A (ドン・ア・ファーム・カンパニー・リミテッド) 18.03.2010 (2010 - 03 - 18) 特許請求の範囲、実施例、等	1-14, 20, 23
Y	JP 2009-542197 A (メルク セローノ ソシエテ アノニム) 03.12.2009 (2009 - 12 - 03) 特許請求の範囲、段落0009、等	1-14, 20, 23
Y	TSUKAMOTO, K. et al., Administration of Monoclonal Antibodies against Vascular Cell Adhesion Molecule-1/Very Late Antigen-4 Abrogates Predisposing Autoimmune Diabetes in NOD Mice, Cell Immunol, 1995, Vol. 165, pp. 193-201, ISSN 0008-8749 Abstract、p. 194左欄、Discussion、等	5-12, 18-19, 23
Y	JP 8-509203 A (ダナーファーマー キャンサー インステテュート インコーポレイテッド) 01.10.1996 (1996 - 10 - 01) 特許請求の範囲、実施例、等	5-12, 23
Y	JP 2019-509988 A (ヤンセン バイオテック, インコーポレーテッド) 11.04.2019 (2019 - 04 - 11) 特許請求の範囲、段落0307-0313、等	5-12, 23
X	樫美和子, 外2名, 糖尿病における骨髄幹細胞の分化異常と糖毒性メモリー, 再生医療, 2013, Vol. 12, Suppl., p. 155, ISSN 1347-7919 0-6-3欄	15-17, 19, 21-22
Y		15-19, 21-23

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	檜美和子, 外2名, 糖尿病における骨髄幹細胞の分化異常ーヒストンデアセチラーゼ 遺伝子の発現異常についてー, 再生医療, 2011, Vol. 10, Suppl., p. 208, ISSN 1347-7919 1P-067欄	15-17, 19, 21-22
Y		15-19, 21-23
Y	檜美和子, 外5名, 糖尿病性神経障害の完治に向けた新規治療標的の同定, 第18回日 本再生医療学会総会 プログラム抄録, 2019, p. 109 0-06-6欄	18-19
P, X	檜美和子, 外7名, 骨髄細胞を標的とした糖尿病の完治を目指した治療法の開発, 第 20回日本再生医療学会総会 プログラム抄録, 2021.02.26, p. 220 0-11-4欄	1-23
P, X	WO 2021/075536 A1 (国立大学法人滋賀医科大学) 22.04.2021 (2021 - 04 - 22) 請求の範囲、実施例、等	1-23

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/008036

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2010-538275	A	09.12.2010	WO	2009/029885	A1	
					Claims, Examples		
				US	2010/0298214	A1	
				EP	2182976	A1	
WO	2013/073698	A1	23.05.2013	JP	2015-24960	A	
JP	2010-508265	A	18.03.2010	US	2010/0048869	A1	
					Claims, Examples		
				US	2011/0076247	A1	
				WO	2008/054098	A1	
				EP	2077852	A1	
JP	2009-542197	A	03.12.2009	WO	2008/003763	A1	
					Claims, p. 3		
				US	2010/0004167	A1	
				EP	2046830	A1	
JP	8-509203	A	01.10.1996	WO	1994/008609	A1	
					Clamis, Examples		
				US	5730975	A	
				US	6015558	A	
				EP	671936	A1	
JP	2019-509988	A	11.04.2019	WO	2017/136524	A2	
					Claims, [323]-[329]		
				US	2017/0247444	A1	
				US	2019/0092849	A1	
				US	2019/0375836	A1	
				EP	3411504	A2	
WO	2021/075536	A1	22.04.2021	(ファミリーなし)			