(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2012-508585
(P2012-508585A)
(43)公表日　平成24年4月12日(2012.4.12)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	102	4B065
A61K 48/00	(2006.01)	A61K	48/00		4C076
A61K 31/7088	(2006.01)	A61K	31/7088		4C084
A61K 9/127	(2006.01)	A61K	9/127		4C086

審査請求 有　予備審査請求 未請求　（全 47 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2011-536538 (P2011-536538)
(86)(22)出願日　平成21年11月13日 (2009.11.13)
(85)翻訳文提出日　平成23年7月4日 (2011.7.4)
(86)国際出願番号　PCT/US2009/064467
(87)国際公開番号　WO2010/057045
(87)国際公開日　平成22年5月20日 (2010.5.20)
(31)優先権主張番号　61/114,407
(32)優先日　平成20年11月13日 (2008.11.13)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　509004712
ベイラー　リサーチ　インスティテュート
ＢＡＹＬＯＲ　ＲＥＳＥＡＲＣＨ　ＩＮＳＴＩＴＵＴＥ
アメリカ国　テキサス７５２０４　ダラス　スイート５０１　ライブオークストリート３３１０
(74)代理人　100107984
弁理士　廣田　雅紀
(72)発明者　グレイバーン　ポール　エイ.
アメリカ国　テキサス７５２１４　ダラス　ローザーウッドコート２７１０
(72)発明者　チェン　シュユアン
アメリカ国　テキサス７５００２　アレン　ストリームスウェイ１５１８
最終頁に続く

(54)【発明の名称】インビボにおいて送達される膵島転写因子遺伝子による膵島の再生及び糖尿病の回復

(57)【要約】
本発明は、膵臓内での超音波標的マイクロバブル破壊によってグルコース応答性細胞を再生するための組成物及び方法であって、前記組成物は、マイクロバブル内及びマイクロバブル周囲でマイクロバブルと接触する予め構築されたリポソーム－核酸複合体を含み、前記予め構築されたリポソーム－核酸複合体は、プロモーターの制御下のＮｅｕｒｏＤ遺伝子を含み、膵臓内の標的部位においてマイクロバブルが破壊することにより膵臓細胞内の超音波破壊位置に核酸が送達され、前記核酸を組み込んだ細胞が高血糖レベルに応答してインスリンを発現する、組成物及び方法を含む。

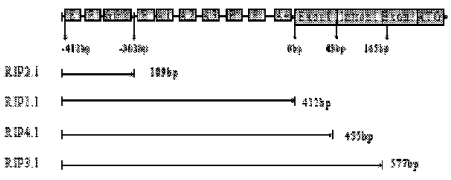


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
膵臓内での超音波標的マイクロバブル破壊のための組成物であって、
予め構築されたリポソーム－核酸マイクロバブル複合体を含み、前記予め構築されたリポソーム－核酸複合体が、インスリン遺伝子の５’非翻訳領域、エクソン１、イントロン１及びエクソン２を含むインスリンプロモーターのゲノム断片を含むインスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子を含む、前記インスリンプロモーターの制御下のＮｅｕｒｏＤ遺伝子を含み、膵臓内の標的部位において前記マイクロバブルが破壊することにより膵臓細胞内の超音波破壊位置に前記核酸が送達され、前記核酸を組み込んだ細胞が高血糖レベルに応答してインスリンを発現する組成物。
【請求項２】
ＮｅｕｒｏＤ遺伝子から上流のインスリン開始部位の上流の領域の連続する５０塩基を含む調節可能なインスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子をさらに含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
ｎｇｎ３、ＧＬＰ１、ＰＤＸ１、Ｍａｆａ、ベータセルリン、Ｎｋｘ２．２、Ｎｋｘ６．１、ＰＡＸ４、Ｉｓｌ１、サイクリンＤ２（及びサイクリンファミリーの他のメンバー）、ＣＤＫ４（及びサイクリン依存性キナーゼファミリーの他のメンバー）、及びサイクリン依存性キナーゼ阻害因子（例えばｐ１６及びＩＮＫ４ファミリーの他のメンバー又はｐ２７及びＣＩＰ／ＫＩＰファミリーの他のメンバー）に対するｓｉＲＮＡから選択される、インスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子から選択される１又は２以上の遺伝子をさらに含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項４】
組成物と同時投与される、抗アポトーシス剤、抗炎症剤、ＪＮＫ阻害剤、ＧＬＰ－１、タクロリムス、シロリムス、アナキンラ、Ｄｅｒｖｉｎポリアミド又はそれらの組合せから選択される薬剤をさらに含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項５】
膵臓内での超音波標的マイクロバブル破壊を用いて膵臓ベータ細胞を再生するための組成物であって、
ＮｅｕｒｏＤを含むマイクロバブルを含み、前記マイクロバブルが、膵臓内での超音波破壊によって前記ＮｅｕｒｏＤを放出する脂質を含む組成物。
【請求項６】
ＮｅｕｒｏＤが組換えＮｅｕｒｏＤである、請求項５に記載の組成物。
【請求項７】
ＮｅｕｒｏＤが、ＣＵＢＩ、ＲＩＰ２．１、ＲＩＰ３．１又はＨＩＰ３．１プロモーターの制御下のＮｅｕｒｏＤ遺伝子を含み、前記ＮｅｕｒｏＤが、超音波標的マイクロバブル破壊による発現を標的とされている細胞中で発現する、請求項５に記載の組成物。
【請求項８】
糖尿病患者においてインビボ及びインサイチュでインスリン応答性細胞を再生する方法であって、
有効量のＮｅｕｒｏＤを膵臓に送達するステップを含み、膵臓内の細胞が、血液中の高グルコースレベルに応答して前記細胞にインスリンを分泌させる方法。
【請求項９】
膵臓細胞内の有効量のＮｅｕｒｏＤが、ＮｅｕｒｏＤ遺伝子を発現する外因性核酸セグメントを送達することを含む、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
ＮｅｕｒｏＤが、超音波標的マイクロバブル破壊により膵臓に送達される、請求項８に記載の方法。

【請求項１１】
膵臓細胞内の有効量のＮｅｕｒｏＤが、ＣＵＢＩ、ＲＩＰ２．１、ＲＩＰ３．１又はＨＩＰ３．１プロモーターの制御下でＮｅｕｒｏＤ遺伝子を発現する外因性核酸セグメントを送達することを含む、請求項８に記載の方法。
【請求項１２】
ＣＵＢＩ、ＲＩＰ２．１、ＲＩＰ３．１又はＨＩＰ３．１プロモーターから選択されるインスリン応答性プロモーターの制御下のＮｅｕｒｏＤ遺伝子を含む核酸セグメントを作製するステップと、
前記核酸セグメントをマイクロバブルに導入するステップと、
患者に前記マイクロバブルを注入するステップと、
前記核酸セグメントを膵臓細胞内に送達するステップと、
インスリン応答性調節遺伝子を発現するのに有効な条件下に標的細胞を維持するステップとを含む、標的細胞をインスリン応答性にする方法であって、
前記標的細胞内での前記ＮｅｕｒｏＤの発現により前記細胞が高血糖に応答する方法。
【請求項１３】
プロモーターの制御下の、ＰＤＸ１、Ｎｋｘ２．２、Ｎｋｘ６．１、ＰＡＸ４、ＭａｆＡ、ｎｇｎ３、ＧＬＰ１、サイクリンＤ２、ＣＤＫ４及びそれらの組合せから選択される１又は２以上の遺伝子をさらに含む、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
組成物と同時投与される、抗アポトーシス剤、抗炎症剤、ＪＮＫ阻害剤、ＧＬＰ－１、タクロリムス、シロリムス、アナキンラ、Ｄｅｒｖｉｎポリアミド又はそれらの組合せから選択される薬剤をさらに含む、請求項１２に記載の方法。
【請求項１５】
マイクロバブルが、予め構築されたリポソーム－核酸複合体リポソームを含む、請求項１２に記載の方法。
【請求項１６】
マイクロバブルが、プラスミドと混合された、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルコリン及び１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルエタノールアミングリセロールを含む予め構築されたリポソーム－核酸複合体リポソームを含む、請求項１２に記載の方法。
【請求項１７】
インスリン遺伝子の５’非翻訳領域、エクソン１、イントロン１、及びエクソン２を含むインスリンプロモーターのゲノム断片を含む高発現インスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子を含む単離された核酸セグメントを取得するステップと、
前記核酸セグメントを標的細胞内に移入するステップと、
前記インスリン応答性調節遺伝子を発現するのに有効な条件下に前記標的細胞を維持するステップとを含むインスリン応答性を回復させる方法であって、
前記標的細胞内での前記インスリン応答性調節遺伝子の発現により前記細胞が高血糖に応答する方法。
【請求項１８】
インスリン応答性細胞が動物内にある、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
インスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子が、ウイルス又はプラスミドベクター内にある、請求項１７に記載の方法。
【請求項２０】
インスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子が、ＮｅｕｒｏＤ、ｎｇｎ３、ＧＬＰ１、ＰＤＸ１、Ｍａｆａ、ベータセルリン、Ｎｋｘ２．２、Ｎｋｘ６．１、ＰＡＸ４、Ｉｓｌ１、サイクリンＤ２（及びサイクリンファミリーの他のメンバー）、ＣＤＫ４（及びサイクリン依存性キナーゼファミリーの他

のメンバー）、及びサイクリン依存性キナーゼ阻害因子（例えばｐ１６及びＩＮＫ４ファミリーの他のメンバー又はｐ２７及びＣＩＰ／ＫＩＰファミリーの他のメンバー）に対するｓｉＲＮＡから選択される、請求項１７に記載の方法。

【請求項２１】

インスリン遺伝子の５’非翻訳領域、エクソン１、イントロン１、及びエクソン２を含むインスリンプロモーターのゲノム断片を含むインスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子を含む単離された核酸セグメントを取得するステップと、

前記核酸セグメントを膵臓細胞内に移入するステップと、

前記インスリン応答性調節遺伝子を発現するのに有効な条件下に標的細胞を維持するステップとを含むインスリン応答性を回復させる方法であって、

前記標的細胞内での前記インスリン応答性調節遺伝子の発現により前記細胞が高血糖に応答する方法。

【請求項２２】

インスリンプロモーター領域が、転写開始部位の上流の領域に配列番号１の連続する１００～５００塩基を含む、請求項２１に記載の方法。

【請求項２３】

インスリンプロモーター領域が、配列番号１における転写開始部位の上流の全領域を含む、請求項２１に記載の方法。

【請求項２４】

インスリンプロモーター領域が、配列番号２における転写開始部位の上流の全領域を含む、請求項２１に記載の方法。

【請求項２５】

１又は２以上のインスリン応答性遺伝子から上流のインスリン遺伝子の５’非翻訳領域、エクソン１、イントロン１及びエクソン２を含むインスリンプロモーターのゲノム断片を含むインスリンプロモーター領域を含む単離された核酸。

【請求項２６】

マイクロバブルと接触する予め構築されたリポソーム－核酸複合体を含む膵臓内での超音波標的マイクロバブル破壊のための組成物であって、

前記予め構築されたリポソーム－核酸複合体が、インスリン遺伝子の５’非翻訳領域、エクソン１、イントロン１及びエクソン２を含むインスリンプロモーターのゲノム断片を含む、高発現の調節可能なインスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子を含み、膵臓内での標的部位において前記マイクロバブルが超音波で破壊することにより膵臓細胞内の超音波破壊位置に前記核酸が送達される組成物。

【請求項２７】

予め構築されたリポソーム－核酸複合体が、カチオン性脂質、アニオン性脂質又はそれらの混合物及び組合せを含む、請求項２６に記載の組成物。

【請求項２８】

マイクロバブルが、薬学的に許容される媒体内に配置される、請求項２６に記載の組成物。

【請求項２９】

活性作用因子である核酸が、インスリン遺伝子を含む、請求項２６に記載の組成物。

【請求項３０】

活性作用因子である核酸が、プロモーターの制御下のヘキソキナーゼ遺伝子を含む核酸ベクターを含む、請求項２６に記載の組成物。

【請求項３１】

活性作用因子である核酸が、プロモーターの制御下のＮｅｕｒｏＤ遺伝子を含む核酸ベクターを含む、請求項２６に記載の組成物。

【請求項３２】

予め構築されたリポソーム－核酸複合体リポソームが、プラスミドと混合された、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルコリン及び１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルエタノールアミングリセロールを含む、請求項２６に記載の組成物。

【請求項３３】

コーティングをさらに含む、請求項２６に記載の組成物。

【請求項３４】

ＮｅｕｒｏＤ、ｎｇｎ３、ＧＬＰ１、ＰＤＸ１、Ｍａｆａ、ベータセルリン、Ｎｋｘ２．２、Ｎｋｘ６．１、ＰＡＸ４、Ｉｓｌ１、サイクリンＤ２（及びサイクリンファミリーの他のメンバー）、ＣＤＫ４（及びサイクリン依存性キナーゼファミリーの他のメンバー）、及びサイクリン依存性キナーゼ阻害因子（例えばｐ１６及びＩＮＫ４ファミリーの他のメンバー又はｐ２７及びＣＩＰ／ＫＩＰファミリーの他のメンバー）に対するｓｉＲＮＡから選択される、インスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子をさらに含む、請求項２６に記載の組成物。

【請求項３５】

インスリン遺伝子の５’非翻訳領域、エクソン１、イントロン１及びエクソン２を含むインスリンプロモーターのゲノム断片を含むインスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子を含む、プロモーターの制御下のヘキソキナーゼ遺伝子を含むベクター。

【請求項３６】

ヘキソキナーゼ遺伝子が、プロモーターの制御下のＮｅｕｒｏＤ遺伝子を含む核酸ベクターを含む、請求項３５に記載のベクター。

【請求項３７】

ヘキソキナーゼ遺伝子が、プロモーターの制御下のＧＬＰ－１（７～３７）遺伝子を含む核酸ベクターを含む、請求項３５に記載のベクター。

【請求項３８】

ヘキソキナーゼ遺伝子が、プロモーターの制御下のサイクリンＤ２遺伝子を含む核酸ベクターを含む、請求項３５に記載のベクター。

【請求項３９】

予め構築されたリポソーム－核酸複合体リポソームが、プラスミドと混合された、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルコリン及び１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルエタノールアミングリセロールを含む、請求項３５に記載のベクター。

【請求項４０】

ＮｅｕｒｏＤ、ｎｇｎ３、ＧＬＰ１、ＰＤＸ１、Ｍａｆａ、ベータセルリン、Ｎｋｘ２．２、Ｎｋｘ６．１、ＰＡＸ４、Ｉｓｌ１、サイクリンＤ２（及びサイクリンファミリーの他のメンバー）、ＣＤＫ４（及びサイクリン依存性キナーゼファミリーの他のメンバー）、及びサイクリン依存性キナーゼ阻害因子（例えばｐ１６及びＩＮＫ４ファミリーの他のメンバー又はｐ２７及びＣＩＰ／ＫＩＰファミリーの他のメンバー）に対するｓｉＲＮＡから選択される、プロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子をさらに含む、請求項３５に記載のベクター。

【請求項４１】

予め構築されたリポソーム－核酸マイクロバブル複合体を細胞内に注入するステップを含む方法によってインスリン応答性にされた細胞であって、前記予め構築されたリポソーム－核酸複合体が、インスリン遺伝子の５’非翻訳領域、エクソン１、イントロン１及びエクソン２を含むインスリンプロモーターのゲノム断片を含むインスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子を含む、インスリンプロモーターの制御下のＮｅｕｒｏＤ遺伝子を含み、膵臓内での標的部位において前記マイクロバブルが破壊することにより膵臓細胞内の超音波破壊位置に前記核酸が送達され、前記核酸を組み込んだ細胞が高血糖レベルに応答してインスリンを発現する細胞。

【請求項４２】
ＮｅｕｒｏＤ遺伝子から上流のインスリン開始部位の上流の領域の連続する５０塩基を含む調節可能なインスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子をさらに含む、請求項４１に記載の細胞。
【請求項４３】
ｎｇｎ３、ＧＬＰ１、ＰＤＸ１、Ｍａｆａ、ベータセルリン、Ｎｋｘ２．２、Ｎｋｘ６．１、ＰＡＸ４、Ｉｓｌ１、サイクリンＤ２（及びサイクリンファミリーの他のメンバー）、ＣＤＫ４（及びサイクリン依存性キナーゼファミリーの他のメンバー）、及びサイクリン依存性キナーゼ阻害因子（例えばｐ１６及びＩＮＫ４ファミリーの他のメンバー又はｐ２７及びＣＩＰ／ＫＩＰファミリーの他のメンバー）に対するｓｉＲＮＡから選択される、インスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子から選択される１又は２以上の遺伝子をさらに含む、請求項４１に記載の細胞。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、糖尿病の治療、より具体的には、グルコース応答性の細胞、すなわちインスリン産生細胞を再生するための組成物及び方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
本発明の範囲を限定することなく、糖尿病に関して本発明の背景を記載する。
【０００３】
糖尿病は、世界中でおよそ２億人の人々が罹患しており、有病率が増加してきている。糖尿病は、世界における死亡原因の第５位であると推定され、心血管疾患、慢性腎疾患、失明、及び神経障害を含む、重篤な合併症をもたらす。
【０００４】
インスリン療法を含む、糖尿病の多様な薬理学的療法があるにもかかわらず、適切な血糖の制御は困難であることが多く、その理由の一部として、これらの作用物質が、正常な膵島のグルコース調節機能を再現し得ないことが挙げられる。したがって、新規の治療戦略は、膵島の移植又はベータ細胞の再生のいずれかによって、糖尿病の主要な形態の両方に共通のベータ細胞塊の欠乏を補うことに焦点を当てている。
【０００５】
糖尿病治療の分野における有望な機会の１つは、Kojimaに発行された、膵臓の機能を向上させるための組成物についての米国特許第６，２３２，２８８号明細書により教示されている。Kojimaは、未分化膵臓細胞からインスリン産生ベータ細胞又は膵臓ポリペプチド産生Ｆ細胞への分化を促進するための、ベータセルリンタンパク質自体、又はその断片の使用を教示している。ＢＴＣタンパク質組成物は患者における耐糖能を向上させ、未分化膵臓細胞の成長を阻害した。ヒトを含む哺乳動物を治療するための方法も提供されているが、糖尿病状態の長期的な治療は、患者にベータセルリンタンパク質を静脈内投与しても成し遂げられなかった。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００６】
【特許文献１】米国特許第６，２３２，２８８号明細書
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００７】
一実施形態において、本発明は、膵臓内での超音波標的マイクロバブル破壊のための組成物及び方法であって、マイクロバブル内及びマイクロバブル周囲でマイクロバブルと接触する予め構築されたリポソーム－核酸複合体を含み、その予め構築されたリポソーム－

核酸複合体が、プロモーターの制御下のＮｅｕｒｏＤ遺伝子を含み、膵臓内の標的部位においてマイクロバブルが破壊することにより膵臓細胞内の超音波破壊位置に核酸が送達され、その核酸を組み込んだ細胞が高血糖レベルに応答してインスリンを発現する、組成物及び方法を含む。一態様において、その組成物は、ＮｅｕｒｏＤの転写開始部位の上流の領域に配列番号１の連続（contiguous）する５０塩基を含む高発現の調節可能なインスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子をさらに含む。別の態様において、その組成物は、ｎｇｎ３、ＧＬＰ１、ＰＤＸ１、Ｍａｆａ、ベータセルリン、Ｎｋｘ２．２、Ｎｋｘ６．１、ＰＡＸ４、Ｉｓｌ１、サイクリンＤ２（及びサイクリンファミリーの他のメンバー）、ＣＤＫ４（及びサイクリン依存性キナーゼファミリーの他のメンバー）、及びサイクリン依存性キナーゼ阻害因子（例えばｐ１６及びＩＮＫ４ファミリーの他のメンバー又はｐ２７及びＣＩＰ／ＫＩＰファミリーの他のメンバー）に対するｓｉＲＮＡから選択される、インスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子から選択される１又は２以上の遺伝子をさらに含む。別の態様において、その組成物は、その組成物と同時投与される薬剤をさらに含み、その薬剤は、抗アポトーシス剤、抗炎症剤、ＪＮＫ阻害剤、ＧＬＰ－１、タクロリムス、シロリムス、アナキンラ、Ｄｅｒｖｉｎポリアミド、又はそれらの組合せから選択される。

【０００８】

別の実施形態において、本発明は、膵臓においてＮｅｕｒｏＤを含むマイクロバブルの膵臓内での超音波標的マイクロバブル破壊を用いて膵臓ベータ細胞を再生するための組成物及び方法を含む。一態様において、ＮｅｕｒｏＤは組換えＮｅｕｒｏＤである。別の態様において、その組成物は、ＣＵＢＩ、ＲＩＰ２．１、ＲＩＰ３．１又はＨＩＰ３．１プロモーターの制御下のＮｅｕｒｏＤ遺伝子をさらに含み、そのＮｅｕｒｏＤは、超音波標的マイクロバブル破壊による発現を標的とされている細胞中で発現される。

【０００９】

本発明のさらに別の実施形態は、糖尿病患者においてインビボ及びインサイチュでインスリン応答性細胞を再生するための方法であって、有効量を膵臓に送達することを含み、膵臓内の細胞が、血液中の高グルコースレベルに応答して細胞にインスリンを分泌させる、方法である。一態様において、膵臓細胞内の有効量のＮｅｕｒｏＤは、ＮｅｕｒｏＤ遺伝子を発現する外因性核酸セグメントを送達することを含む。別の態様において、ＮｅｕｒｏＤは、超音波標的マイクロバブル破壊により膵臓に送達される。さらに別の態様において、膵臓細胞内の有効量のＮｅｕｒｏＤは、ＣＵＢＩ、ＲＩＰ２．１、ＲＩＰ３．１又はＨＩＰ３．１プロモーターの制御下のＮｅｕｒｏＤ遺伝子を発現する外因性核酸セグメントを送達することを含む。

【００１０】

本発明の別の実施形態は、標的細胞をインスリン応答性にする方法であって、ＣＵＢＩ、ＲＩＰ２．１、ＲＩＰ３．１又はＨＩＰ３．１プロモーターから選択されるインスリン応答性プロモーターの制御下のＮｅｕｒｏＤ遺伝子を含む核酸セグメントを作製するステップと、その核酸セグメントをマイクロバブルに導入するステップと、患者にそのマイクロバブルを注入するステップと、その核酸セグメントを膵臓細胞内に送達するステップと、インスリン応答性調節遺伝子を発現するのに有効な条件下に標的細胞を維持するステップとを含み、その標的細胞内でのＮｅｕｒｏＤの発現によりその細胞が高血糖に応答する、方法である。一態様において、その方法は、プロモーターの制御下の、ＰＤＸ１、Ｎｋｘ２．２、Ｎｋｘ６．１、ＰＡＸ４、ＭａｆＡ、ｎｇｎ３及びそれらの組合せから選択される１又は２以上の遺伝子を膵臓に送達することをさらに含む。別の態様において、その方法は、組成物と同時投与される薬剤を送達することをさらに含み、その薬剤は、抗アポトーシス剤、抗炎症剤、ＪＮＫ阻害剤、ＧＬＰ－１、タクロリムス、シロリムス、アナキンラ、Ｄｅｒｖｉｎポリアミド又はそれらの組合せから選択される。一態様において、マイクロバブルは、予め構築されたリポソーム－核酸複合体リポソームを含む。別の態様において、マイクロバブルは、プラスミドと混合された、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－

グリセロ－３－ホスファチジルコリン及び１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルエタノールアミングリセロールを含む予め構築されたリポソーム－核酸複合体リポソームを含む。

【００１１】

さらに別の実施形態において、本発明は、インスリン応答性を回復させる方法であって、インスリン遺伝子の５’非翻訳領域、エクソン１、イントロン１及びエクソン２を含むインスリンプロモーターのゲノム断片を含む高発現インスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子を含む単離された核酸セグメントを取得するステップと、その核酸セグメントを標的細胞内に移入するステップと、インスリン応答性調節遺伝子を発現するのに有効な条件下にその標的細胞を維持するステップとを含み、その標的細胞内でのインスリン応答性調節遺伝子の発現によりその細胞が高血糖に応答する、方法を含む。一態様において、インスリン応答性細胞は動物内にある。別の態様において、１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子は、ウイルス又はプラスミドベクター内にあるインスリンプロモーター領域に作動可能に連結する。別の態様において、インスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子は、ＮｅｕｒｏＤ、ｎｇｎ３、ＧＬＰ１、ＰＤＸ１、Ｍａｆａ、ベータセルリン、Ｎｋｘ２．２、Ｎｋｘ６．１、ＰＡＸ４、Ｉｓｌ１、サイクリンＤ２（及びサイクリンファミリーの他のメンバー）、ＣＤＫ４（及びサイクリン依存性キナーゼファミリーの他のメンバー）、及びサイクリン依存性キナーゼ阻害因子（例えばｐ１６及びＩＮＫ４ファミリーの他のメンバー又はｐ２７及びＣＩＰ／ＫＩＰファミリーの他のメンバー）に対するｓｉＲＮＡから選択される。

【００１２】

本発明の別の実施形態は、インスリン応答性を回復させる方法であって、インスリン遺伝子の５’非翻訳領域、エクソン１、イントロン１及びエクソン２を含むインスリンプロモーターのゲノム断片を含むインスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子を含む単離された核酸セグメントを取得するステップと、その核酸セグメントを膵臓細胞内に移入するステップと、インスリン応答性調節遺伝子を発現するのに有効な条件下に標的細胞を維持するステップとを含み、その標的細胞内でのインスリン応答性調節遺伝子の発現によりその細胞が高血糖に応答する、方法を含む。一態様において、インスリンプロモーター領域は、転写開始部位の上流の領域に配列番号１の連続する１００～５００塩基を含む。一実施形態において、インスリンプロモーター領域は、配列番号１における転写開始部位の上流の全領域、又はさらに転写開始部位の上流の領域に配列番号１の連続する１００～５００塩基を含む。別の態様は、１又は２以上のインスリン応答性遺伝子の転写開始部位の上流の領域に配列番号１の連続する５０塩基を含む高発現インスリンプロモーター領域を含む単離された核酸である。

【００１３】

別の実施形態において、本発明は、膵臓内での超音波標的マイクロバブル破壊のための組成物であって、マイクロバブルと接触する予め構築されたリポソーム－核酸複合体を含み、その予め構築されたリポソーム－核酸複合体が、インスリン遺伝子の５’非翻訳領域、エクソン１、イントロン１及びエクソン２を含むインスリンプロモーターのゲノム断片を含む高発現の調節可能なインスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子を含み、膵臓内での標的部位においてマイクロバブルが超音波で破壊することにより膵臓細胞内の超音波破壊位置に核酸が送達される、組成物である。一態様において、予め構築されたリポソーム－核酸複合体は、カチオン性脂質、アニオン性脂質又はそれらの混合物及び組合せを含む。別の態様において、マイクロバブルは、薬学的に許容される媒体内に配置される。別の態様において、活性因子である核酸は、インスリン遺伝子を含む。一態様において、活性因子である核酸は、プロモーターの制御下のヘキソキナーゼ遺伝子を含む核酸ベクターを構成する。別の態様において、活性因子である核酸は、プロモーターの制御下のＮｅｕｒｏＤ遺伝子を含む核酸ベクターを構成する。予め構築されたリポソーム－核酸複合体リポソームは、例えば、プラスミドと混合

された、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルコリン及び１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルエタノールアミングリセロールであり得る。別の態様において、組成物は、コーティングをさらに含んでもよい。別の態様において、組成物は、ＮｅｕｒｏＤ、ｎｇｎ３、ＧＬＰ１、ＰＤＸ１、Ｍａｆａ、ベータセルリン、Ｎｋｘ２．２、Ｎｋｘ６．１、ＰＡＸ４、Ｉｓｌ１、サイクリンＤ２（及びサイクリンファミリーの他のメンバー）、ＣＤＫ４（及びサイクリン依存性キナーゼファミリーの他のメンバー）及びサイクリン依存性キナーゼ阻害剤（例えばｐ１６及びＩＮＫ４ファミリーの他のメンバー又はｐ２７及びＣＩＰ／ＫＩＰファミリーの他のメンバー）に対するｓｉＲＮＡから選択される、インスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子をさらに含んでもよい。

【００１４】

予め構築されたリポソーム－核酸マイクロバブル複合体を細胞内に注入するステップを含み、その予め構築されたリポソーム－核酸複合体は、インスリン遺伝子の５’非翻訳領域、エクソン１、イントロン１及びエクソン２を含むインスリンプロモーターのゲノム断片を含むインスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子を含む、インスリンプロモーターの制御下のＮｅｕｒｏＤ遺伝子を含み、膵臓内での標的部位においてマイクロバブルが破壊することにより膵臓細胞内の超音波破壊位置に核酸が送達され、その核酸を組み込んだ細胞が高血糖レベルに応答してインスリンを発現する、方法によってインスリン応答性にされた細胞。一態様において、細胞は、ＮｅｕｒｏＤ遺伝子から上流のインスリン開始部位の上流の領域の連続する５０塩基を含む調節可能なインスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子をさらに含む。別の態様において、細胞は、ｎｇｎ３、ＧＬＰ１、ＰＤＸ１、Ｍａｆａ、ベータセルリン、Ｎｋｘ２．２、Ｎｋｘ６．１、ＰＡＸ４、ＩＳｌ１、サイクリンＤ２（及びサイクリンファミリーの他のメンバー）、ＣＤＫ４（及びサイクリン依存性キナーゼファミリーの他のメンバー）、及びサイクリン依存性キナーゼ阻害因子（例えばｐ１６及びＩＮＫ４ファミリーの他のメンバー又はｐ２７及びＣＩＰ／ＫＩＰファミリーの他のメンバー）に対するｓｉＲＮＡから選択される、インスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子から選択される１又は２以上の遺伝子をさらに含む。

【００１５】

添付の図面は、本明細書に組み込まれ、本明細書の一部を構成するものであるが、本発明をさらに例示し、発明の詳細な説明と共に本発明の原理を説明するためのものであり、当該図面において、同様の符号は個別の図を通して同一又は機能が類似した要素を指す。

【図面の簡単な説明】

【００１６】

【図１】ラットインスリンプロモーター領域並びにエクソン１、イントロン１及びエクソン２の概略図である。ラットインスリンプロモーターを既知の配列要素並びに融合エクソン１及びエクソン２と共に示す。

【図２】上図は、３つの異なるグルコース濃度下にてrips-lucをトランスフェクトしてから４８時間後のＩＮＳ－１細胞溶解物のルシフェラーゼ活性である。下図は、高グルコース濃度下のrips-lucでのトランスフェクション後の異なる培養時間における培養溶液のルシフェラーゼ活性であり、グルコースを含まない場合、及び正常なグルコース濃度においてルシフェラーゼ活性は存在しない（データは示さず）。

【図３】（３Ａ）：RIP3.1-DsRedスライド。上左：緑は抗インスリン、上中央の赤は抗ｄｓｒｅｄ、上右はそれらの共焦点画像である。下図は連続的な切片及び同様の膵島構造であり、下左：緑は抗グルカゴン、下中央：赤は抗ｄｓｒｅｄ、下右はそれらの共焦点画像である。（３Ｂ）：RIP-4.1-dsred。（３Ｃ）：RIP-1.1-dsred。（３Ｄ）：RIP-1.1-dsredスライド。（３Ｅ）：pCMV-dsred。（Ｆ）：正常な対照。

【図４】（４Ａ）：画像は１０％グルコースを与えたpRIP3.1-DsRedラットの場合である。上右の緑は抗インスリン、上中央の赤は抗ｄｓｒｅｄ、上左はそれらの共焦点画像であ

る。下右の緑は抗グルカゴン、下中央の赤は抗ｄｓｒｅｄ、下左はそれらの共焦点画像である。（４Ｂ）画像は一晩絶食させたpRIP3.1-DsRedラットの場合である。

【図５】上図。対照ラット（左）及びＵＴＭＤで処理したラット（中央は餌を与えたラット、右は絶食させたラット）由来の顕微鏡用切片（４００倍）。ｉｎ－ｓｉｔｕ　ＰＣＲを使用して、ＤｓＲｅｄプラスミドＤＮＡを染色し、そのＤｓＲｅｄプラスミドＤＮＡは処理した膵臓全体にわたって見られる。膵島は明確に見える（矢印）。下図。対照ラット（左）及びRIP6.1-DsRedを使用してＵＴＭＤで処理したラット（中央は餌を与えたラット、右は絶食させたラット）由来の切片（４００倍）。ｉｎ－ｓｉｔｕ　ＲＴ－ＰＣＲを使用して、ＤｓＲｅｄ　ｍＲＮＡを染色し、そのＤｓＲｅｄ　ｍＲＮＡは膵島中心（中央／餌を与えた）に局在する。膵島の境界で染色した（右／絶食させたラット）。

【図６】免疫蛍光顕微鏡の結果を示す。上図は、３０日の実験からの膵島の代表的な例を示す。ＦＩＴＣで標識した抗インスリン（緑）はベータ細胞を示し、一方、ＤｓＲｅｄで標識した抗グルカゴンはアルファ細胞を示す。Ｎｋｘ２．２、Ｎｋｘ６．１、Ｐａｘ４、Ｎｇｎ３、及びＭａｆＡを用いる超音波標的遺伝子治療により、アルファ細胞が優勢な膵島の形成を生じた。対照的に、ＮｅｕｒｏＤ１で処理したラットは、中央のベータ細胞が周辺のアルファ細胞により囲まれた、ほぼ正常な膵島構造を有した。下左図は、異なる群についてのスライド当たりの膵島の数を示す。正常な対照及びＮｅｕｒｏＤ１で処理したラットの両方は、全ての他の群より、スライド当たり有意に多い膵島を有した（ＡＮＯＶＡにより＊ｐ＜０．０００１）。下右図は、膵島当たりのベータ細胞の数を示す。正常な対照及びＮｅｕｒｏＤ１で処理したラットの両方は、全ての他の群より、膵島当たりのベータ細胞の有意に高い割合を有した（ＡＮＯＶＡにより＊Ｐ＜０．０００１）。

【図７】３０日の実験における血糖（右上図）、血中インスリン（右下図）、及びＣ－ペプチド（右上図）の結果を示す。３日目に、全てのＳＴＺで処理したラットは、正常な対照と比べて、著しく高い血糖並びに低いインスリン及びＣ－ペプチドを有した（ｐ＜０．０００１）。しかし、３０日までに、ＮｅｕｒｏＤ１で処理したラットのみは、血糖、インスリン、及びＣ－ペプチドを正常又はほぼ正常なレベルまで回復させた。下右図は、正常な対照（ｎ＝３）及びＤｓＲｅｄで処理したラット（ｎ＝３）と比較した、別の群の６匹のＮｅｕｒｏＤ１で処理したラット（ｎ＝６）おける耐糖能試験の結果を示す。ＳＴＺにより誘発した糖尿病の後のＮｅｕｒｏＤ１を用いる遺伝子治療により、正常な値まで耐糖能の回復が生じた。

【図８】細胞増殖のマーカーを示す。上左及び中央図は、ＦＩＣＴで標識した抗インスリン（緑）、及びＤｓＲｅｄで標識した抗ＢｒｄＵ（左）及び抗Ｋｉ６７（中央）で共染色した膵島を示す。上右図は、Ｋｉ６７陽性、インスリン陽性細胞の数を示し、正常な対照、ＳＴＺで処理した対照ラット、又はＵＴＭＤによってＤｓＲｅｄを用いて処理したＳＴＺで処理したラットにおいてより、ＮｅｕｒｏＤ１で処理したＳＴＺラットにおいて統計的に有意に高い（ｐ＜０．０００１）。下図は、抗Ｃｋ１９（左、緑）、抗インスリン（左中央、赤）、抗ｎｇｎ３（青、右中央）で染色したＮｅｕｒｏＤ１で処理したＳＴＺラット由来の膵島、及びそれらの共焦点画像（右）を示す。インスリン陽性ベータ細胞はＣｋ１９ではなく、ｎｇｎ３で共染色し、再生した膵島が導管細胞に由来しないことを示す。

【図９】ラットを様々な遺伝子及び遺伝子の組合せを用いてＵＴＭＤにより処理した実験からの代表的な膵島の画像を示す。ＤＡＰＩ（核について青染色）、抗インスリン（緑）、及び抗グルカゴン（赤）で３重染色した。組合せで処理した場合、サイクリンＤ２、ＣＤＫ４、及びＧＬＰ１（膵島は１８０日まで安定であった）。上左図は、ＵＴＭＤにより処理していない正常な対照ラットからの代表的な膵島を示す。インスリンを発現するベータ細胞の高密度の膵島中心部が、グルカゴンを発現する周辺アルファ細胞（赤）の小さな被膜によって囲まれて存在している（緑）。上右図は、ＳＴＺにより誘発された糖尿病後の代表的な膵島残部を示す。少数の拍動細胞のみが存在している。下左図は、ＧＬＰ１遺伝子を用いるＵＴＭＤ後の膵島再生の例を示す。正常より少ない膵島が、いくつかのベータ細胞（緑）及びアルファ細胞（赤）とともに存在しているが、構造は正常ではない。単

一の遺伝子、サイクリンＤ２、ＣＤＫ４、及びＣＤＫ６を使用するＵＴＭＤで処理したラットに関して、同様の研究結果が提示された（示さず）。下右図は、サイクリンＤ２、ＣＤＫ４、及びＧＬＰ１の組合せを用いるＵＴＭＤ後のほぼ正常な膵島を示す（それらの膵島は１８０日まで安定であり、正常な血糖、インスリン及びＣ－ペプチドレベルを有する糖尿病の回復を伴った）。

【図１０】ＵＴＭＤ遺伝子治療で処理したラット、並びに正常な対照、及びＵＴＭＤ処理を行わないＳＴＺ糖尿病ラットの様々な群における膵島の経時的な血糖レベルを示すプロットである。示され得るように、サイクリンＤ２、ＣＤＫ４、ＣＤＫ６、又はＧＬＰ１での単一の遺伝子治療は血糖の正常化を生じなかった。しかし、この特定の実験において、サイクリンＤ２、ＣＤＫ４、及びＧＬＰ１、又はサイクリンＤ２、ＣＤＫ４、ＣＤＫ６、及びＧＬＰ１の組合せを含む組成物は、４週間で血糖を正常なレベルまで回復させた。別の群の動物の長期間の研究により、１８０日までの効果持続期間が確認された。

【図１１】HIP-hNeuroD1プラスミドの地図である。

【図１２】RIP3.1-DsRedプラスミドの地図である。

【図１３】RIP-DsRed4.1プラスミドの地図である。

【図１４】RIP-DsRed5.1プラスミドの地図である。

【図１５】RIP-DsRed2.1プラスミドの地図である。

【発明を実施するための形態】

【００１７】

本発明の新規特徴は、以下の発明の詳細な説明を検証することで当業者に明らかになろう。しかし、発明の詳細な説明及びその後の特許請求の範囲から、本発明の趣旨及び範囲内における様々な変更及び修飾が当業者にとって自明のものとなり、したがって、発明の詳細な説明及び提示する特定の実施例が、本発明の特定の実施形態を示しているものの、例示の目的のみで提供されたものであることが理解されよう。

【００１８】

本発明は、以下の特許請求の範囲の趣旨及び範囲から逸脱することなく、本明細書に記載する教示に照らして行うことが各々可能な修飾及び変化を含み得る。本発明の使用は、異なる特徴を有する構成要素を伴い得るものである。本発明の範囲は、本明細書に添付される特許請求の範囲により定義されるものであり、それにより、全ての点における同等物が完全に認識される。

【００１９】

本明細書では、ヌクレオチドについての「配列番号（＃）で本質的に示される配列」、「に類似の配列」、「ヌクレオチド配列」という用語、及び類似の用語は、配列番号１として本明細書において同定される配列のあらゆる部分に実質的に対応する配列を指す。これらの用語は、合成分子及び天然由来の分子を指し、生物学的に、免疫学的に、実験的に、又はそれ以外の機能的に等しい活性、例えば、核酸セグメントによるハイブリダイゼーションに関する活性、又は、ＮｅｕｒｏＤの活性の全て若しくは一部をコードする能力を有する配列を含む。当然のことながら、これらの用語は、このような配列内の情報を、その線形の順序で特定されている通りに含むものである。

【００２０】

本明細書では、「遺伝子」という用語は、機能的なタンパク質、ポリペプチド、又はペプチドをコードする単位を指す。当業者には理解されるように、この機能的な用語は、ゲノム配列、ｃＤＮＡ配列、又はそれらの断片若しくは組合せと、遺伝子産物との両方を含み、これらは人の手によって改変されている可能性のあるものも含む。精製した遺伝子、核酸、タンパク質などは、それが通常関連している少なくとも１つの汚染核酸又は汚染タンパク質から同定及び分離した場合の、これらの実体を指すために用いる。

【００２１】

本明細書では、「ベクター」という用語は、ある細胞から別の細胞へＤＮＡセグメント（複数可）を移す核酸分子を指す。ベクターは、特定の配列を増殖させるために設計されたベクターとして、又は特定の配列に作動可能に連結したプロモーターを含む発現ベクタ

ーとして、又はこのようなプロモーターを導入するために設計されたベクターとして、さらに定義され得る。ベクターは、宿主細胞の染色体から独立した状態で存在し得るか、又は宿主細胞の染色体内に組み込まれ得る。

【００２２】

本明細書では、「宿主細胞」という用語は、古細菌、原核生物、又は真核生物であろうとなかろうと、核酸セグメント又は改変したセグメントを含むように操作された細胞を指す。したがって、操作された細胞又は組換え細胞は、人の手を介して組換えにより導入された遺伝子を含まない天然の細胞から区別することが可能である。

【００２３】

本明細書では、「制御配列」という用語は、特定の宿主生物における作動可能に連結したコード配列の発現に必要なＤＮＡ配列を指す。原核生物に適した制御配列には、例えばプロモーターが含まれ、オペレーター配列、リボソーム結合部位、及び転写ターミネーターが含まれていてもよい。成長阻害量より低いレベルにＦａｂ'ポリペプチドの合成を抑制し、その一方で例えば対数期の間に細胞培養物を成長及び成熟させる、高度に調節された誘導性プロモーターを用い得る。

【００２４】

本明細書では、「作動可能に連結している」という用語は、第１及び第２の核酸配列の間の機能的な関係を指す。例えば、プレ配列又は分泌リーダーのＤＮＡは、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現する場合、ポリペプチドのＤＮＡに作動可能に連結している。プロモーター若しくはエンハンサーが、コード配列の転写に作用する場合に、コード配列に作動可能に連結しているか、又は、リボソーム結合部位が、翻訳を促進するように位置している場合に、ｅコード配列に作動可能に連結している。通常、「作動可能に連結している」とは、結合対象のＤＮＡ配列が連続的であること、また分泌リーダーの場合は、連続的であり且つ同一のリーディングフレーム内にあることを意味する。エンハンサーは連続的である必要はない。結合は、適当な制限部位におけるライゲーションによって行われる。そのような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドのアダプター又はリンカーを従来の慣例に従って用いる。

【００２５】

本明細書では、「細胞」及び「細胞培養物」という用語は互換的に用いられ、このような表記の全ては後代を含む。したがって、「形質転換体」及び「形質転換細胞」という語は、初代の対象細胞と、移動の数に関係なく、それらに由来する培養物とを含む。また、全ての後代は、意図的な又は不慮の突然変異により、ＤＮＡ含量が正確には同一ではない場合があることも理解されたい。最初に形質転換した細胞においてスクリーニングされたものと同一の機能又は生物学的活性を有する突然変異の後代が含まれる。異なる表記は明らかな文脈から明らかとなろう。

【００２６】

本明細書では、「プラスミド」は、小文字ｐを大文字及び／又は数字の前及び／又は後に付けることによって表記される。市販の開始プラスミドは、無制限で公然に利用可能であるか、又は、このような利用可能なプラスミドから、公開された手順に従って構築可能である。加えて、他の同等のプラスミドが当技術分野において知られており、当業者に自明であろう。

【００２７】

本明細書では、「タンパク質」、「ポリペプチド」、又は「ペプチド」という用語は、ペプチド結合を介して結合しているアミノ酸を含む化合物を指し、互換的に用いられる。

【００２８】

本明細書では、「内因性」という用語は、供給源が細胞内に由来する物質を指す。内因性物質は細胞の代謝活性により産生される。しかし、それにもかかわらず、内因性物質は、例えば物質をコードする遺伝子を細胞に発現させるためのものといった、細胞代謝の操作の結果として産生され得る。

【００２９】

本明細書では、「外因性」という用語は、供給源が細胞外にある物質を指す。核酸について言及する場合、「外因性」は、細胞にとって外来の核酸配列、又は細胞に相同であるが、宿主細胞の核酸内の、通常はそのエレメントが見られない位置に存在している核酸配列を指す。にもかかわらず、外因性物質は、当業者に知られている様々な代謝手段又は誘導手段のいずれか１つにより、細胞に内在化し得る。

【００３０】

遺伝子のゲノム形態又はクローンは、「イントロン」又は「介在領域」又は「介在配列」と呼ばれる非コード配列が介在したコード領域を含む。イントロンは、核ＲＮＡ（ｈｎＲＮＡ）に転写される遺伝子のセグメントであり、イントロンは、エンハンサーのような調節エレメントを含み得る。イントロンは、核又は一次転写産物から除去されるか、削除されるか、又は「スプライシング」される。したがって、イントロンは、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ、messenger RNA）転写産物には存在しない。翻訳の際のｍＲＮＡの機能は、新生ポリペプチドにおけるアミノ酸の配列又は順序を特定することである。

【００３１】

イントロンを含むことに加え、遺伝子のゲノム形態は、ＲＮＡ転写産物上に存在する配列の５’末端及び３’末端の両方に位置する配列も含み得る。これらの配列は「隣接」配列又は「隣接」領域と呼ばれる（これらの隣接配列は、ｍＲＮＡ転写産物上に存在する非翻訳配列の５’又は３’に位置する）。５’隣接領域は、遺伝子の転写を制御するか又はそれに影響を与える、プロモーター及びエンハンサーのような調節配列を含み得る。３’隣接領域は、転写の終結、転写後の切断、及びポリアデニル化を指示する配列を含み得る。

【００３２】

ＤＮＡ分子は「５’末端」及び「３’末端」を有すると言われているが、それは、モノヌクレオチド同士が反応して、モノヌクレオチドの１つのペントース環の５’リン酸がその隣のペントース環の３’酸素にホスホジエステル結合を介して一方向に結合するようなオリゴヌクレオチドを形成するためである。したがって、オリゴヌクレオチドの５’リン酸がモノヌクレオチドのペントース環の３’酸素に結合していない場合は、オリゴヌクレオチドの末端は「５’末端」と呼ばれ、オリゴヌクレオチドの３’酸素が次のモノヌクレオチドのペントース環の５’リン酸に結合していない場合は「３’末端」と呼ばれる。本明細書では、核酸配列は、大きなオリゴヌクレオチドの内部にある場合でも、５’末端及び３’末端を有するものとすることができる。直鎖状又は環状のＤＮＡ分子のいずれかにおいて、個々のエレメントは、「下流」又は３’側のエレメントの「上流」又は５’側にあると言われる。この用語は、転写がＤＮＡ鎖に沿って５’から３’の方向で進むことを反映している。

【００３３】

本明細書では、「形質転換」という用語は、外因性ＤＮＡをレシピエント細胞の中に入れそれを変化させるプロセスを指し、例えば、その外因性ＤＮＡは、ＮｅｕｒｏＤ、ｎｇｎ３、ＧＬＰ１、ＰＤＸ１、Ｍａｆａ、ベータセルリン、Ｎｋｘ２．２、Ｎｋｘ６．１、ＰＡＸ４、Ｉｓｌ１、サイクリンＤ２（及びサイクリンファミリーの他のメンバー）、ＣＤＫ４（及びサイクリン依存性キナーゼファミリーの他のメンバー）、及びサイクリン依存性キナーゼ阻害因子（例えばｐ１６及びＩＮＫ４ファミリーの他のメンバー又はｐ２７及びＣＩＰ／ＫＩＰファミリーの他のメンバー）に対するｓｉＲＮＡを発現するためのプロモーター及びコード配列を含む、１又は２以上のプラスミドである。形質転換は、当技術分野において周知の様々な方法を用いて、天然の又は人工的な条件下において生じさせることができる。形質転換では、外来の核酸配列を原核宿主細胞又は真核宿主細胞内に挿入するために、あらゆる既知の方法を用いることができる。その方法は形質転換する宿主細胞に基づいて選択され、限定はしないが、ウイルス感染、エレクトロポレーション、リポフェクション、及び粒子衝突を含み得る。このような「形質転換」細胞には、挿入されたＤＮＡが自己複製プラスミドとして又は宿主染色体の一部のとしてのいずれかで複製し得る、安定な形質転換細胞が含まれる。

【００３４】
本明細書では、「トランスフェクション」という用語は、外来ＤＮＡを真核細胞内に導入することを指す。トランスフェクションは、例えばリン酸カルシウム－ＤＮＡ共沈殿、ＤＥＡＥ－デキストランを用いたトランスフェクション、ポリブレンを用いたトランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポソーム融合、リポフェクション、プロトプラスト融合、レトロウイルス感染、及びバイオリスティックを含む、当業者に知られている様々な手段によって行うことができる。したがって、「安定なトランスフェクション」又は「安定にトランスフェクトした」という用語は、トランスフェクトする細胞のゲノム内への外来ＤＮＡの導入及び組込みを指す。「安定な形質転換体」という用語は、ゲノムＤＮＡ内に外来ＤＮＡを安定に組み込まれた細胞を指す。また、この用語は、挿入したＤＮＡ又はＲＮＡを限られた時間にわたって一過性に発現する細胞も含む。したがって、「一過性トランスフェクション」又は「一過性にトランスフェクトした」という用語は、トランスフェクトする細胞のゲノム内に外来ＤＮＡが組み込まれていない細胞内に外来ＤＮＡを導入することを指す。外来ＤＮＡは数日間、トランスフェクトした細胞の核内に残存する。この時間の間、外来ＤＮＡは、染色体における内因性遺伝子の発現を管理する調節制御を受ける。「一過性トランスフェクタント」という用語は、外来ＤＮＡを取り込んではいるがこのＤＮＡを組み込んではいない細胞を指す。
【００３５】
本明細書では、「ベクター」という用語は、ある細胞から別の細胞へＤＮＡセグメント（複数可）を移す核酸分子に関して用いる。「媒体」という用語は「ベクター」と互換的に用いる場合がある。本明細書において用いる「ベクター」という用語は、所望のコード配列と特定の宿主生物における作動可能に連結したコード配列の発現に必要な適切な核酸配列とを含む組換えＤＮＡ分子に関する発現ベクターも含む。原核生物における発現に必要な核酸配列には、通常、プロモーター、（任意の）オペレーター、及びリボソーム結合部位が含まれ、他の配列を伴うことが多い。真核細胞は、プロモーター、エンハンサー、並びに終結シグナル及びポリアデニル化シグナルを用いることが知られている。
【００３６】
本明細書では、「増幅する」という用語は、核酸に関して用いる場合は、当技術分野において知られているあらゆる方法によって核酸配列の多くのコピーを産生することを指す。増幅は、鋳型特異性を伴う、核酸の複製の特別なケースである。鋳型特異性は「標的」特異性という用語で記載されることが多い。標的配列は、それらを他の核酸から区別されるべきであるという意味で「標的」である。増幅技術は、主にこの区別のために設計されている。
【００３７】
本明細書では、「プライマー」という用語は、核酸鎖に相補的なプライマー伸長産物の合成が誘導される条件下（すなわち、ヌクレオチド、及びＤＮＡポリメラーゼのような誘導剤の存在下、適切な温度及びｐＨ）にある時に合成の開始点として作用し得る、精製された制限消化物内にあるように自然に生じるか又は合成的に産生されるオリゴヌクレオチドを指す。プライマーは、増幅の最大の効率のためには一本鎖であり得るが、二本鎖であってもよい。二本鎖である場合、プライマーは、まずその二本鎖の鎖を分離するための処理をし、その後、伸長産物を調製するために用いる。プライマーは、誘導剤の存在下で伸長産物の合成を開始するために十分長くなくてはならない。プライマーの正確な長さは、温度、プライマーの源、及び用いる方法を含む多くの要素に依存する。
【００３８】
本明細書では、「プローブ」という用語は、所望の別のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズし得る、精製された制限消化物内にあるように自然に生じるか、又は合成的に、組換えにより、若しくはＰＣＲ増幅により産生される、オリゴヌクレオチド（すなわち、ヌクレオチドの配列）を指す。プローブは一本鎖又は二本鎖であり得る。プローブは、特定の遺伝子配列の検出、同定、及び単離に有用である。本発明において用いるあらゆるプローブは、あらゆる「レポーター分子」で標識されるものであり、それにより、限定はしな

いが、酵素（例えば、ＥＬＩＳＡ、及び酵素に基づいた組織化学的アッセイ）、蛍光、放射能、及び発光のシステムを含む、あらゆる検出システムにおいて検出可能である。本発明は、いかなる特定の検出システム又は標識にも限定されるものではない。

【００３９】

本明細書では、「標的」という用語は、ポリメラーゼ連鎖反応に関して用いる場合、ポリメラーゼ連鎖反応に用いるプライマーが結合している核酸の領域を指す。したがって、「標的」は、他の核酸配列から区別されるべきものである。「セグメント」は、標的配列内の核酸の一領域として定義される。標的は、細胞又は組織に関して用いる場合、細胞内に核酸を送達して細胞の機能を変えるための、例えば、１又は２以上のＢＴＣ遺伝子又はＰＤＸ１遺伝子を発現させるための、細胞に対して外因性のベクター（例えば、ウイルス、リポソーム、又はさらに裸の核酸）を用いた標的化を指す。

【００４０】

本明細書では、「ポリメラーゼ連鎖反応」（「ＰＣＲ（polymerase chain reaction）」）という用語は、クローニング又は精製を行うことなくゲノムＤＮＡの混合物における標的配列のセグメントの濃度を増大させるための方法を記載している、参照することにより本明細書に組み込まれる、K. B. Mullisの米国特許第４，６８３，１９５号明細書、米国特許第４，６８３，２０２号明細書、及び米国特許第４，９６５，１８８号明細書の方法を指す。標的配列を増幅するためのこのプロセスは、所望の標的配列を含むＤＮＡ混合物に対する、非常に過剰な２つのオリゴヌクレオチドプライマーを含み、その後、ＤＮＡポリメラーゼの存在下で正確な一連の熱サイクルを行う。２つのプライマーは、それらの各々の、二本鎖標的配列の鎖に対して相補的である。増幅を行うために、混合物を変性し、次にプライマーをそれらに相補的な標的分子内の配列にアニーリングする。アニーリングの後、プライマーをポリメラーゼで伸長し、相補鎖の新たな対を形成させる。変性段階、プライマーのアニーリング段階、及びポリメラーゼ伸長段階は、所望の標的配列の増幅セグメントを高濃度にするために何度も反復することができる（すなわち、変性、アニーリング、及び伸長は１つの「サイクル」を構成し、多くの「サイクル」を行うことができる）。所望の標的配列の増幅セグメントの長さは、プライマー同士の相関位置によって決定され、したがって、この長さは調節可能なパラメータである。プロセスの反復態様により、この方法は「ポリメラーゼ連鎖反応」（以下では「ＰＣＲ」）と呼ばれる。標的配列の所望の増幅セグメントは混合物における（濃度の観点から）主要な配列となるため、それらは「ＰＣＲ増幅産物」と呼ばれる。ＰＣＲでは、ゲノムＤＮＡにおける特定の標的配列の１つのコピーを、いくつかの異なる手法（例えば、標識したプローブとのハイブリダイゼーション、ビオチニル化したプライマーの組込みの後のアビジン－酵素複合体の検出、増幅セグメントへの^{32}Ｐで標識したＤＣＴＰ又はＤＡＴＰのようなデオキシヌクレオチド三リン酸の組込み）によって検出することが可能なレベルまで増幅することが可能である。ゲノムＤＮＡに加え、あらゆるオリゴヌクレオチド配列を適切なプライマー分子のセットで増幅することができる。特に、ＰＣＲプロセス自体により生成した増幅セグメント自体、その後のＰＣＲ増幅のための有効な鋳型である。

【００４１】

本明細書では、「染色試薬」という用語は、試薬を含む核酸配列の全てのハイブリダイゼーションパターンを指す。ゲノムの一部分に特異的な染色試薬により、標的の染色体物質と非標的の染色体物質との間でコントラストが生じる。多くの異なる異常は、１又は２以上の色で検出されるゲノムの部分上のあらゆる所望の染色パターン（複数色の染色パターン）及び／又は他の指示法により検出し得る。

【００４２】

本明細書では、「導入遺伝子」という用語は、哺乳動物のゲノム、例えば生きている動物の哺乳動物細胞内に人工的に挿入し得る遺伝物質を指す。「トランスジェニック動物」という用語は、本明細書において、その動物の細胞の一部において染色体外エレメントとして存在するか又はその動物の生殖系のＤＮＡ内（すなわち、ほとんどの又は全ての細胞のゲノム配列内）に安定的に組み込まれている非内因性（すなわち異種）核酸配列を有す

る、ヒト以外の動物、通常は哺乳動物を記載するために用いる。異種核酸は、当技術分野において周知の方法に従って、例えば宿主動物の胚又は胚性幹細胞を遺伝的に操作することにより、そのようなトランスジェニック動物の生殖系に導入される。

【００４３】

本明細書では、「導入遺伝子」という用語は、そのような異種核酸、例えば、発現構築物の形態の異種核酸（例えば、「ノックイン」トランスジェニック動物の作製用）、又は標的遺伝子内若しくは標的遺伝子の近傍に挿入されると標的遺伝子の発現を減少させる異種核酸（例えば、「ノックアウト」トランスジェニック動物の作製用）を指す。遺伝子の「ノックアウト」とは、標的遺伝子の機能を低下させて、好ましくは標的遺伝子の発現を検出不可能にするか又は有意でないものにする、遺伝子の配列における改変を意味する。トランスジェニックノックアウト動物は、標的遺伝子のヘテロ接合型のノックアウト、又は標的遺伝子のホモ接合型のノックアウトを含む。

【００４４】

本明細書では、「幹細胞」という用語は、例えば胚性幹細胞などの全能性又は多能性の幹細胞、及び、限定はしないが発生の胚盤胞段階にある細胞を含む、胚の発生の非常に早い段階にある多能性細胞を指す。本発明での使用の特定の一例として、幹細胞は、腺房細胞又はベータ細胞に分化していない膵臓細胞前駆体であり得、ＮｅｕｒｏＤ、ｎｇｎ３、ＧＬＰ１、ＰＤＸ１、Ｍａｆａ、ベータセルリン、Ｎｋｘ２．２、Ｎｋｘ６．１、ＰＡＸ４、Ｉｓｌ１、サイクリンＤ２（及びサイクリンファミリーの他のメンバー）、ＣＤＫ４（及びサイクリン依存性キナーゼファミリーの他のメンバー）、及びサイクリン依存性キナーゼ阻害因子（例えばｐ１６及びＩＮＫ４ファミリーの他のメンバー又はｐ２７及びＣＩＰ／ＫＩＰファミリーの他のメンバー）に対するｓｉＲＮＡを発現するための標的として用いられる。

【００４５】

先行特許出願において、本発明者らは、超音波標的マイクロバブル破壊（ＵＴＭＤ、ultrasound-targeted microbubble destruction）を用いて、遺伝子治療の標的を正常なラットの膵島とし得ることを明らかにした。プラスミドＤＮＡを保有する静脈内のマイクロバブルは、膵臓の微小循環において超音波によって選択的に破壊され、それにより、プラスミドを局所的に送達する。膵島の特異性は、プラスミドＤＮＡ内にラットのインスリン－Ｉプロモーターを組み込むことにより得られた。現在、ラットのストレプトゾトシン（ＳＴＺ、streptozotocin）誘発性の糖尿病において、ベータセルリン（ＢＴＣ、betacellulin）を単独で及びＰＤＸ１と組み合わせて送達するためにＵＴＭＤを用い得ることが明らかになっている。標的細胞の形質転換により、ＢＴＣ及びＰＤＸ１で処理したラットにおいて見られる、グルカゴンを染色した細胞の初期の膵島様塊が生じた。この研究において、塊は処理の３０日後までに消失した。正常な膵島の再生は見られなかったが、ベータ細胞マーカーを用いて膵腺房細胞をインスリン産生細胞に形質転換することにより、糖尿病はＵＴＭＤの１５日後までに回復した。

【００４６】

糖尿病は有病率が増加してきており、世界中で５％を超える人々が罹患している。新規の医薬、膵島移植、及び遺伝子治療を含む、新規の治療戦略が、糖尿病を治療するために強く求められている。膵島を標的とするインビボでの直接的な膵臓遺伝子送達は、糖尿病遺伝子治療のための重要なアプローチである。アデノウイルス、アデノ付随ウイルス、レンチウイルス、及び単純ヘルペスウイルス－１のベクターが、インビボにおいて膵島に有効な遺伝子を移入しているが、宿主免疫応答及びベクター細胞障害性を被ることが、今までの研究により示されている。また、裸のＤＮＡ及びＤＮＡ複合体を含む、非ウイルス遺伝子送達系により、一過性導入遺伝子発現を有するように、非常に低いレベルでの膵島細胞トランスフェクションが実証されている。しかし、非ウイルスベクター系は、臨床試験に関する生物安全性をより容易に満たすようである。

【００４７】

超音波標的マイクロバブル破壊（ＵＴＭＤ）は、インビボにおいて遺伝子又は薬物を膵

島に送達するために使用されている。簡潔に述べると、遺伝子はカチオン性リポソーム内に導入され、次いで気体が充填されたマイクロバブルのリン脂質殻に結合され、次いでそのマイクロバブルが静脈内に注入され、無処置の膵島の微小循環において超音波により破壊される。ＵＴＭＤアプローチは、ほとんどのベータ細胞が存在している、膵島の中心部全体のトランスフェクションを可能にする。ＵＴＭＤは、ベータ細胞特異性を高めるためにラットインスリンプロモーター（ＲＩＰ、rat insulin promoter）と組み合わされている。本発明は、ＲＩＰセグメントの長さを変化させることによって遺伝子発現の微分効率を非常に向上させる。インスリン遺伝子のエクソン１及びエクソン２における非コード領域を融合して、プラスミドにおける下流遺伝子機能を高めた。転写レベルにおいて、インスリンｍＲＮＡの融合は、それらの転写レベルが、正常な膵島のベータ細胞における正常なインスリンｍＲＮＡレベルに類似するような高レベルまで下流遺伝子発現を上方制御した。次いで、ＵＴＭＤを使用して、成体の生きている動物の無処置の膵島に対して駆動するラットインスリンプロモーターの制御下のインスリン遺伝子融合プラスミドを送達し、それによって、糖尿病遺伝子治療のための安全で、組織特異的で、非常に効果的な調節された遺伝子発現を与えた。

［実施例］

【００４８】

新規プロモーター。

材料及び方法。ラットインスリンプロモーター及びプラスミド構築物。配列番号１として本明細書に定義されている、ラットインスリン遺伝子１プロモーター断片（ＲＩＰ２．１（－４１２～－３０３）、ＲＩＰ１．１（－４１２～－１）、ＲＩＰ４．１（－４１２～＋４３）、ＲＩＰ３．１（－４１２～＋１６５））、GenBank受託番号J00747、及び配列番号２として定義されているヒトインスリンプロモーターについてGenBank受託番号NC_000011（これらの両方は本明細書に参照として組み込まれる）を、ＰＣＲを用いてSprague-Dawley(SD)ラットＤＮＡから増幅させた。ＲＩＰフォワードプライマー（５’-G CTG AGC TAA GAA TCC A-３’）（配列番号３）、ＲＩＰ２．１リバースプライマー（５’-CTGA GC ATTTTCCACC-３’）（配列番号４）、ＲＩＰ１．１リバースプライマー（５’-GGGAGTT ACTGGGTCTCCA-３’）（配列番号５）、ＲＩＰ４．１リバースプライマー（５’-GCAGAATT CCTGCTTGCTGATGGTCTA-３’）（配列番号６）、ＲＩＰ３．１リバースプライマー（５’-G TTGGAACAATGACCTGGA-３’）（配列番号７）、並びにKpnI及びxho1制限酵素部位をそれぞれ含むリバースプライマー（５-GGCAGAAGGACAGTGATCT-３）（配列番号８）。これらのプライマーの配列は表１に記載している。得られたＤＮＡ断片を、pGL2-basicホタルレポータープラスミド及びpDsRed1-1レポーターベクターにサブクローニングした。ＳＶ４０－プロモーターホタルルシフェラーゼレポータープラスミド、Promega社製のpGL2-Control、pDsRed1-1及びClonetech社製のpCMV-DsRed-express-1。ラットゲノムＤＮＡを、製造業者の指示書に従ってQIAamp Blood kit（Qiagen Inc社製、Valencia、CA）を用いてラット末梢血から抽出した。対応するＰＣＲ産物を、アガロースゲル電気泳動により検証し、QIAquick Gel Extraction kit（QIAGEN社製）により精製した。配列を確認するために、ＰＣＲ産物の直接配列決定を、ABI 3100 Genomic AnalyzerでdRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit（PE Applied Biosystems社製、Foster City、CA）を用いて実施した。プラスミドの消化、ライゲーション、サブクローニング、単離及び精製を、標準的手段により実施し、人工の変異が存在しないことを確認するために、再度、配列決定した。

【００４９】

【表１】

表１：プライマー配列（同じフォワードプライマーを用いるラットインスリン遺伝子プロモーター）

プライマー	配列	GenBank 受託番号
RIP フォワードプライマー	5'-g CTg AgC TAA gAA TCC A (配列番号 3)	J00747
RIP2.1 リバースプライマー	5'-CTg AgC ATT TTC CAC C (配列番号 4)	
RIP1.1 リバースプライマー	5'-ggg AgT TAC Tgg gTC TCC A (配列番号 5)	
RIP4.1 リバースプライマー	5'-CTg CTT gCT gAT ggT CTA (配列番号 6)	
RIP3.1 リバースプライマー	5'-gAC CTg gAA gAT Agg CAg ggT (配列番号 7)	
ラット Neurod1 cDNA フォワード	5'-AAC Atg ACC AAA TCA TAC AgC (配列番号 9)	NM_019218
ラット Neurod1 cDNA リバース	5'-TgA AAC TgA AAC TgA CgT gCC (配列番号 10)	
ラットニューロゲニン 3 cDNA フォワード	5'-ATg gCg CCT CAT CCC TTg gAT (配列番号 11)	NM_021700
ラットニューロゲニン 3 cDNA リバース	5'-ACA CAA gAA gTC TgA gAA CAC (配列番号 12)	
ラット PAX4 cDNA フォワード	5'-AgC ATg CAg CAg gAC ggT CTCA (配列番号 13)	NM_031799
ラット PAX4 cDNA リバース	5'-TTA Tgg CCA gTg TAA gTA ATA (配列番号 14)	
ラット NKX2.2 cDNA フォワード	5'-ATg TCg CTg ACC AAC ACA AAg AC (配列番号 15)	XM_345446
ラット NKX2.2 cDNA リバース	5'-TCA CCA AgT CCA CTg CTg ggC CT (配列番号 16)	
ラット PDX1 cDNA フォワード	5'-gCC ACC Atg AAT AgT gAg gAg (配列番号 17)	NM_022852
ラット PDX1 cDNA リバース	5'-TCA gCC TgC ggT CCT CAC Cgg ggT (配列番号 18)	
ゴールデンハムスターNKX6.1 cDNA フォワード	5'-CTg Tgg gAT gTT AgC TgT (配列番号 19)	X81409
ゴールデンハムスターNKX6.1 cDNA リバース	5'-TCA ggA CgA gCC gTg ggC CT (配列番号 20)	
ヒト MafA cDNA フォワード	5'-ATg gCC gCg gAg CTg gCg AT (配列番号 21)	NM_201589
ヒト MafA cDNA リバース	5'-CTA CAg gAA gAA gTC ggC CgT (配列番号 22)	

【００５０】

ラットＵＴＭＤプロトコル。Sprague-Dawleyラット（２５０～３５０ｇ）を、ケタミン（１００ｍｇ／ｋｇ）及びキシラジン（５ｍｇ／ｋｇ）の腹腔内投与により麻酔した。ポリエチレンチューブ（PE50、Becton Dickinson社製、MD）を切開により右内頸静脈に挿入

した。前腹部の毛を剃り、S3プローブ（Sonos 5500、Philips Ultrasound社製、Andover、MA）を入れて左腎及び脾臓を画像化し、これにより左腎及び脾臓が容易に識別される。左腎及び脾臓の間に膵臓があるので、プローブを調節して膵臓を標的とし、所定の位置に固定した。１ｍｌのマイクロバブル溶液を、注入ポンプを用いて、２０分間、３ｍｌ／ｈの一定の速度で注入した。注入の間、マイクロバブル破壊を、１．２～１．４のメカニカルインデックス及び４ｃｍの深度の超高調波モード（送信１．３ＭＨｚ／受信３．６ＭＨｚ）を用いて達成した。超音波パルスは、４回の心臓周期毎に４フレームの超音波のバーストを送達するために、（Ｒ波のピーク後８０ｍｓにて）ＥＣＧにより誘発した。これらの設定は、ＵＴＭＤを用いる遺伝子送達に最適な超音波パラメータであることが以前に示されている。各送達の終わりに、頸静脈を結紮し、皮膚を縫合した。送達後、正常な挙動に関して全てのラットをモニターした。４日後にラットを屠殺し、膵臓を採取した。

【００５１】

プラスミドを含有する、脂質で安定化させたマイクロバブルの製造。脂質で安定化させたマイクロバブルを調製した（Ayuso E, Chillon M, Agudo J, Haurigot V, Bosch A, Carretero A, Otaegui PJ, Bosch F: In vivo gene transfer to pancreatic beta cells by systemic delivery of adenoviral vectors. Human Gene Ther 15:805-812, 2004、Wang AY, Peng PD, Ehrhardt A, Storm TA, Kay MA: Comparison of adenoviral and adeno-associated viral vectors for pancreatic gene delivery in vivo. Human Gene Ther 15:405-413, 2004）。簡潔に述べると、２．５ｍｇ／ｍｌのＤＰＰＣ（１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルコリン、Sigma社製、St.Louis、MO）、０．５ｍｇ／ｍｌのＤＰＰＥ（１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルエタノールアミン、Sigma社製、St.Louis、MO）の溶液と、１０％グリセロールとを、２：１の比で２ｍｇのプラスミド溶液と混合した。このリン脂質－プラスミド溶液の０．５ｍｌの一定分量を１．５ｍｌの透明バイアルに加え、上部に残っている空間にペルフルオロプロパンガス（Air Products, Inc社製、Allentown、PA）を満たした。各バイアルを４０℃で３０分間インキュベートし、次いで歯科用混合器（Vialmix（商標）、Bristol-Myers Squibb Medical Imaging社製、N.Billerica、MA）によって２０秒間、機械的に振動させた。脂質で安定化させたマイクロバブルは、未結合のプラスミドＤＮＡを含有している液体の層の上部に浮遊している乳白色の懸濁液として現れる。下層部（subnatant）を捨て、マイクロバブルをＰＢＳで３回洗浄して未結合のプラスミドＤＮＡを除去した。上層のマイクロバブルの平均直径及び濃度を粒子計数器（Beckman Coulter Multisizer III）によって測定した。

【００５２】

ＤｓＲｅｄ　ＤＮＡを検出するためのｉｎ　ｓｉｔｕ　ＰＣＲ。ＤｓＲｅｄプライマー。一対のDsRedプライマーをDsRed ＤＮＡに対して使用した：それらはＤｓＲｅｄ　１２５$^{+}$（５’-GAGTTCATGCGCTTCAAGGTG-３’）及びＤｓＲｅｄ　６９０$^{-}$（５’-TTGGAGTCCACGTAGTAGTAG-３’）である。屠殺直後、２００ｍｌの動脈内冷却塩溶液によりラットから血液を取り出し、続いて１００ｍｌの２％パラホルムアルデヒド及び０．４％グルタルアルデヒドを用いて潅流固定した。膵臓を０．５ｃｍの小片に切断し、４℃で２０％のスクロース溶液中に一晩置き、次いで－８６℃でＯＴＣモールドに入れた。５μｍ厚の凍結切片を、シランでコーティングしたスライド上に置き、４℃で１５分間、４％パラホルムアルデヒド中で固定し、５分間、ＰＢＳ中の１０ｍＭグリシンで反応を止め、ＰＢＳですすぎ、ＰＢＳ中の０．５％Triton X-100で１０分間透過し、ＰＢＳで１０分間すすいだ。カバースリップの片側に１滴のマニキュア液をつけた。次いでスライドをアルミニウムの「ボート」中でサーモサイクラーのブロック上に直接置いた。５０μｌのＰＣＲ反応溶液（０．８ユニットのTaq ＤＮＡポリメラーゼ、２μｌのＤｓＲｅｄプライマー、３μｌのＤＩＧ－ｄＮＴＰ、５μｌの１０×緩衝液及び４０μｌの水）を各スライドに加え、製造業者の指示書に従ってAssembly Tool（Perkin Elmer社製）を用いて、AmpliCover Disc and Clipsにより覆った。ｉｎ　ｓｉｔｕ　ＰＣＲをPerkin-Elmer GeneAmp system 1000を用いて以下のように行った。最初に９４℃で維持した（１分間）後、ＰＣＲを１１サイクル

行った（９４℃で１分、５４℃で１分、及び７２℃で２分）。増幅後、スライドを２×ＳＳＣに１０分間、及び０．５％パラホルムアルデヒドに５分間、及びＰＢＳに５分間を２回浸した。ジゴキシゲニンを組み込んだＤＮＡ断片を、ＤＩＧ検出用に設定された蛍光抗体エンハンサー（Roche社製）を用い、続いて組織化学的染色（PCR DIG Prob Synthesis Kit（Roche Co.社製、カタログ番号：1636090））により検出した。まず、切片を３０分間ブロッキング溶液でインキュベートして、抗体の膵臓組織への非特異的結合を減少させた。次いで、切片を、加湿器中で３７℃にて１時間、５０μｌの抗ＤＩＧ溶液（１：２５）でインキュベートした。次に、スライドを振盪しながらＰＢＳで３回、各５分間洗浄した。再度スライドを３７℃で１時間、５０μｌの抗マウス－ＩｇＧ－ジゴキシゲニン抗体溶液（１：２５）でインキュベートした。スライドを振盪しながらＰＢＳで３回、各５分間、再度洗浄した。スライドを、３７℃で１時間、５０μｌの抗ＤＩＧ－蛍光溶液（１：２５）でインキュベートした。次いで、スライドを振盪しながらＰＢＳで３回、各５分間、再度洗浄した。最後に、切片を７０％ＥｔＯＨ、９５％ＥｔＯＨ及び１００％ＥｔＯＨで、各２分間、脱水し、キシレンで清澄し、カバースリップをかけた。

【００５３】

ＤｓＲｅｄ　ｍＲＮＡを検出するためのｉｎ　ｓｉｔｕ　ＲＴ－ＰＣＲ。ＤｓＲｅｄプライマー。一対のＤｓＲｅｄプライマーをＤｓＲｅｄ　ｃＤＮＡに対して使用し、それらはＤｓＲｅｄ　１２５$^{+}$（５’-GAGTTCATGCGCTTCAAGGTG-３’）及びＤＳＲｅｄ　６９０$^{-}$（５’-TTGGAGTCCACGTAGTAGTAG-３’）である。潅流固定した凍結切片は上記のように調製した。DNase処理は、５０μｌのカクテル溶液（Invitrogen社製）（５μｌのDNaseＩ、５μｌの１０×DNase緩衝液、及び４０μｌの水）を用いて、各スライド上で行い、カバースリップをかけ、２５℃で一晩インキュベートし、次いでＰＢＳで５分間、２回洗浄した。

【００５４】

逆転写：第１鎖ｃＤＮＡ合成を、５０μｌのカクテル溶液（ＲＴ－ＰＣＲ用のSuperscript First-strand synthesis system、Invitrogen kit # 11904-018）（１μｌのＤｓＲｅｄ７２７$^{-}$プライマー（５’-GATGGTGATGTCCTCGTTGTG-３’）、５μｌのＤＴＴ溶液、２．５μｌのｄＮＴＰ、５μｌの１０×緩衝液、５μｌの２５ｍＭ　ＭｇＣｌ、２９μｌの水及び２．５μｌのSuperScript II RT）を用いて、５０μｌの総容量にて各スライド上で行った。カバースリップを置き、スライドを４２℃で２時間インキュベートし、ＰＢＳで５分間、２回洗浄し、１００％ＥＴＯＨで１分間すすぎ、乾燥させた。

【００５５】

ＤｓＲｅｄタンパク質、インスリン、及びグルカゴンを検出するための免疫組織化学。厚さ５～８μｍのクリオスタット切片を、４％パラホルムアルデヒド中で４℃にて１５分間固定し、ＰＢＳ中の１０ｍＭグリシンを用いて５分間反応を止めた。次いで、切片をＰＢＳ中で３回すすぎ、ＰＢＳ中の０．５％Triton X-100で１０分間透過した。切片を１０％ヤギ血清で３７℃にて１時間ブロックし、ＰＢＳで３回洗浄した。一次抗体（Sigma Co.社製）（ブロック溶液中で１：１００００希釈）を加え、４℃で一晩インキュベートした。ＰＢＳで３回、５分間洗浄した後、二次抗体（Sigma Co.社製、ＦＩＴＣ結合抗マウスＩｇＧ）（ブロック溶液中で１：５００希釈）を加え、３７℃で１時間インキュベートした。切片をＰＢＳで１０分間、５回すすぎ、次いで載せた。

【００５６】

細胞培養及び一過性トランスフェクションアッセイ。ＩＮＳ－１細胞株（Newgard lab、Duke Universityから無料提供されたラットインスリノーマ）を細胞に適した培地に維持した。ＩＮＳ－１細胞を、各ウェル、１μｇのルシフェラーゼレポータープラスミド及び内部対照プラスミドとして０．０２μｇのｐＴＳ－ＲＬウミシイタケルシフェラーゼ及び１００μｌの無血清ＤＭＥＭ中の３μｌのリポフェクタミン２０００でトランスフェクトした。細胞を収集し、ホタル及びウミシイタケルシフェラーゼ活性を、Dual Luciferase Assay system（Promega社製）及びTurner TD 20/20照度計を用いてトランスフェクションの４８時間後に測定した。

【００５７】
統計分析。実験群の間のルシフェラーゼ活性の差異は、２元ＡＮＯＶＡにより比較した。ｐ値＜０．０５は統計的に有意であるとみなした。ScheffeのPost-hoc検定を、ＡＮＯＶＡ　Ｆ値が統計的に有意である場合のみ行った。
【００５８】
図１は、ラットインスリンプロモーター領域並びにエクソン１、イントロン１及びエクソン２の概略図である。ラットインスリンプロモーターは、既知の配列エレメント並びに融合エクソン１及びエクソン２により示される。
【００５９】
図２：上図は、３つの異なるグルコース濃度下にてｒｉｐ－ｌｕｃをトランスフェクトしてから４８時間後のＩＮＳ－１細胞溶解物のルシフェラーゼ活性である。下図は、高グルコース濃度下のｒｉｐ－ｌｕｃでのトランスフェクション後の異なる培養時間における培養溶液のルシフェラーゼ活性であり、グルコースを含まない場合、及び正常なグルコース濃度においてルシフェラーゼ活性は存在しない（データは示さず）。
【００６０】
図３．Ａ：ＲＩＰ３．１－ＤｓＲｅｄスライド。上左：緑は抗インスリン、上中央の赤は抗ｄｓｒｅｄ、上右はそれらの共焦点像である。下図は連続的な切片及び同様の膵島構造であり、下左：緑は抗グルカゴン、下中央：赤は抗ｄｓｒｅｄ、下右はそれらの共焦点像である。Ｂ：ＲＩＰ－４．１－ｄｓｒｅｄ、Ｃ：ＲＩＰ－１．１－ｄｓｒｅｄ、Ｄ：ＲＩＰ－１．１－ｄｓｒｅｄスライド、Ｅ：pCMV-dsred、Ｆ：正常対照。
【００６１】
図４：Ａ画像は１０％グルコースを与えたpRIP3.1-DsRedラットの場合である。上右の緑は抗インスリン、上中央の赤は抗ｄｓｒｅｄ、上左はそれらの共焦点画像である。下右の緑は抗グルカゴン、下中央の赤は抗ｄｓｒｅｄ、下左はそれらの共焦点画像である。Ｂ画像は一晩絶食させたpRIP3.1-DsRedラットである。
【００６２】
図５：上図。対照ラット（左）及びＵＴＭＤで処理したラット（中央は餌を与えたラット、右は絶食させたラット）由来の顕微鏡用切片（４００倍）。ｉｎ－ｓｉｔｕ　ＰＣＲを使用して、ＤｓＲｅｄプラスミドＤＮＡを染色し、そのＤｓＲｅｄプラスミドＤＮＡは処理した膵臓全体にわたって見られる。膵島は明確に見える（矢印）。下図。対照ラット（左）及びＲＩＰ６．１－ＤｓＲｅｄを使用してＵＴＭＤで処理したラット（餌を与えたラットとして中央及び絶食させたラットとして右）由来の切片（４００倍）。ｉｎ－ｓｉｔｕ　ＲＴ－ＰＣＲを使用して、ＤｓＲｅｄ　ｍＲＮＡを染色し、そのＤｓＲｅｄ　ｍＲＮＡは膵島中心（中央／餌を与えた）に局在する。膵島の境界で染色した（右／絶食させたラット）。
【００６３】
ラットインスリンプロモーターは、ラットインスリノーマ細胞株（ＩＮＳ－１）でルシフェラーゼ遺伝子トランスフェクションを駆動することを見出した。プラスミドでの発現を駆動する従来のラットインスリンプロモーターは低効率の組織発現を示し、インビボ送達系において高度に組織特異的ではない。本発明は、インスリン１遺伝子のエクソン１及びイントロン１並びにインスリン遺伝子調節に以前は使用されていなかったエクソン２の部分が含まれるインスリンプロモーターを含む。特定の実施形態において、インスリンプロモーターは、ラットインスリンプロモーター、ヒトインスリンプロモーター又はそれらの組合せである。
【００６４】
図２は、正常なグルコースレベル下で、ＲＩＰ３．１のルシフェラーゼ活性が、ＲＩＰ２．１（切断ＲＩＰプロモーター）より４７２６倍高く、ＲＩＰ１．１（完全長の従来のＲＩＰ）より２０倍高く、さらにＣＭＶ－ルシフェラーゼの３．１倍を示したことを示す。グルコースを含まない条件下で、全ての構築物についてのＩＮＳ－１の遺伝子発現は著しく阻害され、ＲＩＰ３．１のルシフェラーゼ活性はまだ、ＲＩＰ１．１の６．６倍、Ｃ

ＭＶの２．６倍であった。高グルコースレベル下で、ＲＩＰ３．１のルシフェラーゼ活性は、ＲＩＰ２．１の３５１５倍、ＲＩＰ１．１の６．９倍、及びＣＭＶの０．６倍であった。驚くべきことに、高グルコース条件下で、ルシフェラーゼ活性は、トランスフェクションの８、１６、２４、３２及び４８時間後にＲＩＰ３．１ディッシュの培養液から検出され得る。グルコースを含まない条件及び正常なグルコース培養条件で分泌は全く見出されなかった（データは示さず）。ルシフェラーゼを駆動するＲＩＰ３．１は、高効率であり、グルコース応答性が実証されているだけでなく、ＩＮＳ－１細胞株の培養液中に発現タンパク質を分泌した。

【００６５】

ＵＴＭＤを用いて生きているラットの膵島に送達されるＲＩＰにより駆動するＤｓＲｅｄプラスミド。単に細胞株のみならず、実際の条件下で、生きている動物の膵島における、上記のＲＩＰプロモーターの遺伝子発現及び調節をより理解するために、それらのＲＩＰプロモーターにより駆動するＤｓＲｅｄプラスミドを、超音波標的マイクロバブル破壊（ＵＴＭＤ）を用いて生きているラットの膵臓に送達し、ＵＴＭＤから４日後に屠殺した。図３は、ＲＩＰ３．１及びＲＩＰ４．１のＤｓＲｅｄタンパク質が、膵島の中心部及び境界を含んだ未処置の膵島において検出され、非膵島領域には見られないことを示す。驚くべきことに、共焦点画像により、ＤｓＲｅｄタンパク質が、膵島中のベータ細胞及びアルファ細胞において検出されたことが示された。ＤｓＲｅｄタンパク質シグナルは完全長のＲＩＰ１．１において非常に低く、切断ＲＩＰ２．１においてはほとんど見られなかった。ＤｓＲｅｄタンパク質のシグナルは、ＣＭＶ－ＤｓＲｅｄプラスミドで処理したラットの膵臓スライドのあらゆる所に見られた。しかし正常なラットの対照膵臓スライドにおいて、ＤｓＲｅｄシグナルは検出できなかった。

【００６６】

次に、インビトロにおいてＩＮＳ－１細胞株で見られたように、送達されたＲＩＰプラスミドの遺伝子発現が、ラット膵島においてグルコースレベルにより調節可能であるか否かを決定した。ラットを処理するために、ＲＩＰ３．１　ＤｓＲｅｄを選択して使用し、ラットを絶食（１２時間）及び給餌（１０％のグルコースを含む）の群に分け、次いで屠殺した。図４は、上図において、（１０％のグルコース給餌）ＤｓＲｅｄシグナルが、膵島のベータ細胞及びアルファ細胞において見られたことを示す。下図において、（１２時間絶食させた）ＤｓＲｅｄシグナルは膵島のアルファ細胞においてのみ見られたが、膵島のベータ細胞においては見られなかった。これにより、グルコースの給餌が、完全な膵島細胞においてＲＩＰ３．１－ＤｓＲｅｄ遺伝子発現の上方制御を誘発し、絶食が、ベータ細胞においてＲＩＰ３．１－ＤｓＲｅｄ遺伝子発現の下方制御を誘発し、アルファ細胞において機能するＲｉｐ３．１－ＤｓＲｅｄ遺伝子を維持することが示された。

【００６７】

プラスミドＤＮＡについてのｉｎ　ｓｉｔｕ　ＰＣＲ及びＤｓＲｅｄ　ｍＲＮＡについてのｉｎ　Ｓｉｔｕ　ＲＴ－ＰＣＲ：図５（上及び中央は１０％グルコース給餌、左図は絶食させた）は、ＲＩＰ３．１－ＤｓＲｅｄプラスミドＤＮＡに対するｉｎ　ｓｉｔｕ　ＰＣＲの結果を示す。プラスミドＤＮＡは、膵島を含む、核パターンにおいて膵臓全体にわたって見られる。プラスミドの同種核組織局在の同様のパターンを、超音波ビーム内の左腎、脾臓、及び肝臓部分に観察した。プラスミドは、超音波ビームの外側にある右腎又は骨格筋、器官に存在しなかった。対照（上右図）（プラスミドを有さないマイクロバブル又は超音波を有さないプラスミドーマイクロバブル）は、膵臓内でプラスミドの痕跡を何も示さなかった。これらの結果により、超音波処理により、膵臓内及びそのすぐ近くにプラスミドが放出されたことが示される。

【００６８】

図５の下中央図（１０％グルコース給餌）は、ＲＩＰ３．１プロモーターの制御下で発現されるＤｓＲｅｄ転写産物に対応するｍＲＮＡに対するｉｎ　ｓｉｔｕ　ＲＴ－ＰＣＲの代表的な例を示す。ＤｓＲｅｄ　ｍＲＮＡは膵島全体にわたって見られたが、膵実質においては見られず、ＲＩＰプロモーターが、膵臓内分泌物においてのみ、ＵＴＭＤにより

送達されたＤｓＲｅｄ　ｃＤＮＡの転写に関与していることが示される。下左図（絶食）は、膵島中心部でなく膵島境界領域におけるＤｓＲｅｄ　ｍＲＮＡ分布を示す。対照のシグナルは検出されなかった。さらなる構築物を図１１～１５に示す。

【００６９】

インビボにおいて送達される膵島転写因子遺伝子による膵島の再生及びストレプトゾトシン誘発性の糖尿病の回復。

インスリン補充を含む、薬物療法は、正常な膵島のグルコース調節機能を再現できないため、血糖管理は、しばしば、糖尿病において不十分になる。したがって、新規の治療戦略は、膵島移植又はベータ細胞再生による糖尿病の両方の主要な形態に共通のベータ細胞塊の欠乏を補充することに焦点を当てている（Newgard CB: While tinkering with the s-cell metabolic regulatory mechanisms and new therapeutic strategies: American Diabetes Association Lilly Lecture, 2001. Diabetes 51:3141-3150, 2002、Bonner-Weir, S. and Weir, G.C. New sources of pancreatic s-cells. Nat. Biotechnol. 23:857-861, 2005）。膵島移植は、供与膵島の供給により制限されており、免疫抑制療法を必要とする（Samson, SL, Chan L. Gene therapy for diabetes: reinventing the islet. Trends in endocrinology and metabolism 17:92-100, 2006）。膵島再生は、安全の理由のためにヒトにおいて使用される可能性は低いウイルスベクター（McClane SJ, Chirmule N, Burke CV, Raper SE: Characterization of the immune response after local delivery of recombinant adenovirus in murine pancreas and successful strategies for readministration. Human Gene Ther 8:2207-2216, 1997、Ayuso E, Chillon M, Agudo J, Haurigot V, Bosch A, Carretero A, Otaegui PJ, Bosch F: In vivo gene transfer to pancreatic beta cells by systemic delivery of adenoviral vectors. Human Gene Ther 15:805-812, 2004、Wang AY, Peng PD, Ehrhardt A, Storm TA, Kay MA: Comparison of adenoviral and adeno-associated viral vectors for pancreatic gene delivery in vivo. Human Gene Ther 15:405-413, 2004、Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson JM: Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. Proc Natl Acad Sci U S A 99:11854-11859, 2002）を用いて肝臓組織を主にターゲティングする、動物モデルにおいて成功している。本発明者らは、遺伝子治療が、超音波標的マイクロバブル破壊（ＵＴＭＤ）を用いて膵島を標的とすることができることを以前に実証している（Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, Lu Y, Calcedo R, Zhou X, Wilson JM: Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. J Virol 78:6381-6388, 2004）。プラスミドＤＮＡを保有する静脈内マイクロバブルは、超音波により膵臓微小循環において破壊され、ラットインスリン－Ｉプロモーターを用いることにより、ベータ細胞をさらに標的とすることができる局所的遺伝子発現を達成する。ＵＴＭＤは、ラットにおけるストレプトゾトシン（ＳＴＺ）誘発性の糖尿病においてベータセルリン及びＰＤＸ１を送達するために使用されており、膵腺房細胞をインスリン産生細胞に再プログラム化することにより、１５日までの間に糖尿病を回復させる（Wang Z, Ma HI, Li J, Sun L, Zhang J, Xiao X: Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. Gene Ther 10:2105-2111, 2003）。本発明は、ＮｅｕｒｏＤ１をコードするプラスミドを用いて膵島を再生するためにＵＴＭＤを使用し、３０日までの間で血糖、インスリン、及びＣ－ペプチドを正常化する。

【００７０】

ラットインスリンプロモーター及びプラスミド構築物。Sprague-Dawleyラットゲノム ＤＮＡを、製造業者の指示書に従ってQIAamp Blood kit（Qiagen Inc社製、Valencia、CA）を用いてラットの末梢血から抽出した。ラットインスリン遺伝子１プロモーター断片（－４１２～＋１６５）を、ＰＣＲを使用してＳＤラットゲノムＤＮＡから増幅させた。得られたＤＮＡ断片を、ｐＤｓＲｅｄ１－１レポーターベクター（Clonetech社製、CA）内でサブクローニングした。ｈＭａｆＡ　ｃＤＮＡ及びハムスターＮｋｘ６．１　ｃＤＮＡは、ミシガン州立大学のOlson研究室及びデューク大学医療センターのNewgard研究室から提

供され／誠意をもって贈られた。ラットＮｇｎ３、ＮｅｕｒｏＤ１、Ｐａｘ４、及びＮｋｘ２．２　ｃＤＮＡは、製造業者の指示書に従って、それらの全ＲＮＡから逆転写させた、Sprague-Dawleyの新生児のラットの膵臓ｃＤＮＡプールからのＰＣＲ産物であった。新生児のラットの膵臓試料を液体窒素中で急速冷凍し、－８６℃に保存した。凍結した試料を１ｍｌのＲＮＡ－ＳＴＡＴ溶液中で解凍し、３０秒間１０，０００ｒｐｍにてポリトロンホモジナイザーを使用してすぐにホモジナイズした。全ＲＮＡ（３０ｎｇ）を、オリゴ(dT)を用いるSensiscript RT kit（Qiagen Inc社製、Valencia、CA）を使用することにより２０μｌ中で逆転写した（Chao, C.S., Loomis, Z. L., Lee, J. E., & Sussel, L. Genetic identification of a novel NeuroD1 function in the early differentiation of islet alpha, PP and epsilon cells. Dev. Biol. 312, 523-532 (2007)）。反応混合物を、４２℃にて５０分間インキュベートし、続いてさらに７０℃にて１５分間インキュベートした。ＰＣＲを、２μｌのｃＤＮＡ、２５μｌのHotStarTaq Master Mix（Qiagen Inc社製、Valencia、CA）、及び２０ｐｍｏｌの各プライマーを含有する５０μｌの体積中でGeneAmp PCR System 9700（PE ABI社製、Foster City、CA、USA）を使用して全ての試料について実施した。対応するＰＣＲ産物を、アガロースゲル電気泳動により確認し、QIAquick Gel Extraction kit（Qiagen Inc社製、Valencia、CA）により精製した。配列を確認するために、ＰＣＲ産物の直接配列決定を、ABI 3100 Genomic AnalyzerでdRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems社製、Foster City、CA)を用いて実施した。全ての転写因子遺伝子ｃＤＮＡを、ＲＩＰ３．１により駆動するベクターにサブクローニングした。プラスミド消化、ライゲーション、サブクローン、単離及び精製を、標準的な手段により実施し、人工変異が存在しないことを確認するために再度配列決定した。

【００７１】

動物における手順及びＵＴＭＤ。全ての動物研究は、国立衛生研究所（ＮＩＨ、National Institute of Health）の推奨及び動物実験委員会の承認に従って行った。オスのSprague-Dawleyラット（２３０～２７０ｇ）をケタミン（６０ｍｇ／ｋｇ）及びキシラジン（５ｍｇ／ｋｇ）の腹腔内投与により麻酔し、左の腹部及び頸部の毛を剃り、ポリエチレンチューブ（PE50、Becton Dickinson社製、Franklin Lakes、TN、USA）を切開により右内頸静脈に挿入した。

【００７２】

４５匹の全ラットに以下の９つの処理のうちの１つを行った：（１）未処理（正常な対照ラット、ｎ＝３）、（２）ＵＴＭＤを行わずＳＴＺ（６０ｍｇ／ｋｇ／腹腔内、Sigma社製、St Louis、MO、USA）のみ（Ｎ＝３）、（３）ＳＴＺ及びＤｓＲｅｄを用いたＵＴＭＤ（ｎ＝３）、（４）ＳＴＺ及びｎｇｎ３を用いたＵＴＭＤ（ｎ＝６）、（５）ＳＴＺ及びＮｅｕｒｏＤを用いたＵＴＭＤ（ｎ＝６）、（６）ＳＴＺ及びＰａｘ４を用いたＵＴＭＤ（ｎ＝６）、（７）ＳＴＺ及びＮｋｘ２．２を用いたＵＴＭＤ（ｎ＝６）、（８）ＳＴＺ及びＮｋｘ６．１を用いたＵＴＭＤ（ｎ＝６）、（９）ＳＴＺ及びＭａｆＡを用いたＵＴＭＤ（ｎ＝６）。全ての遺伝子をＲＩＰ３．１プロモーターの制御下のプラスミドｃＤＮＡとして送達した。血糖をＳＴＺ注入の１２時間後に測定した。２５０ｍｇ／ｄｌ以上の空腹時血糖を有する動物を成功した１型糖尿病モデルとみなし、続いてＳＴＺ処理の４８時間以内にＵＴＭＤを与えた。マイクロバブル又は対照溶液（０．５ｍｌのリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ、phosphate buffered solution）で希釈した０．５ｍｌ）を、ポンプ（Genie、Kent Scientific社製、Torrington、CT、USA）を介して１０分間にわたり注入した。注入の間、市販の超音波振動子（S3、Sonos 5500、Philips Ultrasound社製、Bothell、WA、USA）を使用して、超音波を膵臓に当てた。プローブを適当な位置に固定した。次に、超音波を１．４のメカニカルインデクッスの超高調波モード（送信１．３ＭＨｚ／受信３．６ＭＨｚ）で適用した。Ｒ波のピーク後の４５～７０ｍｓの遅延を用いた心電図により、４回の収縮末期毎に超音波のバーストを４回生じさせた。これらの設定は、この装置を用いたＵＴＭＤによるプラスミドの送達に最適であることが示されている（Chen, S., et al. Efficient gene delivery to pancreatic islets with ultrasonic mic

robubble destruction technology. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 8469-8474 (2006))。バブル破壊は、全てのラットにおいて視覚的に明らかであった。ＵＴＭＤの後、頸静脈を結紮し、皮膚を縫合し、動物を回復させた。血液サンプルを、一晩１２時間絶食させた後、ベースラインとして、並びに、処理の異なる日後に採取した。この手順を、過量のペントバルビタールナトリウム（１２０ｍｇ／ｋｇ）を使用して、１０、２０、及び３０日目に屠殺したラットで３回繰り返した。膵臓、肝臓、脾臓、及び腎臓を組織学のために採取した。血糖値を、血糖試験紙（Precision、Abbott社製、Abbott Park、IL、USA）を用いて測定し、血中インスリン、Ｃ－ペプチドを、ＲＩＡキット（Linco Research社製、Radioimmunoassay、Billerica、MA、USA）を用いて測定した。

【００７３】

プラスミドを含有する、脂質で安定化させたマイクロバブルの製造。脂質で安定化させたマイクロバブルを、本発明者らの実験室において以前に記載したように調製した。簡潔に述べると、２．５ｍｇ／ｍｌのＤＰＰＣ（１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルコリン、Sigma社製、St.Louis、MO）、０．５ｍｇ／ｍｌのＤＰＰＥ（１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルエタノールアミン、Sigma社製、St.Louis、MO）、及び１０％のグリセロールを、２：１の比で２ｍｇのプラスミド溶液と混合した。このリン脂質－プラスミド溶液の０．５ｍｌの一定分量を１．５ｍｌの透明なバイアルに入れ、上部の残っている空間にペルフルオロプロパンガス（Air Products,Inc社製、Allentown、PA）を満たした。各バイアルを４℃で３０分間インキュベートし、次いで歯科用混合器（Vialmix（商標）、Bristol-Myers Squibb Medical Imaging社製、N.Billerica、MA）によって３０秒間、機械的に振動させた。脂質で安定化させたマイクロバブルは、未結合のプラスミドＤＮＡを含有している液体の層の上部に浮遊している乳状の白色懸濁物として現れる。上層におけるマイクロバブルの平均直径及び濃度を、粒子計数器（Beckman Coulter Multisizer III）によって測定した。

【００７４】

免疫組織化学。厚さ５～８μｍのクリオスタット切片を、４℃で１５分間、４％パラホルムアルデヒド中で固定し、ＰＢＳ中の１０ｍＭのグリシンを用いて５分間反応を止めた。次いで切片をＰＢＳ中で３回すすぎ、ＰＢＳ中の０．５％のTriton X-100で１０分間透過処理した。切片を、１０％ヤギ血清を用いて３７℃で１時間ブロックし、ＰＢＳで３回洗浄した。一次抗体（１：５００希釈のマウス抗インスリン抗体、１：５００のウサギ抗グルカゴン、１：５００のウサギ抗ソマトスタチン、１：５００のウサギ抗膵臓ポリペプチド、１：５００のウサギ抗ＮｅｕｒｏＤ１、１：５００のウサギ抗Ｋｉ－６７、ウサギ抗ＢｒＤｕ（Sigma社製、St.Louis、MO）、１：２０００希釈のマウス抗ｃｋ１９（Chemicon社製、Temecula、CA）を加え、室温で２時間インキュベートした。５分間にわたりＰＢＳで３回洗浄した後、二次抗体（Sigma社製、St;Louis、MO）である、ＦＩＴＣ結合抗マウスＩｇＧ、Ｃｙ５結合抗ウサギＩｇＧ）（ブロック溶液中に１：５００の希釈）を加え、室温で１時間インキュベートした。切片をＰＢＳで１０分間、５回すすぎ、その後載せた。

【００７５】

データ分析。Statviewソフトウェア（SAS社製、Cary、NC、USA）を用いてデータを分析した。結果は平均±１標準偏差で表す。差はフィッシャーのpost hoc検定を用いて反復測定ＡＮＯＶＡにより分析し、ｐ＜０．０５で有意であるとみなした。

【００７６】

膵臓内分泌物の胎生発育は、種々の転写因子及び他のタンパク質をコードする、多くの遺伝子の活性化に関連している（Scharfman, R. Control of early development of the pancreas in rodents and humans: implications of signals from the mesenchyme. Diabetologia 43, 1083-1092 (2000)、Bouwens, L., & Rooman, I. Regulation of pancreatic beta-cell mass. Physiol. Rev. 85, 1255-1270 (2005))。新生児の内分泌発育と、糖尿病に罹患している成体動物における膵島再生との間に重要な相違があり得ると認識したので、本発明者らは、後者の膵島再生が、ＵＴＭＤによって膵臓を標的とする遺伝

子治療により、成し遂げられ得るか否かを評価することを試みた。Ｎｇｎ３、ＮｅｕｒｏＤ１、Ｐａｘ４、Ｎｋｘ２．２、Ｎｋｘ６．１、及びＭａｆＡについてのｃＤＮＡをコードするプラスミドを、ラットインスリンプロモーター（ＲＩＰ３．１）の切断型の制御下で構築した。これらの遺伝子を含有するマイクロバブルを、２０分間にわたって静脈内に注入し、一方で、膵臓の微小循環におけるマイクロバブルを破壊するために超音波を使用した。ＵＴＭＤを、ＳＴＺ（６０ｍｇ／ｋｇ）の腹腔内投与による糖尿病の誘導から４８時間後に実施した。対照は、マーカー遺伝子（ＲＩＰ３．１－ＤｓＲｅｄ）を有するＵＴＭＤ、遺伝子治療を行わないＳＴＺのみ、及びＳＴＺを与えなかった正常な対照を含んだ。１０日、２０日、及び３０日に屠殺した、３回の異なる反復実験を実施し、膵島の形態及び遺伝子発現を評価した。３０日の研究の結果をここに論じ、図６～８にまとめる。

【００７７】

図６は、ＦＩＴＣで標識した抗インスリン抗体（緑）及びＣＹ５で標識した抗グルカゴン抗体（赤）で染色した代表的な組織学的試料を示す。これらの切片は、ＵＴＭＤの３０日後に屠殺したラットの群から得た。正常なラットは、膵島の周辺において少数のアルファ細胞（赤）により囲まれているベータ細胞（緑）の中心部を有する。ＳＴＺの後、正常な膵島構造は実質的になくなり、たまたま孤立したベータ細胞又はベータ細胞の小さな塊が残っている。Ｎｇｎ３、Ｐａｘ４、Ｎｋｘ２．２、Ｎｋｘ６．１、及びＭａｆＡでの遺伝子治療により、膵島の一部の再生が生じたが、アルファ細胞が優勢である異常な膵島構造である。対照的に、ＮｅｕｒｏＤ１での遺伝子治療により、ほぼ正常な形態を有する膵島の再生が生じた。興味深いことに、ＵＴＭＤ遺伝子治療群において抗インスリン及び抗グルカゴンで同時染色した少数の細胞が存在したが、正常な膵島では存在しなかった。この研究結果は、内分泌物増殖に関するマーカーであると以前に報告されている（Nir, T., Melton, D.A., & Dor, Y. Recovery from diabetes in mice by β cell regeneration. J. Clin. Invest. 117, 2553-2561 (2007)）。正常なラットにおいて、ＳＴＺ処理単独の後の３±２個のみと比較して、スライド当たり６１±６個の膵島が存在した。ＮｅｕｒｏＤ１は、スライド当たり３７±４個の膵島を生じ、これは、正常な対照を除いて全ての他の群よりも高い、統計的に有意な数字であった（Ｐ＜０．０００１）。膵島当たりのベータ細胞の割合は、正常な対照において平均すると７７±１０％であり、ＮｅｕｒｏＤ１遺伝子治療で処理したラットにおいて６０±６％であった。全ての他の群は、膵島当たり著しく減少した数のベータ細胞を有した。ベータ細胞の割合は、全ての他の遺伝子及び対照より、ＮｅｕｒｏＤ１で処理したラットに関して統計的に有意に高かった（Ｐ＜０．０００１）が、正常な対照未満であった（Ｐ＝０．０００６）。加えて、この図に示した切片と隣接する切片を抗ソマトスタチン及び抗ポリペプチドで染色して、デルタ細胞及びポリペプチド細胞の存在をそれぞれ評価した（データは示さず）。ＮｅｕｒｏＤ１は、正常な対照と同様に、膵島の中心部において相当数のデルタ細胞及びポリペプチド細胞を生じた。他の転写因子は、膵島内にデルタ細胞又はポリペプチド細胞をそう多くは生じなかった。

【００７８】

図７は、血糖（上左図）、インスリン（下左図）、及びＣ－ペプチド（上右図）の血中濃度を、ＳＴＺの３日後、及びＳＴＺの３０日後をベースラインとして示す。血糖は、ＳＴＺ（約４００ｍｇ／ｄｌ）で処理した全てのラットにおいて３日目までに劇的に増加し、ＮｅｕｒｏＤ１で処理したラットを除いて３０日目に増加したままであった。３０日目に、血糖は、ＮｅｕｒｏＤ１で処理したラットにおいて１０１±１１ｍｇ／ｄｌであり、これは、正常な対照からのものを除く、全ての他のＳＴＺで処理した群より、統計的に有意に低かった（Ｐ＜０．０００１）。より短期間の実験において、血糖はまた、ＮｅｕｒｏＤ１で処理したラットにおいて１０日目及び２０日目にも正常であった。図７の中央及び下の図は、インスリン及びＣ－ペプチドレベルが、全てのＳＴＺで処理したラットにおいて３日目に著しく低下したことを示す。３０日までに、インスリン及びＣ－ペプチドレベルは、ＮｅｕｒｏＤ１で処理したラットにおいてほぼ正常であり、これは、３日目又は全ての他のＳＴＺで処理した群より、統計的に有意に高い（Ｐ＜０．０００１）。これら

のインスリン及びＣ－ペプチドレベルがグルコース応答性であるか否かを決定するために、別の群の６匹のＮｅｕｒｏＤ１で処理したラット及び対照（３匹は正常、３匹はＳＴＺ－ＤｓＲｅｄ）に、ＵＴＭＤの３０日後、耐糖能試験を行った。図７の下右図に示すように、ＮｅｕｒｏＤ１で処理したラットは、正常な対照とほぼ同一の耐糖能試験を有した。

【００７９】

図８は、細胞増殖を表す、ＢｒｄＵ（上左）及びＫｉ６７（上中央）染色の結果を示す。それらは、ＮｅｕｒｏＤ１で処理したラット由来の単一の膵島の高倍率画像である。ＢｒｄＵ（赤、上左図）及びＫｉ６７（赤、上中央図）で染色した核は、インスリン陽性（緑）細胞に存在する。正常、及びＳＴＺで処理した対照群と比較すると、ＢｒｄＵ及びＫｉ６７陽性細胞の両方は、それぞれ、インスリン陽性細胞の３０±２％及び１０±２％で統計的に有意であり、より多かった（ｐ＜０．０００１）。正常対照は、ＢｒｄＵ染色の形跡を有さず、Ｋｉ６７について陽性である稀少な細胞のみであった。下図は、ＣＫ１９（緑、一番左の図）、インスリン（赤、左中央図）、ニューロゲニン３（青、右中央図）、及び合わせた画像（一番右の図）についての免疫蛍光染色を示す。ＣＫ１９、導管細胞マーカーと、インスリン又はニューロゲニン３との共局在化は存在しないが、後者の２つのマーカーは、膵島中心のベータ細胞内に共局在化する。これは、膵島再生が導管細胞に由来しないようであることを示している。

【００８０】

この研究は、ＳＴＺで処理したラットの膵臓を標的とするＮｅｕｒｏＤ１のインビボでの送達により、グルコース、インスリン、及びＣ－ペプチドの正常な血中レベルを回復する、ほぼ正常に現れる膵島の再生が生じることを示す。ＵＴＭＤ法は、膵島にとって正常な環境である、膵臓への遺伝子送達の非侵襲性標的を可能にする。ＵＴＭＤによってプラスミドとして送達されるレポーター遺伝子のピーク発現は４日であり、その後急速に分解する（Chen, S., et al. Efficient gene delivery to pancreatic islets with ultrasonic microbubble destruction technology. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 8469-8474 (2006)）。したがって、この方法による一過性遺伝子発現は膵島再生を誘発でき、一方で、理論的に、外来遺伝子治療の長期の発現に関連する可能性がある腫瘍形成の危険性を最小化する。

【００８１】

ＮｅｕｒｏＤ１は、膵臓、腸、及び中枢神経系に見出される、基本的なヘリックス－ループ－ヘリックス転写因子である（Naya, F. J., Stellrecht, C.M., & Tsai, M. J. Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. Genes Dev. 9,1009-1019 (1995)）。ＮｅｕｒｏＤ１は膵芽発生時に存在し、全ての成熟膵島細胞型において検出可能であり続ける。ＮｅｕｒｏＤ１ノックアウトマウスにおいて、全ての内分泌細胞型が発生するが、膵島の数は少なく、ベータ細胞アポトーシスが増加している（Naya F. J., et al. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. Genes Dev. 11, 2323-2334 (1997)）。ＮｅｕｒｏＤ１は早期分化に必須ではないが、ベータ細胞の後期分化及び維持、並びに細胞運命決定に重要な役割を果たすと考えられている（Dhawan, S., Georgia, S., & Bhushan, A. Formation and regeneration of the endocrine pancreas. Curr. Opin. Cell Biol. 19, 634-645 (2007)、Chao, C.S., Loomis, Z. L., Lee, J. E., & Sussel, L. Genetic identification of a novel NeuroD1 function in the early differentiation of islet alpha, PP and epsilon cells. Dev. Biol. 312, 523-532 (2007)）。トランスジェニックマウスでの研究に主に基づいているが、内分泌物発生におけるＮｅｕｒｏＤ１の役割のこの見解は、本研究における複数の細胞型を含む膵島の膵島再生の観察された研究結果と一致する。

【００８２】

他の転写因子、特に、Ｎｇｎ３、Ｐａｘ４、Ｎｋｘ２．２、Ｎｋｘ６．１、及びＭａｆＡもまた、膵島再生を生じるが、その膵島は主にアルファ細胞から構成され、血糖、インスリン、及びＣ－ペプチドは正常化しなかった。興味深いことに、Ｐｄｘ１プロモーター

の調節下でＮｇｎ３を発現するトランスジェニックマウスは、Ｎｇｎ３のインビボ送達後の本発明者らの研究結果と同様の、大部分のグルカゴン陽性細胞を示す（Apelqvist, A., et al. Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. Nature 400, 877-881 (1999)）。Ｎｇｎ３がニワトリの腸を発生する際に過剰発現する場合、Ｎｇｎ３はまた、主にアルファ細胞を産生する（Grapin-Botton, A., Majithia, A.R., & Melton, D.A. Key evenrs of pancreas formation are triggered in gut endoderm by ectopic expression of pancreatic regulatory genes. Genes Dev. 15, 444-454 (2001)）。糖尿病を罹患している成体の動物に対して外部から送達される場合、これらの転写因子の役割は、胎生発育におけるそれらの転写因子の役割とは異なり得る。膵臓発生又は細胞周期に関与する転写因子遺伝子又は他の遺伝子の様々な組合せにより、この研究において観察されたものより、さらにより強力な膵島再生を生じさせることも可能である。例えば、Chen, et alは、腺房細胞によるインスリン産生が、インビボで送達されるベータセルリン及びＰｄｘ１プラスミドを組み合わせることにより、ＳＴＺで処理したラットにおいて誘発でき、正常な血糖及びインスリンを１５日までの間に回復させることを示した（Wang Z, Ma HI, Li J, Sun L, Zhang J, Xiao X: Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. Gene Ther 10:2105-2111, 2003）。より最近、Zhou, et alは、免疫不全マウスの膵臓へのアデノウイルスの直接注入によって送達される、Ｎｇｎ３、ＭａｆＡ、及びＰｄｘ１の組合せが、ベータ細胞表現型に対する外分泌細胞の再プログラミングを生じることを報告している（Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., & Melton, D.A. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β－cells. Nature [epub ahead of print] (2008)）。それらの新しいベータ細胞は、膵島内で凝集するというよりむしろ、単一細胞又は少数の細胞のみの小さな塊内で分離していた。血糖、インスリン、及びＣ－ペプチドは改善されたが、正常なレベルには回復しなかった。単一の転写因子が送達される場合、新しいベータ細胞は有意な数で見られなかった。本研究は少なくとも２つの潜在的に重要な点で異なる。第１に、非ウイルス遺伝子送達法を、直接注入と異なり、膵臓全体を標的とするように使用した。第２に、ベータ細胞特異的プロモーターを、膵臓内分泌物を標的とするように使用した。一般的に使用されるＣＭＶプロモーターは、外分泌物に非常に効果的であるが、膵臓内分泌物に効果的ではない（Zhan, Y., Brady, J.L., Johnston, A.M., & Lew, A.M. Predominate transgene expression in exocrine pancreas directed by the CMV promoter. D.N.A Cell Biol. 19, 639-645 (2000)）。同様に、アデノウイルスは、膵臓内分泌物より、外分泌物においてより強力である（Wang, A.Y., Peng, P.D., Ehrhardt, A., Storm, T.A., & Kay, M.A. Comparison of adenoviral and adeno-associated viral vectors for pancreatic gene delivery in vivo. Hum. Gene Ther. 15,405-413 (2004)）。

【００８３】

図９は、組み合わせて処理した場合のサイクリンＤ２、ＣＤＫ４、及びＧＬＰ１の組合せを含むＵＴＭＤ組成物で処理した安定な膵島の画像を示す（膵島は１８０日まで安定であった）。上左図は、ＵＴＭＤで処理されていない正常な対照ラット由来の代表的な膵島を示す。インスリンを発現するベータ細胞の高密度の膵島の中心部が、グルカゴンを発現する周辺アルファ細胞（赤）の小さな被膜によって囲まれて存在している（緑）。上右図は、ＳＴＺにより誘発された糖尿病後の代表的な膵島残部を示す。少数の拍動細胞のみが存在している。下左図は、ＧＬＰ１遺伝子を用いるＵＴＭＤ後の膵島再生の例を示す。正常より少ない膵島が、いくつかのベータ細胞（緑）及びアルファ細胞（赤）とともに存在しているが、構造は正常ではない。単一の遺伝子、サイクリンＤ２、ＣＤＫ４、及びＣＤＫ６を使用するＵＴＭＤで処理したラットに関して、同様の研究結果が提示された（示さず）。下右図は、サイクリンＤ２、ＣＤＫ４、及びＧＬＰ１の組合せを用いるＵＴＭＤ後のほぼ正常な膵島を示す（それらの膵島は１８０日まで安定であり、正常な血糖、インスリン及びＣ－ペプチドレベルを有する糖尿病の回復を伴った）。

【００８４】

図１０は、ＵＴＭＤ遺伝子治療で処理したラット、並びに正常な対照、及びＵＴＭＤ処理を行わないＳＴＺ糖尿病ラットの様々な群における膵島の経時的な血糖レベルを示すプロットである。示され得るように、サイクリンＤ２、ＣＤＫ４、ＣＤＫ６、又はＧＬＰ１での単一の遺伝子治療は血糖の正常化を生じなかった。しかし、この特定の実験において、サイクリンＤ２、ＣＤＫ４、及びＧＬＰ１、又はサイクリンＤ２、ＣＤＫ４、ＣＤＫ６、及びＧＬＰ１の組合せを含む組成物は、４週間で血糖を正常なレベルまで回復させた。別の群の動物の長期間の研究により、１８０日までの効果持続期間が確認された。

【００８５】

膵島再生は、種々の遺伝子を肝臓に送達するためにアデノウイルスを使用することによって、ＳＴＺにより媒介される糖尿病において成し遂げられ、結果として正常な血糖の回復が生じる（Ferber, S., et al. Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. Nat. Med. 6, 568-572 (2000)、Kojima, H., et al. NeuroD-betacellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice. Nat. Med. 9, 596-603 (2003)、Kaneto, H., et al. PDX-1/VP16 fusion protein, together with NeuroD or Ngn3, markedly induces insulin gene transcription and ameliorates glucose tolerance. Diabetes 54, 1009-1022 (2005)）。しかし、アデノウイルスは、安全性についての配慮のためにヒトの使用に適切ではない。肝臓は膵島再生及び膵島移植のために適切な臓器であるが、本発明は、比較的有効な臓器特異性を有する膵臓全体にプラスミドｃＤＮＡを送達するために超音波により媒介されるマイクロバブル破壊を使用する（Chen, S., et al. Efficient gene delivery to pancreatic islets with ultrasonic microbubble destruction technology. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 8469-8474 (2006)、Chen, S., et al. Reversal of streptozotocin-induced diabetes in rats by gene therapy with betacellulin and pancreatic duodenal homeobox-1. Gene Therapy 14, 1102-1110 (2007)）。膵臓は膵島のための正常な生理学的環境であるため、膵臓を標的とすることは膵島再生及び維持に利点を与える。

【００８６】

再生した膵島は、ＳＴＺによる処理で生存している散在しているベータ細胞の複製を示し得る。Ｃｋ１９、導管細胞マーカーを用いる免疫組織化学的染色は、再生した膵島において有意な摂取を全く示さなかった。ＳＴＺ処理の後すぐに、又はＳＴＺ処理の後４８時間以内に遺伝子送達が施された場合、膵島再生が発生するように見えた。ＳＴＺから７日後に遺伝子送達を用いる実験を繰り返した場合、その期間において、ＳＴＺ対照ラットにおいて実質的にインスリン染色細胞は見られず、膵島再生は見られず、重症高血糖及び体重損失が進行した。強力なベータ細胞特異性であり（Chen, S., et al. Efficient gene delivery to pancreatic islets with ultrasonic microbubble destruction technology. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 8469-8474 (2006)）、膵臓内分泌物において十分な活性を有さないと予想される、ラットインスリンＩプロモーターの修飾を使用した。これらの検討は、ベータ細胞複製がベータ細胞塊を増加させるための主な機構である、一般的見解と一致する（Nir, T., Melton, D.A., & Dor, Y. Recovery from diabetes in mice by β cell regeneration. J. Clin. Invest. 117, 2553-2561 (2007)、Dor, Y., Brown, J., Martinez, O.I., & Melton, D.A. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem cell differentiation. Nature 429, 41-46 (2004)、Teta, M., Rankin, M.M., Long, S.Y., Stein, G.M., & Kushner, J.A. Growth and regeneration of adult β cells does not involve specialized progenitors. Dev. Cell 12, 817-826 (2007)）。ベータ細胞特異的プロモーターの制御下での種々の転写因子を用いる生存ベータ細胞の刺激により、相当数のアルファ細胞、デルタ細胞、及びポリペプチド細胞が生じることは興味深い。このことは、これらの転写因子、特にＮｅｕｒｏＤ１が、膵島内で増殖し、凝集するためにベータ細胞を誘発するだけでなく、同様に他の膵島細胞型も形成することを示唆している。このことが発生する機構はまだ解明されていない。

【００８７】
糖尿病患者において膵島再生を促進するために遺伝子治療を使用する概念は妥当と思われる。Meier, et alは、長期にわたるＩ型糖尿病を罹患している成人由来の剖検標本の８８％が、相当数のベータ細胞、並びにベータ細胞アポトーシス及びＴリンパ球浸潤を有することを示した（Meier, J.J., Bhushan, A., Butler, A.E., Rizza, R.A., Butler, P.C. Sustained beta cell apoptosis in patients with long-standing type I diabetes: indirect evidence for islet regeneration? Diabetologia 48, 2221-2228 (2005)）。したがって、存在しているベータ細胞は、単独で、又は他の転写因子と組み合わせてＮｅｕｒｏＤ１を用いる再生遺伝子治療についての潜在的な標的である。しかしながら、膵島を再生するための任意の戦略はまた、アポトーシス、炎症、又は自己免疫による新しい膵島の潜在的な破壊も考慮に入れなければならないだろう。アポトーシス（Dror, V., et al. Notch signaling suppresses apoptosis in adult human and mouse pancreatic islet cells. Diabetologia 50, 2504-2515 (2007)、Drucker, D.J. Glucagon-like peptide-1 and the islet beta-cell: augmentation of cell proliferation and inhibition of apoptosis. Endocrinology. 144, 5145-5148 (2003)、Noguchi, H., et al. Activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) pathway during islet transplantation and prevention of islet graft loss by intraportal injection of JNK inhibitor. Diabetologia 50, 612-619 (2007)、Lin, C.Y., Gurlo, T., Haataja, L., Hsueh, W.A., Butler, P.C. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by rosiglitazone protects human islet cells against human islet amyloid polypeptide toxicity by a phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent pathway. J. Clin. Endocrinol. Metab. 90, 6678-6686 (2005)）、及び／又は自己免疫反応を阻害する遺伝子又は薬物と、再生遺伝子とを組み合わせることも可能である。後者の自己免疫反応を阻害する遺伝子又は薬物に関して、最近の証拠により、タクロリムス及びシロリムスがベータ細胞に対する毒性作用に関与する可能性があることが示唆されている（Nir, T., Melton, D.A., & Dor, Y. Recovery from diabetes in mice by β cell regeneration. J. Clin. Invest. 117, 2553-2561 (2007)）。最適な免疫抑制療法は、患者の必要性及び（もしあれば）免疫応答に基づいて確立されている。最後に、齧歯動物とヒトの膵島の生態との重要な相違が存在する（Butler, P.C., Meier, J.J., Butler, A.E., & Bhushan A. The replication of β cells in normal physiology, in disease, and for therapy. Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab. 3, 758-768 (2007)）ので、これらの研究結果は、ヒトでの試験が意図され得る前に、高等動物において確認する必要がある。

【００８８】
本明細書で論じられたいかなる実施形態も、本発明のいかなる方法、キット、試薬、又は組成物に関しても、実行することができ、逆も同様であることが企図される。さらに、本発明の組成物は、本発明の方法を達成するために用いることができる。

【００８９】
本明細書に記載された特定の実施形態は、例証として示されており、本発明の限定として示されるのではないことは、理解されるだろう。本発明の主な特徴は、本発明の範囲から逸脱することなく、様々な実施形態に用いることができる。当業者は、本明細書に記載された特定の手順の多数の等価物を認識し、又は日常的な実験だけを用いて確かめることができるであろう。そのような等価物は、本発明の範囲内にあるとみなされ、特許請求の範囲によって網羅されている。

【００９０】
本明細書で言及された全ての刊行物及び特許出願は、本発明に関する当業者の技術のレベルを示している。全ての刊行物及び特許出願は、あたかもそれぞれ個々の刊行物又は特許出願が明確且つ個別に示されて参照により組み入れられているかのように、同じ程度で、参照により本明細書に組み入れられている。

【００９１】
特許請求の範囲及び／又は本明細書において用語「含むこと（comprising）」と共に用

いられる場合の用語「１つの（a）」又は「１つの（an）」の使用は、「１つの（one）」を意味することができるが、それはまた、「１又は２以上」、「少なくとも１の」、及び「１又は１より多い」という意味と一致する。特許請求の範囲における用語「又は」の使用は、代替物のみを指す、又は代替物が相互排他的であることを明確に示されていない限り、「及び／又は」を意味するように用いられるが、本開示は、代替物のみを指す定義と「及び／又は」を指す定義を支持する。本出願を通して、用語「約」は、値が、装置、その値を決定するために用いられることになっている方法についての誤差の固有の変動、又は研究対象間に存在する変動を含むことを示すために用いられる。

【００９２】

本明細書及び特許請求の範囲に用いられる場合、用語「含むこと（comprising）」（及び「含む（comprise）」及び「含む（comprises）」などの含むこと（comprising）の任意の形）、「有すること（having）」（及び「有する（have）」及び「有する（has）」などの有すること（having）の任意の形）、「含むこと（including）」（及び「含む（includes）」及び「含む（include）」などの含むこと（including）の任意の形）、又は「含むこと（containing）」（及び「含む（contains）」及び「含む（contain）」などの含むこと（containing）の任意の形）は、包括的であり、又は限度を設定せず、追加の列挙されていない要素又は方法ステップを除外しない。

【００９３】

本明細書に用いられる場合、用語「又はそれらの組合せ」は、その用語の前にある列挙された項目の全ての順列及び組合せを指す。例えば、「Ａ、Ｂ、Ｃ、又はそれらの組合せ」は、Ａ、Ｂ、Ｃ、ＡＢ、ＡＣ、ＢＣ、又はＡＢＣ、及び特定の状況において順序が重要である場合には、ＢＡ、ＣＡ、ＣＢ、ＣＢＡ、ＢＣＡ、ＡＣＢ、ＢＡＣ、又はＣＡＢもの少なくとも１つを含むことを意図される。この例に関して引き続き述べると、ＢＢ、ＡＡＡ、ＭＢ、ＢＢＣ、ＡＡＡＢＣＣＣＣ、ＣＢＢＡＡＡ、ＣＡＢＡＢＢなどの１又は２以上の項目又は用語の反復を含む組合せが明確に含まれる。当業者は、状況から他に明らかなことがない限り、典型的には、任意の組合せにおいて項目又は用語の数への制限はないことを理解しているだろう。

【００９４】

本明細書に開示及び主張された組成物及び／又は方法の全ては、本開示に照らせば、過度の実験なしに作製し、実行することができる。本発明の組成物及び方法は、好ましい実施形態に関して記載されているが、本明細書に記載された組成物及び／又は方法、及び方法のステップにおいて、又はステップの順序において、本発明の概念、精神、及び範囲から逸脱することなく、改変を適用することができることは、当業者にとって明らかである。当業者にとって明らかな全てのそのような類似した代替形態及び修正形態は、添付された特許請求の範囲によって定義される本発明の精神、範囲、及び概念内にあると考えられる。

【００９５】

（参考文献）

1. Newgard CB: While tinkering with the s-cell metabolic regulatory mechanisms and new therapeutic strategies: American Diabetes Association Lilly Lecture, 2001. Diabetes 51:3141-3150, 2002

2. Bonner-Weir, S. and Weir, G.C. New sources of pancreatic s-cells. Nat. Biotechnol. 23:857-861, 2005

3. Samson, SL, Chan L. Gene therapy for diabetes: reinventing the islet. Trends in endocrinology and metabolism 17:92-100, 2006

4. McClane SJ, Chirmule N, Burke CV, Raper SE: Characterization of the immune response after local delivery of recombinant adenovirus in murine pancreas and successful strategies for readministration. Human Gene Ther 8:2207-2216, 1997

5. Ayuso E, Chillon M, Agudo J, Haurigot V, Bosch A, Carretero A, Otaegui PJ, Bosch F: In vivo gene transfer to pancreatic beta cells by systemic delivery of ad

enoviral vectors. Human Gene Ther 15:805-812, 2004
6. Wang AY, Peng PD, Ehrhardt A, Storm TA, Kay MA: Comparison of adenoviral and adeno-associated viral vectors for pancreatic gene delivery in vivo. Human Gene Ther 15:405-413, 2004
7. Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson JM: Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. Proc Natl Acad Sci U S A 99:11854-11859, 2002
8. Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, Lu Y, Calcedo R, Zhou X, Wilson JM: Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. J Virol 78:6381-6388, 2004
9. Wang Z, Ma HI, Li J, Sun L, Zhang J, Xiao X: Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. Gene Ther 10:2105-2111, 2003
10. McCarty DM, Fu H, Monahan PE, Toulson CE, Naik P, Samulski RJ: Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. Gene Ther 10:2112-2118, 2003

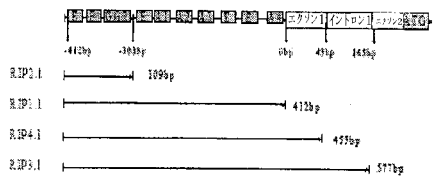
【００９６】

インビボにおいて送達される膵島転写因子遺伝子による膵島の再生及びストレプトゾトシン誘発性の糖尿病の回復

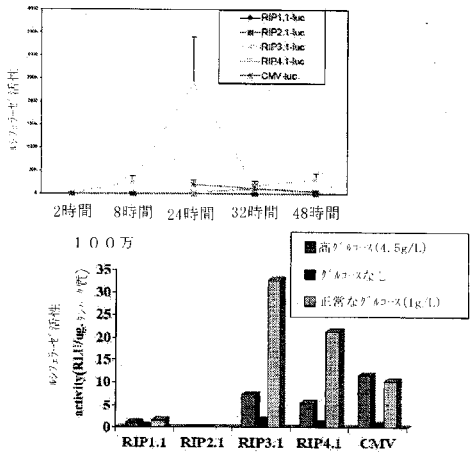
1. Bonner-Weir, S., & Wier, G.C. New sources of pancreatic β-cells. Nat. Biotechnol. 23, 857-861 (2005)
2. Butler, P.C., Meier, J.J., Butler, A.E., & Bhushan A. The replication of β cells in normal physiology, in disease, and for therapy. Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab. 3, 758-768 (2007)
3. Shapiro, A.M., et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. New Engl. J. Med. 355, 1318-1330 (2006)
4. Ferber, S., et al. Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. Nat. Med. 6, 568-572 (2000)
5. Kojima, H., et al. NeuroD-betacellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice. Nat. Med. 9, 596-603 (2003)
6. Kaneto, H., et al. PDX-1/VP16 fusion protein, together with NeuroD or Ngn3, markedly induces insulin gene transcription and ameliorates glucose tolerance. Diabetes 54, 1009-1022 (2005)
7. Wang, A. Y., Ehrhardt, A., Xu, H, & Kay, M.A. Adenovirus transduction is required for the correction of diabetes using Pdx-1 or Neurogenin-3 in the liver. Mol. Ther. 15, 255-263 (2007)
8. Chen, S., et al. Efficient gene delivery to pancreatic islets with ultrasonic microbubble destruction technology. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 8469-8474 (2006)
9. Chen, S., et al. Reversal of streptozotocin-induced diabetes in rats by gene therapy with betacellulin and pancreatic duodenal homeobox-1. Gene Therapy 14, 1102-1110 (2007)
10. Scharfman, R. Control of early development of the pancreas in rodents and humans: implications of signals from the mesenchyme. Diabetologia 43, 1083-1092 (2000)
11. Bouwens, L., & Rooman, I. Regulation of pancreatic beta-cell mass. Physiol. Rev. 85, 1255-1270 (2005)
12. Nir, T., Melton, D.A., & Dor, Y. Recovery from diabetes in mice by β cell

regeneration. J. Clin. Invest. 117, 2553-2561 (2007)
13. Naya, F. J., Stellrecht, C.M., & Tsai, M. J. Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. Genes Dev. 9,1009-1019 (1995)
14. Naya F. J., et al. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. Genes Dev. 11, 2323-2334 (1997)
15. Dhawan, S., Georgia, S., & Bhushan, A. Formation and regeneration of the endocrine pancreas. Curr. Opin. Cell Biol. 19, 634-645 (2007)
16. Chao, C.S., Loomis, Z. L., Lee, J. E., & Sussel, L. Genetic identification of a novel NeuroD1 function in the early differentiation of islet alpha, PP and epsilon cells. Dev. Biol. 312, 523-532 (2007)
17. Apelqvist, A., et al. Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. Nature 400, 877-881 (1999)
18. Grapin-Botton, A., Majithia, A.R., & Melton, D.A. Key evenrs of pancreas formation are triggered in gut endoderm by ectopic expression of pancreatic regulatory genes. Genes Dev. 15, 444-454 (2001)
19. Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., & Melton, D.A. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β−cells. Nature [epub ahead of print] (2008)
20. Zhan, Y., Brady, J.L., Johnston, A.M., & Lew, A.M. Predominate transgene expression in exocrine pancreas directed by the CMV promoter. D.N.A Cell Biol. 19, 639-645 (2000)
21. Wang, A.Y., Peng, P.D., Ehrhardt, A., Storm, T.A., & Kay, M.A. Comparison of adenoviral and adeno-associated viral vectors for pancreatic gene delivery in vivo. Hum. Gene Ther. 15,405-413 (2004)
22. Dor, Y., Brown, J., Martinez, O.I., & Melton, D.A. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem cell differentiation. Nature 429, 41-46 (2004)
23. Teta, M., Rankin, M.M., Long, S.Y., Stein, G.M., & Kushner, J.A. Growth and regeneration of adult β cells does not involve specialized progenitors. Dev. Cell 12, 817-826 (2007)
24. Meier, J.J., Bhushan, A., Butler, A.E., Rizza, R.A., Butler, P.C. Sustained beta cell apoptosis in patients with long-standing type I diabetes: indirect evidence for islet regeneration? Diabetologia 48, 2221-2228 (2005)
25. Dror, V., et al. Notch signaling suppresses apoptosis in adult human and mouse pancreatic islet cells. Diabetologia 50, 2504-2515 (2007)
26. Drucker, D.J. Glucagon-like peptide-1 and the islet beta-cell: augmentation of cell proliferation and inhibition of apoptosis. Endocrinology. 144, 5145-5148 (2003)
27. Noguchi, H., et al. Activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) pathway during islet transplantation and prevention of islet graft loss by intraportal injection of JNK inhibitor. Diabetologia 50, 612-619 (2007)
28. Lin, C.Y., Gurlo, T., Haataja, L., Hsueh, W.A., Butler, P.C. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by rosiglitazone protects human islet cells against human islet amyloid polypeptide toxicity by a phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent pathway. J. Clin. Endocrinol. Metab. 90, 6678-6686 (2005)

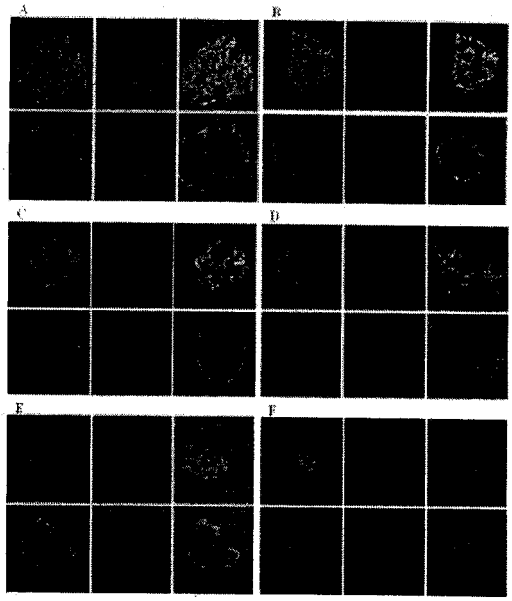
【図１】



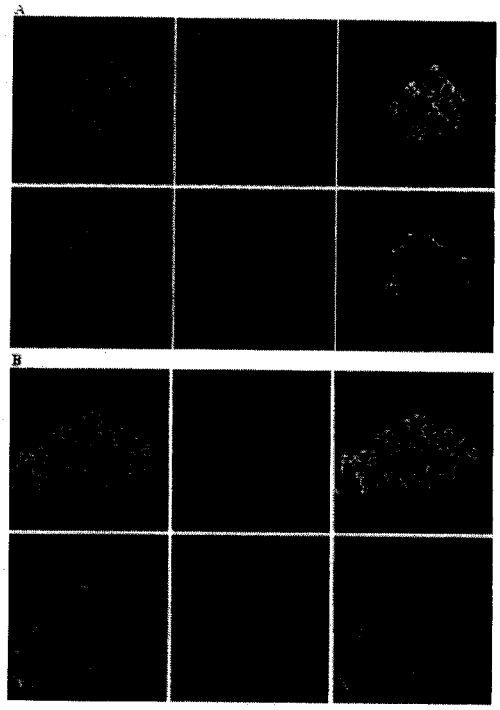
【図２】



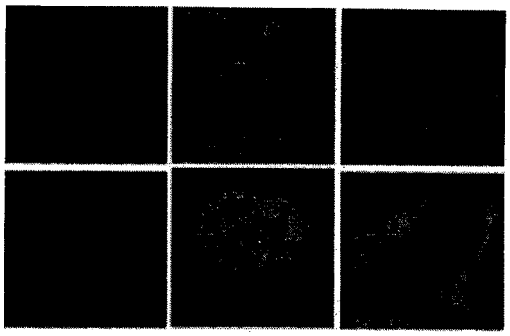
【図３】



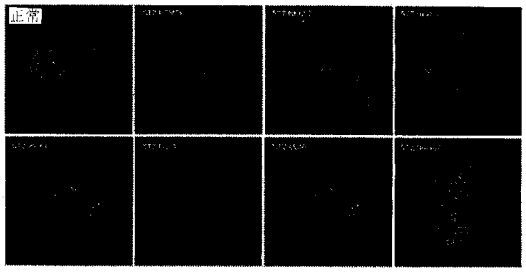
【図４】



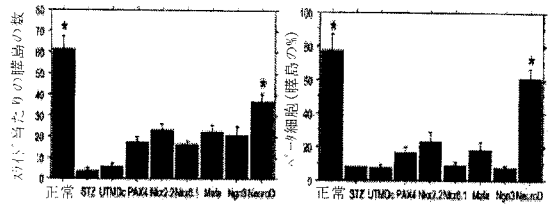
【図５】



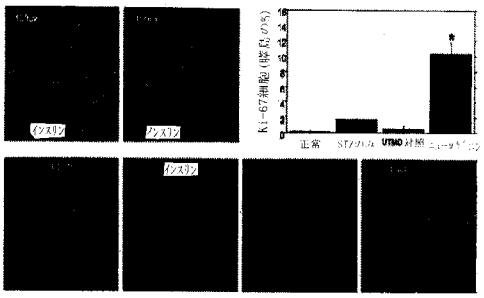
【図６】



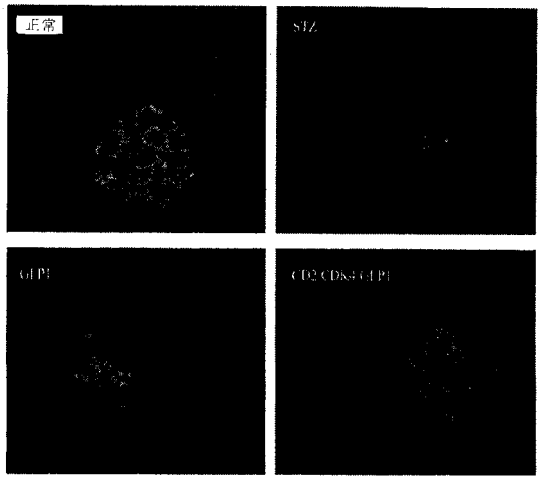
【図７】



【図８】

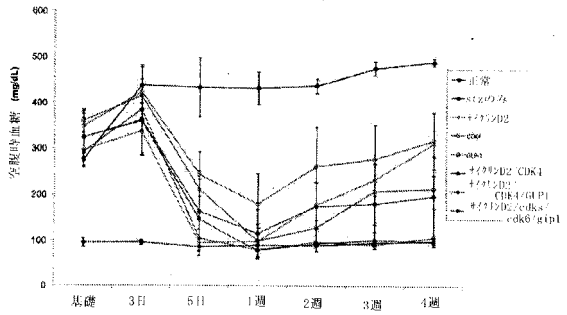


【図９】

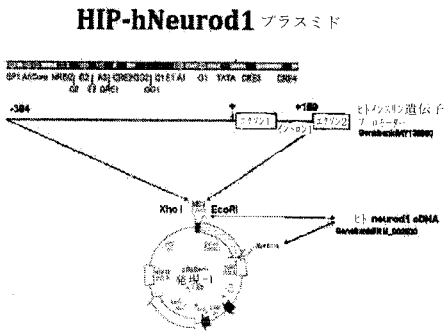


インスリン／グルカゴン／Ｄａｐｉ

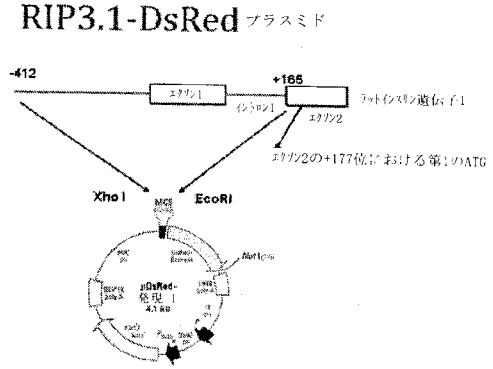
【図１０】



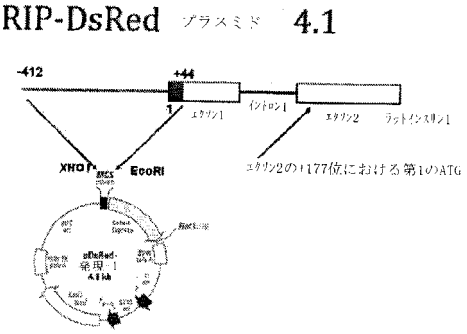
【図１１】



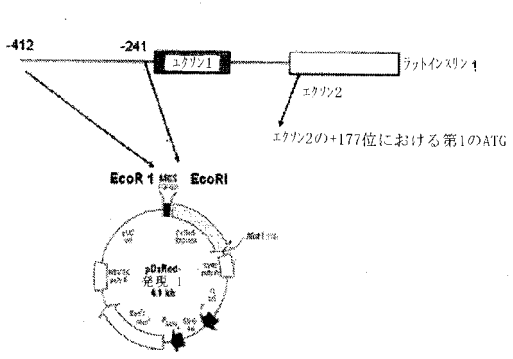
【図１２】



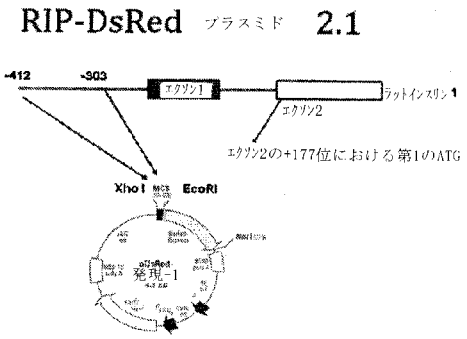
【図１３】



【図１４】



【図１５】



【配列表】
2012508585000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成23年10月19日(2011.10.19)
【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】
膵臓内での超音波標的マイクロバブル破壊のための組成物であって、
予め構築されたリポソーム－核酸マイクロバブル複合体を含み、前記予め構築されたリポソーム－核酸マイクロバブル複合体が、インスリンプロモーターの制御下のＮｅｕｒｏＤ遺伝子を含む核酸を含み、膵臓内の標的部位において前記マイクロバブルが破壊することにより膵臓細胞内の超音波破壊位置に前記核酸が送達され、前記核酸を組み込んだ細胞が高血糖レベルに応答してインスリンを発現する組成物。
【請求項２】
インスリンプロモーターが、エクソン１、イントロン１及びイントロン２の５’非翻訳領域を含む前記インスリンプロモーターのゲノム断片を含むことを特徴とする、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
ｎｇｎ３、ＧＬＰ１、ＰＤＸ１、Ｍａｆａ、ベータセルリン、Ｎｋｘ２．２、Ｎｋｘ６．１、ＰＡＸ４、Ｉｓｌ１、サイクリンＤ２、サイクリンファミリーのメンバー、ＣＤＫ４、又はサイクリン依存性キナーゼファミリーのメンバーから選択される、１又は２以上

の遺伝子をさらに含む、請求項１又は２に記載の組成物。
【請求項４】
組成物と同時投与される、抗アポトーシス剤、抗炎症剤、ＪＮＫ阻害剤、ＧＬＰ－１、タクロリムス、シロリムス、アナキンラ、Ｄｅｒｖｉｎポリアミド又はそれらの組合せから選択される薬剤をさらに含む、請求項１～３のいずれかに記載の組成物。
【請求項５】
膵臓内での超音波標的マイクロバブル破壊を用いて膵臓ベータ細胞を再生するための組成物であって、
ＮｅｕｒｏＤを含むマイクロバブルを含み、前記マイクロバブルが、膵臓内での超音波破壊によって前記ＮｅｕｒｏＤを放出する脂質を含む組成物。
【請求項６】
ＮｅｕｒｏＤが組換えＮｅｕｒｏＤである、請求項５に記載の組成物。
【請求項７】
ＮｅｕｒｏＤが、ＲＩＰ４．１、ＣＵＢＩ、ＲＩＰ２．１、ＲＩＰ３．１又はＨＩＰ３．１プロモーターの制御下のＮｅｕｒｏＤ遺伝子を含み、前記ＮｅｕｒｏＤが、超音波標的マイクロバブル破壊による発現を標的とされている細胞中で発現する、請求項５又は６に記載の組成物。
【請求項８】
糖尿病患者においてインビボ及びインサイチュでインスリン応答性細胞を再生して前記糖尿病患者を治療するための製薬の製造におけるＮｅｕｒｏＤの使用であって、前記治療が、
有効量の前記ＮｅｕｒｏＤを膵臓に送達するステップを含み、前記治療によって膵臓内の細胞に、血液中の高グルコースレベルに応答してインスリンを分泌させる使用。
【請求項９】
膵臓細胞内の有効量のＮｅｕｒｏＤが、ＮｅｕｒｏＤ遺伝子を発現する外因性核酸セグメントを送達することを含む、請求項８に記載の使用。
【請求項１０】
ＮｅｕｒｏＤが、超音波標的マイクロバブル破壊により膵臓に送達される、請求項８又は９に記載の使用。
【請求項１１】
膵臓細胞内の有効量のＮｅｕｒｏＤが、ＲＩＰ４．１、ＣＵＢＩ、ＲＩＰ２．１、ＲＩＰ３．１又はＨＩＰ３．１プロモーターの制御下でＮｅｕｒｏＤ遺伝子をコードする外因性核酸セグメントを送達することを含む、請求項８～１０のいずれかに記載の使用。
【請求項１２】
ＲＩＰ４．１、ＣＵＢＩ、ＲＩＰ２．１、ＲＩＰ３．１又はＨＩＰ３．１プロモーターから選択されるインスリン応答性プロモーターの制御下のＮｅｕｒｏＤ遺伝子を含む核酸セグメントを提供するステップと、
前記核酸セグメントを単離された標的細胞内に送達するステップと、
インスリン応答性調節遺伝子を発現するのに有効な条件下に標的細胞を維持するステップとを含む、前記単離された標的細胞をインスリン応答性にする方法であって、
前記標的細胞内での前記ＮｅｕｒｏＤの発現により前記細胞が高血糖に応答する方法。
【請求項１３】
ＰＤＸ１、ＧＬＰ１、サイクリンＤ２、ＣＤＫ４又はそれらの組合せから選択される１又は２以上の遺伝子を標的細胞内に送達することをさらに含む、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
単離された標的細胞と、抗アポトーシス剤、抗炎症剤、ＪＮＫ阻害剤、ＧＬＰ－１、タクロリムス、シロリムス、アナキンラ、Ｄｅｒｖｉｎポリアミド又はそれらの組合せである薬剤とを接触させることをさらに含む、請求項１２又は１３に記載の方法。
【請求項１５】

核酸が、予め構築されたリポソーム－核酸複合体リポソームを含むマイクロバブルを介して送達される、請求項１２～１４のいずれかに記載の方法。
【請求項１６】
マイクロバブルが、プラスミドと混合された、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルコリン及び１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルエタノールアミングリセロールを含む予め構築されたリポソーム－核酸複合体リポソームを含む、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
インスリン応答性を回復させることによって糖尿病患者を治療するための製薬の製造における、インスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子の使用であって、前記治療が、
インスリン遺伝子のエクソン１、イントロン１、及びエクソン２の５’非翻訳領域を含むインスリンプロモーターのゲノム断片を含むインスリンプロモーター領域に作動可能に連結した前記１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子を含む単離された核酸セグメントを取得するステップと、
前記核酸セグメントを標的細胞内に移入するステップと、
前記インスリン応答性調節遺伝子を発現するのに有効な条件下に前記標的細胞を維持するステップとを含み、
前記標的細胞内での前記インスリン応答性調節遺伝子の発現により前記細胞が高血糖に応答し、
インスリンプロモーター領域に作動可能に連結した前記１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子がＮｅｕｒｏＤを含む、使用。
【請求項１８】
インスリン応答性細胞が動物内にある、請求項１７に記載の使用。
【請求項１９】
インスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子が、ウイルス又はプラスミドベクター内にある、請求項１７又は１８に記載の使用。
【請求項２０】
インスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子が、ｎｇｎ３、ＧＬＰ１、ＰＤＸ１、Ｍａｆａ、ベータセルリン、Ｎｋｘ２．２、Ｎｋｘ６．１、ＰＡＸ４、Ｉｓｌ１、サイクリンＤ２、サイクリンファミリーのメンバー、ＣＤＫ４、又はサイクリン依存性キナーゼファミリーのメンバーをさらに含む、請求項１７～１９のいずれかに記載の使用。
【請求項２１】
標的細胞が、膵臓細胞である、請求項１７～２０のいずれかに記載の使用。
【請求項２２】
インスリンプロモーター領域が、転写開始部位の上流の領域に配列番号１の連続する１００～５００塩基を含む、請求項１７～２１のいずれかに記載の使用。
【請求項２３】
インスリンプロモーター領域が、配列番号１における転写開始部位の上流の全領域を含む、請求項１７～２１のいずれかに記載の使用。
【請求項２４】
インスリンプロモーター領域が、配列番号２における転写開始部位の上流の全領域を含む、請求項１７～２１のいずれかに記載の使用。
【請求項２５】
１又は２以上のインスリン応答性遺伝子から上流のインスリン遺伝子のエクソン１、イントロン１、及びエクソン２の５’非翻訳領域を含むインスリンプロモーターのゲノム断片を含むインスリンプロモーター領域を含む単離された核酸。
【請求項２６】

マイクロバブルと接触する予め構築されたリポソーム－核酸複合体を含む膵臓内での超音波標的マイクロバブル破壊のための組成物であって、

前記予め構築されたリポソーム－核酸複合体が、インスリン遺伝子のエクソン１、イントロン１及びエクソン２の５’非翻訳領域を含むインスリンプロモーターのゲノム断片を含む、高発現の調節可能なインスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子を含み、膵臓内での標的部位において前記マイクロバブルが超音波で破壊することにより膵臓細胞内の超音波破壊位置に前記核酸が送達され、インスリンプロモーター領域に作動可能に連結した前記１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子がＮｅｕｒｏＤを含む組成物。

【請求項２７】

予め構築されたリポソーム－核酸複合体が、カチオン性脂質、アニオン性脂質又はそれらの混合物及び組合せを含む、請求項２６に記載の組成物。

【請求項２８】

マイクロバブルが、薬学的に許容される媒体内に配置される、請求項２６又は２７に記載の組成物。

【請求項２９】

インスリン遺伝子を含む核酸をさらに含む、請求項２６～２８のいずれかに記載の組成物。

【請求項３０】

予め構築されたリポソーム－核酸複合体リポソームが、プラスミドと混合された、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルコリン及び１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルエタノールアミングリセロールを含む、請求項２６～２９のいずれかに記載の組成物。

【請求項３１】

コーティングをさらに含む、請求項２６～３０のいずれかに記載の組成物。

【請求項３２】

ｎｇｎ３、ＧＬＰ１、ＰＤＸ１、Ｍａｆａ、ベータセルリン、Ｎｋｘ２．２、Ｎｋｘ６．１、ＰＡＸ４、Ｉｓｌ１、サイクリンＤ２、サイクリンファミリーのメンバー、ＣＤＫ４、又はサイクリン依存性キナーゼファミリーのメンバーから選択される、インスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子をさらに含む、請求項２６～３１のいずれかに記載の組成物。

【請求項３３】

予め構築されたリポソーム－核酸マイクロバブル複合体をエックスビボ細胞と接触させるステップを含む方法によってインスリン応答性にされた前記エックスビボ細胞であって、前記予め構築されたリポソーム－核酸複合体が、インスリン遺伝子のエクソン１、イントロン１及びエクソン２の５’非翻訳領域を含むインスリンプロモーターの制御下のＮｅｕｒｏＤ遺伝子を含み、前記マイクロバブルが破壊することにより前記核酸が前記細胞内に送達され、前記細胞が高血糖レベルに応答してインスリンを発現する細胞。

【請求項３４】

ＮｅｕｒｏＤ遺伝子から上流のインスリン開始部位の上流の領域の連続する少なくとも５０塩基を含む調節可能なインスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子をさらに含む、請求項３３に記載の細胞。

【請求項３５】

ｎｇｎ３、ＧＬＰ１、ＰＤＸ１、Ｍａｆａ、ベータセルリン、Ｎｋｘ２．２、Ｎｋｘ６．１、ＰＡＸ４、Ｉｓｌ１、サイクリンＤ２、サイクリンファミリーのメンバー、ＣＤＫ４、又はサイクリン依存性キナーゼファミリーのメンバー、並びにサイクリン依存性キナーゼ阻害因子、ｐ１６、ＩＮＫ４ファミリーのメンバー、ｐ２７、又はＣＩＰ／ＫＩＰファミリーのメンバーに対するｓｉＲＮＡから選択される、インスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子をさらに含む、請求項３３又は３４に記載の細胞。

【請求項３６】
サイクリン依存性キナーゼ阻害因子、ｐ１６，ＩＮＫ４ファミリーのメンバー、ｐ２７、又はＣＩＰ／ＫＩＰファミリーのメンバーに対するｓｉＲＮＡをさらに含む、請求項３又は３２に記載の組成物。
【請求項３７】
ｓｉＲＮＡを標的細胞に移入することをさらに含み、
前記ＳｉＲＮＡが、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子、ｐ１６，ＩＮＫ４ファミリーのメンバー、ｐ２７、又はＣＩＰ／ＫＩＰファミリーのメンバーに対するｓｉＲＮＡからなる群より選択されることを特徴とする、請求項２０に記載の方法。
【請求項３８】
サイクリン依存性キナーゼ阻害因子、ｐ１６、ＩＮＫ４ファミリーのメンバー、ｐ２７、又はＣＩＰ／ＫＩＰファミリーのメンバーに対するｓｉＲＮＡからなる群より選択されるｓｉＲＮＡをさらに含む、請求項３５記載の細胞。
【請求項３９】
核酸を含む、予め構築されたリポソーム－核酸マイクロバブル複合体を含む膵臓内での超音波標的マイクロバブル破壊のための組成物であって、
前記核酸が、インスリンプロモーターに作動可能に連結された１又は２以上の　インスリン応答性調節遺伝子を含み、
前記インスリンプロモーターが、インスリン遺伝子のエクソン１、イントロン１及びイントロン２の５’非翻訳領域を含むゲノム断片を含み、
前記１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子が、ＧＬＰ１、サイクリンファミリーのメンバー、サイクリン依存性キナーゼファミリーのメンバー、又はその組合せから選択され、
膵臓内の標的部位において前記マイクロバブルが破壊することにより膵臓細胞内の超音波破壊位置に前記核酸が送達され、前記核酸を組み込んだ細胞が高血糖レベルに応答してインスリンを発現する組成物。
【請求項４０】
核酸が、ＧＬＰ１、サイクリンファミリー、サイクリン依存性キナーゼファミリー、又はその組合せから選択される、２又は３以上のインスリン応答性調節遺伝子をさらに含む、請求項３９に記載の組成物。
【請求項４１】
核酸が、ＧＬＰ１、サイクリンファミリーの１又は２以上のメンバー、サイクリン依存性キナーゼファミリーの１又は２以上のメンバー、又はその組合せから選択される３又は４以上のインスリン応答性調節遺伝子を含む、請求項３９に記載の組成物。
【請求項４２】
サイクリンファミリーのメンバーがサイクリンＤ２である、請求項３９～４１のいずれかに記載の組成物。
【請求項４３】
サイクリン依存性キナーゼファミリーのメンバーが、ＣＤＫ４又はＣＤＫ６である、請求項３９～４２のいずれかに記載の組成物。
【請求項４４】
サイクリン依存性キナーゼ阻害因子、ｐ１６、ｐ２７、ＩＮＫ４ファミリーメンバー、ＣＩＰ／ＫＩＰファミリーのメンバーに対するｓｉＲＮＡ、又はその組合せをさらに含む、請求項３９～４３のいずれかに記載の組成物。
【請求項４５】
１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子が、ＰＤＸ１、ベータセルリン、又はその組合せをさらに含む、請求項３９～４４のいずれかに記載の組成物。
【請求項４６】
組成物と同時投与され、抗アポトーシス剤、抗炎症剤、ＪＮＫ阻害剤、ＧＬＰ－１、タクロリムス、シロリムス、アナキンラ、Ｄｅｒｖｉｎポリアミド、又はそれらの組合せか

ら選択される薬剤をさらに含む、請求項３９～４５のいずれかに記載の組成物。
【請求項４７】
インスリンプロモーターが、ＲＩＰ４．１、ＣＵＢＩ、ＲＩＰ２．１、ＲＩＰ３．１又はＨＩＰ３．１プロモーターを含み、１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子が、超音波標的マイクロバブル破壊による発現を標的とされている細胞内で発現する、請求項３９～４６のいずれかに記載の組成物。
【請求項４８】
インスリンプロモーターが、１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子から上流のインスリン開始部位の上流の領域の連続する少なくとも５０塩基を含む、請求項３９～４７のいずれかに記載の組成物。
【請求項４９】
予め構築されたリポソーム－核酸マイクロバブル複合体が、カチオン性脂質、アニオン性脂質、又はそれらの混合物及び組合せを含む、請求項３９～４８のいずれかに記載の組成物。
【請求項５０】
予め構築されたリポソーム－核酸マイクロバブル複合体が、プラスミドと混合された、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルコリン及び１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルエタノールアミングリセロールを含む、請求項３９～４９のいずれかに記載の組成物。
【請求項５１】
予め構築されたリポソーム－核酸マイクロバブル複合体が、薬学的に許容される媒体内に配置される、請求項３９～５０のいずれかに記載の組成物。
【請求項５２】
糖尿病患者において、インビボ及びインサイチュでインスリン応答性細胞を再生して前記糖尿病患者を治療するための製薬の製造における、１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子の使用であって、
前記１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子が、インスリンプロモーターに作動可能に連結され、
前記１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子が、ＧＬＰ１、サイクリンファミリーのメンバー、サイクリン依存性キナーゼファミリーのメンバー、又はその組合せから選択され、
前記インスリンプロモーターが、インスリン遺伝子のエクソン１、イントロン１及びイントロン２の５’非翻訳領域を含むゲノム断片を含み、
前記治療が、有効量の前記１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子を膵臓に送達するステップを含み、前記治療によって、膵臓内の細胞が血液中の高グルコースレベルに応答してインスリンを分泌する使用。
【請求項５３】
ＧＬＰ１、サイクリンファミリーのメンバー、サイクリン依存性キナーゼファミリーのメンバー、又はその組合せから選択される、２又は３以上のインスリン応答性調節遺伝子を含む、請求項５２の使用。
【請求項５４】
ＧＬＰ１、サイクリンファミリーの１又は２以上のメンバー、サイクリン依存性キナーゼファミリーの１又は２以上のメンバー、又はその組合せから選択される、３又は４以上のインスリン応答性調節遺伝子を含む、請求項５２の使用。
【請求項５５】
サイクリンファミリーのメンバーが、サイクリンＤ２である、請求項５２～５４のいずれかに記載の使用。
【請求項５６】
サイクリン依存性キナーゼファミリーが、ＣＤＫ４又はＣＤＫ６である、請求項５２～５５のいずれかに記載の使用。

【請求項５７】
サイクリン依存性キナーゼ阻害因子、ｐ１６、ｐ２７、ＩＮＫ４ファミリーメンバー、ＣＩＰ／ＫＩＰファミリーのメンバーに対するｓｉＲＮＡ、又はその組合せをさらに含む、請求項５２～５６のいずれかに記載の使用。
【請求項５８】
１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子が、ＰＤＸ１、ベータセルリン、又はその組合せをさらに含む、請求項５２～５７のいずれかに記載の使用。
【請求項５９】
抗アポトーシス剤、抗炎症剤、ＪＮＫ阻害剤、ＧＬＰ－１、タクロリムス、シロリムス、アナキンラ、Ｄｅｒｖｉｎポリアミド又はそれらの組合せから選択される薬剤の使用をさらに含む、請求項５２～５８のいずれかに記載の使用。
【請求項６０】
インスリンプロモーターが、ＲＩＰ４．１、ＣＵＢＩ、ＲＩＰ２．１、ＲＩＰ３．１又はＨＩＰ３．１プロモーターを含み、１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子が、超音波標的マイクロバブル破壊による発現を標的とされている細胞内で発現する、請求項５２～５９のいずれかに記載の使用。
【請求項６１】
インスリンプロモーターが、１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子から上流のインスリン開始部位の上流の領域の連続する少なくとも５０塩基を含む、請求項５２～６０のいずれかに記載の使用。
【請求項６２】
インスリン応答性を回復させて糖尿病患者を治療するための製薬の製造における、インスリンプロモーターに作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子の使用であって、前記治療が、
インスリンプロモーター領域に作動可能に連結した１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子を含む、単離された核酸セグメントを取得するステップであって、
前記インスリンプロモーター領域が、インスリン遺伝子のエクソン１、イントロン１、及びエクソン２の５’非翻訳領域のゲノム断片を含み、
前記１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子が、ＧＬＰ１、サイクリンファミリーのメンバー、サイクリン依存性キナーゼファミリーのメンバー、又はその組合せから選択されるステップ、
前記核酸セグメントを標的細胞に移入するステップ、及び
前記インスリン応答性調節遺伝子を発現するのに有効な条件下に前記標的細胞を維持するステップとを含み、
前記標的細胞内での前記インスリン応答性調節遺伝子の発現により前記細胞を高血糖に応答させる、使用。
【請求項６３】
標的細胞が、膵臓細胞である、請求項６２に記載の使用。
【請求項６４】
インスリンプロモーター領域が、転写開始部位の上流の領域に配列番号１の連続する１００～５００塩基を含む、請求項６２又は６３に記載の使用。
【請求項６５】
インスリンプロモーター領域が、配列番号１における転写開始部位の上流の全領域を含む、請求項６２又は６３に記載の使用。
【請求項６６】
インスリンプロモーター領域が、配列番号２における転写開始部位の上流の全領域を含む、請求項６２又は６３に記載の使用。
【請求項６７】
単離された標的細胞をインスリン応答性にする方法であって、
インスリンプロモーターの制御下で、１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子を含

む少なくとも１つの核酸セグメントを提供するステップであって、
前記インスリンプロモーターが、ＲＩＰ４．１、ＣＵＢＩ、ＲＩＰ２．１、ＲＩＰ３．１、又はＨＩＰ３．１プロモーターを含み、
前記１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子が、ＧＬＰ１、サイクリンファミリーのメンバー、サイクリン依存性キナーゼファミリーのメンバー、又はその組合せから選択されるステップ；
前記核酸セグメントを前記単離された標的細胞に送達するステップ；及び
前記１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子を発現するのに有効な条件下に前記標的細胞を維持するステップとを含み、
前記１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子の発現によって、前記細胞が高グルコースレベルに応答する方法。
【請求項６８】
予め構築されたリポソーム－核酸マイクロバブル複合体をエックスビボ細胞と接触させるステップを含む方法でインスリン応答性となった前記エックスビボ細胞であって、前記予め構築されたリポソーム－核酸マイクロバブル複合体が、インスリン遺伝子のエクソン１、イントロン１及びエクソン２の５’非翻訳領域を含むインスリンプロモーターの制御下の１又は２以上のインスリン応答性調節遺伝子を含み、マイクロバブルの破壊によって核酸が前記細胞内に送達されることを含む方法によって、前記細胞が高グルコースレベルに応答してインスリンを発現する、インスリン応答性となった前記エックスビボ細胞。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2009/064467

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/88(2006.01)i, C12N 15/89(2006.01)i, C12N 15/12(2006.01)i, C12N 5/10(2006.01)i, C12N 5/071(2010.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N 15/88; A61K; A61K 48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models
Japanese utility models and applications for utility models

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: microbubble destruction, NeuroD, insulin promoter, regenerating, pancreas

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2008-036953 A2 (BAYLOR RESEARCH INSTITUTE et al.) 27 March 2008 See abstract, claims, pages 1-3	1-7,12-43
A	WO 03-032923 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 24 April 2003 See abstract, claims, pages 2-5	1-7,12-43
A	PNAS vol.103, No.22, pp 8469-8474 (CHEN et al.) 30 May 2006 See whole document	1-7,12-43

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents,such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 JULY 2010 (22.07.2010)	**27 JULY 2010 (27.07.2010)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	CHO, Jeong Han Telephone No. 82-42-481-5589

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2009/064467

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 8-11
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 8-11 pertain to the method for the treatment of human body by therapy, and thus related to a subject matter which this ISA is not required to search under the PCT Art. 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required addtional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2009/064467

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008-036953 A2	27.03.2008	AU 2007-299649 A1	27.03.2008
		CN 101573445 A	04.11.2009
		EP 2082036 A2	29.07.2009
		JP 2010-504360 A	12.02.2010
		KR20090079897A	22.07.2009
		US 2008-145937 A1	19.06.2008
		WO 2008-036953 A3	27.03.2008
		WO 2008-036953 A3	30.10.2008
		WO 2008-036953 A8	27.03.2008
		WO 2008-036953 A8	30.07.2009
WO 03-032923 A2	24.04.2003	AU 2002-335104 A8	28.04.2003
		EP 1444328 A2	11.08.2004
		EP 1444328 A4	06.09.2006
		JP 2005-506072 A	03.03.2005
		JP 2005-506072 T	03.03.2005
		US 2003-0077259 A1	24.04.2003
		US 2005-0214269 A1	29.09.2005
		US 2006-0210963 A1	21.09.2006
		US 6911324 B2	28.06.2005
		WO 03-032923 A3	24.04.2003

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 47/24	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/24	
Ａ６１Ｋ 45/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00	
Ａ６１Ｐ 3/10	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/10	
Ａ６１Ｐ 5/50	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	5/50	

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

(72)発明者 ディン ジアフアン
アメリカ国 テキサス７５０９４ マーフィー クレイドライブ８０５

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 CA01 CA09 CA11 CA20 DA02 FA02 GA11 HA17
4B065 AA90X AA90Y AA91Y AB01 AC20 BA01 CA44
4C076 AA19 AA95 CC27 DD63F FF16 FF34
4C084 AA13 AA19 MA02 MA24 NA13 NA14 ZC191 ZC351
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA03 MA05 MA24 NA13 NA14
ZC19 ZC35