(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2017-186342
(P2017-186342A)
(43)公開日　平成29年10月12日(2017.10.12)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 38/22	(2006.01)	A61K	38/22	ZNA	2G045
G01N 33/68	(2006.01)	G01N	33/68		4C076
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	D	4C084
A61P 1/18	(2006.01)	A61P	1/18		
A61P 43/00	(2006.01)	A61P	43/00	105	

審査請求 有　請求項の数 14　ＯＬ　外国語出願　（全 59 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-86473 (P2017-86473)
(22)出願日　平成29年4月25日 (2017.4.25)
(62)分割の表示　特願2014-554800 (P2014-554800)の分割
原出願日　平成25年1月23日 (2013.1.23)
(31)優先権主張番号　61/590,021
(32)優先日　平成24年1月24日 (2012.1.24)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　507088266
ユニバーシティ　オブ　マサチューセッツ
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　ボストン　フランクリン　ストリート　２２５
(74)代理人　100092783
弁理士　小林　浩
(74)代理人　100120134
弁理士　大森　規雄
(74)代理人　100153693
弁理士　岩田　耕一
(74)代理人　100104282
弁理士　鈴木　康仁

最終頁に続く

(54)【発明の名称】膵臓β細胞障害における可溶性ＭＡＮＦ

(57)【要約】　（修正有）
【課題】対象の膵臓β細胞障害を処置するかその発症を遅延させる方法の提供。
【解決手段】対象の膵臓β細胞障害を治療するかその発症を遅延させるために用いられる組成物であって、特定のアミノ酸配列と少なくとも８０％同一である配列を含む、可溶性中脳星状細胞由来神経栄養因子（ＭＡＮＦ）の有効量を含むものである、前記組成物。また、生体試料中の可溶性中脳星状細胞由来神経栄養因子（ＭＡＮＦ）のレベルを分析し、生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルと可溶性ＭＡＮＦの基準レベルと比較することを含む、対象の膵臓β細胞障害を発症するリスクを決定する方法。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
対象における膵臓β細胞障害を診断する方法であって、
対象由来の生体試料中の可溶性中脳星状細胞由来神経栄養因子（ＭＡＮＦ）のレベルを決定し；
生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを可溶性ＭＡＮＦの基準レベルと比較する
ことを含み、
基準レベルと比較した生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルの増加は、対象が膵臓β細胞障害に罹患していることを示す、方法。
【請求項２】
対象の膵臓β細胞障害を発症するリスクを予測する方法であって、
対象由来の生体試料中の可溶性中脳星状細胞由来神経栄養因子（ＭＡＮＦ）のレベルを決定し；
生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを可溶性ＭＡＮＦの基準レベルと比較する
ことを含み、
基準レベルと比較した生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルの増加は、対象が膵臓β細胞障害を発症するリスクが高いことを示し、基準レベルと比較した生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルの減少または有意な差がないことは、対象が、膵臓β細胞障害を発症するリスクが普通であるか低いことを示す、方法。
【請求項３】
対象の膵臓β細胞機能または膵臓β細胞量をモニターする方法であって、
第１の時点での対象由来の生体試料中の可溶性中脳星状細胞由来神経栄養因子（ＭＡＮＦ）のレベルを決定し、
第２の時点での対象由来の生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを決定し、
第２の時点での生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを第１の時点での生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルと比較する
ことを含み、
第１の時点での生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルと比較した第２の時点での生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルの増加は、対象の膵臓β細胞機能の減少または膵臓β細胞量の減少を示し、第１の時点での生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルと比較した第２の時点での生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルの減少または有意な変化がないことは、対象の膵臓β細胞機能に変化がないか増加を示し、または膵臓β細胞量に変化がないか増加を示す、方法。
【請求項４】
膵臓β細胞障害を処置するための対象を選択する方法であって、
対象由来の生体試料中の可溶性中脳星状細胞由来神経栄養因子（ＭＡＮＦ）のレベルを決定し；
生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを可溶性ＭＡＮＦの基準レベルと比較し；
基準レベルと比較して生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルが増加した対象を、膵臓β細胞障害を処置するために選択する
ことを含む、方法。
【請求項５】
膵臓β細胞障害が１型糖尿病、２型糖尿病およびウルフラム症候群からなる群から選択される、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
基準レベルが可溶性ＭＡＮＦの閾値である、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７】
基準レベルが健康な対象の可溶性ＭＡＮＦのレベルである、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項８】
対象に、配列番号２に少なくとも８０％同一である配列を含む可溶性中脳星状細胞由来神経栄養因子（ＭＡＮＦ）またはアポモルヒネの有効量を投与することを含む、対象の膵臓β細胞障害を処置するかその発症を遅延させる方法。
【請求項９】
膵臓β細胞における小胞体ストレスを減少する方法であって、
膵臓β細胞を、配列番号２に少なくとも８０％同一である配列を含む可溶性中脳星状細胞由来神経栄養因子（ＭＡＮＦ）またはアポモルヒネの有効量と接触させることを含む、方法。
【請求項１０】
膵臓β細胞が対象内にある、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
２個以上の膵臓β細胞の集団における小胞体ストレス由来アポトーシス細胞死を減少するか遅延させる方法であって、膵臓β細胞の集団を、配列番号２に少なくとも８０％同一である配列を含む可溶性中脳星状細胞由来神経栄養因子（ＭＡＮＦ）またはアポモルヒネの有効量と接触させることを含む、方法。
【請求項１２】
膵臓β細胞の集団が対象内にある、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
対象がヒトである、請求項１～４、８、１０および１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４】
対象における膵臓β細胞障害の処置の有効性をモニターする方法であって、
第１の時点での対象由来の生体試料中の可溶性中脳星状細胞由来神経栄養因子（ＭＡＮＦ）のレベルを決定し、
第２の時点での対象由来の生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを決定し、
第２の時点での生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを、第１の時点での生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルと比較する
ことを含み、
（ｉ）第１の時点が処置前であり、第２の時点が処置開始後の任意の時点であるか、（ｉｉ）第１の時点が処置開始後であり、第２の時点が処置中または処置後のより遅い時点であり、
第１の時点での生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルと比較した第２の時点での生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルの減少が、対象での処置が有効であったことを示す、方法。
【請求項１５】
対象の膵臓β細胞障害の処置またはその発症の遅延に有用な候補化合物をスクリーニングする方法であって、
膵臓β細胞を準備し；
膵臓β細胞を試験化合物と接触させ；
試験化合物の存在下で膵臓β細胞によって産生される可溶性中脳星状細胞由来神経栄養因子（ＭＡＮＦ）のレベルを決定し；
膵臓β細胞によって産生される可溶性ＭＡＮＦのレベルを可溶性ＭＡＮＦの基準レベルと比較し；
基準レベルと比較した膵臓β細胞によって産生される可溶性ＭＡＮＦのレベルの増加に関連している化合物を、対象の膵臓β細胞障害を処置またはその発症を遅延させるための候補化合物として選択する
ことを含む、方法。
【請求項１６】
基準レベルが候補薬剤の非存在下における膵臓β細胞によって産生される可溶性ＭＡＮＦのレベルである、請求項１５に記載の方法。

【請求項１７】
基準レベルが可溶性ＭＡＮＦの閾値である、請求項１５に記載の方法。
【請求項１８】
対象の膵臓β細胞障害を処置またはその発症を遅延に有用な候補化合物をスクリーニングする方法であって、
ＢｉＰシグナル配列、酸化還元感受性蛍光タンパク質、およびアミノ酸配列ＫＤＥＬを含有するレポータータンパク質を発現する哺乳動物細胞を準備し；
細胞を試験化合物と接触させ；
細胞に存在する酸化型レポータータンパク質の量の決定し；
細胞に存在する酸化型レポータータンパク質の量を基準レベルと比較し；
基準レベルと比較して細胞中の酸化型レポータータンパク質のレベルの増加に関連する試験化合物を、対象の膵臓β細胞障害を処置またはその発症を遅延させるための候補化合物として選択する
ことを含む、方法。
【請求項１９】
基準レベルが候補薬剤の非存在下における哺乳動物細胞に存在する酸化型レポータータンパク質の量である、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
基準レベルが酸化型レポータータンパク質の閾値である、請求項１８に記載の方法。
【請求項２１】
対象の膵臓β細胞障害の処置またはその発症の遅延に有用な候補化合物をスクリーニングする方法であって、
ＢｉＰシグナル配列、酸化還元感受性蛍光タンパク質、およびアミノ酸配列ＫＤＥＬを含有するレポータータンパク質を発現する哺乳動物細胞を準備し；
細胞を試験化合物と接触させ；
細胞に存在する還元型レポータータンパク質の量の決定し；
細胞に存在する還元型レポータータンパク質の量を基準レベルと比較し；
基準レベルと比較して細胞中の還元型レポータータンパク質のレベルの減少に関連する試験化合物を、対象の膵臓β細胞障害を処置またはその発症を遅延させるための候補化合物として選択する
ことを含む、方法。
【請求項２２】
基準レベルが候補薬剤の非存在下における哺乳動物細胞に存在する還元型レポータータンパク質の量である、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
基準レベルが還元型レポータータンパク質の閾値である、請求項２１に記載の方法。
【請求項２４】
可溶性ＭＡＮＦに特異的に結合する抗体または抗原結合性抗体フラグメントと；
インスリン、Ｃタンパク質および膵島アミロイドポリペプチドの群から選択されるタンパク質に結合する、少なくとも１つの抗体または抗原結合性抗体フラグメント
を含むキット。
【請求項２５】
配列番号２に少なくとも８０％同一である配列を含む可溶性ＭＡＮＦタンパク質またはアポモルヒネと；
膵臓β細胞障害を処置するための少なくとも１つの追加薬剤と
を含む医薬組成物。
【請求項２６】
少なくとも１つの追加薬剤がインスリンである、請求項２５に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】
【０００１】
優先権の主張
本願は、２０１２年１月２４日に出願した米国特許出願第６１／５９０，０２１号への優先権を主張するものである。米国特許出願第６１／５９０，０２１号は、その全体を参照により本明細書に援用する。
【背景技術】
【０００２】
対象の膵臓β細胞の機能または数の喪失は、１型糖尿病（真性糖尿病）、２型糖尿病およびウルフラム症候群をはじめとする、いくつかの疾患の病因の一因となっている。１型糖尿病では、患者は、インスリン欠乏による高い血糖レベルを有する。一般的に言えば、インスリンの絶対的欠乏は１型糖尿病患者に起こり、インスリンの相対的欠乏は２型糖尿病患者に起こる。増加しつつある証拠によれば、機能性膵臓β細胞量の減少は、１型および２型両方の糖尿病、ならびにウルフラム症候群などの糖尿病の遺伝型に共通する特徴であることを示唆している（Pipeleers et al., Novartis Found Symp. 292:19-24, 2008）。１型または２型糖尿病の進行中に、膵臓β細胞の機能と量は徐々に減少し、インスリン欠乏および高血糖症を最終的にもたらす。最新の知見によれば、「ストレスを受けた」膵臓β細胞は機能不全および死滅を起こしやすいことが示唆されている（Oslowski et al., Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes. 17:107-112, 2010；Oslowski et al., Curr. Opin. Cell Biol. 23:207-215, 2011；Fonseca et al., Trends Endocrinol. Metab. 22:266-274, 2011）。対象の膵臓β細胞の機能不全および死滅を発症しやすさを予測することを支援する診断マーカーは、対象の膵臓β細胞障害（例えば、１型または２型糖尿病）の処置または進行の遅延に有用である。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００３】
本発明は、一つには、ストレスを受けた膵臓β細胞は可溶性中脳星状細胞由来神経栄養因子（ＭＡＮＦ）を産生および分泌し、可溶性ＭＡＮＦは小胞体ストレス由来アポトーシスから膵臓β細胞を保護し、かつ可溶性ＭＡＮＦは膵臓β細胞における小胞体酸化還元ホメオスタシスを維持するという発見に基づく。
【課題を解決するための手段】
【０００４】
これらの発見に鑑み、本願は、対象における膵臓β細胞障害を診断する方法（例えば、インビトロにおける方法）、対象の膵臓β細胞障害を発症するリスクを予測する方法（例えば、インビトロにおける方法）、対象（例えば、膵臓β細胞障害を発症するリスクのある対象）における膵臓β細胞機能または膵臓β細胞量をモニターする方法（例えば、インビトロにおける方法）、膵臓β細胞障害を発症するリスクが高い対象を同定する方法（例えば、インビトロにおける方法）、膵臓β細胞障害を処置するための対象を選択する方法（例えば、インビトロにおける方法）、臨床試験に参加する対象を選択する方法（例えば、インビトロにおける方法）、および膵臓β細胞における小胞体ストレスを検出する方法（例えば、インビトロにおける方法）を提供する。これらの方法は、可溶性ＭＡＮＦの少なくとも１つのレベル（例えば、対象由来の生体試料中、または培地中の可溶性ＭＡＮＦの内因性レベル）を決定することを包含する。
【０００５】
また本願は、対象由来の生体試料中の可溶性中脳星状細胞由来神経栄養因子（ＭＡＮＦ）のレベルを決定し；生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを可溶性ＭＡＮＦの基準レベルと比較し；基準レベルと比較して生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルが増加した対象を膵臓β細胞障害に罹患していると同定することを含む、対象における膵臓β細胞障害を診断する方法（例えば、インビトロにおける方法）を提供する。
【０００６】

さらに本願は、対象由来の生体試料中の可溶性中脳星状細胞由来神経栄養因子（ＭＡＮＦ）のレベルを決定し；生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを可溶性ＭＡＮＦの基準レベルと比較し；基準レベルと比較して生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルが増加した対象を、膵臓β細胞障害を発症するリスクが高いと同定するか、または、基準レベルと比較して生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルが減少したか有意な差がない対象を、膵臓β細胞障害を発症するリスクが正常であるか低いと同定することを含む、対象の膵臓β細胞障害を発症するリスクを予測する方法（例えば、インビトロにおける方法）を提供する。

【０００７】

さらに本願は、第１の時点での対象由来の生体試料中の可溶性中脳星状細胞由来神経栄養因子（ＭＡＮＦ）のレベルを決定し；第２の時点での対象由来の生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを決定し；第２の時点での生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを第１の時点での生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルと比較し；第１の時点での生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルと比較して第２の時点での生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルが増加した対象を、膵臓β細胞機能が減少している、または膵臓β細胞が減少していると同定するか、あるいは、第１の時点での生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルと比較して第２の時点での生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルが減少したか有意な変化がない対象を、膵臓β細胞機能に変化がない、もしくは増加している、または、対象の膵臓β細胞量に変化がない、もしくは増加していると同定することを含む、対象の膵臓β細胞機能または膵臓β細胞量をモニターする方法（例えば、インビトロにおける方法）を提供する。

【０００８】

さらに、対象における膵臓β細胞障害の処置の有効性をモニターする方法（例えばインビトロにおける方法）を提供する。これらの方法は、第１の時点での対象由来の生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを決定し、第２の時点での対象由来の生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを決定し、第２の時点での生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを第１の時点での生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルと比較することを含むものであって、（ｉ）第１の時点が処置前であり、第２の時点が処置開始後の任意の時点であるか、（ｉｉ）第１の時点が処置開始後であり、第２の時点が処置中または処置後のより遅い時点であり；第１の時点での生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルと比較した第２の時点での生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルの減少が、対象での処置が有効であったことを示す方法。

【０００９】

さらに、対象の膵臓β細胞障害を処置するかその発症を遅延させる方法、膵臓β細胞における小胞体ストレスを減少する方法（例えばインビトロにおける方法）、または２個以上の膵臓β細胞の集団における小胞体ストレス由来アポトーシス細胞死を減少するか遅延させる方法（例えばインビトロにおける方法）を提供する。これらの方法は、対象への有効量の可溶性ＭＡＮＦもしくはアポモルヒネの投与、または膵臓β細胞もしくは膵臓β細胞の集団を可溶性ＭＡＮＦもしくはアポモルヒネと接触させることを包含する。一部の実施形態において、可溶性ＭＡＮＦは、哺乳動物の可溶性ＭＡＮＦタンパク質配列（例えば、配列番号２および４～７のいずれか１つの配列）に少なくとも８０％（例えば、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％）同一である配列を含有する。一部の実施形態において、例えば、本方法がアポモルヒネ（apomorpine）を投与することを含むものである場合、対象は勃起不全またはパーキンソン病に罹患していない。

【００１０】

さらに、本願は、対象の膵臓β細胞障害を処置するかその発症を遅延させる薬剤の製造における、本願に記載のいずれかの可溶性ＭＡＮＦ（例えば、配列番号２に少なくとも８０％同一である配列を含む可溶性ＭＡＮＦ）またはアポモルヒネを使用する方法の方法を提供する。さらに、本願は、対象の膵臓β細胞障害の処置またはその発症の遅延で使用するための、単離された可溶性ＭＡＮＦ（例えば、配列番号２に少なくとも８０％同一である配列を含む単離された可溶性ＭＡＮＦ）またはアポモルヒネを提供する。

【００１１】

さらに、本願は、対象の膵臓β細胞障害の処置またはその発症の遅延に有用な候補化合物をスクリーニングする方法（例えばインビトロにおける方法）、膵臓β細胞における小胞体ストレスを減少する方法（例えばインビトロにおける方法）、および膵臓β細胞における小胞体ストレス由来アポトーシス細胞死を減少するか遅延させる方法（例えばインビトロにおける方法）を提供する。これらの方法は、膵臓β細胞を提供し、膵臓β細胞を候補化合物と接触させ、候補化合物の存在下で膵臓β細胞によって産生される可溶性ＭＡＮＦのレベルを決定し、膵臓β細胞によって産生される可溶性ＭＡＮＦのレベルを可溶性ＭＡＮＦの基準レベルと比較し、基準レベルと比較して膵臓β細胞によって産生される可溶性ＭＡＮＦのレベルの増加に関連している化合物を、対象の膵臓β細胞障害を処置またはその発症を遅延させるための候補化合物として選択することを含む。これらの方法では、基準レベルと比較して膵臓β細胞によって産生される可溶性ＭＡＮＦのレベルが増加したということは、候補化合物が対象の膵臓β細胞障害を処置するかその発症を遅延させ、膵臓β細胞における小胞体ストレスを減少し、または膵臓β細胞における小胞体ストレス由来アポトーシス細胞死を減少もしくは遅延させるのに有用であることを示す。

【００１２】

さらに、対象の膵臓β細胞障害を処置するかその発症を遅延させ、膵臓β細胞における小胞体ストレスを減少し、または膵臓β細胞における小胞体ストレス由来アポトーシス細胞死を減少するか遅延させるのに有用な候補化合物をスクリーニングする方法（例えばインビトロにおける方法）を提供する。これらの方法は、ＢｉＰシグナル配列、酸化還元感受性蛍光タンパク質（例えば、酸化還元感受性緑色蛍光タンパク質）、およびＫＤＥＬのアミノ酸配列を含有するレポータータンパク質を発現する哺乳動物細胞（例えば、膵臓β細胞）を提供し；細胞を試験化合物と接触させ；細胞に存在する酸化型レポータータンパク質の量の決定し；細胞に存在する酸化型レポータータンパク質の量を基準レベルと比較することを含むものであって、基準レベルと比較して細胞中の酸化型レポータータンパク質のレベルが増加したということは、候補化合物が対象の膵臓β細胞障害の処置またはその発症の遅延に有用であり得ることを示す。一部の実施形態において、基準レベルは、候補薬剤の非存在下における哺乳動物細胞に存在する酸化型レポータータンパク質の量である。一部の実施形態において、基準レベルは、酸化型レポータータンパク質の閾値である。

【００１３】

さらに、対象の膵臓β細胞障害を処置するかその発症を遅延させ、膵臓β細胞における小胞体ストレスを減少し、または膵臓β細胞における小胞体ストレス由来アポトーシス細胞死を減少するか遅延させるのに有用な候補化合物をスクリーニングする方法（例えばインビトロにおける方法）を提供する。これらの方法は、ＢｉＰシグナル配列、酸化還元感受性蛍光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質）、およびＫＤＥＬのアミノ酸配列を含有するレポータータンパク質を発現する哺乳動物細胞（例えば、膵臓β細胞）を提供し；細胞を試験化合物と接触させ；細胞に存在する還元型レポータータンパク質の量の決定し；細胞に存在する還元型レポータータンパク質の量を基準レベルと比較することを含むものであって、基準レベルと比較して細胞中の還元型レポータータンパク質のレベルが減少したということは、候補化合物が対象の膵臓β細胞障害の処置またはその発症の遅延に有用であり得ることを示す。一部の実施形態において、基準レベルは、候補薬剤の非存在下における哺乳動物細胞に存在する還元型レポータータンパク質の量である。一部の実施形態において、基準レベルは、還元型レポータータンパク質の閾値である。

【００１４】

さらに、可溶性ＭＡＮＦ（例えば、ヒト可溶性ＭＡＮＦ）に特異的に結合する抗体または抗原結合性抗体フラグメントと、インスリン、Ｃタンパク質および膵島アミロイドポリペプチド（ＩＡＰＰ）から選択されるタンパク質に特異的に結合する少なくとも１つの抗体または抗原結合性抗体フラグメントとを含むキットを提供する。さらに、可溶性ＭＡＮＦタンパク質（例えば、配列番号２に少なくとも８０％同一である配列を含有する可溶性ＭＡＮＦタンパク質）および／またはアポモルヒネと、膵臓β細胞障害を処置するための

少なくとも１つの追加薬剤（例えば、ピオグリタゾン、ＴＵＤＣＡ、ＧＬＰ－１、またはＤＰＰ－４阻害剤（例えば、シタグリプチン、ビルダグリプチン、サクサグリプチン、リナグリプチン、デュトグリプチン、ジェミグリプチン、およびアログリプチン））とを含有する医薬組成物を提供する。

【００１５】

「膵臓β細胞障害」という用語は、一部のその病因として、膵臓β細胞機能（例えば、インスリン分泌）の減少、または対象に存在する生存インスリン分泌性膵臓β細胞の数（膵臓β細胞量）の減少を含む疾患を意味する。一部の実施形態において、膵臓β細胞障害は、さらに、対象における膵臓β細胞の集団（例えば、２個以上の膵臓β細胞）における小胞体ストレスの増加を特徴とすることができる。本願に記載のように、膵臓β細胞機能の減少、生存膵臓β細胞数（膵臓β細胞量）の減少、または対象に存在する膵臓β細胞における小胞体ストレスの増加は、本願に記載の方法または当技術分野で公知の他の方法を用いて間接的に検出することができる。膵臓β細胞障害の非限定的な例としては、１型糖尿病（真性糖尿病）、２型糖尿病、およびウルフラム症候群が挙げられる。

【００１６】

「膵臓β細胞機能」という用語は、哺乳動物（例えばヒト）の膵臓β細胞を説明するために用いられる生物活性（例えば、膵臓β細胞に特に特有である活性）を意味する。膵臓β細胞機能の非限定的な例としては、インスリンの合成および分泌、膵島アミロイドポリペプチド（ＩＡＰＰ）の合成および分泌、ならびにＣペプチドの合成および分泌が挙げられる。インスリン、ＩＡＰＰおよびＣペプチドの合成および分泌を検出する方法は、当技術分野で公知である。膵臓β細胞機能はまた、本願に記載の方法、ならびに当技術分野で公知の方法（例えば、血糖レベルの決定および糖化ヘモグロビンＡ１Ｃレベルの決定）を用いて、間接的に検出することができる。

【００１７】

「膵臓β細胞量」という用語は、哺乳動物（例えばヒト）における生存可能なインスリン分泌性膵臓β細胞の総数を意味する。対象の膵臓β細胞量を間接的に決定する方法は、本願に記載されている。対象の膵臓β細胞量を間接的に決定するさらなる方法は、当技術分野で公知である（例えば、血糖レベルの決定および糖化ヘモグロビンＡ１Ｃレベルの決定）。

【００１８】

膵臓β細胞量は、対象における内因性の生存膵臓β細胞の総数を表すか、対象における内因性の生存膵臓β細胞の数と対象に移植された生存膵臓β細胞（例えば、自家移植、同種移植または異種移植された生存膵臓β細胞）の数との合計を表し得る。

【００１９】

「可溶性ＭＡＮＦ」という用語は、中脳星状細胞由来神経栄養因子（ＭＡＮＦ）の可溶性哺乳動物形態の配列に少なくとも８０％同一である配列を含有するタンパク質を意味する。例えば、可溶性ＭＡＮＦは、配列番号２および４～７のいずれか１つに、すなわち、配列番号２または４～７の完全長に少なくとも８０％同一である（例えば、少なくとも８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％同一である）配列を含有するタンパク質であり得る。一部の実施形態において、可溶性ＭＡＮＦは、野性型哺乳動物の可溶性ＭＡＮＦ（例えば、配列番号２および４～７）であり得る。

【００２０】

可溶性ＭＡＮＦタンパク質は、治療的処置として（例えば、本願に記載されているいずれかの方法を使用する組換え型または精製内因性タンパク質として）投与することができる。精製可溶性ＭＡＮＦタンパク質は、例えば、乾燥重量で少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％または９９％）純粋であり得る。可溶性ＭＡＮＦのさらなる変更形態は、本願に記載されている。

【００２１】

「増加」または「増加した」という用語は、基準レベルまたは同一対象における（例えば、同一対象由来の生体試料における）より早い時点もしくはより遅い時点で測定されたレベルと比較した場合の観察可能な、検出可能な、または有意なレベルの増加を意味する。

【００２２】

「減少」という用語は、基準レベルまたは同一対象における（例えば、同一対象由来の生体試料における）より早い時点もしくはより遅い時点で測定されたレベルと比較した場合の観察可能な、検出可能な、または有意なレベルの減少を意味する。

【００２３】

「可溶性ＭＡＮＦのレベルが増加したことに関連している化合物」という句は、化合物の非存在下において対照の哺乳動物細胞（例えば、同一または同一タイプの哺乳動物細胞）に存在するか、当該細胞よって産生または分泌される、可溶性ＭＡＮＦ（例えばタンパク質またはｍＲＮＡ）のレベルと比較して、化合物と接触させた哺乳動物細胞に存在するか、当該細胞よって産生または分泌される可溶性ＭＡＮＦ（例えばタンパク質またはｍＲＮＡ）のレベルの増加を誘発またはもたらす化合物を意味する。

【００２４】

「疾患を発症するリスク」という句は、対照の対象または対象群（例えば、健康な対象もしくは対象群、または膵臓β細胞障害の家族歴のない対象もしくは対象群）と比較して、対象が将来、膵臓β細胞障害を発症する相対的可能性を意味する。本願は、可溶性ＭＡＮＦのレベルを決定することを含む、対象の膵臓β細胞障害を（将来）発症するリスクを決定する方法を提供する。

【００２５】

「処置する」という用語は、対象における疾患（例えば、膵臓β細胞障害）の症状の数を減少すること、または疾患の１つもしくは複数の症状の重症度、持続期間もしくは頻度を減少することを含む。また処置するという用語は、対象が（将来）膵臓β細胞障害を発症するリスクを減少すること、または、対象の膵臓β細胞障害の１つもしくは複数の症状の発症を遅延させることも含み得る。

【００２６】

「膵臓β細胞障害の発症を遅延させる」という句は、膵臓β細胞障害の１つまたは複数の症状が対象において観察されるまでの期間を延ばすことを意味する。一部の実施形態において、対象は、膵臓β細胞障害を発症するリスクが高いと前もって同定され得る。本願で記載されているように、対象は、本願に記載の方法を使用して、または膵臓β細胞障害（例えば２型糖尿病）の家族歴の所見によって、膵臓β細胞障害を発症するリスクが高いと同定され得る。

【００２７】

「生体試料」という用語は、体液を含む、対象から収集した任意の試料を包含する。非限定的な例において、生体試料としては、血液、血清、血漿、尿、脳脊髄液、唾液、胆汁、胃液または母乳を挙げることができる。

【００２８】

「小胞体ストレス」という句は、活性酸素種（プロオキシダント種）の産生と、活性酸素種（またはそれらの中間体）を解毒する（除去する）細胞または細胞小器官の能力との間の小胞体アンバランスであって、小胞体内腔の酸化還元電位のシフト、および／または小胞体内腔内のミスフォールドもしくはアンフォールドタンパク質の蓄積が生じることを意味する。小胞体ストレスは、小胞体ストレス応答（ＵＰＲ）と呼ばれる固有のストレス経路（本願にさらに記載されている）を誘発する。

【００２９】

膵臓β細胞における小胞体ストレスは、多数の分子事象（例えば、小胞体における遊離脂肪酸レベルの増加、高インスリン血症、ＶＥＧＦの過剰産生、低酸素、グルコース除去、変異型膵島アミロイドポリペプチド、変異型インスリン、ＩＬ－１レベルの増加、ＩＦＮ－γレベルの増加、またはウイルス感染）によって引き起こされ得る。様々な各種の化

学薬剤（例えば、タプシガルギンまたはツニカマイシン）も、小胞体ストレスの誘発に使用することができる。小胞体ストレスは、酸化環境からより還元性の強い環境に向けて小胞体をシフトすることが示されている。一部の実施形態において、ＥＲストレス条件下で還元環境から酸化環境に向けて小胞体をシフトする能力を有する薬剤はＥＲストレスを減少するのに有用であり、かつ／または、ＥＲストレス由来アポトーシス細胞死を減少もしくは防止することができる。

【００３０】

小胞体ストレスは、当技術分野で公知の様々な異なる方法を使用して検出することができる。膵臓β細胞における小胞体ストレスの発症を検出、減少、または遅延させる具体的な方法は、本願に記載されている。

【００３１】

「膵臓β細胞の集団」という句は、２個以上の膵臓β細胞を意味する。一部の実施形態において、膵臓β細胞の集団は、哺乳動物（例えばヒト）対象に存在し得る（例えば、対象の内因性膵臓β細胞、膵臓β細胞の自家移植、同種移植または異種移植片）。一部の実施形態において、膵臓β細胞の集団は、インビトロにおいて培養することができる（組織培養）。一部の実施形態において、膵臓β細胞の集団は、膵臓β細胞株（例えば、本願に記載の膵臓β細胞株）である。一部の実施形態において、膵臓β細胞は、任意の哺乳動物種（例えば、ヒト、モンキー（例えばチンパンジー）、マウス、ブタ、ラットまたはサル）由来であってもよい。一部の実施形態において、膵臓β細胞の集団は、初代細胞株または不死化細胞株であってもよい。

【００３２】

「膵臓β細胞」という用語は、ランゲルハンス島中の哺乳動物の膵臓に通常存在するインスリン産生細胞を意味する。本願で使用する場合、膵臓β細胞という用語は、哺乳動物の体内に存在する膵臓β細胞（例えば、内因性膵臓β細胞、または膵臓β細胞の自家移植、同種移植もしくは異種移植片）、またはインビトロで培養された膵臓β細胞（例えば、本願に記載の任意の哺乳動物種由来の膵臓β細胞または膵臓β細胞株（例えば初代細胞株または不死化細胞株）のエクスビボにおける（例えば初代）培養物）を包含する。一部の実施形態において、哺乳動物に存在する膵臓β細胞は膵臓に存在する。一部の実施形態において、哺乳動物に存在する膵臓β細胞は膵臓以外の組織（例えば肝臓組織）に位置している。別の実施形態において、膵臓β細胞は、対象に移植されているデバイス（例えば生体適合性ポリマー）に封入されている。また膵臓β細胞という用語は、哺乳動物（例えば、ヒト、ブタ、ラットおよびマウス）細胞株における膵臓β細胞、または初代哺乳動物（例えば、ヒト、ブタ、ラットおよびマウス）細胞培養物を包含する。一部の実施形態において、膵臓β細胞は、１種もしくは複数の組換え型タンパク質（例えばインスリン）を発現するように、かつ／または１種もしくは複数の内因性タンパク質の発現を減少するように、分子生物学技術を使用して遺伝学的に操作され得る。

【００３３】

「小胞体由来アポトーシス細胞死」という用語は、細胞（例えば膵臓β細胞）の小胞体におけるストレスが引き金となって起きるプログラム細胞死である。一部の実施形態において、アポトーシス細胞死を誘発する小胞体ストレスは、細胞（例えば膵臓β細胞）における小胞体ストレス応答（ＵＰＲ）経路を誘発する。ＵＰＲ経路の例示的な成分は、本願に記載されている。本願に記載されているように、小胞体ストレスは、多数の薬剤（例えば、生物薬剤および化学薬剤）によって引き起こされ得る。膵臓β細胞における小胞体由来アポトーシス細胞死の発症を検出、測定、減少および遅延させる方法は、本願に記載されている。小胞体由来アポトーシス細胞死を検出および測定するさらなる方法は、当技術分野で公知である。

【００３４】

「レベルを決定する」という用語は、特定の分子（例えば、生体試料または細胞培養培地中のもの）のレベルを測定する１つまたは複数の科学技術（例えば、分子生物学、分子遺伝学、免疫学、および生化学上の方法またはアッセイ）を使用することを意味する。レ

ベルを決定するという句は、特定の分子（例えば抗体、または抗原結合性抗体フラグメント）に特異的に結合する１種または複数の試薬を、試料（例えば生体試料または細胞培養培地）に物理的に接触させることを包含する。

【００３５】

「第２の時点」という用語は、一般に、第１の時点（例えば入院の時点）の後に生じるすべての時点を意味する。第２の時点は、例えば、第１の時点の少なくとも６時間、１２時間、２４時間、１日、２日、３日、４日、５日、６日、１週間、２週間、３週間、４週間、６週間、２か月、６か月、１年、または２年後に生じ得る。一部の実施形態において、対象は、第１の時点と第２の時点の間に処置が施され得る。

【００３６】

「酸化還元感受性蛍光タンパク質」という用語は、その酸化還元環境の変化時に（例えば小胞体の酸化還元環境の変化時に）、その蛍光特性（例えば、励起および／または発光スペクトル（例えばピーク励起または発光波長）が変化するタンパク質である。一部の実施形態において、タンパク質の蛍光特性のこの変化は、例えば、１つまたは複数のジスルフィド結合の形成および／または切断の結果として生じ得る。酸化還元感受性蛍光タンパク質の非限定的な例としては、酸化還元－酸化感受性緑色蛍光タンパク質（ｒｏＧＦＰ）および酸化還元感受性黄色蛍光タンパク質（ｒｘＹＦＰ）が挙げられる。さらなる酸化還元感受性蛍光タンパク質は、当技術分野では公知である。

【００３７】

他の定義は、本開示の全体にわたる文脈において表示される。別段の定義がない限り、本願で用いるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本発明における使用に関する方法および材料は本願に記載されている。当技術分野で公知の好適な他の方法および材料を使用することもできる。材料、方法および例は単なる例示にすぎず、限定することを意図するものではない。本願に記載されているすべての刊行物、特許出願、特許、配列、データベース登録、および他の参考文献は、その全体を参照により援用するものとする。矛盾する場合、定義を含む本明細書が規制する。

【００３８】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および図面から、ならびに特許請求の範囲から明白であろう。

【図面の簡単な説明】

【００３９】

【図１】２４時間のタプシガルギン（５０ｎＭ）またはツニカマイシン（０．５μｇ／ｍＬ）による処理後または未処理後に、ラット膵臓β細胞株（ＩＮＳ－１　８３２／１３）の培養物から得た濃縮培地中、またはラット膵臓β細胞株（ＩＮＳ－１　８３２／１３）から得た溶解物中のＭＡＮＦタンパク質のレベルを示すイムノブロットである。

【図２】下記の条件下で培養したラット膵臓β細胞株（ＩＮＳ－１　８３２／１３）におけるＭＡＮＦ　ｍＲＮＡの相対的発現を示すグラフである：１１ｍＭグルコース（２４時間）；２５ｍＭグルコース（２４時間）；２５ｍＭグルコース（４８時間）；２５ｍＭグルコース（７２時間）；１１ｍＭグルコースおよび５μＭツニカマイシン（ＴＭ）（２４時間）；または１１ｍＭグルコースおよび２０ｎＭタプシガルギン（Ｔｇ）（２４時間）。示したデータは、定量的リアルタイムＰＣＲを用いて作製した（ｎ＝３；Ｓ．Ｄ．）。

【図３】５ｍＭグルコース（ＬＧ）、１１ｍＭグルコース（ＭＧ）、もしくは２５ｍＭグルコース（ＨＧ）と一緒に５日間培養したか、または５ｍＭグルコース（ＬＧ）と５日間および０．５μＭタプシガルギン（ＴＧ）と６時間培養した、マウス初代膵島におけるＭＡＮＦ、ＷＦＳ１、ＴＸＮＩＰおよびＣＨＯＰ　ｍＲＮＡの相対的発現を示すグラフである。示したデータは、定量的リアルタイムＰＣＲを用いて作製した（ｎ＝３；Ｓ．Ｄ．）。

【図４】５．５ｍＭグルコース（ＵＴ）、２５ｍＭグルコース（ＨＧ）、０．２５μＭタプシガルギン（ＴＧ）、１０μＭ膵島アミロイドポリペプチド（ＩＡＰＰ）、またはウシ

血清アルブミンを含む５００μＭパルミチン酸塩（パルミチン酸塩）で２４時間処理した後の二人のヒトのドナー（ＨＰ１１１３９－０１およびＨＩ１１－２０）由来のヒト初代膵島におけるＭＡＮＦ　ｍＲＮＡの相対的発現を示すグラフである。示したデータは、定量的リアルタイムＰＣＲを用いて作製した（ｎ＝３；Ｓ．Ｄ．）。

【図５】２５ｍＭグルコース（２４時間）、０．２５μＭタプシガルギン（２４時間）、または０．５ｍＭパルミチン酸塩（２４時間）による追加処理後または未処理後のヒト初代膵島培地中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを示すイムノブロットである。

【図６】２５ｍＭグルコース（２４時間）、０．２５μＭタプシガルギン（２４時間）、または０．５ｍＭパルミチン酸塩（２４時間）による追加処理後または未処理後のヒト初代膵島培地から免疫沈降させた可溶性ＭＡＮＦのレベルを示すイムノブロットである。この実験では、ヒトＭＡＮＦは、ウサギ抗ヒトＭＡＮＦ抗体（Ｐｒｏｔｅｉｎｔｅｃｈ）を用いて免疫沈降し、同一抗体を用いてイムノブロットを展開した。

【図７】２４時間２μＭツニカマイシンによる処理後または未処理後のネガティブコントロールのｓｉＲＮＡ（ＮＣ）または３つの異なるＭＡＮＦ　ｍＲＮＡを標的とするｓｉＲＮＡ分子（ｓｉＭＡＮＦ＃１、ｓｉＭＡＮＦ＃２、またはｓｉＭＡＮＦ＃３）のいずれかでトランスフェクトしたマウス膵臓β細胞株（ＭＩＮ６）におけるＢｉＰ　ｍＲＮＡの相対的発現を示すグラフである。これらのデータは、定量的リアルタイムＰＣＲを用いて作製した（ｎ＝３；Ｓ．Ｄ．）。

【図８】１μＭツニカマイシンまたは１００ｎＭタプシガルギンによる２４時間処理または未処理後、さらに０、４０、または２００ｎＭの可溶性ＭＡＮＦで処理した、マウス膵臓β細胞株（ＭＩＮ６）における切断カスパーゼ－３のレベルを示すイムノブロットである。

【図９】図９Ａは、哺乳動物小胞体に局在するＲｅｄＯｘ感受性ＧＦＰ（ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ）の図である。　図９ＢはＣＯＳ７細胞の２つの共焦点画像である。ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰの蛍光を左側の図に示し、ＤｓＲｅｄ－ＥＲトラッカーの蛍光を右側の図に示す。

【図１０】図１０Ａは、異なる濃度のＤＴＴによる処理後または未処理後のＭＥＲＯＳ－ＧＦＰの一連の励起スペクトルである（５１０ｎｍの発光波長）。　図１０Ｂは、未処理ＮＳＣ３４細胞における酸化型ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰの発光スペクトルである（３９４ｎｍの励起波長）。　図１０Ｃは、２ｍＭのＤＴＴで処理したＮＳＣ３４細胞における還元型ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰの発光スペクトルである（４７３ｎｍの励起波長）。

【図１１】２ｍＭのＤＴＴで処理したＩＮＳ－１　８３２／１３細胞（右の２つの図）またはＤＴＴによる処理なしのＩＮＳ－１　８３２／１３細胞（左の２つの図）における、４７６ｎｍの励起波長（下の２つの図）または４０５ｎｍの励起波長（上の２つの図）を使用して収集された一連のＭＥＲＯＳ－ＧＦＰの４つの共焦点顕微鏡画像である。

【図１２】未処理のままのＩＮＳ－１　８３２／１３細胞（標識なし）またはH_2O_2（１ｍＭまたは０．１ｍＭのH_2O_2）もしくはＤＴＴ（０．１、０．２、０．５、１、２、５または１０ｍＭのＤＴＴ）で処理したＩＮＳ－１　８３２／１３細胞におけるＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比のグラフである。ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比はプレートリーダーを使用して決定した。示したデータは、平均±Ｓ．Ｄ．（ｎ＝３）である。

【図１３】未処理のままの細胞（左側レーン）または２ｍＭのＤＴＴで処理した細胞（右側レーン）由来の溶解物における、４－アセトアミド－４’－マレイミジルスチルベン－２，２’－ジスルホン酸（ＡＭＳ）で修飾したＭＥＲＯＳ－ＧＦＰの非還元ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）の写真である。溶解物は、電気泳動前に未処理のままであったか（－βＭＥ）（上）、β－メルカプトエタノールで処理した（＋βＭＥ）（下）。

【図１４】１０分間、１ｍＭのＤＴＴで処理し、次いで洗浄した、ＮＳＣ３４細胞におけるＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比の経時変化を示すグラフである。ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比は、洗浄後、４分間処理する前に、それぞれ１分の間隔で計算した。一番下のラインは４７３ｎｍ

での励起で観察された蛍光を表し、黒い線はＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比を表し、ライトグレーの線は、３９４ｎｍで励起した蛍光を表す（ｎ＝３；Ｓ．Ｄ．）。
【図１５】ＤＴＴ（０．２、０．５、または１０ｍＭのＤＴＴ）による処理後または未処理後のＭＥＲＯＳ－ＧＦＰで安定的にトランスフェクトしたＩＮＳ－１　８３２／１３細胞の蛍光標示式細胞分取（fluorescence-assisted cell sorting、ＦＡＣＳ）データである。データは、４８８および４０５ｎｍの励起波長、ならびに５１０ｎｍでの発光スペクトルを使用して収集した。下から上に、異なる一連のデータは、未処理、０．２ｍＭのＤＴＴ、０．５ｍＭのＤＴＴ、および１０ｍＭのＤＴＴである（濃度を上昇させたＤＴＴによる処理後、より一層還元状態へのシフトを示す）。
【図１６】ＤＴＴ（０．２ｍＭ、０．５ｍＭ、または１０ｍＭのＤＴＴ）による処理後または未処理後にＭＥＲＯＳ－ＧＦＰで安定的にトランスフェクトしたＩＮＳ－１　８３２／１３細胞のＦＡＣＳデータのヒストグラムである。水平軸はＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比を表し、垂直軸は細胞数を表す。左から右へのピークは、未処理のままの細胞、０．２ｍＭのＤＴＴ、０．５ｍＭのＤＴＴ、および１０ｍＭのＤＴＴで処理した細胞を表す。
【図１７】ＤＴＴ（０．２、０．５、または１０ｍＭのＤＴＴ）による処理後または未処理後にＭＥＲＯＳ－ＧＦＰで安定的にトランスフェクトしたＩＮＳ－１　８３２／１３細胞における平均ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比のグラフである。示したＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ値は、未処理の値に標準化される。
【図１８】３０分間１ｍＭのH_2O_2による処理後または未処理後に、ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰで安定的にトランスフェクトしたＩＮＳ－１　８３２／１３細胞のＦＡＣＳ分析から得たデータを示す２つのグラフである。右のグラフは、未処理であるか１ｍＭのH_2O_2で処理したＩＮＳ－１　８３２／１３細胞のＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比のヒストグラムである。左のグラフは、未処理であるか（左）、１ｍＭのH_2O_2で３０分間処理したＩＮＳ－１　８３２／１３細胞の平均ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比を示す。
【図１９】未処理後またはツニカマイシン（ＴＭ）（５μＭ；２４時間）、タプシガルギン（ＴＧ）（１０ｎＭ；２４時間）、ＴＧ（１μＭ；４時間）、ブレフェルジンＡ（ＢｒｅＡ）（１００ｎｇ／ｍＬ；２４時間）もしくはＭＧ１３２（１００ｎｍ；２４時間）で処理した後に、ＦＡＣＳ分析を使用して、ＩＮＳ－１　８３２／１３細胞において計算した平均ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比のグラフである。エラーバーは±Ｓ．Ｄ．を示す（＊ｐ＜０．０１）。データは、未処理の細胞について計算した平均ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比に標準化される。
【図２０】未処理のまま、または４時間１μＭのタプシガルギン（ＴＧ）で処理したＩＮＳ－１　８３２／１３細胞におけるＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比を示すヒストグラムである。
【図２１】１１ｍＭグルコース（２４時間）または２５ｍＭグルコースで２４、４８または７２時間処理した後、ＦＡＣＳ分析を用いてＩＮＳ－１　８３２／１３細胞において計算した平均ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比のグラフである。エラーバーは±Ｓ．Ｄ．を示す。データは、２４時間１１ｍＭグルコースで処理した細胞について計算した平均ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比に標準化される。
【図２２】未処理、血清枯渇、またはグルコース枯渇後に、ＦＡＣＳ分析を用いてＩＮＳ－１　８３２／１３細胞において計算した平均ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比のグラフである。エラーバーは±Ｓ．Ｄ．を示す（＊ｐ＜０．０１）。データは、未処理の細胞について計算した平均ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比に標準化した。
【図２３】未処理のままのＩＮＳ－１　８３２／１３細胞、またはパルミチン酸（０．２ｍＭ；２４時間）、パルミチン酸（０．２ｍＭ）および高グルコース（２５ｍＭ）（２４時間）、パルミチン酸（０．５ｍＭ；２４時間）、オレイン酸（０．５ｍＭ；２４時間）もしくはリノール酸（０．５ｍＭ；２４時間）で処理したＩＮＳ－１　８３２／１３細胞における平均ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比のグラフである。エラーバーは±Ｓ．Ｄ．を示す。データは、未処理の細胞について計算した平均ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比に標準化した。
【図２４】未処理のままのＩＮＳ－１　８３２／１３細胞、またはヒト膵島アミロイドポリペプチド（ＩＡＰＰ）（１０μＭ；２４時間）、マウスＩＡＰＰ（１０μＭ；２４時間

）、もしくはサイトカイン（インターロイキン－１β（５ｎｇ／ｍＬ）、ＩＦＮγ（１００ｎｇ／ｍＬ）、およびＴＮＦα（２５ｎｇ／ｍＬ）；２４時間））で処理したＩＮＳ－１　８３２／１３細胞における平均ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比のグラフである。エラーバーは±Ｓ．Ｄ．を示す。データは、未処理の細胞について計算した平均ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比に標準化した。

【図２５】未処理のままのＩＮＳ－１　８３２／１３細胞、または２４時間０．５ｍＭパルミチン酸塩（ＰＡ）で処理したＩＮＳ－１　８３２／１３細胞から得たＦＡＣＳデータの２つのグラフである。Ｙ軸は４８８ｎｍを使用して励起した後の蛍光を表し、Ｘ軸は４０５ｎｍを使用して励起した後の蛍光を表す。

【図２６】未処理のＩＮＳ－１　８３２／１３細胞、または２４時間０．５ｍＭパルミチン酸塩（ＰＡ）もしくは０．５ｍＭオレイン酸（ＯＡ）で処理したＩＮＳ－１　８３２／１３細胞におけるＦＡＣＳ分析を使用して計算したＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比を示すグラフである。パルミチン酸塩で処理した細胞に関するデータは右へシフトされている。

【図２７】２４時間１１ｍＭグルコースによる処理または２４、４８もしくは７２時間２５ｍＭグルコースによる処理を行った後のＩＮＳ－１　８３２／１３細胞の集団における還元型細胞のパーセンテージを示すグラフである。エラーバーは、±標準偏差を示す（＊＊ｐ＜０．０１）。

【図２８】未処理、２４時間の血清枯渇、または２４時間のグルコース枯渇後のＩＮＳ－１　８３２／１３細胞の集団における還元型細胞のパーセンテージを示すグラフである。エラーバーは、±標準偏差を示す（＊＊ｐ＜０．０１）。

【図２９】未処理後、または２４時間１０μＭヒトＩＡＰＰ、１０μＭマウスＩＡＰＰ、もしくはインターロイキン－１β（５ｎｇ／ｍＬ）、ＩＦＮγ（１００ｎｇ／ｍＬ）およびＴＮＦα（２５ｎｇ／ｍＬ）の組合せによる処理後のＩＮＳ－１　８３２／１３細胞の集団における還元型細胞のパーセンテージを示すグラフである。エラーバーは、±標準偏差を示す（＊＊ｐ＜０．０１）。

【図３０】未処理後、または２４時間０．２ｍＭパルミチン酸塩、０．２ｍＭパルミチン酸塩および２５ｍＭグルコース、０．５ｍＭパルミチン酸塩、０．５のｍＭオレイン酸、０．５ｍＭリノール酸、ウシ血清アルブミンおよび０．５ｍＭパルミチン酸塩、０．５ｍＭパルミチン酸塩および０．５ｍＭオレイン酸、ならびに０．５ｍＭパルミチン酸塩および０．５ｍＭリノール酸で処理した後のＩＮＳ－１　８３２／１３細胞の集団における還元型細胞のパーセンテージを示すグラフである。エラーバーは、±標準偏差を示す（＊＊ｐ＜０．０１）。

【図３１】ＢｉＰ－Ｐ－ｍＣｈｅｒｒｙでトランスフェクトした細胞の図であり、図はフローサイトメーターレーザーラインおよびフィルターの構造を示す。

【図３２】酸化型または還元型ＩＮＳ－１　８３２／１３細胞における平均ＢｉＰ－Ｐ－ｍＣｈｅｒｒｙ発現のグラフである。これらの細胞は、未処理のままであるか、２４時間、１０ｎＭタプシガルギン、５μＭツニカマイシン、２５ｍＭグルコース、血清枯渇、グルコース枯渇、０．５ｍＭパルミチン酸塩、１０μＭヒトＩＡＰＰ、またはインターロイキン－１β（５ｎｇ／ｍＬ）、ＩＦＮγ（１００ｎｇ／ｍＬ）およびＴＮＦα（２５ｎｇ／ｍＬ）の組合せにより処理した。ＢｉＰ－Ｐ－ｍＣｈｅｒｒｙ発現は、ＦＡＣＳ分析を使用して決定した。エラーバーは±標準偏差を示す。

【図３３】２４時間、５μＭツニカマイシン（ＴＭ、上方のヒストグラム）またはグルコース枯渇（下方のヒストグラム）により処理した、酸化型または還元型ＩＮＳ－１　８３２／１３細胞を示す２つのヒストグラムである。Ｘ軸は、ｍＣｈｅｒｒｙの発現レベルがヒトＢｉＰプロモーターによって作動されることを示す。

【図３４】２４時間、０．５ｍＭのパルミチン酸塩で処理したＩＮＳ－１　８３２／１３細胞から得たＦＡＣＳデータのヒストグラムである。

【図３５】ＦＡＣＳ分離した、酸化型または還元型ＩＮＳ－１　８３２／１３細胞の純度を示すヒストグラムである。

【図３６】２４時間０．５ｍＭパルミチン酸塩で処理したＩＮＳ－１　８３２／１３細胞

におけるＢｉＰ（左のグラフ）およびスプライスＸＢＰ１（ｓＸＢＰ）（右のグラフ）の発現レベルを示す２つのグラフである。ＢｉＰおよびｓＸＢＰの発現レベルは、リアルタイムＰＣＲを使用して測定した。エラーバーは±標準偏差を示す。

【図３７】酸化型または還元型ＩＮＳ－１　８３２／１３細胞から精製された小胞体中のＤｅｒｌｉｎ３、ＢｉＰ、ＨｅｒｐおよびＰＤｌａ５の発現レベルを示す表である。発現データはＤＮＡマイクロアレイ分析を使用して収集した。

【図３８】死滅細胞（左のグラフ）のパーセンテージ、またはＤＭＳＯ単独、１０ｎＭタプシガルギン（Ｔｇ）、１０ｎＭ　Ｔｇおよび１０μＭピオグリタゾン、もしくは１０ｎＭ　Ｔｇおよび５００μｇ／ｍＬのタウロウルソデオキシコール酸（ＴＵＤＣＡ）で処理したＩＮＳ－１　８３２／１３細胞の平均ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比（右のグラフ）を示す２つのグラフである。

【図３９】ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ系を使用するスクリーニングシステムを示す図である。

【図４０】１０μＭアポモルヒネ（Ａｐｏ）の非存在下（左上のグラフ）または存在下（右上のグラフ）で０．５ｍＭパルミチン酸塩により処理した後のＩＮＳ－１　８３２／１３－ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ細胞から収集したＦＡＣＳデータを示す２つのヒストグラムおよび、未処理後、または１０μＭアポモルヒネの非存在下もしくは存在下で０．５ｍＭパルミチン酸塩により処理した後のＩＮＳ－１　８３２／１３　ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ細胞における還元型細胞のパーセンテージを示すグラフである。エラーバーは±標準偏差を示す。

【図４１】１０ｎＭまたは５０ｎＭのアポモルヒネ（Ａｐｏ）との組合せの有無における、０．５ｍＭパルミチン酸塩（ＰＡ）で処理した後のＭｉｔｏｐｒｏｂｅ色素で染色したＩＮＳ－１　８３２／１３－ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ細胞から収集したＦＡＣＳデータのヒストグラムである。

【図４２】未処理後、または０．５ｍＭパルミチン酸塩単独、もしくは０．５ｍＭパルミチン酸塩および１０ｎＭアポモルヒネで処理した後の、ＦＡＣＳ分析によって分画された低Δψｍ細胞（左のグラフ）のパーセンテージおよび死滅細胞（右のグラフ）のパーセンテージを示す２つのグラフである。

【図４３】未処理後、または１０ｎＭタプシガルギン（Ｔｇ）で処理した後、もしくは１０ｎＭ　Ｔｇと１０ｎＭアポモルヒネで処理した後の死滅細胞のパーセンテージのグラフである。

【図４４】１０ｎＭアポモルヒネまたは１０μＭピオグリタゾンで処理した、１０ｎＭタプシガルギン処理初代ヒト膵島（右のイムノブロット）および２μＭドキシサイクリン処理ＷＦＳ１ノックダウンＩＮＳ－１　８３２／１３細胞（ｓｈＷＦＳ１）（左のイムノブロット）に存在する切断カスパーゼ３（ｃ－ｃａｓｐａｓｅ３）および切断ＰＡＲＰ（ｃ－ＰＡＲＰ）の量を示す２つのイムノブロットである。

【図４５】１１ｍＭグルコースまたは２５ｍＭグルコース（２４時間）（それぞれ上の図および下の図）で培養し、かつ４８時間、０または０．５μｇ／ｍＬの可溶性ＭＡＮＦ（それぞれ、左の図および右の図）で処理した後、小胞体においてＥｒｏＧＦＰの還元型を含有するＩＮＳ１　８３２／１３細胞（膵臓β細胞株）のパーセンテージを示す、蛍光指標式細胞分取データのグラフである。細胞は、４７３ｎｍの波長と５１０ｎｍの発光スペクトルを使用して励起した。

【発明を実施するための形態】

【００４０】

本発明は、少なくとも一部は、可溶性ＭＡＮＦがストレスを受けた膵臓β細胞よって分泌されること、また、可溶性ＭＡＮＦが小胞体ストレス由来膵臓β細胞アポトーシス細胞死を遅延させ、小胞体ストレスを誘発する薬剤または条件に暴露された膵臓β細胞における小胞体の酸化還元状態の変動を減少することに関する発見に基づく。これらの発見に鑑み、膵臓β細胞障害を診断する方法、対象の膵臓β細胞障害を発症するリスクを予測する方法、対象（例えば、膵臓β細胞障害を発症するリスクのある対象）における膵臓β細胞機能および膵臓β細胞量をモニターする方法、対象における膵臓β細胞病気の処置の有効性をモニターする方法、膵臓β細胞障害を発症するリスクが高い対象を同定する方法、膵

臓β細胞障害を処置するための対象を選択する方法、臨床試験に参加する対象を選択する方法、および膵臓β細胞における小胞体ストレスを検出する方法を提供する。これらの方法は、可溶性ＭＡＮＦ（例えば、対象由来の生体試料中、または培地中のもの）の少なくとも１つのレベルを決定することを包含する。

【００４１】

また、対象の膵臓β細胞障害を処置するかその発症を遅延させ、膵臓β細胞における小胞体ストレスを減少し、２個以上の膵臓β細胞の集団における小胞体ストレス由来アポトーシス細胞死を減少するか遅延させる方法も提供する。これらの方法は、対象への有効量の可溶性ＭＡＮＦもしくはアポモルヒネの投与、または膵臓β細胞もしくは膵臓β細胞の集団を可溶性ＭＡＮＦと接触させることを包含する。一部の実施形態において、例えば、本方法がアポモルヒネの投与を含んでいる場合、対象は勃起不全またはパーキンソン病に罹患していない。

【００４２】

さらに、対象の膵臓β細胞障害を処置するかその発症を遅延させるのに有用な候補化合物をスクリーニングし、膵臓β細胞における小胞体ストレスを減少し、または膵臓β細胞における小胞体ストレス由来アポトーシス細胞死を減少するか遅延させる方法も提供する。一部の実施形態において、これらの方法は、膵臓β細胞を提供し、膵臓β細胞を候補化合物と接触させ、候補化合物の存在下で膵臓β細胞によって産生される可溶性ＭＡＮＦのレベルを決定し、膵臓β細胞によって産生される可溶性ＭＡＮＦのレベルを可溶性ＭＡＮＦの基準レベルと比較することを含む。一部の実施形態において、これらの方法は、ＢｉＰシグナル配列、酸化還元感受性蛍光タンパク質（例えば、酸化還元感受性緑色蛍光タンパク質または酸化還元感受性黄色蛍光タンパク質）、およびＫＤＥＬのアミノ酸配列を含有するレポータータンパク質を発現する哺乳動物細胞（例えば、膵臓β細胞）を提供し；細胞を試験化合物と接触させ；細胞に存在する酸化型レポータータンパク質の量の決定し；細胞に存在する酸化型レポータータンパク質の量を基準レベルと比較することを含むものであって、基準レベルと比較して細胞中の酸化型レポータータンパク質のレベルが増加したということは、候補化合物が対象の膵臓β細胞障害を処置するかその発症を遅延させ、膵臓β細胞における小胞体ストレスを減少し、かつ／または膵臓β細胞における小胞体ストレス由来アポトーシス細胞死を減少するか遅延させるのに有用であり得ることを示す。一部の実施形態において、これらの方法は、ＢｉＰシグナル配列、酸化還元感受性蛍光タンパク質（例えば、酸化還元感受性緑色蛍光タンパク質または酸化還元感受性黄色蛍光タンパク質）、およびＫＤＥＬのアミノ酸配列を含有するレポータータンパク質を発現する哺乳動物細胞（例えば、膵臓β細胞）を提供し；細胞を試験化合物と接触させ；細胞に存在する還元型レポータータンパク質の量の決定し；細胞に存在する還元型レポータータンパク質の量を基準レベルと比較することを含むものであって、基準レベルと比較して細胞中の還元型レポータータンパク質のレベルが減少したということは、候補化合物が対象の膵臓β細胞障害を処置するかその発症を遅延させ、膵臓β細胞における小胞体ストレスを減少し、かつ／または膵臓β細胞における小胞体ストレス由来アポトーシス細胞死を減少するか遅延させるのに有用であり得ることを示す。

【００４３】

膵臓β細胞障害

膵臓β細胞障害は、対象の膵臓β細胞機能不全または膵臓β細胞量の段階的な減少を特徴とする疾患の分類である。膵臓β細胞障害に罹患している対象において減少の可能性のある膵臓β細胞機能としては、限定するものではないが、インスリンの産生および分泌、Ｃペプチドの産生および分泌、ならびに膵島アミロイドポリペプチド（ＩＡＰＰ）の産生および分泌が挙げられる。膵臓β細胞障害の非限定的な例としては、１型糖尿病（真性糖尿病）、２型糖尿病、およびウルフラム症候群が挙げられる。膵臓β細胞障害は、すべての年齢のヒト、例えば幼児、小児、成人および高齢の対象において発症し得る。例えば、膵臓β細胞障害は、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５または９０歳を超える年齢の対象で発症し得る。

【００４４】
医療専門家（例えば、医師、看護師、医師助手、看護助手、または検査技師）は、対象における１つまたは複数（例えば、２、３、４または５つ）の膵臓β細胞障害の症状を評価することによって膵臓β細胞障害に罹患している対象を診断することができる。対象の膵臓β細胞障害の非限定的な症状としては、健康な個体または個体群と比較した血糖レベル（例えば、空腹時血糖レベル）の有意な増加（例えば、１００ｍｇ／ｄＬを超えるか、または１２０ｍｇ／ｄＬを超える空腹時血糖レベル）、健康な個人または集団と比較した糖化ヘモグロビンレベル（ヘモグロビンＡ１Ｃレベル）の有意な増加（例えば、６．５％を超える、７．０％を超える、または８．０％を超えるヘモグロビンＡ１Ｃレベル）、渇きの増大、頻尿、極端な空腹感、原因不明の体重減少、尿中ケトンの存在、疲労、目のかすみ、治癒の遅い傷、軽度の高血圧、および頻繁な感染症が挙げられる。医療専門家は、一部において、さらに対象の膵臓β細胞障害の家族歴に関する診断をベースとすることもできる。医療専門家は、医療施設（例えば、クリニックまたは病院）への対象の来院の際に、膵臓β細胞障害に罹患していると対象を診断することができる。場合によっては、医療専門家は、対象が介護付き医療施設に入院している間に、膵臓β細胞障害に罹患していると対象を診断することができる。典型的には、医師は、対象における１つまたは複数の症状の観察または検出後に、対象における膵臓β細胞障害を診断する。

【００４５】
医療専門家はまた、以下の１つまたは複数の要因に基づいて、膵臓β細胞障害を発症するリスクが高い対象を同定することができる。

【００４６】
本願はさらに、対象（例えば、膵臓β細胞障害の１つもしくは複数の症状を示す対象、または膵臓β細胞障害の症状を示さない対象（例えば、診断未確定および／または無症候性の対象）の膵臓β細胞障害を診断するさらなる方法を提供する。さらに、膵臓β細胞障害を発症するリスクが高い対象を同定するさらなる方法も提供する。さらに、本願は、対象の膵臓β細胞障害を処置する方法も提供する。

【００４７】
中脳星状細胞由来神経栄養因子（ＭＡＮＦ）
本願に記載されている、可溶性ＭＡＮＦタンパク質の内因性レベルは、例えば、膵臓β細胞障害を診断するためのマーカー、対象の膵臓β細胞障害を発症するリスクを予測するためのマーカー、対象（例えば、膵臓β細胞障害を発症するリスクのある対象）における膵臓β細胞機能または膵臓β細胞量をモニターするためのマーカー、膵臓β細胞障害を発症するリスクが高い対象を同定するためのマーカー、膵臓β細胞障害を処置するための対象を選択するためのマーカー、臨床試験に参加する対象を選択するためのマーカー、および膵臓β細胞における小胞体ストレスを検出するためのマーカーとして、本願に記載されているいずれかの方法で検出することができる。精製、単離し、かつ／または組換え型である可溶性ＭＡＮＦタンパク質はまた、対象の膵臓β細胞障害を処置するかその発症を遅延させ、膵臓β細胞における小胞体ストレスを減少し、２個以上の膵臓β細胞の集団における小胞体ストレス由来アポトーシス細胞死を減少するか遅延させる方法において使用することができる。

【００４８】
ＭＡＮＦタンパク質は、その後切断され、細胞（例えば、膵臓β細胞）から可溶性タンパク質として放出される、前駆体タンパク質として翻訳される。完全長（前駆体）ヒトＭＡＮＦタンパク質およびヒト可溶性ＭＡＮＦタンパク質を以下に示す。前駆体ヒトＭＡＮＦタンパク質中の２５個のアミノ酸シグナル配列に対してアンダーラインを付している。また、ヒト前駆体ＭＡＮＦタンパク質をコードするｍＲＮＡを下記に示す。

【００４９】
ヒト前駆体ＭＡＮＦタンパク質（配列番号１）
MRRMWATQGLAVALALSVLPGSRALRPGDCEVCISYLGRFYQDLKDRDVTFSPATIENELIKFCREARGKENRLCYYIGA
TDDAATKIINEVSKPLAHHIPVEKICEKLKKKDSQICELKYDKQIDLSTVDLKKLRVKELKKILDDWGETCKGCAEKSDY

IRKINELMPKYAPKAASARTDL

【００５０】

ヒト可溶性ＭＡＮＦタンパク質（配列番号２）

LRPGDCEVCISYLGRFYQDLKDRDVTFSPATIENELIKFCREARGKENRLCYYIGATDDAATKIINEVSKPLAHHIPVEK
ICEKLKKKDSQICELKYDKQIDLSTVDLKKLRVKELKKILDDWGETCKGCAEKSDYIRKINELMPKYAPKAASARTDL

【００５１】

ヒトＭＡＮＦのｍＲＮＡ（配列番号３）

ggaggcggtg cggcgcggcg ggtgcggttc agtcggtcgg cggcggcagc ggaggaggag gaggaggagg agg
aggagga ggatgaggag gatgtgggcc acgcaggggc tggcggtggc gctggctctg agcgtgctgc cgggca
gccg ggcgctgcgg ccgggcgact gcgaagtttg tatttcttat ctgggaagat tttaccagga cctcaaaga
c agagatgtca cattctcacc agccactatt gaaaacgaac ttataaagtt ctgccgggaa gcaagaggca a
agagaatcg gttgtgctac tatatcgggg ccacagatga tgcagccacc aaaatcatca atgaggtatc aaag
cctctg gcccaccaca tccctgtgga gaagatctgt gagaagctta agaagaagga cagccagata tgtgagc
tta agtatgacaa gcagatcgac ctgagcacag tggacctgaa gaagctccga gttaaagagc tgaagaagat
tctggatgac tgggggggaga catgcaaagg ctgtgcagaa aagtctgact acatccggaa gataaatgaa ct
gatgcctа aatatgcccc caaggcagcc agtgcacgga ccgatttgta gtctgctcaa tctctgttgc acctg
agggg gaaaaaacag ttcaactgct tactcccaaa acagcctttt tgtaatttat tttttaagtg ggctcctg
ac aatactgtat cagatgtgaa gcctggagct ttcctgatga tgctggccct acagtacccc catgagggga
ttcccttcct tctgttgctg gtgtactcta ggacttcaaa gtgtgtctgg gatttttta ttaaagaaaa aaa
atttcta gctgtccttg cagaattata gtgaatacca aaatggggtt ttgccccagg aggctcctaa aaaaaa
aaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa

【００５２】

さらに、ウシ、ラット、マウス、ブタ、ハエ、およびゼブラフィッシュの可溶性ＭＡＮＦタンパク質配列も記載し、下記に示す。

【００５３】

ウシ可溶性ＭＡＮＦ（配列番号４）

LRQGDCEVCISYLGRFYQDLKDRDVTFSPASIEKELIKFCREARGKENRLCYYIGATEDAATKIINEVSKPLSHHIPVEK
ICEKLKKKDSQICELKYDKQIDLSTVDLKKLRVKELKKILDDWGETCKGCAEKSDYIRKINELMPKYAPKAASSRTDL

【００５４】

ラット可溶性ＭＡＮＦ（配列番号５）

LRPGDCEVCISYLGRFYQDLKDRDVTFSPATIEEELIKFCREARGKENRLCYYIGATDDAATKIINEVSKPLAHHIPVEK
ICEKLKKKDSQICELKYGECD

【００５５】

マウス可溶性ＭＡＮＦ（配列番号６）

LRPGDCEVCISYLGRFYQDLKDRDVTFSPATIEEELIKFCREARGKENRLCYYIGATDDAATKIINEVSKPLAHHIPVEK
ICEKLKKKDSQICELKYDKQIDLSTVDLKKLRVKELKKILDDWGEMCKGCAEKSDYIRKINELMPKYAPKAASARTDL

【００５６】

ブタ可溶性ＭＡＮＦ（配列番号７）

LRPGDCEVCISYLGRFYQDLKDRDVTFSPASIEKELTKFCREARGKENRLCYYIGATDDAATKIINEVSKPLAHHIPVEK
ICEKLKKKDSQICELKYDKQIDLSTVDLKKLRVKELKKILDDWGETCKGCAEKSDYIRKINELMPKYAPKAASSRTD

【００５７】

キイロショウジョウバエ（Drosophila melanogaster）可溶性ＭＡＮＦ（配列番号８）

LKEEDCEVCVKTVRRFADSLDDSTKKDYKQIETAFKKFCKAQKNKEHRFCYYLGGLEESATGILNELSKPLSWSMPAEKI
CEKLKKKDAQICDLRYEKQIDLNSVDLKKLKVRDLKKILNDWDESCDGCLEKGDFIKRIEELKPKYSRSEL

【００５８】

ゼブラフィッシュ可溶性ＭＡＮＦ（配列番号９）

LKDGECEVCVGFLQRLYQTIQENNVKFDSDSIEKALLKSCKDAKGKENRFCYYIGATSDAATKITNEVSKPMSYHVPVEK
ICEKLKKKDSQICELKYDKQVDLSSVDLKKLKVKDLKKILEEWGESCKGCVEKSDFIRKINELMPKYAPSAAKARTDL

【００５９】

哺乳動物の可溶性ＭＡＮＦタンパク質は高度に保存されており、ヒトとウシの可溶性Ｍ

ＡＮＦタンパク質は９６％の同一性を有し、ヒトとマウスの可溶性ＭＡＮＦタンパク質は９９％の同一性を有し、ヒトとブタの可溶性ＭＡＮＦタンパク質は９７％の同一性を有している。さらに、ヒト可溶性ＭＡＮＦタンパク質は、ゼブラフィッシュ可溶性ＭＡＮＦタンパク質と７２％の同一性を共有し、８８％の類似性を共有する。

【００６０】

診断方法

本願は、対象における膵臓β細胞障害を診断する方法を提供する。これらの方法は、対象由来の生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを決定（アッセイ）することと、生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを可溶性ＭＡＮＦの基準レベルと比較することとを含む。これらの方法において、可溶性ＭＡＮＦの基準レベルと比較して生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルが増加したということは、対象が膵臓β細胞障害に罹患していることを示し、また、可溶性ＭＡＮＦの基準レベルと比較して生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルが減少したか有意な変化がないということは、対象が膵臓β細胞障害に罹患していないことを示す。

【００６１】

本願のすべて部分で記載されている、「可溶性ＭＡＮＦの基準レベル」とは、可溶性ＭＡＮＦの閾値レベル、対照対象もしくは対象群（例えば、疾患に罹患していると診断されない対象または被検体群（健康な対象または対象群）は、膵臓β細胞障害の１つもしくは複数の症状を有しておらず、かつ／または膵臓β細胞障害の家族歴を有していない）に存在する可溶性ＭＡＮＦのレベル、または同一対象における初期の時点の可溶性ＭＡＮＦのレベルであり得る。

【００６２】

可溶性ＭＡＮＦのレベルは、当技術分野で公知の方法を利用して決定することができる。例えば、可溶性ＭＡＮＦのレベルは、可溶性ＭＡＮＦに特異的に結合する抗体を利用する、当技術分野で公知の多数の技術（例えば酵素免疫吸着測定法）を使用して検出することができる。ヒト可溶性ＭＡＮＦに特異的に結合する多数の抗体は市販されている（例えば、Ｓｉｇｍａ－ＡｌｄｒｉｃｈおよびＰｒｏｔｅｉｎｔｅｃｈから入手できるウサギ抗ヒト可溶性ＭＡＮＦ抗体）。

【００６３】

本願に記載のいずれかの方法は、対象由来の試料（例えば、体液、例えば尿、血液、血漿、血清、または脳脊髄液を含有する生体試料）を取得または収集することをさらに含んでいてもよい。本願に記載のいずれかの方法において、生体試料は、可溶性ＭＡＮＦのレベルの決定前に、一定期間（例えば、少なくとも１時間または少なくとも２４時間）保管することができる（例えば、１０℃以下での保管）。

【００６４】

本願に記載のいずれかの方法は、医療施設（例えば病院、クリニックまたは介護付き医療施設）に来院する患者に対して実施することができる。対象は、膵臓β細胞障害の１つまたは複数の症状（例えば、本願に記載の膵臓β細胞障害のいずれかの症状）を示し得る。対象は、膵臓β細胞障害に罹患している疑いがあり得る。また対象は、症状なしで（無症候性の対象）または膵臓β細胞障害の症状をわずかに１つ示す場合がある。対象は、膵臓β細胞障害（例えば２型糖尿病）の家族歴を有している可能性がある。また対象は、膵臓β細胞障害の発症のリスクが高い可能性がある。対象は、幼児、小児、十代の若者、成人または高齢者である場合がある。

【００６５】

一部の実施形態において、本方法は、検出可能もしくは観察可能な膵臓β細胞量を有しており、かつ／または検出可能もしくは観察可能な量の膵臓β細胞機能を有する対象（例えば、膵臓β細胞量または膵臓β細胞機能を完全に喪失していない対象）に対して行われる。膵臓β細胞機能の検出方法は本願に記載されている。膵臓β細胞量は、対象における膵臓β細胞機能を観察することにより、または当技術分野で公知の方法（例えば、米国特許出願公開第２０１１０１２３４４３号に記載されている方法）を使用することにより間

接的に検出することができる。

【００６６】

本願に記載の診断方法は、任意の医療専門家（例えば、医師、検査技師、看護師、医師助手および看護助手）により実施可能である。本願に記載の診断方法は、当技術分野で公知の、または本願に記載の１つまたは複数の追加診断試験方法（例えば、対象の膵臓β細胞障害の１つまたは複数の症状に関する知見または評価、例えば、血糖モニタリング、糖化ヘモグロビン分析、インスリンのレベル、ＩＡＰＰのレベル、Ｃペプチドのレベルまたは尿中ケトン）と組み合わせて使用することができる。本願に記載の診断方法は、膵臓β細胞障害を発症するリスクが高いと同定された対象（例えば、本願に記載のいずれかの方法を使用して、膵臓β細胞障害を発症するリスクが高いと同定された対象）に対して行うことができる。一部の実施形態において、本願に記載の診断方法は、膵臓β細胞障害を発症するリスクが高いと同定された対象に対して、定期的に（例えば、少なくとも１か月、２か月、６か月または１年毎に１回）行うことができる。一部の実施形態は、対象由来の生体試料の収集をさらに含む。

【００６７】

一部の実施形態は、膵臓β細胞障害に罹患している、または同障害を発症するリスクがあると同定された対象に、膵臓β細胞障害の処置を施すこと（例えば、単離、精製された、もしくは組換え型である可溶性ＭＡＮＦタンパク質、ピオグリタゾン、ＧＬＰ－１、またはＤＰＰ－４阻害剤（例えば、シタグリプチン、ビルダグリプチン、サクサグリプチン、リナグリプチン、デュトグリプチン、ジェミグリプチンおよびアログリプチン）、あるいは、本願に記載のいずれかの組成物、例えば、治療有効用量の配列番号２に少なくとも９０％同一である配列を含有する可溶性ＭＡＮＦタンパク質および／またはアポモルヒネ）をさらに含む。一部の実施形態は、対象における膵臓β細胞障害の診断を確認する追加試験を行うことをさらに含む。一部の実施形態は、定期的にグルコースをモニターする（例えば、グルコメーターを使用して定期的に自己血糖をモニターする）対象を選択すること、または、本願に記載のいずれかのモニタリング方法を含む。一部の実施形態は、医師または医療専門家による定期的な医学的評価（例えば、少なくとも１年に１回、少なくとも６か月に１回、少なくとも３か月に１回、少なくとも２か月に１回、または少なくとも１か月に１回の定期的訪問）のための対象を選択することをさらに含む。一部の実施形態は、対象の医療記録に診断試験の結果を記録すること、または、本願に記載の方法を使用して膵臓β細胞障害に罹患していると診断された対象の１人もしくは複数の直系家族の膵臓β細胞障害について診断試験を行うことをさらに含む。

【００６８】

膵臓β細胞障害を発症するリスクを予測する方法

さらに、対象の膵臓β細胞障害を発症するリスクを予測する方法を提供する。これらの方法は、対象由来の生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを決定（アッセイ）し、生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを可溶性ＭＡＮＦの基準レベルと比較することを含む。可溶性ＭＡＮＦの基準レベルと比較して生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルが増加したということは、対象が膵臓β細胞障害を発症するリスクが高いことを示し、また、基準レベルと比較して生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルが減少したか有意な変化がないということは、対象が膵臓β細胞障害を発症するリスクが低いか有意なリスクがないことを示す。本願に記載の可溶性ＭＡＮＦの任意の基準レベルを、これらの方法で使用することができる。一部の実施形態は、対象由来の生体試料を取得することをさらに含む。

【００６９】

可溶性ＭＡＮＦのレベルは、当技術分野で公知の方法を利用して決定することができる。例えば、可溶性ＭＡＮＦのレベルは、可溶性ＭＡＮＦに特異的に結合する抗体を利用する、当技術分野で公知の多数の技術（例えば酵素免疫吸着測定法）を使用して検出することができる。一部の実施形態において、本方法は、対象由来の試料（例えば、体液、例えば尿、血液、血漿、血清、または脳脊髄液を含有する生体試料）を取得または収集することをさらに含む。

【００７０】
本願に記載のいずれかの方法は、医療施設（例えば、病院、クリニックまたは介護付き医療施設）に来院する患者に対して実施することができる。一部の実施形態において、本方法は、医療専門家によって定期的な身体検査の一部として対象に対して行われる。対象は、膵臓β細胞障害の１つまたは複数の症状（例えば、本願に記載の膵臓β細胞障害のいずれかの症状）を示し得る。対象は、膵臓β細胞障害に罹患している疑いがあり得る。また対象は、症状なしで（無症候性の対象）、または膵臓β細胞障害の症状をわずかに１つ示す場合がある。対象は、膵臓β細胞障害（例えば、２型糖尿病）の家族歴を有している可能性がある。対象は、幼児、小児、十代の若者、成人または高齢者である可能性がある。

【００７１】
本願に記載のこれらの方法は、任意の医療専門家（例えば、医師、検査技師、看護師、医師助手および看護助手）により実施可能である。これらの方法は、膵臓β細胞障害を発症するリスクのある対象を同定するための当技術分野で公知の任意の追加方法と組み合わせて使用することができる（例えば、以下の１つまたは複数の要因の評価：体重増加、無気力、膵臓β細胞障害の家族歴、人種、年齢、多嚢胞性卵巣症候群の診断、高血圧、高密度リポタンパク質レベルの減少（例えば３５ｍｇ／ｄＬ未満）、およびトリグリセリドレベルの増加（例えば２５０ｍｇ／ｄＬ超））。膵臓β細胞障害を発症するリスクが高いと同定された対象は、本願に記載のいずれかの方法を使用してモニターすることができる（例えば、次のセクションを参照）。

【００７２】
一部の実施形態は、膵臓β細胞障害を発症するリスクが高いと同定された対象に、膵臓β細胞障害の処置を施すこと（例えば、単離、精製された、もしくは組換え型である可溶性ＭＡＮＦタンパク質、ピオグリタゾン、ＧＬＰ－１、またはＤＰＰ－４阻害剤（例えば、シタグリプチン、ビルダグリプチン、サクサグリプチン、リナグリプチン、デュトグリプチン、ジェミグリプチンおよびアログリプチン）、あるいは、本願に記載のいずれかの組成物、例えば、治療有効用量の配列番号２に少なくとも９０％同一である配列を含有する可溶性ＭＡＮＦタンパク質および／またはアポモルヒネ）をさらに含む。一部の実施形態は、定期的にグルコースをモニターする（例えば、グルコメーターを使用して定期的に自己血糖をモニターする）ための膵臓β細胞障害を発症するリスクが高いと同定された対象を選択することを含む。一部の実施形態は、医師または医療専門家による定期的な医学的評価（例えば、少なくとも１年に１回、少なくとも６か月に１回、少なくとも３か月に１回、少なくとも２か月に１回、または少なくとも１か月に１回の定期的訪問）のための膵臓β細胞障害を発症するリスクが高いと同定された対象を選択することを含む。一部の実施形態は、対象の医療記録に試験の結果を記録すること、または、本願に記載の方法を使用して、膵臓β細胞障害を発症するリスクが高いと同定された対象の１人もしくは複数の直系家族における膵臓β細胞障害を発症するリスクを決定する類似の試験または任意の当技術分野で公知の試験を行うことをさらに含む。

【００７３】
膵臓β細胞機能不全および膵臓β細胞量をモニターする方法
さらに、対象（例えば、膵臓β細胞障害を発症するリスクのある対象、膵臓β細胞障害に罹患している対象、または膵臓β細胞移植を受けた対象）の膵臓β細胞機能不全をモニターする方法を提供する。これらの方法は、第１の時点での対象由来の生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを決定（アッセイ）し、第２の時点での対象由来の生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを決定（アッセイ）し、第２の時点での生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを第１の時点での生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルと比較することを含む。第１の時点での可溶性ＭＡＮＦのレベルと比較して第２の時点での生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルが増加したということは、膵臓β細胞機能が減少している（例えば、有意な、観察可能な、または検出可能な減少）、または対象の膵臓β細胞量が減少していることを示す。第１の時点での生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルと比較して第２の時点で

の生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルが減少したか有意な変化がないということは、対象の膵臓β細胞機能または膵臓β細胞量に変化がない、または増加していることを示す。

【００７４】

一部の実施形態において、本方法は、第１の時点および第２の時点で、検出可能もしくは観察可能な膵臓β細胞量を有しており、かつ／または検出可能もしくは観察可能な量の膵臓β細胞機能を有する対象（例えば、第１の時点および第２の時点で膵臓β細胞量または膵臓β細胞機能を完全に喪失していない対象）に対して行われる。

【００７５】

一部の実施形態において、第２の時点は、第１の時点の少なくとも６時間（例えば、少なくとも１２時間、１８時間、２４時間、１日、２日、３日、４日、５日、６日、１週間、２週間、３週間、１か月、２か月、３か月、６か月、１年、２年、３年、４年または５年）後であってもよい。一部の実施形態において、第１の時点は、医療機関への入院時であってもよく、または、膵臓β細胞障害の少なくとも１つの症状を最初に診察した１週間以内であってもよい。

【００７６】

一部の実施形態において、本方法は、１つまたは複数のさらなるより遅い時点で、対象由来の生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを決定（アッセイ）することをさらに含む。これらの方法において、（早い日付順の時点で収集した）より早い時点の（例えば、直前の）試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルと比較して、（後の日付順の時点で収集した）より遅い時点の試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルが増加したということは、対象の膵臓β細胞機能における減少（例えば、有意な、観察可能な、または検出可能な減少）、または膵臓β細胞量における減少を示す。同様に、（早い日付順の時点で収集した）初期の（例えば、直前の）試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルと比較して、（後の日付順の時点で収集した）より遅い時点の試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルが減少するか有意な変化がないということは、対象の膵臓β細胞機能または膵臓β細胞量に変化がないことまたは増加があることを示す。一部の実施形態において、これらの方法は、第１、第２の時点および１つまたは複数のさらなる時点で、検出可能もしくは観察可能な膵臓β細胞量を有し、かつ／または検出可能もしくは観察可能な量の膵臓β細胞機能を有する対象（例えば、第１、第２の時点および１つまたは複数のさらなる時点で、膵臓β細胞量または膵臓β細胞機能が完全に喪失していない対象）に対して行われる。

【００７７】

一部の実施形態において、対象は事前に膵臓β細胞移植を受けていることができ、こういった場合、これらの方法は、一つには、対象へ移植された膵臓β細胞の膵臓β細胞機能および膵臓β細胞量をモニターする。一部の実施形態において、移植された膵臓β細胞は、自家移植、同種移植、または異種移植された膵臓β細胞である。一部の実施形態において、移植された膵臓β細胞は、デバイス内に存在するか、または生体適合性ポリマーにより内包されているか、または生体適合性ポリマー内に配置されている。一部の実施形態において、移植された膵臓β細胞は、膵臓以外の組織内（例えば、肝臓組織）に存在する。一部の実施形態において、これらの方法は、膵臓β細胞移植の１週間、２週間、３週間、１か月、２か月、３か月、４か月、５か月、６か月、または１年以内に対象において実施される。一部の実施形態において、第１の時点は、移植術の直後（例えば、１週間または２週間以内）である。

【００７８】

可溶性ＭＡＮＦのレベルは、当技術分野で公知の方法を用いて決定することができる。例えば、可溶性ＭＡＮＦのレベルは、可溶性ＭＡＮＦに特異的に結合する抗体を利用する、当技術分野で公知の多数の技術（例えば酵素免疫吸着測定法）を使用して検出することができる。一部の実施形態において、本方法は、対象由来のある１つの試料または少なくとも２つの試料（例えば、体液、例えば尿、血液、血漿、血清、または脳脊髄液を含有する生体試料）を取得または収集することを含む。

【００７９】

本願に記載のいずれかの方法は、医療施設（例えば、病院、クリニックまたは介護付き医療施設）に来院する患者に対して実施することができる。一部の実施形態において、本方法は、医療専門家による定期検査の一部として対象に対して行われる。対象は、膵臓β細胞障害の１つまたは複数の症状（例えば、本願に記載の膵臓β細胞障害のいずれかの症状）を示し得る。また対象は、症状を示さない場合があり（無症候性の対象）または膵臓β細胞障害の症状をわずかに１つ示す場合がある。対象は、膵臓β細胞障害（例えば、２型糖尿病）の家族歴を有している可能性がある。対象は、幼児、小児、十代の若者、成人または高齢者である場合がある。

【００８０】

これらの方法は、任意の医療専門家（例えば、医師、検査技師、看護師、医師助手、および看護助手）によって行われる。膵臓β細胞機能に減少（例えば、有意な、観察可能な、または検出可能な減少）対象、または膵臓β細胞量に減少があると同定された対象には、膵臓β細胞障害の処置を施すことができる（例えば、単離、精製された、もしくは組換え型である可溶性ＭＡＮＦタンパク質、ピオグリタゾン、ＧＬＰ－１、またはＤＰＰ－４阻害剤（例えば、シタグリプチン、ビルダグリプチン、サクサグリプチン、リナグリプチン、デュトグリプチン、ジェミグリプチン、およびアログリプチン）、あるいは、本願に記載のいずれかの組成物、例えば、治療有効用量の配列番号２に少なくとも９０％同一である配列を含有する可溶性ＭＡＮＦタンパク質および／またはアポモルヒネ）。一部の実施形態において、例えば、本方法がアポモルヒネの投与を含んでいる場合、対象は勃起不全またはパーキンソン病に罹患していない。

【００８１】

一部の実施形態は、対象の膵臓β細胞機能不全の１つまたは複数の（例えば２、３または４つの）別のマーカー（例えば、Ｃペプチド産生および分泌の減少、インスリン産生および分泌の減少、ＩＡＰＰ産生および分泌の減少、血糖レベルの増加、糖化ヘモグロビンレベルの増加、ならびに対象の体液（例えば、尿中）のケトンの存在）の追加検出または評価をさらに含む。膵臓β細胞機能不全の１つまたは複数の追加マーカーの検出方法は、当技術分野で公知である。

【００８２】

一部の実施形態は、膵臓β細胞機能の減少対象または膵臓β細胞量の減少があると同定された対象に、膵臓β細胞障害の処置を施すこと（例えば、単離、精製された、もしくは組換え型である可溶性ＭＡＮＦタンパク質、ピオグリタゾン、ＧＬＰ－１、またはＤＰＰ－４阻害剤（例えば、シタグリプチン、ビルダグリプチン、サクサグリプチン、リナグリプチン、デュトグリプチン、ジェミグリプチンおよびアログリプチン）、あるいは、本願に記載のいずれかの組成物、例えば治療有効用量の配列番号２に少なくとも９０％同一である配列を含有する可溶性ＭＡＮＦタンパク質および／またはアポモルヒネ）をさらに含む。一部の実施形態は、定期的にグルコースをモニターする（例えばグルコメーターを使用して定期的に自己血糖をモニターする）ための膵臓β細胞機能の減少対象または膵臓β細胞量の減少があると同定された対象を選択することを含む。一部の実施形態は、医師または医療専門家による定期的な医学的評価（例えば、少なくとも１年に１回、少なくとも６か月に１回、少なくとも３か月に１回、少なくとも２か月に１回、または少なくとも１か月に１回の定期的訪問）のための膵臓β細胞機能の減少対象または膵臓β細胞量の減少があると同定された対象を選択することをさらに含む。一部の実施形態は、対象の医療記録に試験結果を記録すること、または、膵臓β細胞機能の減少もしく対象は膵臓β細胞量の減少があると同定された対象の１人もしくは複数の直系家族の膵臓β細胞機能もしくは膵臓β細胞量をモニターする類似の試験もしくは任意の当技術分野で公知の試験を行うことをさらに含む。一部の実施形態は、膵臓β細胞移植のための膵臓β細胞機能の減少対象または膵臓β細胞量の減少がある対象を選択することをさらに含む。

【００８３】

膵臓β細胞障害の処置の有効性をモニターする方法

さらに、対象（例えば、膵臓β細胞障害に罹患していると診断された対象）における膵

臓β細胞機能不全の処置の有効性をモニターする方法を提供する。これらの方法は、第１の時点での対象由来の生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを決定（アッセイ）し、第２の時点での対象由来の生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを決定（アッセイ）し、第２の時点での生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを第１の時点での生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルと比較することを含むものであって、（ｉ）第１の時点が処置前であり、第２の時点が処置開始後の任意の時点であるか、（ｉｉ）第１の時点が処置開始後であり、第２の時点が処置中または処置後のより遅い時点であり；第１の時点での生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルと比較した第２の時点での生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルの減少は、対象において処置が有効であったことを示す。一部の実施形態において、膵臓β細胞障害の処置は、インスリン（例えば、本願に記載のインスリンのいずれかの形態）、ピオグリタゾンおよびＴＵＤＣＡの１つまたは複数の投与である。一部の実施形態において、処置は、対象（例えば、本願に記載のような対象）への膵臓β細胞の移植である。

【００８４】

第１の時点での可溶性ＭＡＮＦのレベルと比較した第２の時点での生物試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルの減少は、対象における処置の有効性を示す。第１の時点での可溶性ＭＡＮＦのレベルと比較した第２の時点での生物試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルの増加または実質的な変化がないことは、処置が有効でなかったこと、および／または本処置が終了されるべきであること、および／または代替療法を被検体に施すべきであることを示す。一部の実施形態において、第１の時点での可溶性ＭＡＮＦのレベルと比較した第２の時点での生物試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルの増加または実質的な変化がないことは、投与量を増やして対象に処置を施すべきであること、または、頻度および／もしくは期間を増やして処置を施すべきであることを示す。

【００８５】

一部の実施形態において、本方法は、第１の時点および第２の時点で、検出可能もしくは観察可能な膵臓β細胞量を有し、かつ／または検出可能もしくは観察可能な量の膵臓β細胞機能を有している対象（例えば、第１の時点および第２の時点で膵臓β細胞量または膵臓β細胞機能を完全に喪失していない対象）に対して実施される。一部の実施形態において、本方法は、膵臓β細胞障害に罹患していると事前に同定または診断された対象に対して行われる。一部の実施形態は、膵臓β細胞障害に罹患している対象を選択することをさらに含む。一部の実施形態は、対象由来の試料を取得することをさらに含む。一部の実施形態は、１回または複数の用量の処置を対象に施すことをさらに含む。

【００８６】

一部の実施形態において、第２の時点は、第１の時点の少なくとも６時間（例えば、少なくとも１２時間、１８時間、２４時間、１日、２日、３日、４日、５日、６日、１週間、２週間、３週間、１か月、２か月、３か月、６か月、１年、２年、３年、４年または５年）後であってもよい。一部の実施形態において、第１の時点は、医療機関への入院時であってもよく、または、膵臓β細胞障害の少なくとも１つの症状を最初に診察した１週間以内であってもよい。

【００８７】

一部の実施形態において、本方法は、１つまたは複数のさらなるより遅い時点で、対象由来の生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを決定（アッセイ）することをさらに含む。これらの方法において、（早い日付順の時点で収集した）初期の（例えば、直前の）試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルと比較して、（後の日付順の時点で収集した）より遅い時点の試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルの減少は、対象における処置の有効性を示す。同様に、（早い日付順の時点で収集した）より早い時点の（例えば、直前の）試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルと比較して、（後の日付順の時点で収集した）より遅い時点の試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルの増加または有意な変化がないということは、対象における処置が有効でなかったことを示す。一部の実施形態において、これらの方法は、第１の時点、第２の時点、および１つまたは複数のさらなる時点で、検出可能もしくは観察可能な膵臓β細胞量を有し、かつ／または、検出可能もしくは観察可能な量の膵臓β細胞機能を有する

対象（例えば、第１の時点、第２の時点、および１つまたは複数のさらなる時点で、膵臓β細胞量または膵臓β細胞機能が完全に喪失していない被検体）に対して行われる。

【００８８】

一部の実施形態において、対象は事前に膵臓β細胞移植を受けていることができ、こういった場合、これらの方法は、一つには、対象における膵臓β細胞移植の効果細胞量をモニターする。一部の実施形態において、移植された膵臓β細胞は、自家移植、同種移植、または異種移植された膵臓β細胞である。一部の実施形態において、移植された膵臓β細胞は、デバイス内に存在するか、または生体適合性ポリマーにより内包されているか、または生体適合性ポリマー内に配置されている。一部の実施形態において、移植された膵臓β細胞は、膵臓以外の組織内（例えば、肝臓組織）に存在する。一部の実施形態において、これらの方法は、膵臓β細胞移植の１週間、２週間、３週間、１か月、２か月、３か月、４か月、５か月、６か月、または１年以内に対象において実施される。一部の実施形態において、第１の時点は、移植術の直後（例えば、１週間または２週間以内）である。

【００８９】

可溶性ＭＡＮＦのレベルは、当技術分野で公知の方法を用いて決定することができる。例えば、可溶性ＭＡＮＦのレベルは、可溶性ＭＡＮＦに特異的に結合する抗体を利用する、当技術分野で公知の多数の技術（例えば酵素免疫吸着測定法）を使用して検出することができる。一部の実施形態において、本方法は、対象由来のある１つの試料または少なくとも２つの試料（例えば、体液、例えば尿、血液、血漿、血清、または脳脊髄液を含有する生体試料）を取得または収集することを含む。本願に記載のいずれかの方法は、医療施設（例えば、病院、クリニックまたは介護付き医療施設）に来院する患者に対して実施することができる。一部の実施形態において、本方法は、医療専門家による定期検査の一部として対象に対して行われる。対象は、膵臓β細胞障害であると事前に診断されている可能性があるか、膵臓β細胞障害の１つまたは複数の症状（例えば、本願に記載の膵臓β細胞障害のいずれかの症状）を示し得る。対象は、幼児、小児、十代の若者、成人または高齢者である場合がある。

【００９０】

これらの方法は、任意の医療専門家（例えば、医師、検査技師、看護師、医師助手、および看護助手）によって行われる。一部の実施形態は、対象の膵臓β細胞障害の１つまたは複数の（例えば２、３または４つの）別のマーカーの追加検出または評価をさらに含む（例えば、第１の時点の対応するレベルと比較して第２の時点で、Ｃペプチド産生および分泌の増加、インスリン産生および分泌の増加、ＩＡＰＰ産生および分泌の増加、血糖レベルの減少、糖化ヘモグロビンレベルの減少、ならびに対象の体液（例えば、尿中）のケトンの欠如また有意なレベルがない場合、処置が有効であることをさらに示す）。膵臓β細胞障害の１つまたは複数のさらなるマーカーの検出方法は、当技術分野で公知である。

【００９１】

処置するための対象を選択する方法

さらに、膵臓β細胞障害を処置するための対象を選択する方法を提供する。これらの方法は、対象由来の生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを決定（アッセイ）し；生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを可溶性ＭＡＮＦの基準レベルと比較し；基準レベルと比較して生体試料の可溶性ＭＡＮＦのレベルが増加した対象を膵臓β細胞障害の処置のために選択することを含む。これらの方法において、基準レベルと比較して生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルが減少しているか、有意な変化がない対象は、膵臓β細胞障害の処置のために選択されない。

【００９２】

一部の実施形態は、膵臓β細胞障害の１つまたは複数のさらなるマーカーのレベルを評価または決定することをさらに含み、膵臓β細胞障害の１つまたは複数のさらなるマーカーの検出は、対象が膵臓β細胞障害の処置のために選択されものとすることをさらに示す。膵臓β細胞障害のこれらの１つまたは複数のさらなるマーカーとしては、対象由来の生体試料中のＣペプチドレベルの減少、対象由来の生体試料中のＩＡＰＰレベルの減少、対

象由来の生体試料中のインスリンレベルの減少、対象の１種もしくは複数の血糖レベルの増加、対象の糖化ヘモグロビンレベルの増加、または対象由来の生体試料中（例えば、尿中）のケトンの検出が挙げられる。対象由来の生体試料中のＣペプチド、ＩＡＰＰ、インスリン、血糖、糖化ヘモグロビンおよびケトンのレベルを検出する方法は、当技術分野で公知である。

【００９３】

可溶性ＭＡＮＦのレベルは、当技術分野で公知の方法を使用して決定することができる。例えば、可溶性ＭＡＮＦのレベルは、可溶性ＭＡＮＦに特異的に結合する抗体を利用する、当技術分野で公知の多数の技術（例えば酵素免疫吸着測定法）を使用して検出することができる。一部の実施形態において、本方法は、対象由来の試料（例えば、体液、例えば尿、血液、血漿、血清、または脳脊髄液を含有する生体試料）を取得または収集することをさらに含む。本方法は、任意の医療専門家（例えば、医師、看護師、医師助手、検査技師、または看護助手）により実施可能である。

【００９４】

対象は、膵臓β細胞障害の１つまたは複数の症状（例えば、本願に記載の膵臓β細胞障害のいずれかの症状）を示し得る。また対象は、症状なしで、または膵臓β細胞障害のをわずかに１つ示す場合がある。対象は、膵臓β細胞障害に罹患していることが疑われ得るか、または対象は膵臓β細胞障害を発症する増加したリスクを有し得る。対象は、膵臓β細胞障害（例えば２型糖尿病）の家族歴を有している可能性がある。対象は、膵臓β細胞障害に罹患していると事前に診断することができる。

【００９５】

一部の実施形態において、本方法は、検出可能もしくは観察可能な膵臓β細胞量を有しており、かつ／または、検出可能もしくは観察可能な量の膵臓β細胞機能を有する対象（例えば、膵臓β細胞量または膵臓β細胞機能を完全に喪失していない対象）に対して実施される。

【００９６】

対象に施すことが可能な膵臓β細胞障害の処置としては、限定するものではないが、次のものが挙げられる：可溶性ＭＡＮＦ（例えば、配列番号２、すなわち配列番号２の完全長に少なくとも８０％同一である配列を含有する可溶性ＭＡＮＦタンパク質）、アポモルヒネ、速効型インスリン（例えば、アスパルトまたはリスプロインスリン）、短時間作用型（例えば、レギュラーインスリン）、中間型インスリン（例えば、中性プロタミンハーゲドルンまたはＮＰＨインスリン）、長時間型インスリン（例えば、ウルトラレンテインスリン）、インスリングラルギン、インスリンデテミル、プラムリンタイド、インクレチンミメティックス（例えば、エクセナチド）、スルホニル尿素（例えば、クロルプロパミド、グリピジド、グリブリドおよびグリメピリド）、メグリチニド（例えば、レパグリニドおよびナテグリニド）、ビグアナイド（例えば、メトホルミン）、チアゾリジンジオン（例えば、ロシグリタゾンおよびピオグリタゾン）、α－グルコシダーゼ阻害剤（例えば、アカルボースおよびメグリトール（meglitol）、およびＤＰＰ－４阻害剤（例えば、シタグリプチンおよびサクサグリプチン）。膵臓β細胞障害の処置は、任意の組合せで使用される、１つまたは複数の（例えば、２、３または４つの）上記薬剤を包含し得る。一部の実施形態において、例えば、本方法がアポモルヒネの投与を含んでいる場合、対象は勃起不全またはパーキンソン病に罹患していない。

【００９７】

これらの方法の一部の実施形態は、対象に膵臓β細胞障害に関する少なくとも１種（例えば、２、３、または４種）の処置（例えば、本願に記載の、または当技術分野で公知の１種または複数の膵臓β細胞障害の処置）を施すことをさらに含む。例えば、これらの方法の一部の実施形態は、少なくとも１（例えば、少なくとも２、４、６、８、または１０）用量の本願に記載のいずれかの医薬組成物を投与することをさらに含む。膵臓β細胞障害の処置は、少なくとも１週間、１か月、６か月、１年、２年、３年、４年、５年、または１０年の期間にわたって継続することが可能である。処置は、対象に定期的に施すこと

ができる（例えば、１日１回、１日２回、１日３回、１日４回、週に１回、週に２回、週に３回、週に４回、月に１回、月に２回、月に３回、または月に４回）。

【００９８】

一部の実施形態において、基準レベルと比較して、可溶性ＭＡＮＦのレベルが増加した対象は、医師または医療専門家による定期的な医学的評価（例えば、少なくとも１年に１回、少なくとも６か月に１回、少なくとも３か月に１回、少なくとも２か月に１回、または少なくとも１か月に１回、または少なくとも週に１回の定期的訪問）のために選択される。一部の実施形態は、対象の医療記録に、対象が膵臓β細胞障害の１種または複数の処置（例えば、本願に記載のいずれかの例示的な処置）を施されるか処方されるよう記録することをさらに含む。一部の実施形態において、基準レベルと比較して可溶性ＭＡＮＦのレベルが増加した対象は、膵臓β細胞を移植するために選択される。

【００９９】

膵臓β細胞障害を発症するリスクのある対象を同定する方法

さらに、膵臓β細胞障害を発症するリスクのある対象を同定する方法を提供する。これらの方法は、対象由来の生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを決定し；対象由来の生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを可溶性ＭＡＮＦの基準レベルと比較することを含む。対象由来の生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルが基準レベルと比較して増加した場合、対象は、膵臓β細胞障害を発症するリスクが高いと同定される。基準レベルと比較して、対象由来の生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルが減少したか有意に変化していない場合、対象は膵臓β細胞障害を発症するリスクが低いと同定される。

【０１００】

本願に記載のいずれかの方法において、増加したリスクは、可溶性ＭＡＮＦのレベルにおける有意なまたは観察可能な増加のない対象（例えば、本願に記載のいずれかの方法を使用して、膵臓β細胞障害に罹患していると診断されない対象、健康な対象は疾患に罹患していると診断されない、または、膵臓β細胞障害の症状のない対象、もしくは膵臓β細胞障害の家族歴のない対象）と相対的である。

【０１０１】

可溶性ＭＡＮＦのレベルは、標準的な方法（例えば、当技術分野で公知の抗体に基づくいずれかの方法）を使用して決定することができる。本方法は、任意の医療専門家（例えば、医師、看護師、医師助手、検査技師、または看護助手）によって行われる。

【０１０２】

対象は、膵臓β細胞障害の１つまたは複数の症状（例えば、本願に記載の膵臓β細胞障害のいずれかの症状）を示し得る。対象はまた、膵臓β細胞障害に罹患していることが疑われ得る。また対象は、症状を示さないことがあり、または膵臓β細胞障害の症状をわずかに１つ示す場合がある。対象は、膵臓β細胞障害（例えば、２型糖尿病）の家族歴を有している可能性がある。

【０１０３】

一部の実施形態において、本方法は、検出可能もしくは観察可能な膵臓β細胞量を有しており、かつ／または検出可能もしくは観察可能な量の膵臓β細胞機能を有する対象（例えば、膵臓β細胞量または膵臓β細胞機能が完全に喪失していない対象）に対して実施される。

【０１０４】

膵臓β細胞障害を発症するリスクが高いと同定された対象には、膵臓β細胞障害の処置（例えば、本願に記載のいずれかの処置）を施すことができるか、または、膵臓β細胞障害に対する新規処置もしくは代替処置を施すことができる。膵臓β細胞障害を発症するリスクが高いと同定された対象は、さらに侵襲性な治療的処置を受けることもできる（例えば、クリニックまたは病院の定期的訪問の増加）。

【０１０５】

一部の実施形態は、膵臓β細胞障害を発症するリスクが高いと同定された対象に、膵臓β細胞障害の処置を施すこと（例えば、単離、精製された、もしくは組換え型である可溶

性ＭＡＮＦタンパク質、ピオグリタゾン、ＧＬＰ－１、またはＤＰＰ－４阻害剤（例えば、シタグリプチン、ビルダグリプチン、サクサグリプチン、リナグリプチン、デュトグリプチン、ジェミグリプチンおよびアログリプチン）、あるいは、本願に記載のいずれかの組成物、例えば、治療有効用量の配列番号２に少なくとも９０％同一である配列を含有する可溶性ＭＡＮＦタンパク質および／またはアポモルヒネ）をさらに含む。一部の実施形態は、グルコースをモニターする（例えば、グルコメーターを使用して定期的に自己血糖をモニターする）ための膵臓β細胞障害を発症するリスクの高い対象を選択することを含む。一部の実施形態は、医師または医療専門家による定期的な医学的評価（例えば、少なくとも１年に１回、少なくとも６か月に１回、少なくとも３か月に１回、少なくとも２か月に１回、または少なくとも１か月に１回の定期的訪問）のための対象を選択することをさらに含む。一部の実施形態は、対象の医療記録に試験結果を記録すること、または、本願に記載の方法を使用して、膵臓β細胞障害を発症するリスクが高いと同定された対象の１人もしくは複数の直系家族における膵臓β細胞障害を発症するリスクを決定する類似の試験もしくは任意の当技術分野で公知の試験を実施することをさらに含む。

【０１０６】

臨床試験に参加する対象を選択する方法

さらに、臨床試験に参加する対象を選択する方法を提供する。これらの方法は、対象由来の生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを決定し；対象由来の生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルを可溶性ＭＡＮＦの基準レベルと比較し、臨床試験に参加するための、基準レベル（例えば、本願に記載の可溶性ＭＡＮＦのいずれかの基準レベル）と比較して生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルが増加したか、または減少したかもしくは有意な変化のない対象を選択することを含む。

【０１０７】

可溶性ＭＡＮＦのレベルは、標準的な分子生物学的方法（例えば、本願に記載の抗体に基づくいずれかの方法）を使用して決定することができる。本方法は、任意の医療専門家（例えば、医師、看護師、医師助手、検査技師、または看護助手）により実施することができる。

【０１０８】

一部の実施形態において、対象は、膵臓β細胞障害の１つまたは複数の症状（例えば、本願に記載の膵臓β細胞障害のいずれかの症状）をもって来院し得る。一部の実施形態において、対象はまた、症状を示さない場合もあり、または膵臓β細胞障害の症状をわずかに１つ示す場合がある。一部の実施形態において、対象は、膵臓β細胞障害（例えば、２型糖尿病）の家族歴を有している可能性がある。一部の実施形態において、対象は既に膵臓β細胞障害に罹患していると診断され得る。一部の実施形態において、対象は、膵臓β細胞障害の処置を受けている。一部の実施形態において、対象には、臨床試験の間に、膵臓β細胞障害の新規処置または代替処置が施される。

【０１０９】

膵臓β細胞における小胞体ストレスを検出する方法

さらに、膵臓β細胞によって産生される可溶性ＭＡＮＦのレベルを決定し、産生される可溶性ＭＡＮＦのレベルを可溶性ＭＡＮＦの基準レベル（例えば、本願に記載の可溶性ＭＡＮＦのいずれかの基準レベル）と比較することを含む、膵臓β細胞の小胞体ストレスを検出する方法を提供する。可溶性ＭＡＮＦの基準レベルと比較して、膵臓β細胞により産生される可溶性ＭＡＮＦのレベルが増加したということは、膵臓β細胞における小胞体ストレスの増加を示す。可溶性ＭＡＮＦの基準レベルと比較して、膵臓β細胞によって産生される可溶性ＭＡＮＦのレベルが減少したか有意な変化がないということは、膵臓β細胞が検出可能なレベルの小胞体ストレスを受けていないことを示す。

【０１１０】

可溶性ＭＡＮＦのレベルは、標準的な分子生物学的方法（例えば、本願に記載の抗体に基づくいずれかの方法）を使用して決定することができる。本方法は、任意の医療専門家（例えば、医師、看護師、医師助手、検査技師、または看護助手）または科学者によって

行われる。

【０１１１】

一部の実施形態において、膵臓β細胞は哺乳動物（例えばヒト）にあり、膵臓β細胞によって産生される可溶性ＭＡＮＦのレベルは、哺乳動物由来の生体試料（例えば、血液、血清または血漿を含む試料）から決定することができる。一部の実施形態において、膵臓β細胞は、内因性膵臓β細胞であってもよいし、移植された膵臓β細胞（例えば自家移植、同種移植または異種移植された膵臓β細胞）であってもよい。一部の実施形態において、膵臓β細胞は、遺伝学的に改変された自家移植型膵臓β細胞である）。一部の実施形態において、膵臓β細胞は、哺乳動物の膵臓内に存在し得るか、膵臓以外の組織（例えば肝臓）に存在し得る。一部の実施形態において、膵臓β細胞は、デバイス、または生体適合性材料もしくはポリマーに存在し得る。

【０１１２】

一部の実施形態において、膵臓β細胞は、インビトロにおいて（例えば、組織培養物において）存在する。例えば、哺乳動物から回収された初代膵臓β細胞はエクスビボで培養することができる。一部の実施形態において、培養された膵臓β細胞は、初代哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、モンキー、ウシ、またはブタ）の膵臓β細胞株である。一部の実施形態において、培養された哺乳動物の膵臓β細胞は、遺伝学的に操作することができるか（例えば、１つまたは複数のタンパク質を発現するように遺伝学的に改変することができるか、１つまたは複数のタンパク質の発現を減少するように遺伝学的に改変することができる）、または化学的に（例えば、１つまたは複数の増殖因子で）処理することができる。一部の実施形態において、膵臓β細胞は、１つまたは複数の生体適合性ポリマーまたは生合成材料（例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）への膵臓β細胞の移植を促進するポリマーまたは材料）の存在下で培養することができる。様々な生体適合性ポリマーおよび生合成材料が当技術分野で公知である。

【０１１３】

一部の実施形態において、対象内の膵臓β細胞における小胞体ストレスの検出は以下の１つまたは複数により行われる：対象の膵臓β細胞における小胞体ストレスのレベルが増加した対象の同定、治療薬（例えば、膵臓β細胞における小胞体ストレスを減少する薬剤、例えば、本願に記載のいずれかの可溶性ＭＡＮＦタンパク質および／またはアポモルヒネ）の投与；対象の膵臓β細胞機能のモニタリング（例えば、本願に記載の膵臓β細胞機能をモニターするいずれかの方法）；および、病院訪問の頻度または対象のヘルスモニタリングレベルの増加（例えば、血糖検査の頻度の増加）。一部の実施形態において、例えば、本方法がアポモルヒネの投与を含んでいる場合、対象は勃起不全またはパーキンソン病に罹患していない。

【０１１４】

一部の実施形態において、インビトロでの膵臓β細胞における小胞体ストレスの増加の検出は、膵臓β細胞を治療薬（例えば、膵臓β細胞における小胞体ストレスを減少する薬剤、例えば、本願に記載のいずれかの可溶性ＭＡＮＦタンパク質またはアポモルヒネ）と接触させ、かつ／または膵臓β細胞機能をモニターする（例えば、本願に記載の膵臓β細胞機能をモニターするいずれかの方法）ことによって行われる。本願に記載のいずれかの方法において、膵臓β細胞は、少なくとも１つの別の細胞型または少なくとも１つの別の細胞株と共にインビトロで培養させることができる（例えば、共培養またはフィーダー培養）。

【０１１５】

処置の方法

さらに、対象に有効量の可溶性ＭＡＮＦ（例えば、精製、単離し、または組換え型である可溶性ＭＡＮＦタンパク質（例えば、本願に記載のいずれかの可溶性ＭＡＮＦタンパク質））および／またはアポモルヒネを投与することを含む、対象の膵臓β細胞障害を処置するかその発症を遅延させる方法を提供する。一部の実施形態において、処置によって、対象の膵臓β細胞障害の症状（例えば、本願に記載のいずれかの症状）の数が減少するか

、または、膵臓β細胞障害の１つもしくは複数の症状（例えば、本願に記載のいずれかの症状）の重症度、強度もしくは頻度が減少する可能性がある。一部の実施形態において、処置によって、発症または１つもしくは複数の症状を遅延させることができる（処置を受けている対象と比較して、処置を受けていない対象における１つまたは複数の症状の実際的な発症の時間が増加）。例えば、処置によって下記の１つまたは複数が生じ得る：対象の血糖レベル（複数可）の減少、対象の糖化ヘモグロビンのレベルの減少、対象のインスリン産生の喪失割合の減少、対象の膵臓β細胞機能の喪失割合の減少、および対象の膵臓β細胞量の喪失割合の減少。一部の実施形態において、例えば、本方法がアポモルヒネ（apomorpine）の投与を含んでいる場合、対象は勃起不全またはパーキンソン病に罹患していない。

【０１１６】

可溶性ＭＡＮＦ

例えば、一部の実施形態において、対象に投与される可溶性ＭＡＮＦは、配列番号２および４～７のいずれか１つ、すなわち、配列番号２または４～７の完全長に少なくとも８０％同一（例えば、少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％同一）である配列を含有し、場合によっては、（本願に記載の）可溶性ＭＡＮＦタンパク質の生物活性を有していてもよい。一部の実施形態において、対象に投与される可溶性ＭＡＮＦは、配列番号２（ヒト可溶性ＭＡＮＦ）に、すなわち、配列番号２の完全長に少なくとも９５％同一（例えば、少なくとも９６％、９７％、９８％、９９％または１００％同一）である配列を含有し、場合によっては、（本願に記載の）可溶性ＭＡＮＦタンパク質の生物活性を有していてもよい。一部の実施形態において、対象に投与される可溶性ＭＡＮＦは、配列番号２または可溶性ＭＡＮＦの内因性形態（野性型）である。これらのいずれかの実施形態において、可溶性ＭＡＮＦは精製または単離することができる。これらのいずれかの実施形態において、可溶性ＭＡＮＦは組換え型タンパク質であり得る。

【０１１７】

配列の比較および２つの配列間の同一性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを用いて行われる。２つのアミノ酸の配列間の同一性パーセントは、（インターネット上のｇｃｇ．ｃｏｍで利用可能な）ＧＣＧソフトウェアパッケージ中のＧＡＰプログラムに組み込まれている、Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol., 48:444-453, 1970）アルゴリズムを使用し、Ｂｌｏｓｓｕｍ６２マトリックスまたはＰＡＭ２５０マトリックスのいずれかを使用し、ギャップ加重１６およびギャップ長加重１を用いて決定される。２つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、ＧＣＧソフトウェアパッケージ（これもまたインターネット上のｇｃｇ．ｃｏｍで利用可能）のＧＡＰプログラムを使用し、ＮＷＳｇａｐｄｎａ．ＣＭＰマトリックス、ギャップ加重４０、およびギャップ長加重１を用いて決定される。

【０１１８】

一般に、本願に記載されているアミノ酸配列間の同一性パーセントは、米国バイオテクノロジー情報センター（National Center for Biotechnology Information、ＮＣＢＩ）のウェブサイトで一般に利用可能なＢＬＡＳＴ２．０プログラムを用いて決定されている。配列比較はギャップのないアラインメントを使用するとともに、デフォルトパラメータ（Ｂｌｏｓｓｕｍ６２マトリックス、ギャップ伸長コスト１１、残基当たりのギャップコスト１、およびラムダ比０．８５）を使用して行われる。ＢＬＡＳＴプログラムにおいて使用される数学的アルゴリズムは、Altschul et al., Nucleic Acids Research 25:3389-3402, 1997に記載されている。

【０１１９】

本願で述べているように、可溶性ＭＡＮＦの哺乳動物形態は、高度な配列同一性を有している。一般に、生物活性（例えば、対象の膵臓β細胞障害を処置するかその発症を遅延させる、または、膵臓β細胞における小胞体ストレスを減少する、または、２個以上の膵臓β細胞の集団における小胞体ストレス由来アポトーシス細胞死を減少するか遅延させる

能力）を有する可溶性ＭＡＮＦの異型体を取得するためには、可溶性ＭＡＮＦの様々な哺乳動物種間で保存されていない残基を改変または除去することができる一方、高度に保存されている残基は改変または除去してはならないことは、当業者には理解されよう。当技術分野で公知であるように、当業者は、本願で提供されている哺乳動物可溶性ＭＡＮＦタンパク質に関する各種配列をアラインメントさせて、高度に保存されているそれらの残基と、保存されていないそれらの残基を同定することができる。

【０１２０】

可溶性ＭＡＮＦの各種形態の生物活性は、本願に記載の様々な生物活性アッセイまたは当技術分野で公知のアッセイを実施することによって試験することができる。例えば、可溶性ＭＡＮＦタンパク質の生物活性は、可溶性ＭＡＮＦ（例えば、本願に記載のいずれかの可溶性ＭＡＮＦタンパク質）の存在下または非存在下で培養された膵臓β細胞を処理し、膵臓β細胞における小胞体ストレスを誘発する薬剤で膵臓β細胞を刺激することによって試験することができる。生物活性を有する可溶性ＭＡＮＦは、可溶性ＭＡＮＦと接触させず、薬剤で処理した細胞と比較すると、可溶性ＭＡＮＦおよび薬剤と接触させた細胞で観察された小胞体ストレスまたは小胞体ストレス由来アポトーシスの量を減少する。例えば、生物活性を有する可溶性ＭＡＮＦは、可溶性ＭＡＮＦで処理せず、薬剤で処理した細胞と比較すると、小胞体ストレスを誘発する薬剤で処理した細胞における小胞体ストレスの１つまたは複数のマーカーを減少することができる（例えば、グルコース調節タンパク質７８（ｇｒｐ７８またはＢｉＰとしても公知である）の誘発またはｂｃｌ－２関連ａｔｈａｎｏｇｅｎｅ－１（ｂａｇ－１）発現の減少；活性化、ゴルジ転座、プロテアーゼ切断、または転写因子６（ＡＴＦ６）活性化の核移行の減少；プロテインキナーゼＲＮＡ様小胞体キナーゼ（ＰＥＲＫ）活性化、オリゴマー化、または自己リン酸化（autohosphorylation）の減少；ＩＲＥ１の活性化の減少；ｅＩＦ２αリン酸化の減少；ＸＢＰ１　ｍＲＮＡのイントロン処理の減少；ＪＮＫシグナル経路活性化の減少；プロカスパーゼ４の活性化および切断の防止；ならびに小胞体酸化還元環境におけるシフトの防止または減少（例えば、実施例に記載したように、酸化還元感受性ｅｒｏＧＦＰタンパク質を使用して測定））。

【０１２１】

対象に投与される可溶性ＭＡＮＦは、１つまたは複数の（例えば２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４または１５）の挿入、付加、欠失または修飾を含有することができる。例えば、可溶性ＭＡＮＦは、対象における可溶性ＭＡＮＦの半減期を有意に延長するか、（例えば保管中に）可溶性ＭＡＮＦの熱安定性を高める化学的成分（例えば、タンパク質（例えばアルブミン）、糖（例えば、Ｎ結合型糖鎖またはＯ結合型糖鎖、例えばマンノース）（例えば、Sola et al., J. Pharm. Sci. 98:1123-1245, 2009を参照）、またはポリマー（例えば、ポリエチレングリコール））に共有結合させることができる。これらの方法で用いられる可溶性ＭＡＮＦタンパク質は、ＨＩＶ　ｔａｔタンパク質または可溶性ＭＡＮＦタンパク質の細胞透過性を増加させる任意の他の成分を含むこともできる。

【０１２２】

分子生物学および細胞培養技術を用いた組換えタンパク質（例えば、組換え型可溶性ＭＡＮＦ）を産生するためのいくつかの方法は、当技術分野で公知である。例えば、ｍＲＮＡ配列（例えば、配列番号３に少なくとも８０％同一である（例えば、少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％同一である）配列を含有するｍＲＮＡ）によってコードされている可溶性ＭＡＮＦは、細菌細胞、酵母細胞または哺乳動物細胞に（タンパク質発現プラスミドまたはウイルス系ベクターを使用して）トランスフェクトすることができ、トランスフェクト細胞によって可溶性ＭＡＮＦを発現させることができる。トランスフェクト細胞または培地は回収可能で、組換え型可溶性ＭＡＮＦタンパク質は、当技術分野で公知の方法を利用して精製することができる。別の哺乳動物の可溶性ＭＡＮＦタンパク質をコードしている多数のさらなる核酸（ｍＲＮＡ）は、当技術分野で公知である。

【０１２３】
一部の実施形態において、まず、対象は、本願に記載のいずれかの診断方法、または、本願に記載の、もしくは当技術分野で公知の膵臓β細胞障害を発症するリスクがある対象を予測するいずれかの方法を用いて、処置のために同定または選択される。
【０１２４】
対象には、少なくとも１（例えば、少なくとも２、３、４、または５）用量の可溶性ＭＡＮＦ（例えば、本願に記載のいずれかの可溶性ＭＡＮＦタンパク質）および／またはアポモルヒネを投与することができる。可溶性ＭＡＮＦおよび／またはアポモルヒネは、少なくとも１日に１回（例えば１日に２回、１日に３回、および１日に４回）、少なくとも週に１回（例えば、週に２回、週に３回、週に４回）、および／または少なくとも月に１回、対象に投与することができる。対象は長期間（例えば、少なくとも１か月、２か月、６か月、１年、２年、３年、４年、または５年）処置することができる（例えば、定期的に可溶性ＭＡＮＦを投与することができる）。本願に詳細に記載しているように、対象に投与する可溶性ＭＡＮＦおよび／またはアポモルヒネの投与量は、医師によって、多数の生理学的要因、例えば、限定するものではないが、対象の性別、対象の体重、対象の年齢および他の病状の存在などに配慮して決定することができる。可溶性ＭＡＮＦおよび／またはアポモルヒネは、経口投与、静脈内投与、動脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、頭蓋内投与、または脳脊髄液への注射によって対象に投与することができる。同様に、薬剤は固体（例えば経口投与用）として、または生理学上許容できる液状担体（例えば生理食塩水）（例えば、静脈内投与、動脈内投与、皮下投与、筋内投与または脳脊髄投与用）として処方できる。
【０１２５】
一部の実施形態において、対象には、膵臓β細胞障害の少なくとも１つの（例えば２、３、４、または５つ）の他の処置（例えば、本願に記載の膵臓β細胞障害に関するいずれかの処置、例えば、本願に記載のいずれかのインスリン）がさらに施される。一部の実施形態において、可溶性ＭＡＮＦおよび／またはアポモルヒネは、膵臓β細胞障害の少なくとも１つの（例えば２、３または４つの）他の処置と一緒に処方される（例えば、全身投与用の生理学上許容できるバッファーまたは媒体中で処方される）（例えば、本願に記載のいずれかの医薬組成物）。
【０１２６】
膵臓β細胞における小胞体ストレスを減少する方法
さらに、膵臓β細胞における小胞体ストレスを減少する方法を提供する。これらの方法は、膵臓β細胞を有効量の１つまたは複数の（例えば２または３つの）の可溶性ＭＡＮＦ（例えば、本願に記載のいずれかの可溶性ＭＡＮＦタンパク質、例えば、配列番号２に少なくとも８０％同一である配列を含有する、組換え型、精製、または単離された可溶性ＭＡＮＦタンパク質）、アポモルヒネ、およびピオグリタゾンと接触させることを含む。一部の実施形態において、膵臓β細胞はインビトロにある（組織培養物）。一部の実施形態において、膵臓β細胞は対象内にあり得る。これらの実験において使用される膵臓β細胞は、本願に記載のいずれかの膵臓β細胞であり得る。
【０１２７】
一部の実施形態において、膵臓β細胞は、１つまたは複数の（例えば、２または３つの）可溶性ＭＡＮＦ、アポモルヒネおよびピオグリタゾンと、長時間（例えば、少なくとも１５分、３０分、１時間、２時間、６時間、８時間、１０時間、１２時間または２４時間）の間、接触させることができる。一部の実施形態において、膵臓β細胞は、数用量の１つまたは複数の（例えば、２または３つの）可溶性ＭＡＮＦ、アポモルヒネおよびピオグリタゾン（例えば、少なくとも２用量、３用量、４用量、または５用量）と、例えば、定期的な時間間隔で（例えば、約１日１回、週に１回、または月に１回）接触させる。
【０１２８】
小胞体ストレスの減少は、細胞における小胞体ストレスを検出するための（例えば、本願に記載の小胞体ストレスのいずれかのマーカーを検出またはアッセイするための）当技

術分野で公知の任意の方法を用いて決定することができる。例えば、小胞体ストレスの減少は、細胞における小胞体ストレスの１つまたは複数のマーカーの減少によって検出することができる。一部の実施形態において、小胞体ストレスの減少は、以下の１つまたは複数の事象によって観察することができる：ｇｒｐ７８（ＢｉＰ）またはｂａｇ－１発現の誘発の減少；活性化、ゴルジ転座、プロテアーゼ切断、またはＡＴＦ６の核移行の減少；ＰＥＲＫ活性化、オリゴマー化、または自動リン酸化の減少；ＩＲＥ１活性化の減少；ｅＩＦ２αリン酸化の減少；ＸＢＰ１　ｍＲＮＡのイントロン処理の減少；ＪＮＫシグナル経路活性化の減少；プロカスパーゼ４の活性化および切断の減少；ならびにＥＲストレス誘発剤に暴露させることにより誘発される小胞体の酸化還元環境におけるシフトの減少（例えば、ＥＲストレス誘発剤に暴露させるが、１つまたは複数（例えば２または３つ）の可溶性ＭＡＮＦ、アポモルヒネおよびピオグリタゾンで処理されていない対照の膵臓β細胞と比較した場合）。小胞体の酸化還元環境におけるシフトの減少は、酸化還元感受性色素またはタンパク質、例えば、実施例に記載のレポータータンパク質を使用して測定することができる。一部の実施形態において、膵臓β細胞における小胞体ストレスの減少は、１つまたは複数の可溶性ＭＡＮＦ、アポモルヒネおよびピオグリタゾンと接触させていない膵臓β細胞において観察または検出した小胞体ストレスの量と、それぞれ（例えば、インビトロで、または対象において）比較することができる。一部の実施形態において、膵臓β細胞における小胞体ストレスの減少は、可溶性ＭＡＮＦタンパク質、アポモルヒネまたはピオグリタゾンと接触させていないが、小胞体ストレス誘発剤（例えば、タプシガルギン）と接触させる対照の膵臓β細胞と相対的である。

【０１２９】

これらの方法は、医療専門家（例えば、本願に記載のいずれかの医療専門家）または科学者により実施され得る。

【０１３０】

小胞体ストレス由来アポトーシスを減少するか遅延させる方法

小胞体ストレスのある膵臓β細胞は、細胞内のアポトーシス経路を活性化し得る。本願はまた、膵臓β細胞の集団を有効量の１つまたは複数の（例えば２または３つの）可溶性ＭＡＮＦ（例えば、本願に記載のいずれかの可溶性ＭＡＮＦタンパク質）、アポモルヒネおよびピオグリタゾンと接触させることを含む、２個以上の膵臓β細胞の集団における小胞体ストレス由来アポトーシスを減少するか遅延させる方法を提供する。

【０１３１】

一部の実施形態において、膵臓β細胞はインビトロにある（組織培養物）。一部の実施形態において、膵臓β細胞は対象内に（例えば、移植した生体適合性材料またはポリマー内に）あり得る。これらの方法において使用される膵臓β細胞は、本願に記載のいずれかの膵臓β細胞であり得る。一部の実施形態において、膵臓β細胞は、１つまたは複数の（例えば、２または３つの）可溶性ＭＡＮＦ、アポモルヒネおよびピオグリタゾンと、長時間（例えば、少なくとも１５分、３０分、１時間、２時間、６時間、８時間、１０時間、１２時間または２４時間）の間、接触させることができる。一部の実施形態において、膵臓β細胞は、数用量の１つまたは複数の（例えば、２または３つの）可溶性ＭＡＮＦ、ピオグリタゾンおよびアポモルヒネおよび（例えば、少なくとも２用量、３用量、４用量、または５用量）と、例えば、定期的な時間間隔で接触させる。

【０１３２】

膵臓β細胞の集団におけるアポトーシスの発現およびタイミングは、本願に記載の方法または当技術分野で公知のいずれかの方法を用いて決定することができる。膵臓β細胞の集団と１つまたは複数の（例えば、２または３つの）可溶性ＭＡＮＦ、アポモルヒネおよびピオグリタゾンとの接触は、アポトーシス（例えば、小胞体ストレス由来アポトーシス）を受ける細胞の集団内の膵臓β細胞の割合の減少を介在し得るか、膵臓β細胞の集団内のアポトーシスの発現を遅延させることができる。一部の実施形態において、１つまたは複数の（例えば、２または３つの）可溶性ＭＡＮＦ、アポモルヒネおよびピオグリタゾンで処理された細胞における小胞体ストレス由来アポトーシスの減少または遅延は、１つま

たは複数の（例えば、２または３つの）可溶性ＭＡＮＦ、アポモルヒネおよびピオグリタゾンで処理されていない細胞膵臓β細胞の集団と比較することができる。一部の実施形態において、１つまたは複数の（例えば、２または３つの）可溶性ＭＡＮＦ、アポモルヒネおよびピオグリタゾンで処理した細胞における小胞体ストレス由来アポトーシスの減少または遅延は、１つまたは複数の（例えば、２または３つの）可溶性ＭＡＮＦ、アポモルヒネおよびピオグリタゾンで処理されていないが、小胞体ストレス誘発剤（例えばタプシガルギン）と接触させた膵臓β細胞の集団の対照群と比較することができる。

【０１３３】

アポトーシス細胞死を検出する方法は当技術分野で周知であり、限定するものではないが、細胞カスパーゼ（例えば、プロカスパーゼ－３およびプロカスパーゼ－４）の切断、Ｈｏｅｓｃｈｔおよび７－アミノ－アクチノマイシンの取り込み、ＴｄＴ介在性ｄＵＴＰニック末端標識アッセイ、ならびにアネキシン膜染色が挙げられる。アポトーシス細胞死を検出するための様々なキットは市販されている。

【０１３４】

医薬組成物

さらに、本願は、少なくとも１つの可溶性ＭＡＮＦ（例えば、本願に記載のいずれかの可溶性ＭＡＮＦタンパク質、例えば、精製、単離された、または組換え型である可溶性ＭＡＮＦ）および／またはアポモルヒネと、膵臓β細胞障害に対する少なくとも１つの他の処置（例えば、本願に記載のいずれかの膵臓β細胞障害の処置、例えばピオグリタゾン、ＴＵＤＣＡ、および本願に記載のいずれかのインスリンの１つまたは複数）とを含有する医薬組成物を提供する。

【０１３５】

一部の実施形態において、本組成物は薬学的に許容できる担体と処方される。医薬組成物および処方物は、非経口投与、経口投与または局所投与によって、例えば、エアロゾルにより、または経皮的に投与することができる。本医薬組成物は、任意の方法で処方することができ、状態または疾患および病気の程度、各患者の一般的な病状、好ましい結果が得られる投与方法などに応じて、様々な単位剤形で投与することができる。処方および医薬品の投与に関する技術の詳細は、科学文献および特許文献に十分に記載されているが、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed., 2005を参照されたい。

【０１３６】

本願で提供する医薬組成物は、ヒト用または獣医学用の薬で使用するための任意の都合のよい方法で、投与用に処方することができる。浸潤剤、乳化剤および潤滑剤、例えば、ラウリル硫酸ナトリウムおよびステアリン酸マグネシウム、ならびに、着色料、剥離剤、コーティング剤、甘味剤、フレーバー剤および芳香剤、保存剤、ならびに抗酸化剤もまた本組成物中に存在し得る。

【０１３７】

本発明の組成物の処方物は、皮内投与、吸入投与、経口／経鼻投与、局所投与、および／または非経口投与に適したものが含まれる。本処方物は、単位剤形で提供されるのが都合よく、薬学の分野で周知の任意の方法によって調製することができる。担体材料と組み合わせて単回投与剤形を産生することができる有効成分（例えば、可溶性ＭＡＮＦおよび／またはアポモルヒネ、ならびに１つまたは複数の膵臓β細胞障害の追加治療薬）の量は、処置しようとする宿主、特定の投与方法、例えば、皮内投与または吸入投与に応じて変わり得る。担体材料と組み合わせて単回投与剤形を産生することができる有効成分の量は、一般に、処置の有効性（例えば、本願に記載の１つまたは複数のいずれかの処置の有効性）が得られる化合物の量である。

【０１３８】

本発明の医薬処方物は、医薬品を製造するための分野で公知のいずれかの方法によって調製することができる。このような薬物は、甘味剤、フレーバー剤、着色剤および保存料を含有し得る。処方物は、製造に適した無毒で薬学的に許容できる添加剤と混合すること

ができる。処方物は、１つまたは複数の希釈剤、乳化剤、保存剤、バッファー、添加剤などを含んでいてもよく、液剤、粉末剤、エマルジョン剤、凍結乾燥粉末剤、スプレー剤、クリーム剤、ローション剤、制御放出処方物、錠剤、丸剤、ゲル剤、貼付剤、インプラントなどの形態で提供することができる。

【０１３９】

経口投与用の医薬処方物は、適切かつ好適な投薬量で、当技術分野で周知である薬学的に許容できる担体を用いて処方することができる。そのような担体は、医薬品を、対象による服用に適した、錠剤、丸剤、粉末剤、糖衣錠、カプセル剤、液剤、ロゼンジ、ゲル剤、シロップ剤、スラリー、懸濁液剤などの単位剤形で処方することを可能にする。経口使用のための医薬製剤は、任意に、錠剤または糖衣錠コアを得るために、所望ならば、得られた混合物を粉砕し、適切なさらなる化合物を加えた後、顆粒の混合物を加工し、固体添加剤として処方することができる。適切な固体添加剤は炭水化物またはタンパク質充填剤であり、例えば、ラクトース、スクロース、マンニトールまたはソルビトールをはじめとする糖；トウモロコシ、コムギ、コメ、ジャガイモ、または他の植物由来のデンプン；セルロース、例えば、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチル－セルロースまたはカルボキシ－メチルセルロースナトリウム；アラビアゴムおよびトラガカントゴムを含むゴム類；ならびにタンパク質、例えばゼラチンおよびコラーゲンが挙げられる。崩壊剤または可溶化剤は、例えば、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸、またはその塩、例えばアルギン酸ナトリウムを添加することができる。プッシュフィットカプセルは、充填剤または結合剤と混合した活性剤、例えば、ラクトースまたはデンプン、潤滑剤、例えば、タルクまたはステアリン酸マグネシウム、また必要に応じて、安定剤を含有することができる。軟カプセル剤において、活性剤は、安定剤とともに、または安定剤なしで、適切な液体、例えば、脂肪油、流動パラフィン、または液体ポリエチレングリコール中に溶解または懸濁させることができる。

【０１４０】

水性懸濁液剤は、活性剤（例えば、可溶性ＭＡＮＦおよび／またはアポモルヒネ、ならびに１つまたは複数の膵臓β障害の追加の治療薬）を、水性懸濁液剤、例えば水性皮内注射剤の製造に適した添加剤との混合剤中に含有することができる。そのような添加剤としては、懸濁化剤、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントゴムおよびアラビアゴム、ならびに分散剤もしくは浸潤剤、例えば、天然のホスファチド（例えばレシチン）、アルキレンオキシドと脂肪酸との縮合物（例えばポリオキシエチレンステアレート）、エチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合物（例えばヘプタデカエチレンオキシセタノール）、エチレンオキシドと脂肪酸由来の部分エステルおよびヘキシトールとの縮合物（例えば、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート）、またはエチレンオキシドと脂肪酸由来の部分エステルおよびヘキシトール無水物との縮合物（例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート）などが挙げられる。水性懸濁液剤はまた、１つまたは複数の保存剤、例えば、エチルまたはｎ－プロピルｐ－ヒドロキシベンゾエート、１つまたは複数の着色剤、１つまたは複数のフレーバー剤、および１つまたは複数の甘味剤、例えばショ糖、アスパルテームまたはサッカリンを含有することもできる。処方物は、浸透圧を調節することができる。

【０１４１】

一部の実施形態において、油性薬剤が投与に使用される。油性懸濁液剤は、植物油、例えばラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油もしくはヤシ油中に、または鉱油、例えば流動パラフィン中に、あるいはこれらの混合物中に活性剤を懸濁することによって処方することができる。例えば、バイオアベイラビリティを増加させ、また、経口投与される疎水性医薬化合物の個体間および個体内の変動性を減少するために精油または精油成分を使用することを記載している、米国特許第５，７１６，９２８号を参照されたい（さらに米国特許第５，８５８，４０１号も参照されたい）。油性懸濁液剤は、蜜蝋、固形パラフィン、またはセチルアルコールなどの増粘剤を含有することができる。甘味剤、例えばグリセロー

ル、ソルビトール、またはスクロースなどを添加して、口当たりのよい経口製剤を提供することができる。これらの処方物は、アスコルビン酸などの抗酸化剤の添加により保存することができる。注射用の油性ビヒクルの例としては、Minto, J. Pharmacol. Exp. Ther. 281:93-102, 1997を参照されたい。

【０１４２】

医薬処方物はまた、水中油型エマルジョンの形態をとっていてもよい。油相は、上述の植物油もしくは鉱油、またはこれらの混合物であり得る。適切な乳化剤としては、天然のゴム、例えばアラビアゴムおよびトラガカントゴム、天然のホスファチド、例えば大豆レシチン、エステル、または脂肪酸由来の部分エステルおよびヘキシトール無水物類、例えばソルビタンモノオレエート、ならびにこれらの部分エステルとエチレンオキシドとの縮合物、例えばポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートが挙げられる。エマルジョンはまた、シロップ剤およびエリキシル剤の処方物の場合、甘味剤およびフレーバー剤を含有することができる。またこのような処方物は、粘滑剤、保存剤、または着色剤を含有することができる。代替の実施形態において、本発明のこれらの注射可能な水中油型エマルジョンは、パラフィン油、ソルビタンモノオレエート、エトキシル化ソルビタンモノオレエート、および／またはエトキシル化ソルビタントリオレエートを含む。

【０１４３】

さらに医薬化合物は、ガス注入、粉末剤、およびエアロゾル処方物を含む鼻腔内または眼内経路で投与することができる（ステロイド吸入薬の例については、例えば、Rohatagi, J. Clin. Pharmacol. 35:1187-1193, 1995；Tjwa, Ann. Allergy Asthma Immunol. 75:107-111, 1995を参照されたい）。

【０１４４】

一部の実施形態において、医薬化合物は、アプリケータースティック、液剤、懸濁液剤、エマルジョン剤、ゲル剤、クリーム剤、軟膏剤、ペースト剤、ゼリー剤、ペイント剤、粉末剤およびエアロゾル剤として処方され、局所経路によって、経皮的に送達することができる。

【０１４５】

一部の実施形態において、また医薬化合物は、体内で徐放するためのミクロスフェアとして送達され得る。例えば、ミクロスフェアは、皮下でゆっくりと放出される薬物の皮内注射によって投与することができる；Rao, J. Biomater Sci. Polym. Ed. 7:623-645, 1995を参照；生分解性および注射用ゲル処方物の場合、例えば、Gao, Pharm. Res. 12:857-863, 1995を参照；または、経口投与用のミクロスフェアの場合、例えば、Eyles, J. Pharm. Pharmacol. 49:669-674, 1997を参照されたい。

【０１４６】

一部の実施形態において、医薬化合物は、非経口投与、静脈内（ＩＶ）投与、筋肉内投与、腹腔内投与、もしくは皮下投与などによって投与することができるか、または、対象の体腔、器官の内腔、もしくは脳脊髄液への投与により投与することができる。これらの処方物は、薬学的に許容できる担体中に溶解された活性剤の溶液を含むことができる。使用可能な許容さできるビヒクルおよび溶媒は、水およびリンガー溶液、または等張性塩化ナトリウムである。さらに、滅菌不揮発性油は、溶媒または懸濁媒体として用いることができる。この目的のために、合成モノまたはジグリセリドをはじめとする、任意の無菌不揮発性油を使用することができる。さらに、オレイン酸などの脂肪酸が、注射剤の調製に同様に使用することができる。これらの溶液は無菌であり、一般的に望ましくない物質は含まれない。これらの処方物は、従来の周知の滅菌技術によって滅菌され得る。本処方物は、生理学的条件に近づけるために必要とされる薬学的に許容できる補助物質、例えば、ｐＨ調整剤および緩衝剤、毒性調整剤、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどを含有していてもよい。これらの処方物における活性剤の濃度は、広範囲で変化し得る。また、選択される特定の投与方法および患者のニーズに従って、主として液量、粘度、体重などに基づき選択される。ＩＶ投与の場合、処方物は、滅菌注射用水性または油性懸濁液として無菌注射用製剤とすることがで

きる。この懸濁液は、適切な分散剤または湿潤剤および懸濁化剤を用いて処方することができる。滅菌注射用製剤はまた、非毒性の非経口的に許容できる希釈剤または溶媒、例えば１，３－ブタンジオール溶液中の懸濁液であってもよい。本投与は、ボーラス投与または連続的投与（例えば、一定時間の血管への実質的な連続導入）によって行うことができる。

【０１４７】

一部の実施形態において、医薬化合物および処方物は凍結乾燥することができる。可溶性ＭＡＮＦおよび／またはアポモルヒネと、１つまたは複数の膵臓β細胞障害の追加の治療薬を含む安定性凍結乾燥処方物は、可溶性ＭＡＮＦおよび／またはアポモルヒネと、１つまたは複数の膵臓β細胞障害の追加の治療薬、および増量剤、例えばマンニトール、トレハロース、ラフィノース、スクロース、またはそれらの混合物を含む溶液を凍結乾燥することにより製造することができる。安定性凍結乾燥処方物を調製するための方法は、約２．５ｍｇ／ｍＬのタンパク質、約１５ｍｇ／ｍＬのスクロース、約１９ｍｇ／ｍＬのＮａＣｌ、ｐＨが５．５よりも大きく６．５未満であるクエン酸ナトリウムバッファーの溶液を凍結乾燥することを含み得る。例えば、ＵＳ２００４／００２８６７０を参照されたい。

【０１４８】

本組成物および処方物は、リポソームの使用によって送達することができる。リポソームの使用によって、特にリポソーム表面が標的細胞に特異的なリガンドを担持しているか、または特定の器官に優先的に指向される場合、インビボにおいて標的細胞への活性剤の送達を集中させることができる。例えば、米国特許第６，０６３，４００号および同第６，００７，８３９号；Al-Muhammed, J. Microencapsul. 13:293-306, 1996；Chonn, Curr. Opin. Biotechnol. 6:698-708, 1995；およびOstro, Am. J. Hosp. Pharm. 46:1576-1587, 1989を参照されたい。

【０１４９】

本発明の処方物は、予防的および／または治療的処置のために投与することができる。一部の実施形態において、処置的用途に関しては、本願に記載の障害のリスクがあるか障害に罹患している対象に、障害またはその合併症の臨床症候を治癒、緩和または部分的に停止するのに十分な量で、組成物が投与される；これは、治療有効量と呼ぶことができる。例えば、一部の実施形態において、本発明の医薬組成物は、対象における症状の数を減らすか、または膵臓β細胞障害の１つもしくは複数の症状の重症度、持続期間、もしくは頻度を減少するのに十分な量で投与される。

【０１５０】

これを達成するのに適切な医薬組成物の量は、治療有効用量である。この使用に有効な投与計画と量、すなわち投与レジメンは、様々な要因によって決まり、例えば、疾患または状態の段階、疾患または状態の重症度、患者の全体的な健康状態、患者の身体状態、年齢などである。患者に対する投薬レジメンを計算する際に、投与方法も考慮される。

【０１５１】

また投薬レジメンは、当技術分野で周知の薬物動態パラメータ、すなわち、活性剤の吸収率、バイオアベイラビリティ、代謝、クリアランスなどを考慮に入れる（例えば、Hidalgo-Aragones, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 58:611-617, 1996；Groning, Pharmazie 51:337-341, 1996；Fotherby, Contraception 54:59-69, 1996；Johnson, J. Pharm. Sci. 84:1144-1146, 1995；Rohatagi, Pharmazie 50:610-613, 1995；Brophy, Eur. J. Clin. Pharmacol. 24:103-108, 1983；Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed., 2005を参照されたい）。技術水準により、臨床医は、それぞれの個別患者に対する投薬レジメン、活性剤、および処置する疾患または状態を決定することができる。医薬品として使用される類似の組成物のために提供されているガイドラインは、投薬レジメンを決定するための指針として使用することができ、すなわち、本発明の用量スケジュールおよび投薬量レベル、実施した実行方法が正確で適切であることw決定するための指針として使用することができる。

【０１５２】
処方物の単回または複数回投与は、例えば、患者により必要とされ、許容される投薬量および頻度などに応じて行うことができる。処方物は、状態、疾患、または症状を効果的に処置、予防し、または改善するための活性剤の十分な量を提供するものとする。
【０１５３】
代替の実施形態において、経口投与用の医薬処方物は、１日につき体重１キログラム当たり約１～１００ｍｇの間またはそれ以上の１日量である。低投与量は、経口投与とは異なり、血流中に、体腔内または器官の内腔に使用することができる。実質的な高投与量は、局所投与もしくは経口投与、または粉末剤、スプレー剤、もしくは吸入剤による投与に用いることができる。非経口的または経口的に投与可能な処方物を調製するための実際的な方法は、当業者には公知または明白であり、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed., 2005などの刊行物により詳細に記載されている。
【０１５４】
キット
さらに、可溶性ＭＡＮＦタンパク質（例えば、本願に記載のいずれかの可溶性ＭＡＮＦタンパク質）に特異的に結合する、少なくとも１つの抗体または抗原結合性抗体フラグメント（例えば、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆａｂ’、ｓｃＦｖ、ｄｉ－ｓｃＦｖ、またはｓｄＡｂ）と、膵臓β細胞障害の１つの別のマーカー（例えば、インスリン、Ｃタンパク質およびＩＡＰＰ）に特異的に結合する少なくとも１つの（例えば２、３または４つの）抗体または抗原結合性抗体フラグメントを含有するキットを提供する。一部の実施形態において、キットに含まれる抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、基質上に局在している（例えば酵素免疫吸着測定法）。一部の実施形態において、キットは、単離、精製された、または組換え型である可溶性ＭＡＮＦタンパク質（例えば、本願に記載のいずれかの可溶性ＭＡＮＦタンパク質）をさらに含むことができる。一部の実施形態において、１つまたは複数の抗体または抗原結合性抗体フラグメントは標識化されている（例えば、放射性同位元素、フルオロフォア、または結合性タンパク質（例えばアビジン））。これらのキットは、例えば、膵臓β細胞障害の診断、対象における膵臓β細胞を発症するリスクにある対象の同定、または対象の膵臓β細胞機能もしくは膵臓β細胞量のモニタリングに有用であり得る。一部の実施形態において、キットは、本願に記載のいずれかの方法を実施するための説明書をさらに含有することができる。
【０１５５】
レポータータンパク質
本願で提供する方法は、結合タンパク質（ＢｉＰ）シグナル配列（例えば、マウスまたはヒトＢｉＰシグナル配列）、酸化還元感受性蛍光タンパク質（例えば、酸化還元感受性緑色蛍光タンパク質および酸化還元感受性黄色蛍光タンパク質）、およびアミノ酸配列ＫＤＥＬ（Ｌｙｓ－Ａｓｐ－Ｇｌｕ－Ｌｅｕ）を含有するレポータータンパク質を使用する。一部の実施形態において、ＢｉＰのシグナル配列はＮ末端にあり、酸化還元感受性蛍光タンパク質はＢｉＰシグナル配列に対してＣ末端側であり、アミノ酸配列ＫＤＥＬは酸化還元感受性蛍光タンパク質に対してＣ末端側である。一部の実施形態において、レポータータンパク質に存在する２つ以上の個別のタンパク質エレメント（例えば、ＢｉＰのシグナル配列、酸化還元感受性蛍光タンパク質、およびＫＤＥＬ配列）の間に、１～１００個のアミノ酸（例えば、１～５０、１～４０、１～３０、１～２５、１～２０、１～１５および１～１０個のアミノ酸）がある。酸化還元感受性緑色蛍光タンパク質のアミノ酸配列を下記に記載する。
【０１５６】
酸化還元感受性緑色蛍光タンパク質（配列番号１０）
MSKGEELFTG VVPILVELDG DVNGHKFSVS GEGEGDATYG KLTLKFIVTT GKLPVPWPTL VTTFXLQCFA RYP DHMKRHD FFKSAMPEGY VQERTIFFKD DGNYKTRAEV KFEGDTLVNR IELKGIDFKE DGNILGHKLE YNYNSH CVYI VADKQKNGIK VNFKIRHNIE DGSVQLADHY QQNTPIGDGP VLLPDNHYLC YQSALSKDPN EKRDHMVLL E FVTAAGITHG MDELYK

【０１５７】
本願に記載のレポータータンパク質は、（得られるタンパク質がその酸化還元感受性蛍光特性を維持する限り）配列番号１０に少なくとも８０％同一である（例えば、少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％）配列を含有する。例えば、酸化還元感受性緑色蛍光タンパク質または酸化還元感受性黄色蛍光タンパク質に導入された突然変異は、システインに突然変異を含んでいないものとする。一部の実施形態において、酸化還元感受性蛍光タンパク質は、酸化還元感受性黄色蛍光タンパク質である（例えば、ｒｘＹＦＰ；Ostergaard et al., EMBO J. 20:5853-5862, 2001に記載されている）。酸化還元感受性蛍光タンパク質のさらなる例は、Merksamer et al. (Cell 135:933-947, 2008)およびDooley et al. (J. Biol. Chem. 279:22284-22293, 2004)に記載されている。

【０１５８】
レポータータンパク質に存在することができる例示的なヒトおよびマウスＢｉＰシグナル配列を以下に示す。本願に記載されている方法で使用されるレポータータンパク質は、任意の哺乳動物のＢｉＰシグナル配列を含有することができる（例えば、ヒトまたはマウスのＢｉＰシグナル配列）。

【０１５９】
一部の実施形態において、レポータータンパク質およびこれらのレポータータンパク質をコードする核酸は、無傷の膵臓β細胞内の酸化還元環境における微妙な変動を高感度に（例えば、大幅に改善された）検出を行うための手段を提供する。

【０１６０】
ヒトＢｉＰシグナル配列（配列番号１２）
MKLSLVAAMLLLLSAARA

【０１６１】
マウスＢｉＰシグナル配列（配列番号１３）
MMKFTVAAALLLLGAVRA

【０１６２】
一部の実施形態において、レポータータンパク質は、配列番号１４の配列（以下に示す）を含有するレポータータンパク質に少なくとも８０％同一である（例えば、少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一である）配列を含有する。一部の実施形態において、レポータータンパク質は、配列番号１５に少なくとも８０％同一である（例えば、少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一である）配列を含有する核酸によってコードされている。例えば、配列番号１４のレポータータンパク質中の突然変異は、システインに突然変異を含んでいないものとする。配列番号１４の各種突然変異型は、その突然変異型がそれらの酸化還元依存性の蛍光特性を維持しているかどうかを決定するために、本願に記載のいずれかの方法を使用して試験することができる。配列番号１４（ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ）に少なくとも８０％同一である配列を含有するタンパク質の特異的酸化還元依存性蛍光特性は、実施例に詳細に記載している。

【０１６３】
ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰタンパク質（配列番号１４）
MMKFTVVAAALLLLGAVRAEEEDPPVATMSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFISTTGK
LPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKE
DGNILGHKLEYNYNCHKVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLKTCSALSKDPN
EKRDHMVLLERVTAAGITHGMDELYKTSGGPPPTGEEDTSEKDEL

【０１６４】
ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ　ｍＲＮＡ（配列番号１５）
atgatgaagttcactgtggtggcggcggcgttgctgctgggcgcggtgcgggccgaggaggaggatccaccggtcgc
caccatgagtaaaggagaagaacttttcactggagttgtcccaattcttgttgaattagatggtgatgttaatgggcaca

aattttctgtcagtggagagggtgaaggtgatgcaacatacggaaaacttacccttaaatttatttccactactggaaaa
ctacctgttccatggccaacacttgtcactactttcagttatggtgttcaatgcttttcaagatacccagatcatatgaa
acggcatgacttttcaagagtgccatgcccgaaggttatgtacaggaaagaactatatttttcaaagatgacgggaact
acaagacacgtgctgaagtcaagtttgaaggtgatacccttgttaatagaatcgagttaaaaggtattgattttaaagaa
gatggaaacattcttggacacaaattggaatacaactataactgccacaaggtatacatcatggcagacaaacaaaagaa
tggaatcaaagttaacttcaaaattagacacaacattgaagatggaagcgttcaactagcagaccattatcaacaaaata
ctccaattggcgatggccctgtccttttaccagacaaccattacctgaagacatgctctgccctttcgaaagatcccaac
gaaaagagagaccacatggtccttcttgagcgcgtaacagctgctgggattacacatggcatggatgaactatacaaaac
tagtggaggccctcccccaactggtgaagaggatacatcagaaaaagatgagttgtag

【０１６５】

候補薬剤のスクリーニング方法

また、以下の１つまたは複数について有用な候補化合物のスクリーニング方法を提供する：対象の膵臓β細胞障害を処置するかその発症を遅延させること、膵臓β細胞における小胞体ストレスを減少すること、および膵臓β細胞における小胞体ストレス由来アポトーシス細胞死を減少するか遅延させること。これらの方法は、膵臓β細胞を提供し、膵臓β細胞と候補化合物と接触させ、候補化合物の存在下で膵臓β細胞によって産生される可溶性ＭＡＮＦのレベルを決定し、可溶性ＭＡＮＦの基準レベルと膵臓β細胞によって産生される可溶性ＭＡＮＦのレベルを比較することを含む。これらの方法において、基準レベルと比較した膵臓β細胞により産生される可溶性ＭＡＮＦのレベルの増加は、試験化合物が、以下の１つまたは複数に有用であり得る：対象の膵臓β細胞障害を処置するかその発症を遅延させること、膵臓β細胞における小胞体ストレスを減少すること、および膵臓β細胞における小胞体ストレス由来アポトーシス細胞死を減少するか遅延させること。

【０１６６】

これらの方法において使用される膵臓β細胞（複数可）は、本願に記載のいずれかの膵臓β細胞（例えば、膵臓β細胞株（例えば、本願に記載のいずれかの膵臓β細胞株）または初代膵臓β細胞）であり得る。

【０１６７】

可溶性ＭＡＮＦのレベルは、標準的な分子生物学的方法（例えば、本願に記載の抗体に基づくいずれかの方法）を用いて決定することができる。本方法は、任意の医療専門家（例えば医師、看護師、医師助手、検査技師または看護助手）または科学者により実施することができる。

【０１６８】

一部の実施形態において、基準レベルは、候補化合物の非存在下で膵臓β細胞により産生される可溶性ＭＡＮＦのレベルである。一部の実施形態において、基準レベルは、膵臓β細胞障害に罹患していない、または膵臓β細胞障害の症状を有していない、または膵臓β細胞障害の家族歴を有してない対象に存在する可溶性のＭＡＮＦのレベルである。一部の実施形態において、基準レベルは、哺乳動物または哺乳動物膵臓β細胞株由来の初代膵臓β細胞において産生される可溶性ＭＡＮＦのレベルである。一部の実施形態において、基準レベルは可溶性ＭＡＮＦの閾値である。

【０１６９】

さらに、対象の膵臓β細胞障害を処置するかその発症を遅延させ、膵臓β細胞における小胞体ストレスを減少し、かつ／または膵臓β細胞における小胞体ストレス由来アポトーシス細胞死を減少するか遅延させるのに有用な候補化合物をスクリーニングする方法を提供する。これらの方法は、ＢｉＰシグナル配列、酸化還元感受性蛍光タンパク質、およびアミノ酸配列ＫＤＥＬを含有するレポータータンパク質を発現する哺乳動物細胞（例えば、哺乳動物の膵臓β細胞または膵臓β細胞株）を提供し；細胞を試験化合物と接触させ；細胞に存在する酸化型レポータータンパク質の量を決定し；基準レベルと比較して、細胞に存在する酸化型レポータータンパク質の量を比較することを含むものであって；基準レベルと比較した細胞中の酸化型レポータータンパク質のレベルの増加は、候補化合物が、対象の膵臓β細胞障害を処置するかその発症を遅延させ、膵臓β細胞における小胞体スト

レスを減少し、かつ／または膵臓β細胞における小胞体ストレス由来アポトーシス細胞死を減少するか遅延させるのに有用であり得ることを示す。一部の実施形態において、基準レベルは、候補薬剤の非存在下で哺乳動物細胞に存在する酸化型レポータータンパク質の量である。一部の実施形態において、細胞を、候補薬剤とＥＲストレス誘発剤の両方と接触させ、基準レベルは、ＥＲストレス誘発剤で単独処理した、細胞に存在する酸化型レポータータンパク質のレベルである。ＥＲストレス誘発剤の非限定的な例は、本願に記載されている。ＥＲストレス誘発剤のさらなる例は当技術分野で公知である。一部の実施形態において、基準レベルは酸化型レポータータンパク質の閾値である。使用する細胞は、ヒト、マウス、ラット、ブタ、モンキーまたはウシの細胞であり得る。細胞は、本願に記載されているか、当技術分野で公知のいずれかの膵臓β細胞株であり得る。一部の実施形態において、レポータータンパク質は、配列番号１４であるか、配列番号１４に少なくとも８０％同一である（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である）配列を含有するタンパク質である。

【０１７０】

さらに、対象の膵臓β細胞障害を処置するかその発症を遅延させ、膵臓β細胞における小胞体ストレスを減少し、かつ／または膵臓β細胞における小胞体ストレス由来アポトーシス細胞死を減少するか遅延させるのに有用な候補化合物をスクリーニングする方法を提供する。これらの方法は、ＢｉＰシグナル配列、酸化還元感受性蛍光タンパク質、およびアミノ酸配列ＫＤＥＬを含有するレポータータンパク質を発現する哺乳動物細胞（例えば、哺乳動物の膵臓β細胞）を提供し；細胞を試験化合物と接触させ；細胞に存在する還元型レポータータンパク質の量を決定し；基準レベルと比較して、細胞に存在する還元型レポータータンパク質の量を比較することを含むものであって；基準レベルと比較した細胞中の還元型レポータータンパク質のレベルの増加は、候補化合物が、対象の膵臓β細胞障害を処置するかその発症を遅延させ、膵臓β細胞における小胞体ストレスを減少し、かつ／または膵臓β細胞における小胞体ストレス由来アポトーシス細胞死を減少するか遅延させるのに有用であり得ることを示す。一部の実施形態において、基準レベルは、候補薬剤の非存在下で哺乳動物細胞に存在する還元型レポータータンパク質の量である。一部の実施形態において、細胞を、候補薬剤とＥＲストレス誘発剤の両方と接触させ、基準レベルは、ＥＲストレス誘発剤で単独処理した、細胞に存在する還元型レポータータンパク質のレベルである。ＥＲストレス誘発剤の非限定的な例は、本願に記載されている。ＥＲストレス誘発剤のさらなる例は当技術分野で公知である。一部の実施形態において、基準レベルは還元型レポータータンパク質の閾値である。使用する細胞は、ヒト、マウス、ラット、ブタ、モンキーまたはウシの細胞であり得る。細胞は、本願に記載されているか、当技術分野で公知のいずれかの膵臓β細胞株であり得る。一部の実施形態において、レポータータンパク質は、配列番号１４であるか、または配列番号１４に少なくとも８０％である（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である）配列を含有するタンパク質である。

【０１７１】

一部の実施形態において、決定は、細胞のレポータータンパク質の１つまたは複数の蛍光特性を検出することにより行われる（例えば、レポータータンパク質の還元形態または酸化形態に特有のスペクトルの特徴を検出する）。一部の実施形態において、レポータータンパク質の還元形態または酸化形態のレベルは、蛍光プレートリーダーを使用して、または蛍光標示式細胞分取（ＦＡＣＳ）を使用して決定される。

【０１７２】

例えば、レポータータンパク質を発現する膵臓β細胞（例えば、ＩＮＳ－１　８３２／１３）を６ウェルプレートにプレーティングし、候補化合物と接触させ、トリプシン処理によって回収することができる。リン酸緩衝生理食塩水で洗浄した後、細胞を適切な媒体（例えば、１１ｍＭのグルコースハンクス緩衝塩溶液）中に懸濁させ、ＬＳＲＩＩ（ＢＤ）を用いてＦＡＣＳを行い、細胞に存在するレポータータンパク質の還元形態または酸化形態のレベルを決定する。

【０１７３】
一部の実施形態において、蛍光プレートリーダーを用いて、細胞に存在するレポータータンパク質の還元形態または酸化形態のレベルを決定することができる。例えば、膵臓β細胞株（例えばＩＮＳ－１　８３２／１３細胞）を９６ウェルプレートへプレーティングし、候補薬剤で処理することができる。レポータータンパク質の還元形態または酸化形態のレベルは、蛍光プレートリーダーを用いて検出することができる。そのような実施形態において、バックグラウンドシグナルの減算は、レポータータンパク質の還元形態または酸化形態のレベルを決定する前に行うものとする。
【０１７４】
一部の実施形態において、レポータータンパク質は、配列番号１４、または配列番号１４に少なくとも８０％同一である配列を含有するタンパク質を含有する。これらの実施形態において、レポータータンパク質の還元形態は、４７３ｎｍの励起波長および５１０ｎｍの発光波長を有しており、レポータータンパク質の酸化形態は、３９４ｎｍの励起波長および５１０ｎｍの発光波長を有する。
【０１７５】
これらの方法の一部の実施形態において、細胞内のレポータータンパク質の酸化形態のレベルとレポータータンパク質の還元形態のレベルの比を決定することができる。これらの方法において、計算された比は、基準比と比較することができる。基準比は、候補薬剤で処理されていない細胞から得た比であり得る。基準比はまた、閾値比とすることができる。一部の実施形態において、細胞を、候補薬剤とＥＲストレス誘発剤と接触させ、細胞内のレポータータンパク質の酸化形態のレベルとレポータータンパク質の還元形態のレベルの比を決定し、その細胞における比は、ＥＲストレス誘発剤で単独処理された細胞から得た基準比と比較される。これらの方法において、基準比と比較して、細胞内の比を減少する候補薬剤は、対象における膵臓β細胞障害を処置するための候補薬剤として同定される。
【０１７６】
上記の方法の一部の実施形態は、膵臓β細胞障害の動物モデルにおいて候補化合物を試験する（例えば、候補化合物の投与が、動物モデルにおける膵臓β細胞障害の１つもしくは複数の症状を処置（例えば、重症度、頻度、または持続期間の減少）するかどうか、または動物モデルにおける膵臓β細胞障害の１つもしくは複数の症状の発症を遅延させるかどうかを決定する）ことをさらに含む。２型糖尿病の非限定的な動物モデルとしては、Ｚｕｃｋｅｒ脂肪ラット（ＺＦＲ）、ｏｂ／ｏｂ（肥満）マウス、ｃｐ（肥満形質）ラット、Ｚｕｃｋｅｒ糖尿病肥満（ＺＤＦ）ラット、ホリネズミ（Psammomys obesus）、肥満アカゲザル、ＫＫマウス、およびＫＫ－Ａ^{y}マウスが挙げられる（Srinivasan et al., Indian J. Med. Res. 125:451-472, 2007に記載されている）。１型糖尿病の非限定的な動物モデルとしては、非肥満糖尿病（ＮＯＤ）マウスおよびバイオ育種（ＢＢ）ラットが挙げられる（Rees et al., Diabetic Med. 22:359-370, 2005に記載されている）。膵臓β細胞障害の１つまたは複数の症状の重症度または発症は、本願に記載の方法または当技術分野で公知の方法を使用して、これらの動物において決定または観察することができる。
【０１７７】
上記方法の一部の実施形態は、候補化合物が膵臓β細胞の集団における小胞体ストレス由来アポトーシス細胞死を減少または遅延させるかどうかを試験することをさらに含む（例えば、候補薬剤および小胞体ストレス誘発剤で処理した膵臓β細胞の集団における小胞体ストレス由来アポトーシス細胞死の、候補薬剤の非存在下において小胞体ストレス誘発剤で処理した膵臓β細胞群と比較した減少または遅延）。アポトーシス細胞死を検出する方法は当技術分野で周知であり、限定するものではないが、細胞カスパーゼ（例えばプロカスパーゼ－３およびプロカスパーゼ－４）の切断、Ｈｏｅｓｃｈｔおよび７－アミノ－アクチノマイシン取り込み、ＴｄＴ介在性ｄＵＴＰニック末端標識アッセイ、ならびにアネキシン膜染色が挙げられる。アポトーシス細胞死を検出する様々なキットは市販されている。

【０１７８】
上記の方法の一部の実施形態は、候補化合物が膵臓β細胞における小胞体ストレスの別のマーカーの誘発を防止または遅延させるかどうかを試験することをさらに含む（例えば、候補化合物がｇｒｐ７８（ＢｉＰ）もしくはｂａｇ－１発現の誘発を減少するか否か；活性化、ゴルジ転座、プロテアーゼ切断、もしくはＡＴＦ６核移行を減少するか否か；ＰＥＲＫ活性化、オリゴマー化、もしくは自動リン酸化を減少するか否か；ＩＲＥ１の活性化を減少するか否か；ｅＩＦ２αのリン酸化を減少するか否か；ＸＢＰ１　ｍＲＮＡのイントロン処理を減少するか否か；ＪＮＫシグナル経路の活性化を減少するか否か；プロカスパーゼ４の活性化および切断を防止するか否か；ならびに／または小胞体酸化還元環境のシフトを防止または減少するか否か（例えば、本願に記載のいずれかのレポータータンパク質を使用して測定される））。ＢｉＰおよびＢａｇ－１の発現レベルは、ＢｉＰのまたはＢａｇ－１の部分にハイブリダイズするように設計されたプライマーのセットを用いて定量的リアルタイムＰＣＲを用いて決定することができる。ＢｉＰ、Ｂａｇ－１、ＰＥＲＫ、ＩＲＥ１、ｅＩＦ２α、ＸＢＰ１およびＡＴＦ６の発現レベルまたは処理、活性化、リン酸化もしくは細胞の局在化は、当技術分野で公知の方法を使用して、１つのＢｉＰ、Ｂａｇ－１、ＰＥＲＫ、ＩＲＥ１、ｅＩＦ２α、ＸＢＰ１、またはＡＴＦ６に特異的に結合する抗体を使用して決定することができる。一部の実施形態において、候補薬剤および小胞体ストレス誘発剤で処理した細胞中の小胞体ストレスの１つまたは複数のマーカーにおける防止または遅延は、候補薬剤の非存在下において小胞体ストレス誘発剤で処理された膵臓β－細胞（複数可）と比較される。

【０１７９】
いずれかの種類の候補化合物は、上記の方法において使用することができる。候補化合物は、例えば、タンパク質、ペプチド、核酸（例えば、ＲＮＡまたはＤＮＡ）、無機化合物、脂質、オリゴ糖、またはそれらの任意の組合せであり得る。上記の方法において使用することができる候補化合物のライブラリーは市販されている。スクリーニングされる候補化合物は、当技術分野で公知のコンビナトリアルライブラリー法において、多数の手法のうちのいずれかを用いて取得することが可能であり、例えば次のものが挙げられる：生物学的ライブラリー；空間的アドレス可能平行固相または溶液相ライブラリー（spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries）；デコンボリューションを必要とする合成ライブラリー法；「１ビーズ１化合物」ライブラリー法；およびアフィニティークロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリー法。生物学的ライブラリー手法はペプチドライブラリーに限定されるが、他の４つの手法はペプチド、非ペプチドオリゴマー、または化合物の小分子ライブラリーに適用することができる（Lam, Anticancer Drug Des., 12:145, 1997）。

【０１８０】
分子ライブラリーの合成方法の例は、例えば、以下の文献で確認することができる：DeWitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90:6909, 1993；Erb et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91:11422, 1994；Zuckermann et al., J. Med. Chem., 37:2678, 1994；Cho et al., Science 261:1303, 1993；Carrell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 33:2059, 1994；Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 33:2061, 1994；およびGallop et al., J. Med. Chem., 37:1233, 1994。

【０１８１】
化合物のライブラリーは、溶液中に提示され得るか（例えば、Houghten, Bio/Techniques, 13:412-421, 1992）、ビーズ上に提示され得るか（Lam, Nature, 354:82-84, 1991）、チップ上に提示され得るか（Fodor, Nature 364:555-556, 1993）、細菌上に提示され得るか（米国特許第５，２２３，４０９号）、胞子上に提示され得るか（米国特許第５，５７１，６９８号；同第５，４０３，４８４号；および同第５，２２３，４０９号）、プラスミド上に提示され得るか（Cull et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89:1865-1869, 1992）、またはファージ上に提示され得る（Scott and Smith, Science, 249:386-390, 1990；Devlin, Science, 249:404-406, 1990；Cwirla et al., Proc. Natl. Acad.

Sci. U.S.A., 87:6378-6382, 1990；およびFelici, J. Mol. Biol., 222:301-310, 1991）。

実施例

【実施例１】

【０１８２】

可溶性ＭＡＮＦ発現は、膵臓β細胞においてＥＲストレス時に増加される

実験は、可溶性ＭＡＮＦの発現が小胞体ストレスに応答して膵臓β細胞で誘発されるかどうかを決定するために行った。これらの実験は、齧歯類膵臓β細胞株（ＩＮＳ－１　８３２／１３およびＭＩＮ６）、初代マウスおよびヒト膵島、ならびに小胞体ストレスを誘発する２つの異なる化学薬剤（タプシガルギンおよびツニカマイシン）を使用して行った。ＩＮＳ－１　８３２／１３細胞を、１０％ウシ胎児血清、ペニシリン、ストレプトマイシン、ピルビン酸ナトリウム、および０．１％β－メルカプトエタノールを含有するＲＰＭＩ－１６４０中で培養した。初代膵島はＰｒｏｄｏから取得し、８０４Ｇ細胞によって産生されるラミニンＶでプレコートした６ウェルプレートにプレーティングし、ウシ胎児血清、非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、および抗生物質を補充したＣＭＲＬ培地中で培養した。

【０１８３】

可溶性ＭＡＮＦタンパク質は、タプシガルギン（５０ｎＭ）で処理した後の培養ラット膵臓β細胞株（ＩＮＳ－１　８３２／１３）の培地で検出した（図１）。ＭＡＮＦのｍＲＮＡレベルの増加は、５μＭツニカマイシンまたは２０ｎＭタプシガルギンで２４時間処理した後の同一細胞株で検出した（図２）。

【０１８４】

マウス初代膵島を使用して行った実験から得たデータは、６時間０．５μＭタプシガルギンによるマウス膵島の処理は、ＭＡＮＦのｍＲＮＡ発現の有意な増加をもたらすことをさらに示す（図３）。第２の一連の実験は、２名のヒトのドナーから得たヒト初代膵島を用いて行った。これらのデータもまた、タプシガルギン（０．２５μＭ）でヒト膵島を処理するとＭＡＮＦ　ｍＲＮＡの発現と（図４）、可溶性ＭＡＮＦタンパク質の細胞外培地への産生および放出（図５および６）に有意な増加が生じることを示す。

【０１８５】

実験は、可溶性ＭＡＮＦが小胞体ストレスから膵臓β細胞を保護するかどうかを決定するために行った。第１の一連の実験では、ＭＡＮＦの発現は、ＭＡＮＦ　ｍＲＮＡを標的とする３つの異なるｓｉＲＮＡ構築物の１つを使用してノックダウンした。製造者のプロトコルに従って、リポフェクタミン２０００を使用してトランスフェクションを行った。これらの実験のデータからは、ＭＡＮＦ発現のノックダウンは、細胞をツニカマイシン（２μＭ）で２４時間処理した場合に、コントロールｓｉＲＮＡでトランスフェクトされ、同レベルのツニカマイシンで処理した対照細胞と比較して、（ＢｉＰ　ｍＲＮＡレベルの増加によって明らかなように）小胞体ストレスを増加させた（図７）ことが示される。これらのデータは、可溶性ＭＡＮＦが膵臓β細胞における小胞体ストレスの防止または減少に役割を果たすことを示す。

【０１８６】

さらなる実験は、可溶性ＭＡＮＦが小胞体ストレス誘発化学薬剤で処理した膵臓β細胞の小胞体ストレス由来アポトーシスを減少または遅延させるか否かを決定するために行った。これらの実験から得たデータからは、可溶性ＭＡＮＦによるマウス膵臓β細胞株（ＭＩＮ６）の処理が、ツニカマイシン処理（１μＭ、２４時間）後の細胞で観察されたカスパーゼ－３切断量を有意に減少したことが明らかである（図８）。これらのデータは、可溶性ＭＡＮＦが、膵臓β細胞における小胞体ストレス由来アポトーシス細胞死を防止または遅延させることができることを示唆している。

【実施例２】

【０１８７】

ＥＲにおける酸化還元状態をモニターするためのシステム

細胞内のＥＲの酸化還元状態をモニターするための新規システムを開発した。このシステムでは、マウスＢｉＰのシグナル配列および哺乳動物ＥＲ回収シグナル（ＫＤＥＬ）を、酸化還元感受性緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）のＮ末端およびＣ末端のそれぞれに付加した（図９Ａ）。組換えタンパク質はＭＥＲＯＳ－ＧＦＰと命名した（哺乳動物小胞体局在型酸化還元感受性ＧＦＰ）。蛍光顕微鏡検査の使用により、ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰがＥＲに局在していることが確認された（図９Ｂ）。ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰは、３９４ｎｍおよび４７３ｎｍにて極大で、ＮＳＣ３４細胞の完全酸化型および還元型種の個別の励起スペクトルを示す（図１０Ａ）。ＮＳＣ３４細胞は、１０％ウシ胎児血清、ペニシリン、およびストレプトマイシンを含有するＤＭＥＭで培養した。

【０１８８】

個別の２つの励起波長、５０８ｎｍおよび５１０ｎｍの発光スペクトルは同程度であった（図１０Ｂおよび１０Ｃ）。共焦点顕微鏡分析では、強力還元剤ジチオスレイトール（ＤＴＴ）で処理した細胞においては、４０５ｎｍで蛍光がわずかに減少したが、４７６ｎｍ励起の蛍光では有意な増加が確認された（図１１）。

【０１８９】

野生型の未処理細胞に対して標準化した、励起４７３ｎｍの蛍光と３９４ｎｍの蛍光の間の比は、ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比と呼ぶ。ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比は、蛍光プレートリーダーを用いて決定した。これらの実験において、ＩＮＳ－１　８３２／１３細胞を５０，０００個／ウェルで９６ウェルプレートにプレーティングし、細胞を３０分間、様々な濃度のH_2O_2またはＤＴＴで処理し、励起波長４７３ｎｍの蛍光および発光波長５１０ｎｍの蛍光（ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰの還元に関して）、または励起波長３９４ｎｍの蛍光および発光波長５１０ｎｍの蛍光（ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰの酸化に関して）を測定した。ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比は、バックグラウンドシグナルの減算後に決定した。このデータからは、酸化剤、H_2O_2はＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比を変化させなかったことが明らかであり、このことは、ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰがインビボにおいてほぼ１００％酸化されていることを示唆している（図１２）。反対に、ＤＴＴ処理は、用量依存的にＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比を増加させた（図１２）。

【０１９０】

ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比がインビボでの酸化還元状態の変化を反映していることを確認するため、さらなる実験を行った。これらの実験において、ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰの酸化還元状態は、チオール－アルキル化試薬、４－アセトアミド－４’－マレイミジルスチルベン－２，２’－ジスルホン酸（ＡＭＳ）と組み合わせた非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用してモニターした。これらの実験において、２ｍＭのＤＴＴで処理したか、未処理のままのＩＮＳ－１　８３２／１３細胞を２－β－メルカプトエタノール含有または非含有の２５ｍＭ　ＡＭＳを含有する１×ＳＤＳ－ＰＡＧＥ試料バッファーに溶解させ、１０分間９５℃で沸騰させ、ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して電気泳動を行い、抗ＧＦＰ抗体を使用してイムノブロットを行った。予想通りに、ＤＴＴ処理細胞から得た溶解物の非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥが、ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰのゆるやかな移行形態のたった１つを示した。このことは、ＤＴＴ処理がインビボにおいてＭＥＲＯＳ－ＧＦＰを完全に還元したことを示唆している（図１３）。

【０１９１】

さらに、ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比も、ＤＴＴ処理細胞において異なる時点でモニターした。図１４は、ＥＲがＤＴＴ処理の数分以内に還元され、ＤＴＴ排出の１分以内に酸化型環境に戻すことができることを示す。これらの結果は、ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰを用いて、哺乳動物細胞のＥＲ内の酸化還元状態をリアルタイムでライブモニターすることができることを示唆している。

【０１９２】

フローサイトメトリーを用いて、インビボにおけるＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比を正確にモニターした。これらのデータは、膵臓β細胞株ＩＮＳ－１　８３２／１３のＤＴＴ処理が４８８ｎｍ対４０５ｎｍの励起の蛍光比に用量依存的増加をもたらすことを示す（図１５お

よび１６）。さらにこの知見を分析するため、平均ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比をＤＴＴ処理細胞にて調べた。データは、ＤＴＴ処理が用量依存的に平均ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比を増加させることを示す（図１７）。しかし、H_2O_2処理ではＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比に変化はなく（図１８）、このことは、ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰが基底レベルでＥＲでの酸化がほぼ完全であったことを示唆している。さらに、平均ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比は、ツニカマイシンおよびタプシガルギン、ブレフェルジンＡ、ＭＧ１３２（図１９および２０）、慢性高グルコース（図２１）、血清欠乏およびグルコース除去（図２２）、パルミチン酸塩、ヒト膵島アミロイドポリペプチド（ｈＩＡＰＰ）、ならびに炎症性サイトカイン（図２３および２４）をはじめとする、ＥＲストレスの実験的および生理的誘発剤によって増加した。

【実施例３】

【０１９３】

ＥＲストレス細胞におけるＥＲ酸化還元状態の不均一性

個別の２つの細胞の集団について、パルミチン酸塩（膵臓β細胞に対する強力ＥＲ誘発剤）でＩＮＳ－１　８３２／１３細胞を処理した後に、フローサイトメトリーにより観察した：１つは酸化型ＥＲ状態を維持することができ、もう１つは高度還元型ＥＲであった（図２５および２６）。細胞のこれらの不均一群をさらに研究するため、ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比が２よりも大きい細胞を「還元型細胞」として分類した。さらに、これらの異なる２つの細胞の集団についても、慢性高グルコース（図２７）、血清欠乏およびグルコース除去（図２８）、ならびにヒトＩＡＰＰ（図２９）をはじめとする、膵臓β細胞に対する別の既知のＥＲストレス誘発剤で処理した後に観察した。ストレス誘発剤のうち、パルミチン酸塩処理は、高度還元型ＥＲのある細胞の集団を最大限に増加する。興味深いことに、パルミチン酸塩誘発細胞機能不全に対して保護的であることがこれまでに明らかにされてきた、不飽和脂肪酸、オレイン酸およびリノール酸は、還元型ＥＲを形成するパルミチン酸塩の能力を有意に抑制した（図３０）。これらのデータは、ＥＲストレス細胞がそれらの酸化還元状態で不均一であることを示唆している。

【実施例４】

【０１９４】

還元型ＥＲのある細胞における小胞体ストレス応答（ＵＰＲ）の活性化

ＵＰＲと酸化還元状態の不均一性との関係を研究するために実験を行った。これらの実験において、酸化還元状態とＵＰＲの活性化レベルの両方を同一細胞内でモニターした。これを達成するため、ヒトＢｉＰプロモーターによって作動される、赤色蛍光タンパク質ｍＣｈｅｒｒｙをコードするＵＰＲレポーター遺伝子を構築した。ＢｉＰプロモーターは３つの小胞体ストレス応答エレメント（ＵＰＲＥ）を含有し、ＵＰＲの活性化レベルを効率的に反映することが明らかにされている。このＢｉＰ－ｍＣｈｅｒｒｙレポータープラスミドをＭＥＲＯＳ－ＧＦＰを発現するＩＮＳ－１　８３２／１３細胞へトランスフェクトし、ＦＡＣＳ分析を用いて、同一細胞におけるＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比とＢｉＰ－ｍＣｈｅｒｒｙを介したＵＰＲの活性化レベルをモニターした（図３１）。ＢｉＰ－ｍＣｈｅｒｒｙの活性化レベルとＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比は、ＥＲストレス誘発後にモニターした。これらの実験において、ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰを発現するＩＮＳ－１　８３２／１３細胞を６ウェルのプレート上にプレーティングし、提示した時間に各化合物で処理し、次いで、トリプシン処理することによって回収した。リン酸緩衝生理食塩水で洗浄した後、細胞を１１ｍＭのグルコース－ハンクス緩衝食塩溶液に再懸濁した。フローサイトメトリー分析は、ＬＳＲＩＩ（ＢＤ）で行った。

【０１９５】

データによれば、還元型ＥＲのある細胞の集団（ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比＞２．０）は、酸化型ＥＲを維持可能な細胞と比較して、高度還元型ＥＲ細胞の集団でのＵＰＲの活性化を示す、ＢｉＰ－ｍＣｈｅｒｒｙの活性化レベルがより増加したことが明らかである（図３２および３３）。

【０１９６】

これらのデータを確認するため、さらなる実験を行った。これらの実験において、酸化

型ＥＲと高度還元型ＥＲのある細胞をパルミチン酸塩で処理した後、ＦＡＣＳにより選別し（図３４および３５）、ＵＰＲマーカーＢｉＰとスプライスＸＢＰ－１の発現はリアルタイムＰＣＲを使用して測定した。これらの実験において、還元型細胞および酸化型細胞はＦＡＣＳによって選別し、全ＲＮＡはＲＮｅａｓｙキット（Ｑｉａｇｅｎ）によって抽出した。逆転写酵素と定量的ＰＣＲは、ＳＹＢＲ緑色色素を使用し、ＢｉｏＲａｄ　ｉＱ５を用いて行った。

【０１９７】

データによれば、ＢｉＰおよびスプライスＸＢＰ－１の発現レベルは、酸化型ＥＲの細胞におけるレベルと比較して、高度還元型ＥＲの細胞で増加したことが明らかである（図３６）。これらのデータは、還元型ＥＲおよび酸化型ＥＲの細胞内での発現プロファイリングによってさらに確認した（図３７）。これらの実験は、２４時間、０．５ｍＭパルミチン酸塩で処理した、ＦＡＣＳ選別ＩＮＳ－１　８３２／１３細胞を使用して行った。全ＲＮＡは、ＲＮＡｅａｓｙキット（Ｑｉａｇｅｎ）で抽出した。次いで、精製ＲＮＡは、製造業者のプロトコルに従って、ＧｅｎｅＣｈｉｐ　Ｒａｔ　Ｇｅｎｅ　１．０　ＳＴアレイ（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ）にアプライした。これらのデータは、高度還元型ＥＲを保持する細胞が、おそらく調節機序として、ＵＰＲを高度に活性化したことを示唆している。

【実施例５】

【０１９８】

還元環境から酸化環境へＥＲをシフトする化合物に対する小分子スクリーニング

上記のデータは、酸化環境に向けてＥＲをシフトする化学化合物および生物製剤がＥＲストレスおよびＥＲ機能不全に関連する疾患の処置に有効であり得ることを示唆している。この可能性の調査については、２つのＦＤＡ承認薬、ピオグリタゾン（Ａｃｔｏｓ）とタウロウルソデオキシコール酸（ＴＵＤＣＡ）がＥＲの酸化還元状態に影響を及ぼし、ＥＲ疾患の細胞モデルにおける細胞死を改善する可能性がある。ピオグリタゾンは、２型糖尿病患者を処置するために承認され、ウォルフラム症候群のマウスモデルにおける膵臓β細胞機能を維持することが示されている。ピオグリタゾンは、タプシガルギン（で処理した膵臓β細胞において酸化環境にＥＲをシフトし図３８、右図）、細胞死からこれらの細胞を保護する（図３８、左図）ことを示した。別の小分子、ＴＵＤＣＡは、胆石の処置および胆汁性肝硬変のために使用され、糖尿病のマウスモデルにおいてＥＲストレスを緩和することが示されている。ＴＵＤＣＡはまた、酸化環境に向けてＥＲをシフトし（図３８、右図）、ＥＲストレス条件下で細胞を死滅から保護する（図３８、左図）ことを示した。

【０１９９】

酸化環境に向けてＥＲをシフトする薬剤がＥＲストレスに対する保護を付与することができるという知見に基づき、ハイスループット手法を使用する、還元型ＥＲの新規の小分子抑制剤を同定するための新たなスクリーニングアッセイを開発することができる。１２８０種の化合物ライブラリー（ＭｉｃｒｏＳｏｕｒｃｅ）、１，０４０種の米国医薬品および２４０種の国際医薬品コレクション（図３９）のパイロットスクリーニングを実施した。この実験において、ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰを安定的に発現するＩＮＳ－１　８３２／１３細胞は、ブラックオプティカル９６ウェルプレートに播種した（２０，０００個／ウェル）。２４時間後、各化合物の２μＬを、ＴｅＭｏ液体処理ロボットを用いて添加した。さらに２４時間後、細胞を２時間、０．２ｍＭのＤＴＴ、強力還元剤で刺激し、次いで、ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比を計算した。未処理細胞の平均比は０．０３７（Ｓ．Ｄ．＝０．００３）であり、ＤＴＴ処理細胞の平均比は０．０６９（Ｓ．Ｄ．＝０．００６）であった。陽性化合物は０．０５未満のＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比を維持することができるというものであった。この基準を用いて、２０種の陽性化合物をスクリーニングで同定した。

【０２００】

第２のスクリーニングは、ＥＲストレスを誘発する２０ｍＭグルコースと組み合わせた０．４ｍＭパルミチン酸塩を使用して行った。両スクリーニング間で、９種の一般的な陽

性化合物が同定され、そのうちの５種は自己蛍光により除かれた。偽陽性をさらに除去するため、ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰを安定的に発現するＩＮＳ－１　８３２／１３細胞を、残りの４種の一般化合物で前処理し、２４時間、０．５ｍＭパルミチン酸塩で刺激し、ＦＡＣＳを使用してＭＥＲＯＳ－ＧＦＰ比を測定した。この追加ステップにより、２つの化合物が偽陽性として除かれた。残りの２つの化合物は、臨床で使用されている薬剤のアポモルヒネとグリセオフルビンであった。グリセオフルビンはスクリーニングアッセイで陽性として同定されたが、ＩＮＳ－１　８３２／１３細胞において強い毒作用を有していた。

【実施例６】

【０２０１】

アポモルヒネは、酸化環境に向けてＥＲをシフトし、ＥＲストレスに対する保護を付与する

さらなる実験を行って、アポモルヒネが還元環境から酸化環境へＥＲをシフトすることができることを確認した。これらの実験において、ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰを発現するＩＮＳ－１　８３２／１３細胞をアポモルヒネで２４時間処理し、次いで、２４時間パルミチン酸塩で刺激した。データからは、アポモルヒネ処理が還元型ＥＲの細胞の集団を減少したことが明らかである（図４０）。パルミチン酸塩で処理したＩＮＳ－１　８３２／１３細胞における細胞生存率とミトコンドリア膜ポテンシャルは、ヨウ化プロピジウム（ＰＩ）およびＭｉｔｏＰｒｏｂｅ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）染色をそれぞれ使用して測定した。アポモルヒネは、ミトコンドリア膜ポテンシャルの低い細胞の集団を減少し（図４１）、ＥＲストレス由来細胞死を抑制した（図４２）。さらにアポモルヒネは、強力ＥＲストレス誘発剤のタプシガルギンによって誘発されたＥＲストレス介在性細胞死からＩＮＳ－１　８３２／１３細胞を保護した（図４３）。総体として、これらのデータは、アポモルヒネが酸化環境に向けてＥＲをシフトし、ＥＲストレスに対する保護を付与することを示す。

【実施例７】

【０２０２】

酸化環境に向けてＥＲをシフトする小分子は、ＥＲストレスの細胞モデルの病変を軽減することができる

上記のデータからは、アポモルヒネおよびピオグリタゾンが、酸化環境に向けてＥＲをシフトし、ＥＲストレスに対する保護を付与する能力を有していることは明らかである。さらなる実験を行って、アポモルヒネとピオグリタゾンがＥＲストレス介在性細胞死からヒト膵島を保護することができるか否かを決定した。データは、アポモルヒネとピオグリタゾンの両方がタプシガルギン介在性細胞死からヒト膵島を保護できたことを示す（図４４、左図）。

【０２０３】

ＩＮＳ－１　８３２／１３由来のドキシサイクリン誘発性ＷＦＳ１ノックダウン細胞、ウルフラム症候群の細胞モデルを使用してさらなる実験を行った。このモデルを使用して、アポモルヒネとピオグリタゾンが細胞死を防止できるか否かを試験した。以前に報告されているように、ｓｈＲＮＡ介在性ＷＦＳ１ノックダウンは、カスパーゼ－３の切断を伴って、細胞死をもたらした（Riggs et al., Diabetologia 48:2313-2321, 2005）。このモデルにおいて、アポモルヒネとピオグリタゾンは両方とも、カスパーゼ３の切断、およびカスパーゼ３の基質、ポリ（ＡＤＰ）－リボシル化酵素（ＰＡＲＰ）の切断を抑制し、ＷＦＳ１－ノックダウンβ細胞を細胞死から保護することができた（図４４、右図）。まとめると、これらのデータからは、酸化環境に向けてＥＲをシフトする小分子がＥＲ疾患の細胞モデルの病態を緩和することができることが明らかである。

【実施例８】

【０２０４】

可溶性ＭＡＮＦは、ＥＲストレスおよびＥＲストレス由来アポトーシス細胞死から膵臓β細胞を保護する

可溶性ＭＡＮＦが、小胞体ストレス誘発剤に暴露した際に、膵臓β細胞の小胞体におけ

る酸化還元環境の変動を防止することができるか否かを決定するため、さらなる実験を行った。実験は、ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰを発現するレンチウイルスベクターでトランスフェクトしたＩＮＳ－１　８３２／１３細胞（膵臓β細胞株）を用いて行った。細胞は１１ｍＭまたは２５ｍＭのグルコース中で培養し、未処理のままとするか、０．５μｇ／ｍＬの可溶性ＭＡＮＦで処理した。次いで、トランスフェクト細胞中の還元型ＥｒｏＧＦＰ由来の蛍光性発光を特異的に検出することができる、４６０～４９５ｎｍの間の励起スペクトルと５２０～５７０ｎｍの間の発光スペクトル（ＦＩＴＣ－Ａ光学フィルター）を用いてＦＡＣＳ分析により細胞を分析した。データからは、可溶性ＭＡＮＦ処理によって、検出可能なレベルの還元型ＭＥＲＯＳ－ＧＦＰを含有する細胞数が減少したことが明らかである（図４５；右下図対左下図）。上記のデータと一致して、これらのデータは、可溶性ＭＡＮＦで膵臓β細胞を処理すると、酸化環境に向けてＥＲをシフトすることができ、しかも、対象の膵臓β細胞障害の処置またはその進行の防止に使用することができることを示す。

【０２０５】

別の実施形態

本発明をその詳細な説明と併せて説明してきたが、前述の説明は例示であり、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲を限定するものではないことを理解されたい。他の態様、利点、および変更は、以下の特許請求の範囲内にある。

【図１】

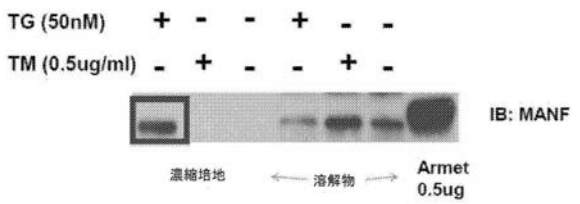


Figure 1

【図２】

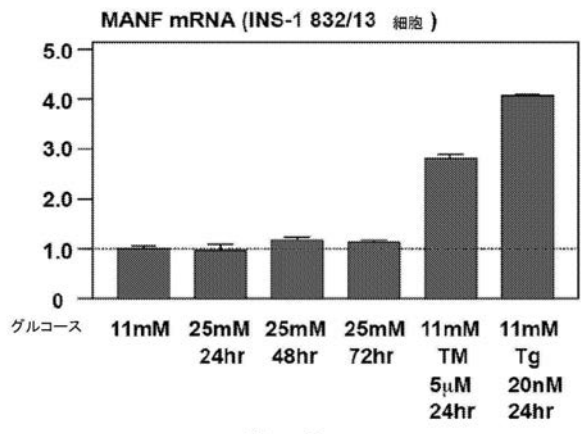


Figure 2

【図３】

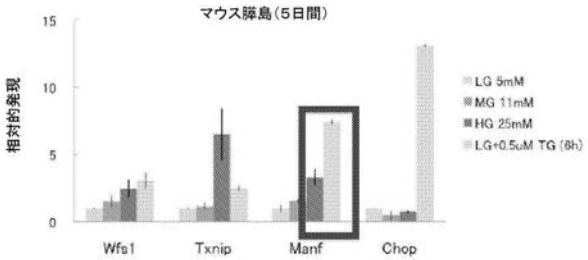


Figure 3

【図４】

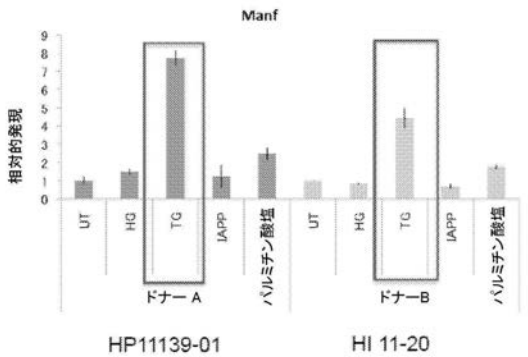


Figure 4

【図５】

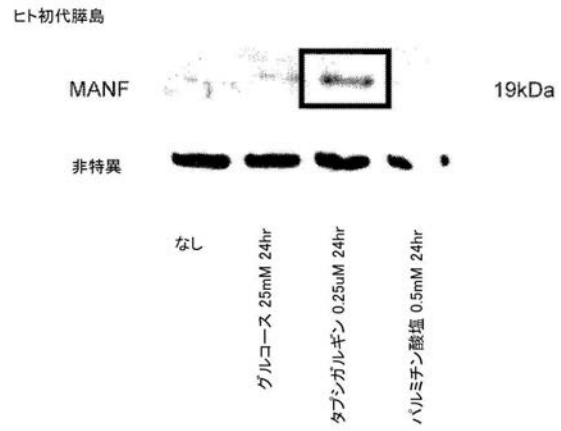


Figure 5

【図６】

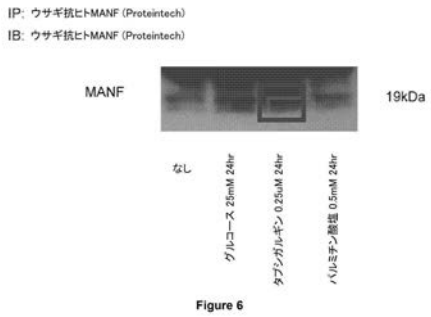


Figure 6

【図７】

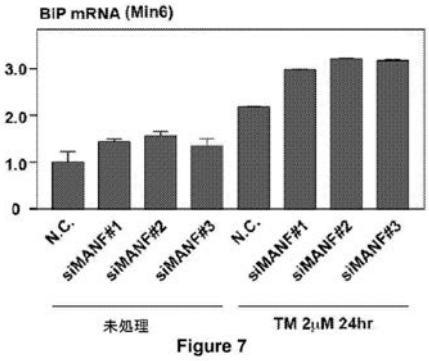


Figure 7

【図８】

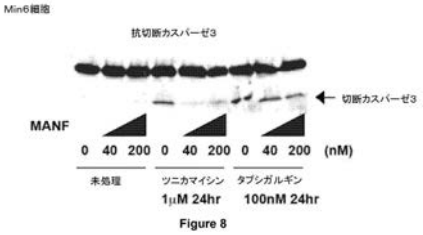


Figure 8

【図９】

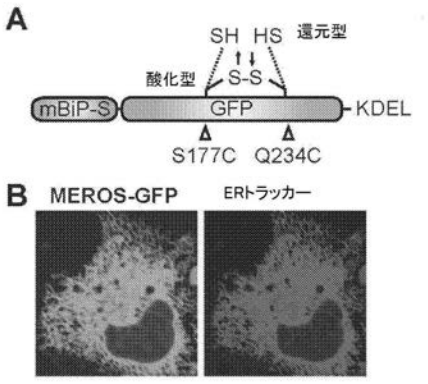


Figure 9

【図１０】

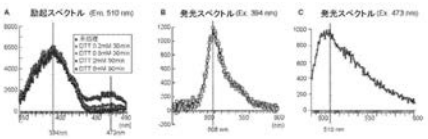


Figure 10

【図１１】

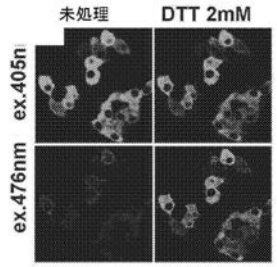


Figure 11

【図１２】

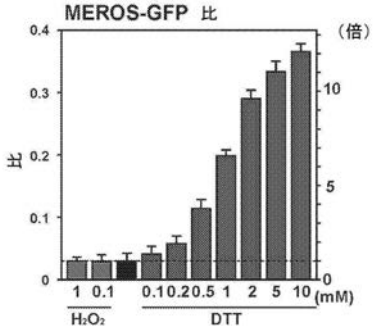


Figure 12

【図１３】

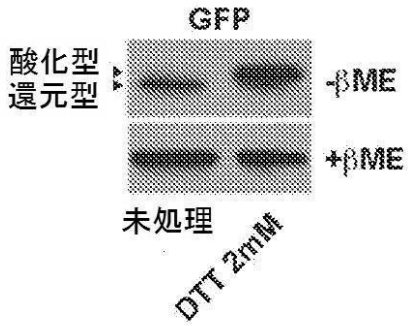


Figure 13

【図１４】

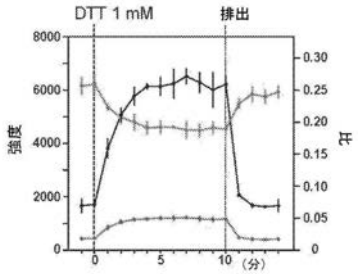


Figure 14

【図１５】

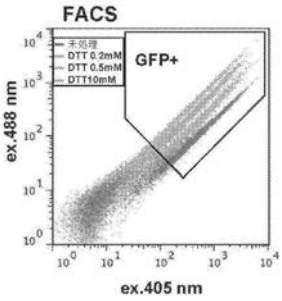


Figure 15

【図１６】

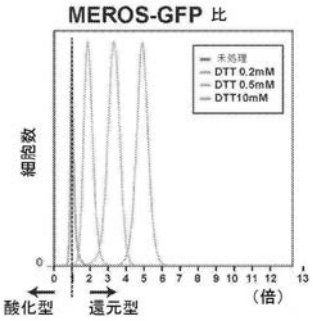


Figure 16

【図１７】

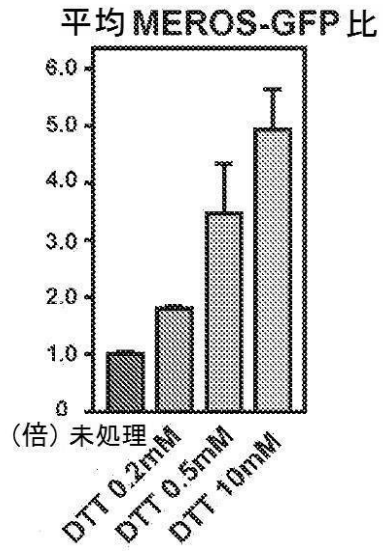


Figure 17

【図１８】

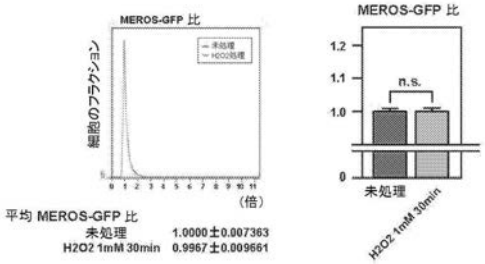


Figure 18

【図１９】

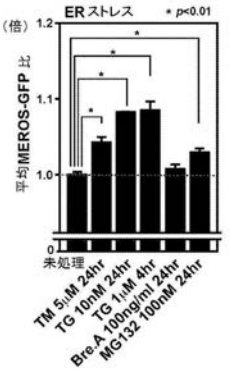


Figure 19

【図２０】

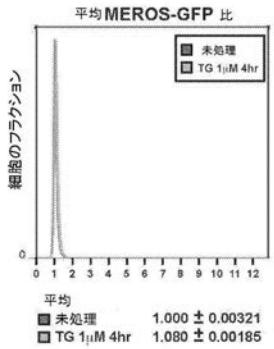


Figure 20

【図２１】

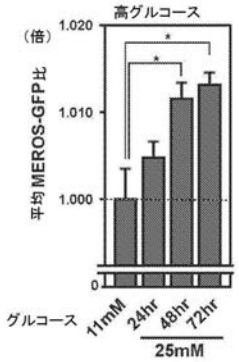


Figure 21

【図２２】

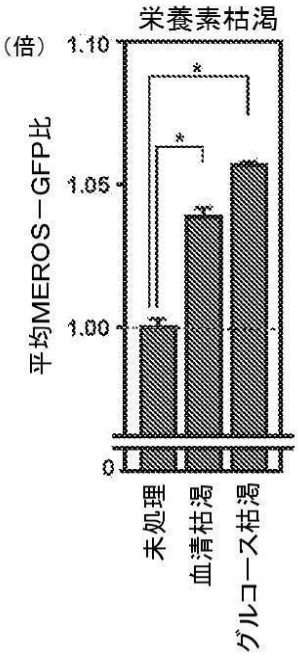


Figure 22

【図２３】

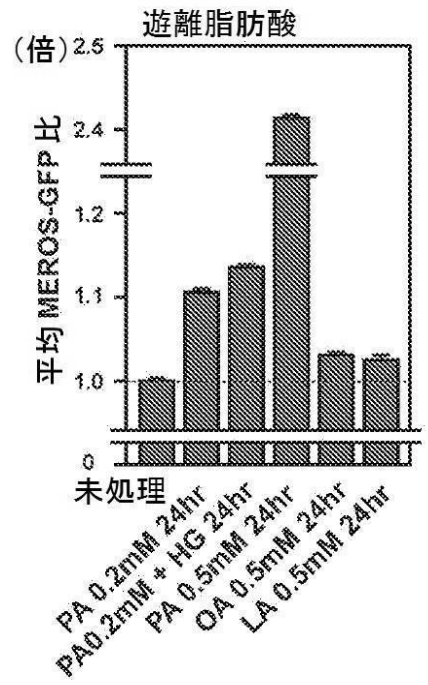


Figure 23

【図２４】

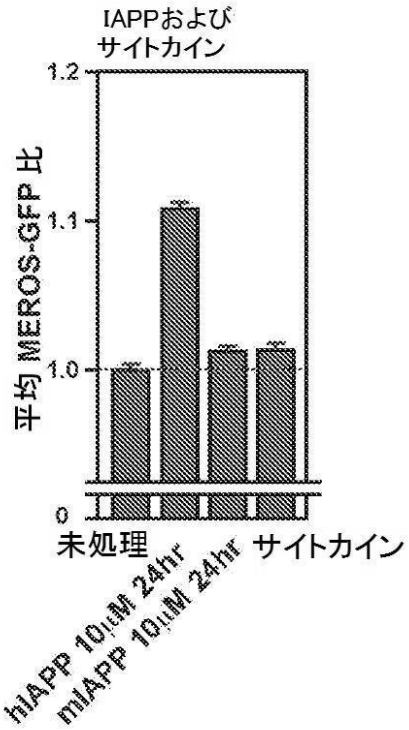


Figure 24

【図２５】

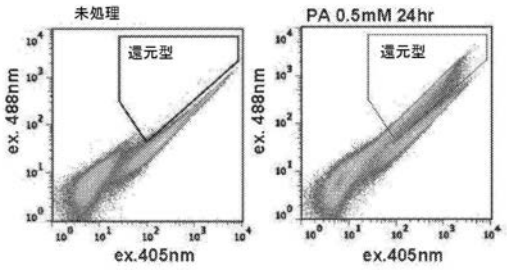


Figure 25

【図２６】

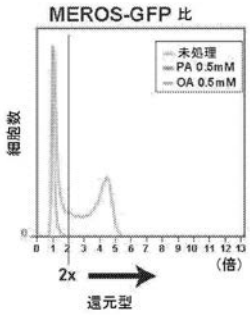


Figure 26

【図２７】

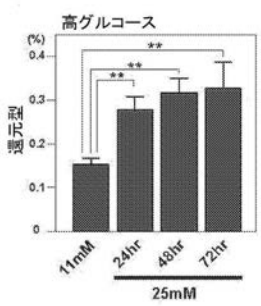


Figure 27

【図２８】

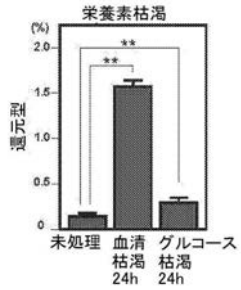


Figure 28

【図２９】

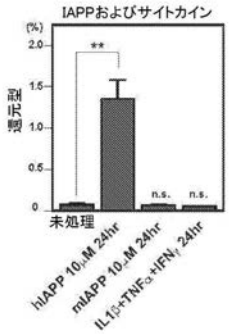


Figure 29

【図３０】

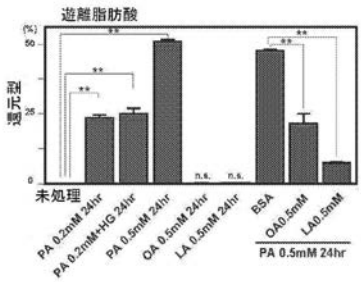


Figure 30

【図３１】

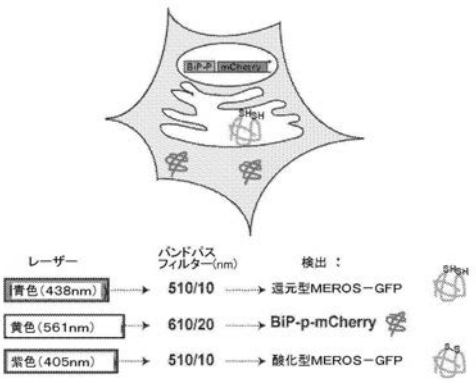


Figure 31

【図３２】

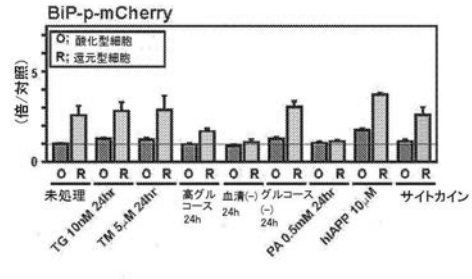


Figure 32

【図３３】

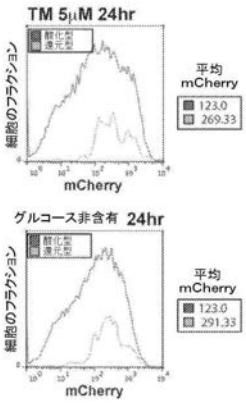


Figure 33

【図３４】

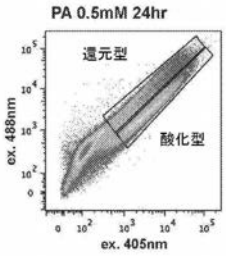


Figure 34

【図３５】

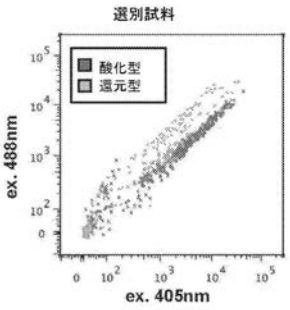


Figure 35

【図３６】

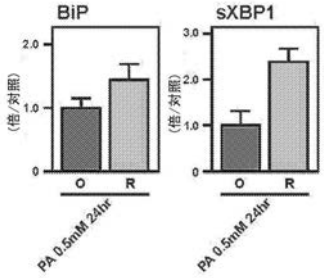


Figure 36

【図３７】

DNAマイクロアレイ

遺伝子	還元型平均 (log2)	酸化型平均 (log2)	差(還元型-酸化型) (log2)	p値
Derlin3	8.92297307	8.43722219	0.48575088	0.0002205
BiP	13.6816986	13.5347029	0.14699569	0.02232816
Herp	10.9968276	10.6206649	0.37616266	0.00079626
PDIa5	7.68002865	7.49100064	0.18902801	0.00776143

Figure 37

【図３８】

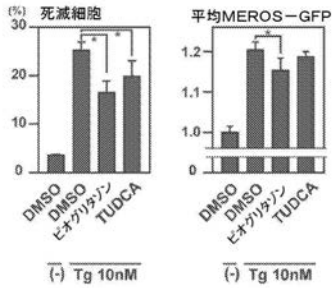


Figure 38

【図３９】

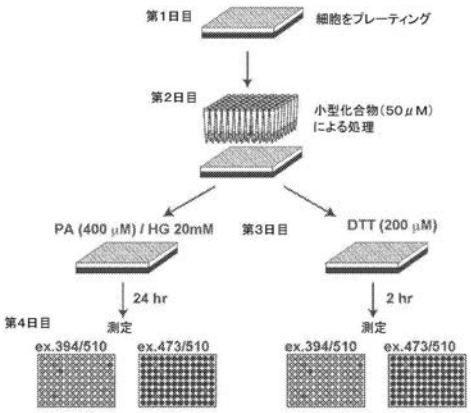


Figure 39

【図４０】

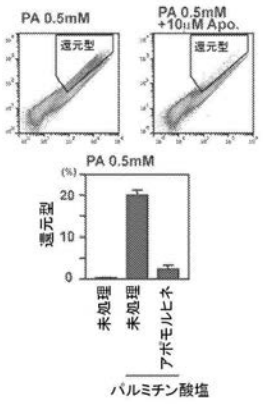


Figure 40

【図４１】

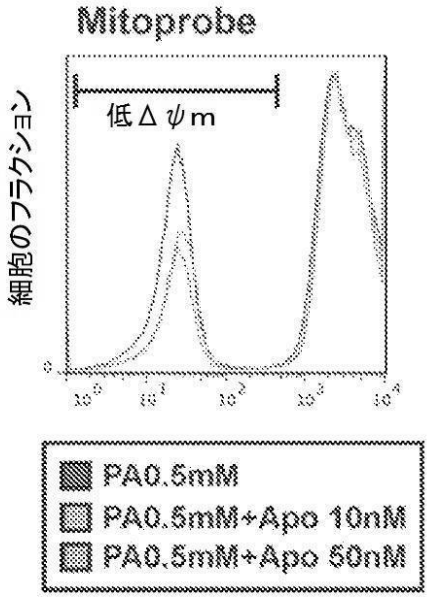


Figure 41

【図４２】

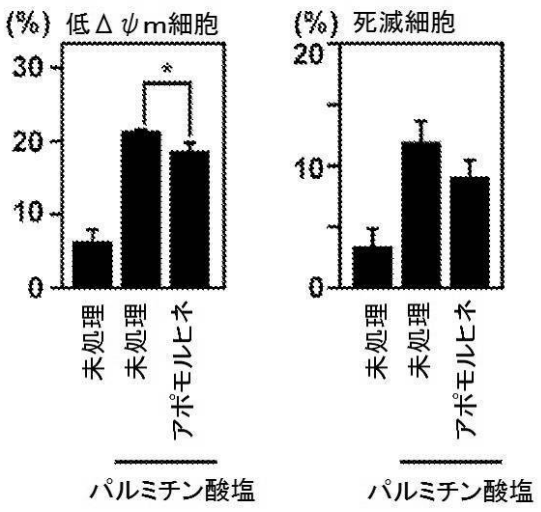


Figure 42

【図４３】

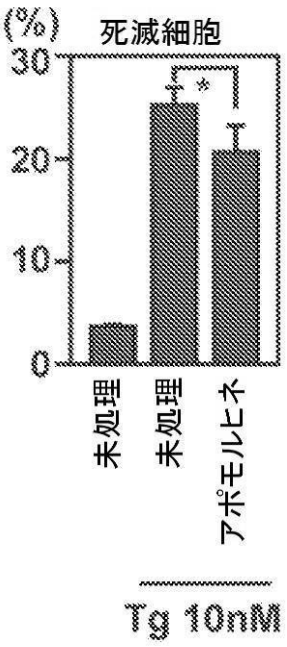


Figure 43

【図４４】

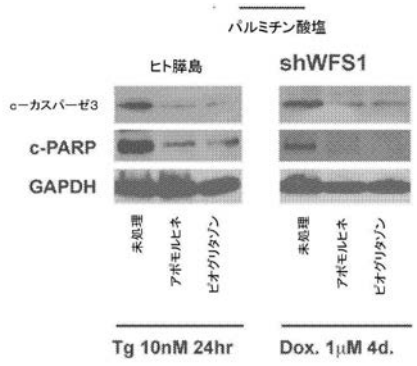


Figure 44

【図４５】

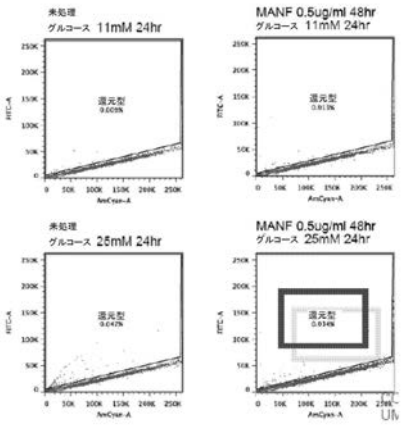


Figure 45

【配列表】
2017186342000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成29年5月24日(2017.5.24)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
対象の膵臓β細胞障害を治療するかその発症を遅延させるために用いられる組成物であって、
配列番号２に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％同一である配列を含む可溶性中脳星状細胞由来神経栄養因子（ＭＡＮＦ）の有効量を含むものである、
前記組成物。
【請求項２】
前記可溶性ＭＡＮＦが、配列番号２に示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％同一である配列を含むものである、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
前記可溶性ＭＡＮＦが、配列番号２に示されるアミノ酸配列と少なくとも９５％同一である配列を含むものである、請求項１に記載の組成物。
【請求項４】
前記可溶性ＭＡＮＦが、配列番号２に示されるアミノ酸配列と１００％同一である配列を含むものである、請求項１に記載の組成物。

【請求項５】
前記膵臓β細胞障害が、１型糖尿病、２型糖尿病およびウルフラム症候群からなる群から選択されるものである、請求項１～４のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項６】
前記膵臓β細胞障害の処置は、対象の血糖レベルの減少、対象の糖化ヘモグロビンのレベルの減少、対象のインスリン産生の喪失割合の減少、対象の膵臓β細胞量の喪失割合の減少のうちの１種以上をもたらすものである、請求項１～５のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項７】
前記組成物は、経口投与、静脈内投与、動脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、頭蓋内投与、または脳脊髄液への注射によって投与されるものである、請求項１～６のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項８】
固体として、または生理学上許容できる液状担体として処方されるものである、請求項１～７のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項９】
前記組成物は、可溶性ＭＡＮＦの生物活性を有するものである、請求項１～８のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項１０】
前記可溶性ＭＡＮＦの生物活性は、対象の膵臓β細胞障害を処置するかその発症を遅延させる能力、膵臓β細胞における小胞体ストレスを減少させる能力、または、２個以上の膵臓β細胞の集団における小胞体ストレス由来アポトーシス細胞死を減少させるか遅延させる能力である、請求項９に記載の組成物。
【請求項１１】
対象の、１型糖尿病、２型糖尿病およびウルフラム症候群からなる群から選択される膵臓β細胞障害を発症するリスクを決定する、インビトロにおける方法であって、
（ａ）生体試料中の可溶性中脳星状細胞由来神経栄養因子（ＭＡＮＦ）のレベルを分析すること、
（ｂ）生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルと可溶性ＭＡＮＦの基準レベルとを比較すること、および
（ｃ）膵臓β細胞障害を発症するリスクを決定すること（ここで、前記生体試料中の可溶性ＭＡＮＦのレベルが前記基準レベルと比較して増加した場合、前記対象は膵臓β細胞障害を発症するリスクがあると決定する。）
を含む、前記方法。
【請求項１２】
前記基準レベルは、対照対象または対象群における可溶性ＭＡＮＦのレベルである、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記可溶性ＭＡＮＦのレベルの分析は、可溶性ＭＡＮＦに特異的に結合する抗体を用いて行う、請求項１１または１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記可溶性ＭＡＮＦのレベルの分析は、酵素免疫吸着測定法を用いて行う、請求項１１～１３のいずれか１項に記載の方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*3/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/10	
Ａ６１Ｋ	*9/08*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/08	
Ａ６１Ｋ	*9/14*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/14	
Ａ６１Ｋ	*9/20*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/20	
Ａ６１Ｋ	*9/48*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/48	

(72)発明者　浦野　文彦
アメリカ合衆国　６３１２４　ミズーリ州，セイント　ルイス，リオ　ビスタ　ドライブ　１３
(72)発明者　金蔵　孝介
アメリカ合衆国　６３１４４　ミズーリ州，ブレントウッド，レンウッド　レーン　９１９７

Ｆターム(参考) 2G045 AA25 DA36 FB03
4C076 AA11 AA29 AA36 AA53 BB01 BB11 BB13 BB14 BB15 BB16
CC16 CC30
4C084 AA01 AA02 AA03 BA01 BA22 BA23 DB58 DB59 MA16 MA34
MA52 MA66 NA14 ZA661 ZB211 ZC351

【外国語明細書】
2017186342000001.pdf