

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2014年8月21日(21.08.2014)



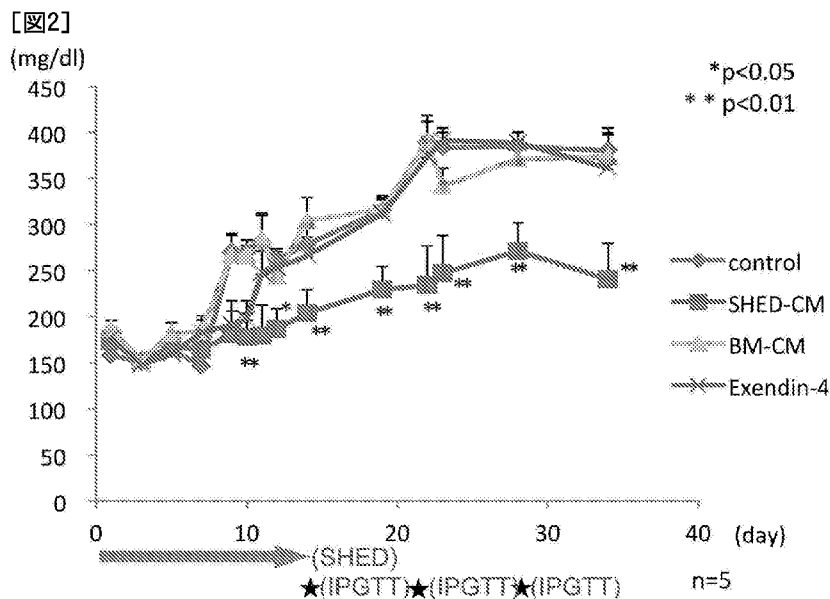
(10) 国際公開番号  
WO 2014/126175 A1

- (51) 国際特許分類:  
A61K 35/32 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)  
A61P 3/10 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/053382
- (22) 国際出願日: 2014年2月13日(13.02.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2013-025120 2013年2月13日(13.02.2013) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人名古屋大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 Aichi (JP).
- (72) 発明者: 恒川 新(TSUNEKAWA Shin); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 上田 実(UEDA Minoru); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 山本 朗仁(YAMAMOTO Akihito); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 泉本 貴子(IZUMOTO Takako); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人 快友国際特許事務所 (KAI-U PATENT LAW FIRM); 〒4516009 愛知県名古屋市西区牛島町6番1号 名古屋ルーセントタワー9階 Aichi (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING DIABETES

(54) 発明の名称: 糖尿病の予防又は治療用組成物



(57) Abstract: [Problem] Provided is a composition for preventing or treating diabetes. [Solution] A culture supernatant obtained by culturing dental pulp stem cells is used as a composition for preventing or treating diabetes.

(57) 要約: 【課題】糖尿病の予防又は治療用組成物を提供する。【解決手段】歯髄幹細胞を培養することによって得られる培養上清を、糖尿病の予防又は治療用組成物として用いる。

WO 2014/126175 A1

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

## 明 細 書

発明の名称：糖尿病の予防又は治療用組成物

### 技術分野

[0001] 本明細書は、糖尿病の予防又は治療用組成物に関する。

本出願は、2013年2月13日に出願された日本国特許出願特願2013-25120に対する優先権を主張するものであり、この内容は、引用により、本明細書に組み込まれる。

### 背景技術

[0002] 糖尿病は、多くの国において増え続けている重大な疾患である。糖尿病は、各種の重篤な合併症も発症するため、有効な予防・治療方法が期待されている。糖尿病には1型糖尿病と2型糖尿病とがあり、1型糖尿病は、自己免疫による膵β細胞の死滅を伴い、2型糖尿病は、一定の膵β細胞の死滅と共にインスリン分泌低下と感受性の低下を伴う。糖尿病は、遺伝的素因や環境的素因がその発症の原因とは考えられているが、必ずしも明らかではない。

[0003] これら糖尿病の治療は、基本的には、1型にはインスリンの投与であり、2型には血糖降下剤の投与、その後にはインスリンの投与である。

[0004] 近年、ストレプトゾトシン（STZ）誘発糖尿病モデルマウスに骨髄幹細胞移植することで、耐糖能障害が改善されたという報告がある（非特許文献1）。また、膵島移植はカナダ、エドモントンにあるアルバータ大学によって確立され、複数の脳死ドナー（組織提供者）から分離した膵島組織を比較的短期間に、ひとりの1型糖尿病患者に移植するという膵島移植を7人の1型糖尿病患者に対して行い、一時的ではあるがその7人全員がインスリン離脱（正常血糖値を維持するのにインスリン注射が不要である状態）となったとの報告がある（非特許文献2）。

[0005] 損傷部の治療を目的として、歯髄幹細胞などの幹細胞の培養上清を含む組成物が有効であることが記載されている（特許文献1）。

### 先行技術文献

## 特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第WO2011/118795号

## 非特許文献

[0007] 非特許文献1：Urban VS et al; Stem Cell. 2008 Jan;26(1):244-53

非特許文献2：Shapiro AM et al; N Engl J M. 2000 Jul 27;343(4):230-8

## 発明の概要

[0008] しかしながら、長期のインスリン離脱を目標とした場合、現在の技術では、複数回の移植が必要であること、膵島はたらきは徐々に悪化するため、5年インスリン離脱成績は悪い。また、幹細胞移植や膵島移植の場合、たとえ自己由来であっても、癌化する可能性は否定できない。また、免疫拒絶反応も異種の場合は避けて通ることはできないため、免疫抑制剤の使用は回避できない。

[0009] 歯髄幹細胞などの幹細胞の培養上清を含む組成物は組織損傷に有効であり、歯周病や脊髄損傷等に有効であるが、糖尿病に有効であることは一般に想定できない。

[0010] 本明細書は、糖尿病の予防又は治療用組成物を提供する。

## 課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、糖尿病の治療について検討していたところ、意外にも歯髄幹細胞の培養上清が有効であるという知見を得た。本明細書は、本知見に基づき以下の手段を提供する。

[0012] (1) 歯髄幹細胞を培養することによって得られる培養上清を含む、糖尿病の予防又は治療用組成物。

(2) 血清を含まない、(1)に記載の組成物。

(3) 前記歯髄幹細胞を含まない、(1)又は(2)に記載の組成物。

(4) (1)～(3)のいずれかに記載の予防又は治療用組成物の製造方法であって、

歯髄細胞から接着性細胞を選抜し、

前記接着性細胞を培養し、  
培養上清を回収する、製造方法。

(5) 糖尿病の予防又は治療方法であって、

(1) ~ (3) のいずれかに記載の組成物を、糖尿病リスクのある個体あるいは糖尿病を罹患する個体に、糖尿病の予防又は治療に有効な量で投与することを含む、方法。

(6) 前記組成物を、静脈内投与、動脈内投与、門脈内投与、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、腹腔内投与及び鼻腔内投与からなる群より選択された投与方法により投与する、(5) に記載の方法。

### 図面の簡単な説明

[0013] [図1] S T Z 投与量の違いによる血糖値の変化を示す図である。

[図2] S T Z 低投与量マウスに対するヒト脱落乳歯歯髄幹細胞培養上清、S H E D - C M 投与時の血糖値の変化を示す図である。

[図3] S T Z 低投与量マウスに対する S H E D - C M 投与時の体重の変化を示す図である。

[図4] S T Z 低投与量マウスに対する S H E D - C M 投与時における I P G T T ( d a y 2 7 ) 結果 (血糖値) を示す図である。

[図5] S T Z 低投与量マウスに対する S H E D - C M 投与時における I P G T T ( d a y 2 7 ) 結果 (インスリン) を示す図である。

[図6] S T Z 低投与量マウスに対する S H E D - C M 投与時 ( d a y 3 4 ) の膵臓中のインスリン含有量の測定結果を示す図である。

[図7] S T Z 低投与量マウスに対する S H E D - C M 投与時 ( d a y 3 4 ) の膵臓組織の H E 染色結果 (倍率 × 4 ) を示す図である。

[図8] S T Z 低投与量マウスに対する S H E D - C M 投与時 ( d a y 3 4 ) の膵臓組織の H E 染色結果 (倍率 × 4 0 ) を示す図である。

[図9] S T Z 低投与量マウスに対する S H E D - C M 投与時 ( d a y 3 4 ) の膵臓組織の免疫染色結果 (倍率 × 4 0 ) を示す図である。

[図10] S T Z 大量投与マウスに対する S H E D - C M 投与時の血糖値の変化

を示す図である。

[図11] S T Z 大量投与マウスに対する S H E D - C M 投与時の体重の変化を示す図である。

[図12] S T Z 大量投与マウスに対する S H E D - C M 投与時の I P G G T ( d a y 3 1 ) の結果 ( 血糖値 ) を示す図である。

[図13] 高脂肪食マウスに対する S H E D - C M 投与時の血糖値の変化を示す図である。

[図14] 高脂肪食マウスに対する S H E D - C M 投与時の体重の変化を示す図である。

[図15] 高脂肪食マウスに対する S H E D - C M 投与時の I P G G T ( d a y 6 9 ) の結果 ( 血糖値 ) を示す図である。

[図16] 脂肪食マウスに対する S H E D - C M 投与時の I P G G T ( d a y 6 9 ) の結果 ( インスリン ) を示す図である。

[図17] 脂肪食マウスに対する S H E D - C M 投与時の I T T ( d a y 5 8 ) の結果 ( 血糖値及び低下率 ) を示す図である。

[図18] マウス膵β細胞株 : M I N 6 を用いた S H E D - C M 投与時の D A P 染色結果に基づくネクロシス (%) を示す図である。

[図19] マウス膵β細胞株 : M I N 6 を用いたインスリン分泌実験結果 ( content , release/content ) を示す図である。

[図20] マウス膵β細胞株 : M I N 6 を用いた S H E D - C M の A p o p t o s i s に対する効果を示す図である。

[図21] d b d b マウスに対する S H E D - C M 投与時の血糖値の変化を示す図である。

[図22] d b d b マウスに対する S H E D - C M 投与時の体重の変化を示す図である。

[図23] d b d b マウスに対する S H E D - C M 投与時の I P G G T ( d a y 3 6 ) 結果 ( 血糖値 ) を示す図である。

[図24] d b d b マウスに対する S H E D - C M 投与時の I P G G T ( d a y

36)の結果(インスリン)を示す図である。

[図25] d b d b マウスに対する S H E D - C M 投与時の I T T ( d a y 5 1 ) の結果(血糖値及び低下率)を示す図である。

[図26] d b d b マウスに対する S H E D - C M 投与時の膵インシュリン含有量( d a y 6 1 ) を示す図である。

### 発明を実施するための形態

[0014] 本明細書は、糖尿病の予防又は治療用組成物に関する。本組成物は、歯髄幹細胞を培養することによって得られる培養上清を含むことができる。本培養上清は、種々のサイトカインが含まれている。特許文献1では、本培養上清が、こうしたサイトカインを含有していることから、損傷部における細胞を増殖させ、その結果、損傷部を有する組織を修復することができるとしている。本発明者らは、こうした本培養上清の未だ知られていない作用として糖尿病を罹患する個体に対して本培養上清を投与することでこれらを治療できるという知見を得るにいたった。本培養上清に種々のサイトカインが含まれているといっても、糖尿病に有効であることは、当業者である本発明者らも予想しえなかった。

[0015] 本組成物によれば、従来の糖尿病治療の問題点を解消しつつ、糖尿病を効果的に予防又は治療できる。

[0016] 以下では、本開示の代表的かつ非限定的な具体例について、適宜図面を参照して詳細に説明する。この詳細な説明は、本発明の好ましい例を実施するための詳細を当業者に示すことを単純に意図しており、本開示の範囲を限定することを意図したものではない。また、以下に開示される追加的な特徴ならびに発明は、さらに改善された糖尿病の予防又は治療用組成物を提供するために、他の特徴や発明とは別に、又は共に用いることができる。

[0017] また、以下の詳細な説明で開示される特徴や工程の組み合わせは、最も広い意味において本開示を実施する際に必須のものではなく、特に本開示の代表的な具体例を説明するためにのみ記載されるものである。さらに、上記及び下記の代表的な具体例の様々な特徴、ならびに、独立及び従属クレームに

記載されるものの様々な特徴は、本開示の追加的かつ有用な実施形態を提供するにあたって、ここに記載される具体例のとおり、あるいは列挙された順番のとおり組合せなければならないものではない。

[0018] 本明細書及び／又はクレームに記載された全ての特徴は、実施例及び／又はクレームに記載された特徴の構成とは別に、出願当初の開示ならびにクレームされた特定事項に対する限定として、個別に、かつ互いに独立して開示されることを意図するものである。さらに、全ての数値範囲及びグループ又は集団に関する記載は、出願当初の開示ならびにクレームされた特定事項に対する限定として、それらの中間の構成を開示する意図を持ってなされている。

[0019] 本明細書において、「糖尿病」とは、分類を問わず、血糖値が病的に高い状態を疾患を意味している。より具体的には血糖値及びヘモグロビンA1cが一定以上の数値を超えている場合をいう。さらに、本明細書において、「糖尿病」には、糖尿病に合併する糖尿病性の急性又は慢性障害（合併症）を含むものとする。急性障害としては、糖尿病性昏睡（ケトン性昏睡、非ケトン性高浸透圧性昏睡、乳酸アシドーシス、低血糖性昏睡）、急性感染症が挙げられる。慢性障害としては、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症等の微小血管障害、脳血管障害、糖尿病性壊疽などの大血管障害、高脂血症・慢性感染症、胆石症、白内障などが挙げられる。

[0020] （糖尿病の予防又は治療用組成物）

本組成物は、歯髄に由来する体性幹細胞、すなわち、歯髄幹細胞を培養して得られる培養上清を含むことができる。

[0021] （歯髄幹細胞）

歯髄幹細胞は、歯髄から得られる歯髄に由来した幹細胞であれば特に限定されない。永久歯歯髄幹細胞であってもよいし、乳歯歯髄幹細胞であってもよいが、好ましくは、細胞増殖能の観点から、脱落した乳歯に由来する歯髄幹細胞を用いる。本組成物を適用する個体との関係においては、拒絶反応を抑制又は回避するため、同一生物種（ヒトであればヒト由来）の歯髄幹細胞



であることが好ましく、より好ましくは自家歯髄幹細胞を用いる。

[0022] 歯髄幹細胞は、歯髄細胞の中の接着性細胞として選別可能である。脱落した乳歯や永久歯から採取した歯髄細胞の中の接着性細胞又はその継代細胞を培養して得られる培養上清を、「歯髄幹細胞の培養上清」として用いることができる。例えば、以下に示す、特開2011-219432号公報に記載の方法等により適宜取得できる。

[0023] なお、歯髄幹細胞の不活化細胞も提供されうる。通常、歯髄幹細胞の不活化にあたり、1又は2以上、好ましくは3以上、より好ましくは4以上の遺伝子が導入されている。このため不活化細胞においては、もとの細胞である歯髄幹細胞と均等な性質をもはや有していない。元の細胞とその不活化細胞とは、その産生物や分泌物や量が異なるのは当業者においてよく知られたことである。したがって、もとの細胞である歯髄幹細胞と歯髄幹細胞由来の不活化細胞とでは、その産生物が異なるとともに、分泌物状況や分泌物の組成も相違している。したがって、歯髄幹細胞の培養上清と歯髄幹細胞由来の不活化細胞の培養上清とは、その組成、すなわち、成分の種類やその割合においても大きく相違している。したがって、炎症性疾患に対する培養上清の作用や治療効果も、歯髄幹細胞と当該細胞に由来する不活化細胞とでは異なっている。

[0024] (1) 歯髄の採取

自然に脱落した乳歯（又は抜歯した乳歯、或いは永久歯）をクロロヘキシジンまたはイソジン溶液で消毒した後、歯冠部を分割し歯科用リーマーにて歯髄組織を回収する。

(2) 酵素処理

採取した歯髄組織を基本培地（10%ウシ血清・抗生物質含有ダルベッコ変法イーグル培地）に懸濁し、2mg/mlのコラゲナーゼ及びディスパーゼで37℃、1時間処理する。5分間の遠心操作（5000回転/分）により酵素処理後の歯髄細胞を回収する。セルストレーナーによる細胞選別はSHEDやDPSCの神経幹細胞分画の回収効率を低下させるので原則、使用

しない。

### (3) 細胞培養（接着性細胞の選択）

細胞を4cc基本培地で再懸濁し、直径6cmの付着性細胞培養用ディッシュに播種する。5%CO<sub>2</sub>、37℃に調整したインキュベータにて3日間培養した後、コロニーを形成した接着性細胞を0.05%トリプシン・EDTAにて5分間、37℃で処理する。ディッシュから剥離した歯髄細胞を直径10cmの付着性細胞培養用ディッシュに播種し拡大培養を行う。例えば、肉眼で観察してサブコンフルエント（培養容器の表面の約70%を細胞が占める状態）又はコンフルエントに達したときに細胞を培養容器から剥離して回収し、再度、培養液を満たした培養容器に播種する。継代培養を繰り返して行ってもよい。例えば継代培養を1～8回行い、必要な細胞数（例えば約 $1 \times 10^7$ 個/ml）まで増殖させる。尚、培養容器からの細胞の剥離は、トリプシン処理など常法で実施することができる。以上の培養の後、細胞を回収して保存することにしてもよい（保存条件は例えば-198℃）。

### （別法）

細胞を4cc基本培地で再懸濁し、直径6cmの付着性細胞培養用ディッシュに播種する。培養液（例えば、10%FCS含有DMEM（Dulbecco's Modified Eagle's Medium））を添加した後、5%CO<sub>2</sub>、37℃に調整したインキュベータにて2週間程度培養する。培養液を除去した後、PBS等で細胞を1回又は数回洗浄する。この操作（培養液の除去及び細胞の洗浄）に代えて、コロニーを形成した接着性細胞（歯髄幹細胞）を回収することにしてもよい。この場合には例えば、0.05%トリプシン・EDTAにて5分間、37℃で処理し、ディッシュから剥離した細胞を回収する。

### (4) 細胞の回収

次に、細胞を回収する。トリプシン処理等で培養容器から細胞を剥離した後、遠心処理を施すことによって細胞を回収することができる。このようにして回収した歯髄幹細胞を用いて本発明の組成物を調製する。

[0025] (歯髄幹細胞の培養上清)

歯髄幹細胞の培養上清は、歯髄幹細胞を培養して得られる培養液の上清である。すなわち、実質的に細胞成分（歯髄幹細胞又は歯髄細胞）を含んでいない。本組成物は、典型的には、歯髄幹細胞及び歯髄細胞を含まず、歯髄幹細胞の培養上清のみで構成された組成物である。培養した歯髄幹細胞は、培養後に細胞成分を分離除去することによって、除去される。培養液からの細胞成分の分離は、当業者に周知の方法で可能である。さらに、培養液に対して各種処理（例えば、遠心処理、濃縮、溶媒の置換、透析、凍結、乾燥、凍結乾燥、希釈、脱塩、保存等）を適宜施した培養上清を用いることにしてもよい。

[0026] 歯髄幹細胞の培養には、基本培地、或いは基本培地に血清等を添加したものの等を使用可能である。基本培地としてはDMEMの他、イスコフ改変ダルベッコ培地（IMDM）（GIBCO社等）、ハムF12培地（HamF12）（SIGMA社、GIBCO社等）、RPMI1640培地等を用いることができる。二種以上の基本培地を併用することにもよい。混合培地の一例として、IMDMとHamF12を等量混合した培地（例えば商品名：IMDM/HamF12（GIBCO社）として市販される）を挙げることができる。また、培地に添加可能な成分の例として、血清（ウシ胎仔血清、ヒト血清、羊血清等）、血清代替物（Knockout serum replacement（KSR）など）、ウシ血清アルブミン（BSA）、抗生物質、各種ビタミン、各種ミネラルを挙げることができる。

[0027] 本組成物は、血清を含まないことが好ましい。血清を含まないことでその安全性が高められる。例えば、血清を含まない培地（無血清培地）で歯髄幹細胞を培養することによって、血清を含まない培養上清を調製することができる。1回又は複数回の継代培養を行うことにし、最後又は最後から数回の継代培養を無血清培地で培養することによっても、血清を含まない培養上清を得ることができる。一方、回収した培養上清から、透析やカラムによる溶媒置換などを利用して血清を除去することによっても、血清を含まない培養

上清を得ることができる。

[0028] (培養上清の取得)

歯髄幹細胞の培養には、通常幹細胞に用いられる条件をそのまま適用あるいは適宜変更して適用できる。歯髄幹細胞培養上清の製造は、当業者であれば適宜行うことができる。例えば、以下のような操作で培養上清を取得してもよい。

[0029] まず、既に説明したように、歯髄から選抜した接着性細胞（歯髄幹細胞）を、上記した培地で培養する。例えば、細胞を付着性細胞培養用ディッシュに播種し、5%CO<sub>2</sub>、37℃に調整したインキュベータにて培養する。必要に応じて継代培養を行う。例えば、肉眼で観察してサブコンフルエント（培養容器の表面の約70%を細胞が占める状態）又はコンフルエントに達したときに細胞を培養容器から剥離して回収し、再度、培養液を満たした培養容器に播種する。継代培養を繰り返し行ってもよい。例えば継代培養を1～8回行い、必要な細胞数（例えば約1×10<sup>7</sup>個/ml）まで増殖させる。尚、培養容器からの細胞の剥離は、トリプシン処理など常法で実施することができる。以上の培養の後、細胞を回収して保存することにしてもよい（保存条件は例えば-198℃）。

[0030] 次いで、選抜・培養した歯髄幹細胞の培養上清を回収する。例えば、スポイトやピペットなどで培養液を吸引して回収することができる。回収した培養上清はそのまま或いは一以上の処理を経た後に本発明の組成物の有効成分として使用される。ここでの処理として、遠心処理、濃縮、溶媒の置換、透析、凍結、乾燥、凍結乾燥、希釈、脱塩、保存（例えば、4℃、-80℃）を例示することができる。

[0031] 本培養上清に対して適宜濃縮処理を施すこともできる。すなわち、本培養上清は濃縮物として含まれていてもよい。濃縮方法としては公知の手法から当業者であれば適宜選択して用いることができる。例えば、スピンカラム濃縮法、エタノール沈殿濃縮法により、培養上清の濃縮物を得ることができる。本培養上清は、凍結乾燥処理が施されていてもよい。すなわち、本培養上

清は、凍結乾燥物であってもよい。

[0032] (本組成物の成分や形態)

本組成物は、歯髄幹細胞の培養上清であり、歯髄幹細胞が培養中において分泌したタンパク質などの高分子化合物のほか、低分子有機化合物を含みうる。さらに、本組成物は、培養上清であるため、培地由来の成分も含みうる。

[0033] 本組成物は、液体状（液状、ゲル状など）及び固体状（粉状、細粒、顆粒状など）の形態を採りうる。また、本組成物は、疾患の種類、疾患を有する個体の特徴、投与方法及び投与量に応じて、公知の各種製剤形態を採りうる。例えば、錠剤、粉剤、粒剤、顆粒剤、細粒剤、カプセル剤、用時溶解する固形の注射剤、坐剤などの固形性剤、液状の注射剤（静注／筋注）、注入剤、点滴用剤などの液状性剤、点眼剤、スプレー剤、ローション剤、クリーム剤、貼付剤などの局所外用剤等が挙げられる。また、体内留置型の医療器具等に担持される形態を採ることもできる。そのほか、本組成物は、公知の薬学上許容される塩を含むことができる。当業者であれば、適切な製剤化が可能である。

[0034] 本組成物は、疾患の種類や製剤形態に応じて、製剤上許容される他の成分を含むことができる。製剤上許容される他の成分（例えば、担体、賦形剤、崩壊剤、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤、無痛化剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩水など）を含有させることもできる。賦形剤としては乳糖、デンプン、ソルビトール、D-マンニトール、白糖等を用いることができる。崩壊剤としてはデンプン、カルボキシメチルセルロース、炭酸カルシウム等を用いることができる。緩衝剤としてはリン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩等を用いることができる。乳化剤としてはアラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、トラガント等を用いることができる。懸濁剤としてはモノステアリン酸グリセリン、モノステアリン酸アルミニウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ラウリル硫酸ナトリウム等を用いることができる。無痛化剤としてはベンジルアルコール、クロロブタノー

ル、ソルビトール等を用いることができる。安定剤としてはプロピレングリコール、アスコルビン酸等を用いることができる。保存剤としてはフェノール、塩化ベンザルコニウム、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルパラベン等を用いることができる。防腐剤としては塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸、クロロブタノール等を用いることができる。抗生物質、pH調整剤、成長因子（例えば、上皮細胞成長因子（EGF）、神経成長因子（NGF）、脳由来神経栄養因子（BDNF））等を含有させることにしてもよい。

[0035] 本組成物は、糖尿病の予防又は治療用として用いることができる。糖尿病としては、1型、2型糖尿病のほか、既に記載したとおり、これらに伴う急性及び慢性の糖尿病性障害を含むことができる。

[0036] 本組成物の投与経路は特に限定されない。適用部位や対象とする疾患に応じて公知の各種投与形態を採用できる。たとえば、非経口投与は、全身投与であってもよいし局所投与であってもよい。より具体的には、注入、塗布又は噴霧が挙げられる。また、静脈内投与、動脈内投与、門脈内投与、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、腹腔内投与、鼻腔内投与、口腔内投与等が挙げられる。

[0037] 本組成物の用法用量は特に限定されない。被験対象の年齢、体重、病態等を勘案して設定することができる。投与スケジュールとしては例えば一日一回～数回、二日に一回、或いは三日に一回などを採用できる。投与スケジュールの作成においては、対象（レシピエント）の性別、年齢、体重、病態などを考慮することができる。

[0038] 本組成物が適用される対象個体としては、ヒトを含む哺乳動物（ペット、家畜、実験動物等）が挙げられる。例えば、イヌ、ネコ、ウサギ、マウス、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、サル、モルモット、ラット及びマウス等が挙げられる。

[0039] （糖尿病の予防又は治療方法）

本明細書に開示される予防又は治療方法は、本組成物を、糖尿病リスクの

ある個体又は糖尿病に罹患する個体に、糖尿病の予防又は治療に有効な量で投与することを含むことができる。本治療方法によれば、従来の不都合を一挙に解決して糖尿病を予防又は治療できる。本組成物、投与方法等については、既に説明した態様を本方法に適用することができる。

[0040] (糖尿病の予防又は治療に有効な因子又はその組合せのスクリーニング方法)

本明細書の開示によれば、歯髄幹細胞を培養することによって得られる培養上清に含まれる1又は2以上の成分を糖尿病に対する評価系に供給して、炎症性疾患への作用を評価する工程、を備える、方法が提供される。

[0041] 本スクリーニング方法によれば、歯髄幹細胞の培養上清に含まれる成分のうち、どの成分が糖尿病に対して有効であるかをスクリーニングでき、特定された歯髄幹細胞の培養上清成分を有効成分として含有する、すなわち、主として特定された培養上清成分のみを有効成分として含有する予防又は治療用組成物を取得できる。また、こうした組成物は、歯髄幹細胞の培養上清に由来しないで、市販され及び／又は精製等された特定成分を組み合わせることによって有効な予防又は治療用組成物を得ることができる。

[0042] なお、本スクリーニング方法で用いる糖尿病に関する評価系は、糖尿病について公知である。例えば、ストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルマウス・ラット、NODマウス(NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Sug/Jic)、dbdbマウス(C57BLK S/J l a r - +Lepr db /+Lepr db)、obobマウス(C57BL/6JHamSlc ob/ ob)、Got o-Kakizakiラット(GKラット)、Zucker fattyラット(ZDF-Leprfa/ CrlCrlj)=ZDFラット(Zucker Diabetic fatty)、Wistar fatty ラット(Wistar- Leprfa/ Leprfa)、高脂肪食負荷モデル動物等の糖尿病モデル動物を利用できるほか、MIN6細胞、INS-1細胞、 $\beta$ TC細胞、HIT細胞等の膵 $\beta$ 細胞株を用いた評価系を適宜選択して利用できる。こうした各種の評価系については、当業者であれば適宜選択できるほか、本明細書の実施例等を参照することによっても適宜選択することができる。

[0043] 歯髄幹細胞の培養上清には、以下に示す成分(各成分は、タンパク質、遺伝

子あるいは物質名、通称名等でそれぞれ記載されている)が含まれている。こうした成分から選択される1又は2以上、あるいは3以上を適宜組み合わせることで糖尿病に有効な因子のスクリーニングに適用することができる。

[0044]



[表1]

GRO	Platelet factor 4
MMP-10	IGFBP-6
Follistatin	Growth Hormon
LYVE-1	Trappin-2
TACE	GDF-15
NRG1	IL-29
MMP-7	beta IG-H3
Furin	IL-5R alpha
Angiogenin	Siglec-9
RANK	BCAM
Galectin-7	HGF
NrCAM	Lymphotactin
Axl	VEGF-C
MMP-3	Osteoprotegerin
TSLP	TIMP-2
Ferritin	MIF
XEDAR	ALCAM
FLRG	TIM-1
CD40	CCL-28
DKK-3	CD30
Resistin	MCP-1
sTNT R1	Thrombopoietin
Nidogen-1	IL-6 R
TRAIL R2	SAA
IL-22	LIMPII
MMP-2	MMP-8
Marapsin	Erythropoietin R
NCAM-1	PIGF
MICA	sgp130
Fcr RIIB/C	TIMP-1
Insulin	VEGF
SCF	IL-28A
Osteopontin	TRAIL R3
LAP	

## 実施例

[0045] 以下、本発明を、実施例を挙げて具体的に説明するが、以下の実施例は本発明を限定するものではない。なお、以下の実施例において、%は、いずれも質量%を意味する。

### 実施例 1

[0046] 以下の実施例で用いた実験方法等について以下に記載する。

[0047] (ヒト脱落乳歯歯髄幹細胞培養上清 (SHED-CM) の調製)

10cmdishを用いてDMEM (SIGMA ALORICH Co USA) +10%FBS (SIGMA ALORICH Co USA) +1% PenicillinStreptomycin (Life Technologies Japan Ltd) でヒト脱落乳歯歯髄幹細胞を培養し、80~90%コンフルエントになるまで培養を行う。PBSで2回洗浄した後に、無血清培養液 (DMEM) に変更し、48時間培養を行った。上清を回収し、1500rpmで4~5分、3000rpmで5分遠心分離し、その上清を、SHED-CMとして以下の実施例に使用した。

[0048] (腹腔内ブドウ糖負荷試験 (IPGTT) とインスリン負荷試験 (ITT) )

16時間絶食マウスにIPGTTは2g/kgのグルコース、ITTはヒューマリンRを2U/kgで腹腔内投与した。投与前、投与後15分、30分、60分、120分に眼窩採血を行い、血糖値測定および血中インスリン量を測定した。

血糖値測定は、全血をアントセンス (HORIBA) を用いて測定を行った。また、血中インスリン量測定は、EDTAで分離した血清をELISA法 (モリナガインスリン測定キット: 商品名 (森永製薬)) で測定した。

[0049] (単離膵臓インスリン含有量)

単離した膵臓を、KRB10ml中でホモゲナイザーを用いて攪拌させ、25%asidethanolを投与し、一晚反応させた。遠心分離した上清

をHTRF法 (Homogeneous Time Resolved Fluorescence, Cipro Bioassays) を用いてインスリン含有量を測定した。

[0050] (病理組織学的検討)

単離膵島を4% PFAに4時間浸水させ、組織を固定した。病理組織学的検討は、免疫染色とHE染色で比較検討を行った。

[0051] (免疫染色)

PFA固定後、10%スクロースに8時間、20%スクロースに一晩浸水させ、OCTコンパウンドに包埋した。10 $\mu$ mの厚さに切片を作成し、インスリン及びグルカゴンの発現を蛍光免疫染色法を用いて比較検討を行った。

[0052] 切片をPBSで3回洗浄した後に、0.3% Triton-X in PBSで2分間処理し、1% BSA + 0.1% Triton-X in PBSで30分ブロッキングを行った。その後、ブロッキング溶液で1/500に希釈した1次抗体を4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた (インスリン: abcam; ab7842, glucagon: abcam; ab8055)。1次抗体反応後、PBSで3回洗浄し、蛍光標識した2次抗体Alexa Fluor (Invitrogen) をブロッキング溶液で1/1000希釈し、室温で2時間反応させた。2次抗体反応後、PBSで3回洗浄し、マウントした後に、蛍光顕微鏡で観察を行った。

[0053] 5枚の非連続切片を無作為に選出し、1切片あたり5視野以上観察した (1匹あたり、25視野以上)。image Jを使用し、蛍光発現した面積評価の解析を行った。

[0054] (HE染色)

PFAで固定した組織をPBS置換し (2時間、8時間及び2時間の順でPBSを交換)、パラフィン包埋器 (サクラファインテックスジャパン) を用いてパラフィン包埋し、4 $\mu$ mの厚さに切片を作成した。切片を脱パラフィン処置 (キシレン3分 $\times$ 3回、100%エタノール3分 $\times$ 3回、95%エ

タノール1分、90%エタノール1分、70%エタノール1分、95%エタノール1分、ミリQ水（MQ）の順で洗浄し、×5ヘマトキシリン液（マイヤー：MQで希釈）で5分間反応させ、MQで10分間洗浄した。その後、×5 1%エオシンY液（WAKO：70%エタノールで希釈）で2分間反応させ、MQで1回洗浄し、脱水処置（70%エタノール1分、80%エタノール1分、90%エタノール1分、100%エタノール3分×3回、キシレン3分×3回の順で）し、マウントした後に蛍光顕微鏡で観察を行った。

[0055] （核染色）

STZ負荷後、スライドガラスをPBSで3回洗浄し、スライドガラス上の細胞を4%PFAで30分固定し、PBSで3回洗浄した。洗浄後、PBSで1/2000に希釈したDAPI（Dojindo；Japan）を5分間反応させ、PBSで3回洗浄し、マウントした後に、蛍光顕微鏡で観察を行った。imageJを使用し、1視野中のnecrosis細胞数/全体の細胞数をカウントし、比較検討をおこなった。（1スライドガラスより6視野n：3）

[0056] （ウェスタンブロッティング）

STZ負荷後、PBSで3回洗浄し、50×プロテアーゼインヒビター+Cdc42ライシスバッファー400μl/wellを投与し、15分間反応させた。wellの内容物を全て回収し、4℃で15000rpmで20分間遠心分離した。遠心分離した上清30μl+1×SDS30μlを混和させ、100℃3分間反応させたものを、サンプルとして使用した。（全てのサンプルのタンパク量：約2000μl/mlであることをBCA assay；SIGMA ALORICHを用いて確認している。）

[0057] サンプル10μlをSDSポリアミドゲルで電気泳動した後（20mA/1.5時間）、メンブレンに転写（250mA/1時間）した。Blocking one（ナカライテスク）で30分間メンブレンのブロッキングを行い、ブロッキング後、canget signal（東洋紡）で1/3000に希釈した1次抗体（caspase3：cell signaling, c

leaved caspase: cell signaling) を4℃で一晩反応させ、TBS-Tで3回洗浄した。その後 can get signal (東洋紡) で1/10000に希釈した2次抗体 (rabbit: SIGMA ADLICH) を室温で2時間反応させ、TBS-Tで3回洗浄した後、ECL-primeを用いて、蛍光発色させ、現像をおこなった。

## 実施例 2

[0058] (STZ投与による膵臓β細胞の破壊による糖尿病モデルマウスの作製及び SHED-CMの投与)

Streptozotocin (以下STZ、SIGMA ALORICH Co. USA) を生理食塩液に溶解して5mg/mlの溶液を調整し、この溶液を9~10週齢C57Bl6/Jマウスに対し、1日1回50mg/kgを5日間腹腔内投与を行い、糖尿病モデルマウスを作成した。

[0059] STZ投与開始日をday1とし、day1より14日間SHED-CMを2ml/day尾静脈内投与を行った。Control群として、DMEM (無血清の培養液) を2ml/dayで尾静脈内投与し、またExendin-4 (以下、Ex-4) 群として、Ex-4を14日間48nmol/dayで腹腔内投与を行った。24時間毎に体重・随時血糖測定を行い、day15, 27に腹腔内グルコース負荷試験 (以下IPGTT) で血糖値および血中インスリン濃度を測定した。day34に膵臓を単離し、病理組織学的検討および膵臓のインスリン含有量を測定した。結果を図1~図9に示す。

[0060] 図1に示すように、本実施例で作製したマウスは、徐々に血糖値が高くなり、2週間後程度に最高血糖値 (400mg/ml) となった。図2に示すように、SHED-CM上清を添加した群において顕著に血糖値低下効果が観察された。これに対して骨髓幹細胞培養上清投与群及びEx-4投与群は、いずれもControl群と同等の血糖値を示したにすぎなかった。なお、図3に示すように、各群の体重は、観察期間を通じてほぼ同等であった。

[0061] 図4及び図5に示すように、IPGTTの結果は、SHED-CM投与群

において血糖値が最も低下し、血中のインスリン濃度も高くインスリン分泌が促進されていた。また、図6に示すように、day 34の膵臓中のインスリン含有量は、SHED-CM投与群において最も高かった。

[0062] 図7及び図8に示すように、day 34に採取した膵臓のHE染色の結果からは、SHED-CM投与群において最も良好な $\beta$ 細胞の存在が多数確認された。図9に示すように、34日後の免疫染色結果からは、SHED-CM投与群においては、インスリンを生成分泌する $\beta$ 細胞が充実しその周囲を $\alpha$ 細胞が取り囲んだ組織を観察できた。これに対して骨髓幹細胞培養上清投与群やEx-4投与群では、SHED-CM投与群のような良好な組織形態を観察できなかった。

### 実施例 3

[0063] (STZ投与による膵臓 $\beta$ 細胞の破壊による糖尿病モデルマウスの作製及びSHED-CMの投与)

STZの生理食塩溶液15mg/mlを9~10週齢C57BL/6Jマウスに対し、150mg/kgを1回腹腔内投与し、糖尿病モデルマウスを作製した。STZ投与開始日をday 1とし、day 3に血糖値400mg/dL以上であることを確認した後に、day 3~day 16までSHED-CM, DMEMを各群2ml/dayで尾静脈内投与し、Ex-4を48nmol/dayで腹腔内投与を行った。24時間毎に体重・随時血糖値の測定を行い、day 17, 31にIPGTTで血糖値および血中インスリン濃度を測定した。day 37に膵臓を単離し、膵臓のインスリン含有量を測定した。結果を図1及び図10~12に示す。

[0064] 図1に示すように、本実施例で作製したマウスは、急激に血糖値が高くなり、最高血糖値(約500~600mg/ml)となった。図10に示すように、SHED-CM投与群では、早期に血糖値が低下傾向となり、その効果が維持された。図11に示すように、体重については、SHED-CM投与群とEx-4投与群は同様の体重減少傾向を呈した。図12に示すように、day 17のIPGTTの結果からは、SHED-CM投与群で最も血糖

値抑制効果が高いことがわかった。

#### 実施例 4

[0065] (高脂肪食による糖尿病モデルマウスの作製及びSHED-CMの投与)

4週齢C57BL/6Jに36日間、高脂肪食(High Fat Diet 32:HFD)を摂食させ、体重39.5g血糖値200mg/dLまで上昇させた。その後、HFDの摂食を継続したまま、SHED-CM, DMEMを2ml/day腹腔内投与した。体重・随時血糖測定は、高脂肪食開始後から7日毎に行った。SHED-CM投与開始日をday1とし、day58にインスリン負荷試験(ITT)でインスリン抵抗性の評価を行い、day69にIPGTTで血糖値および血中インスリン濃度を測定した。結果を、図13~17に示す。

[0066] 図13に示すように、SHED-CM投与群は、Controlに対して有意に低い血糖値を維持した。図14に示すように、SHED-CM投与群とControl群との体重増加は同程度であった。図15及び図16に示すように、SHED-CM投与群のIPGTTの結果は、Control群より良好であった。図17に示すように、ITTの結果によれば、インスリン抵抗性は、SHED-CM群とControl群とはほぼ同程度であった。

#### 実施例 5

[0067] (マウス膵β細胞を用いたSHED-CMの評価)

マウス膵β細胞株:MIN6( $1 \times 10^6$ /well)を90%コンフルエントになるまで培養し、DMEM(無血清の培養液)で3回洗浄した後、培養液をそれぞれSHED-CM, DMEM, DMEM+Ex-4(10nM)に交換した。なお、MIN6の培地には、DMEM(SIGMAADLICH Co USA)+10%FBS(SIGMA ALORICH Co USA)+1%Penicillin Streptomycin(invitrogen USA)を用いた。培養液の交換と同時にSTZ(0mM, 1mM, 5mM)の各濃度となるように添加し、6時間培養を行った。PFAで細



胞を固定した後、スライドガラス上のMIN6をDAPI染色し、蛍光顕微鏡で観察を行った。imageJを用いて、necrosis細胞数/全体の細胞数(100~200)をカウントし、各群でのnecrosis(細胞死)の割合の評価を行った。結果を図18に示す。

[0068] 図18に示すように、SHED-CM投与群では、最もnecrosisが有意に抑制されていることがわかった。

## 実施例 6

[0069] (マウス膵β細胞を用いたSHED-CMのインスリン分泌促進に対する評価)

MIN6 ( $1 \times 10^6$ /well) を90%コンフルエントになるまで培養し、DMEM(無血清の培養液)で3回洗浄した後、培養液をそれぞれSHED-CM, DMEM, DMEM+Ex-4(10nM)に交換した。培養液の交換と同時にSTZ(0mM, 1mM, 5mM)の各濃度となるように添加し、6時間培養を行った。その後、2.5mMグルコースのKRBBufferで30分間スタベーションを行った後、低グルコースKRBBuffer(2.5mM)および高グルコースKRBBuffer(16.7mM)で30分間刺激を行った。低グルコースと高グルコースそれぞれ刺激後の上清を回収し、上清を回収した後、asidethanol法にて最終的にインスリン含有量を回収した。HTRF法を用いて、上清中のインスリン量(release)および上清回収後のインスリン含有量(content)を測定し、 $release/content$ (%)にてインスリン分泌能の比較検討を行った。結果を図19に示す。

[0070] 図19に示すように、SHED-CM投与群では、インスリンの分泌が促進されていることがわかった。

## 実施例 7

[0071] (マウス膵β細胞を用いたSHED-CMのApoptosis促進に対する評価)

MIN6 ( $1 \times 10^6$ /well) を90%コンフルエントになるまで培養

し、DMEM（無血清の培養液）で3回洗浄した後、培養液をそれぞれSHED-CM, DMEM, DMEM+Ex-4（10nM）に交換した。培養液の交換と同時にSTZ（0mM, 1mM, 5mM）を添加し、6時間培養を行った。その後MIN6のタンパク質を回収し、ウェスタンブロット法にて、カスパーゼ3、クリーブドカスパーゼ3の発現量の比較検討を行った。結果を図20に示す。

[0072] 図20に示すように、SHED-CM投与群は、Control群及び骨髓幹細胞培養上清投与群よりも低いクリーブドカスパーゼ3の発現量を呈した。

[0073] 以上の結果から、SHED-CMは、 $\beta$ 細胞のnecrosis及びApoptosisを抑制し、 $\beta$ 細胞のインスリン分泌能を促進しているものと考えられた。

## 実施例 8

[0074] （2型糖尿病モデルマウスの作製及びSHED-CMの投与）

レプチン受容体欠損マウス（自然発症型）（dbdbマウス）の13週齢（雌）に61日間、12時間毎に実施例1で調製したSHED-CM1mlを静注及び腹腔内投与した。また、コントロールとして、DMEMを同様にして静注投与した。体重・随時血糖測定は、投与開始後から5日毎に行った。SHED-CM投与開始日をday1とし、day36にグルコース負荷試験（IPGTT）で血糖値および血中インスリン濃度を測定した。また、day51にインスリン負荷試験（ITT）でインスリン抵抗性の評価を行った。結果を、図21～26に示す。

[0075] 図21に示すように、SHED-CM投与群は、Controlに対して概して低い血糖値を維持した。図22に示すように、SHED-CM投与群とControl群との体重増加は同程度であった。図23及び図24に示すように、SHED-CM投与群のIPGTTの結果は、Control群より良好であった。図25に示すように、ITTの結果によれば、インスリン抵抗性は、SHED-CM群とControl群とはほぼ同程度であった。

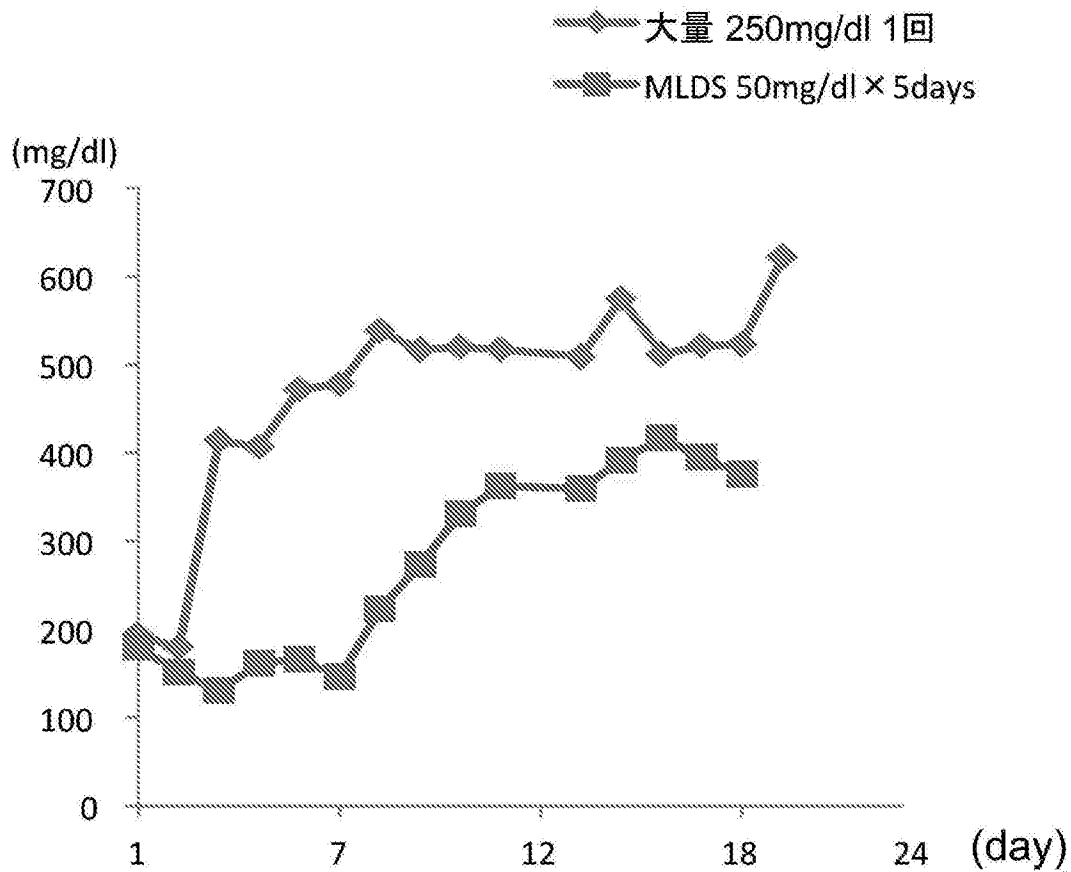
。また、図26に示すように、day 61の膵臓インシュリン含有量はSHED-CM投与群において高く、SHED-CMのインスリン分泌促進効果を支持するものであった。

[0076] 以上の結果から、本組成物は、糖尿病の治療に有用であることがわかった。

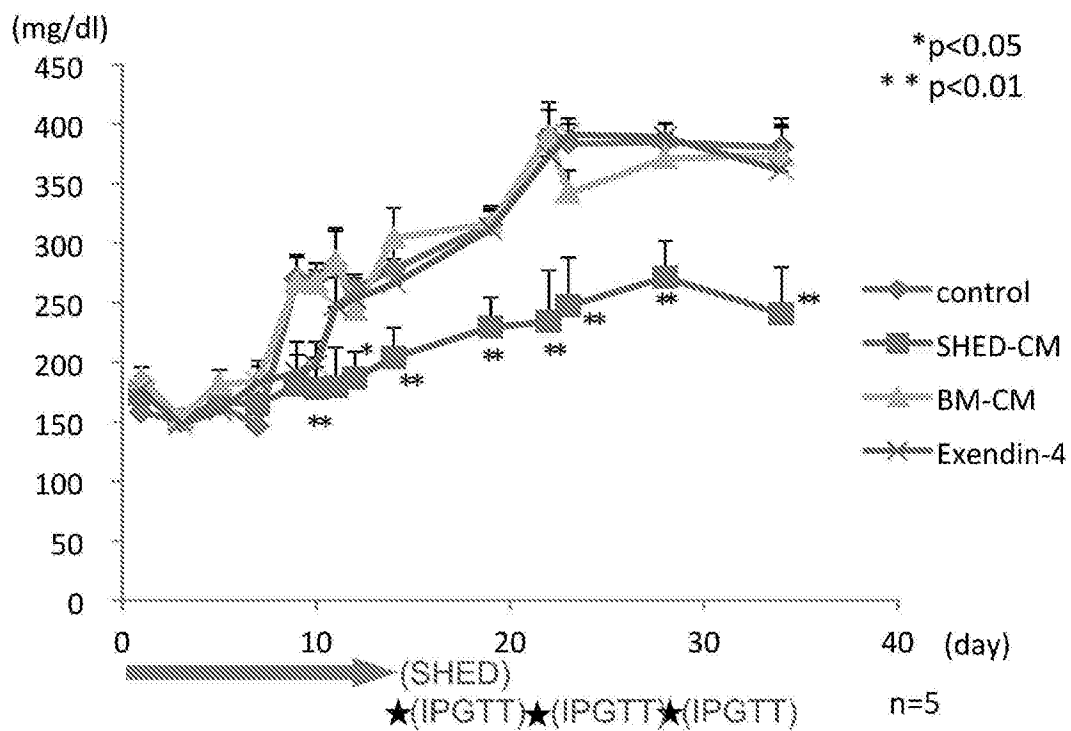
## 請求の範囲

- [請求項1] 歯髄幹細胞を培養することによって得られる培養上清を含む、糖尿病の予防又は治療用組成物。
- [請求項2] 血清を含まない、請求項1に記載の組成物。
- [請求項3] 前記歯髄幹細胞を含まない、請求項1又は2に記載の組成物。
- [請求項4] 請求項1～3のいずれかに記載の予防又は治療用組成物の製造方法であって、  
歯髄細胞から接着性細胞を選抜し、  
前記接着性細胞を培養し、  
培養上清を回収する、製造方法。
- [請求項5] 糖尿病の予防又は治療方法であって、  
請求項1～3のいずれかに記載の組成物を、糖尿病リスクのある個体あるいは糖尿病を罹患する個体に、糖尿病の予防又は治療に有効な量で投与することを含む、方法。
- [請求項6] 前記組成物を、静脈内投与、動脈内投与、門脈内投与、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、腹腔内投与及び鼻腔内投与からなる群より選択された投与方法により投与する、請求項5に記載の方法。
- [請求項7] 糖尿病の予防又は治療に有効な因子又はその組合せのスクリーニング方法  
歯髄幹細胞を培養することによって得られる培養上清に含まれる1又は2以上の成分を糖尿病に関する評価系に供給して、糖尿病への作用を評価する工程、を備える、方法。

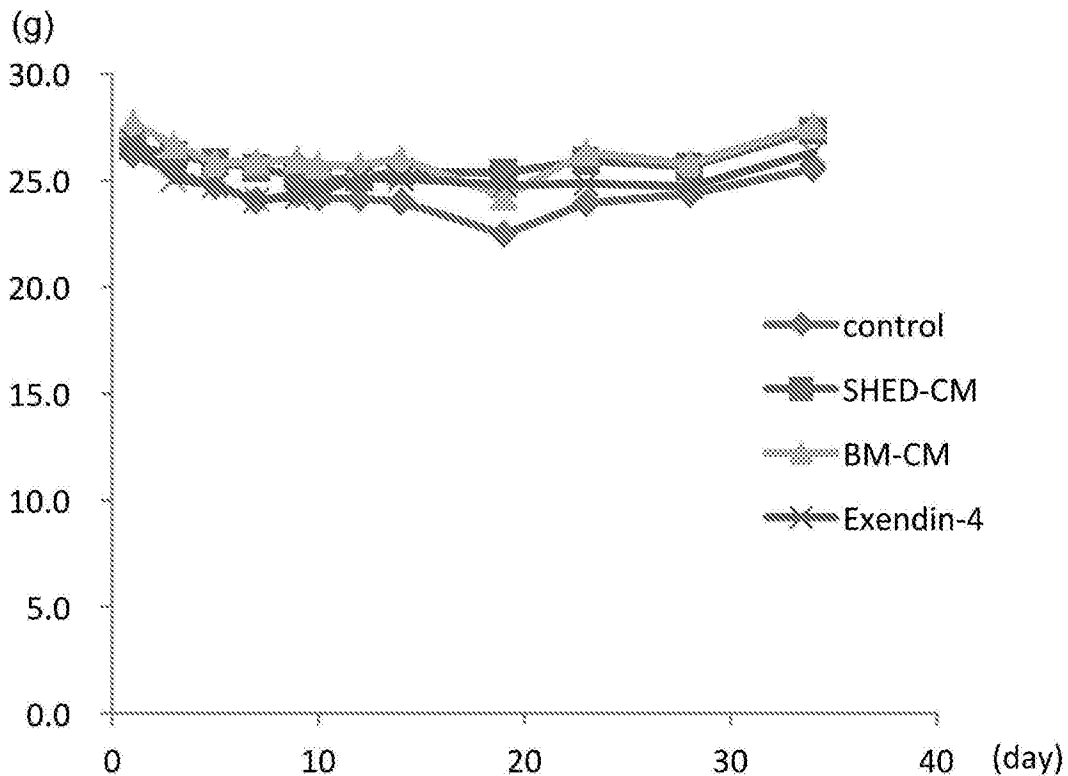
[図1]



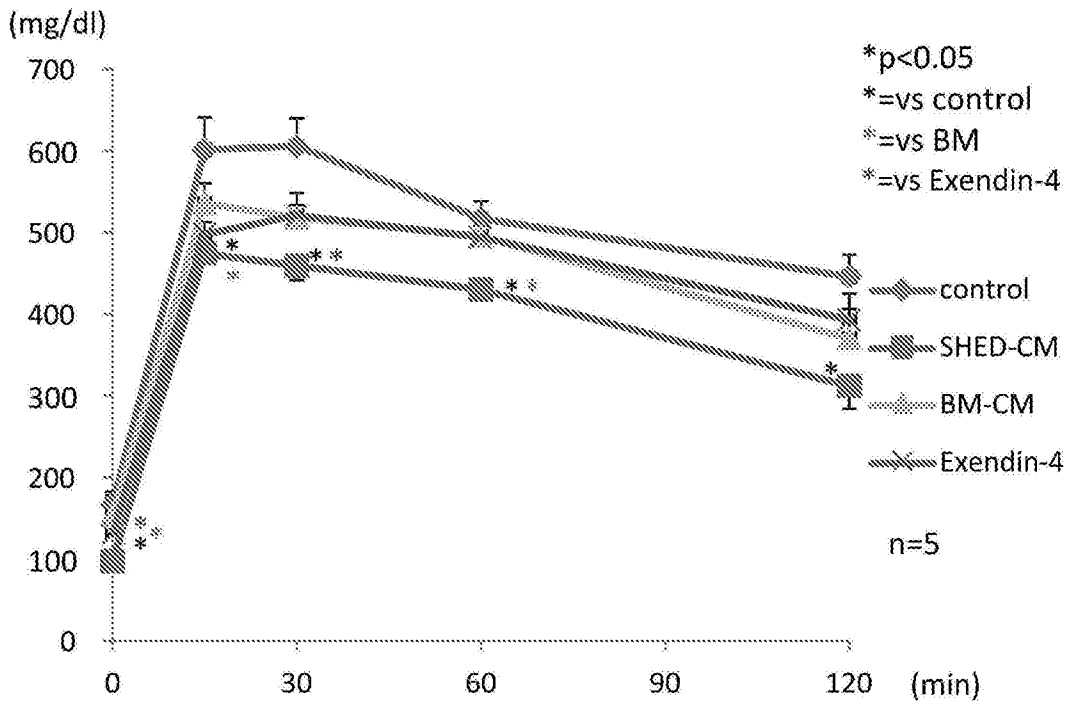
[図2]



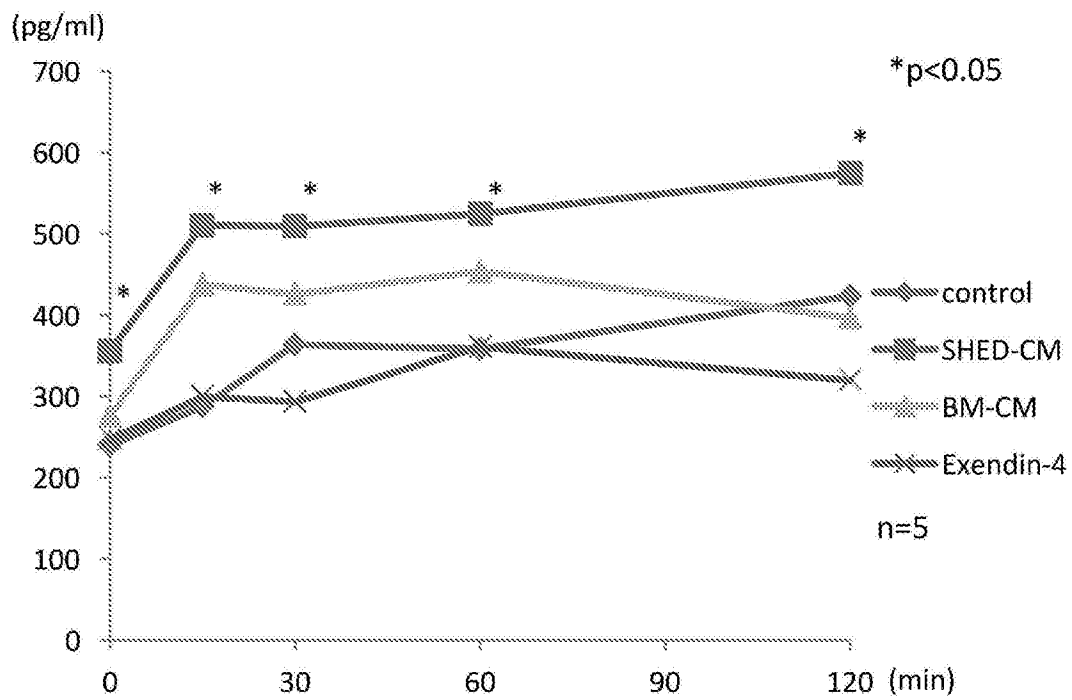
[図3]



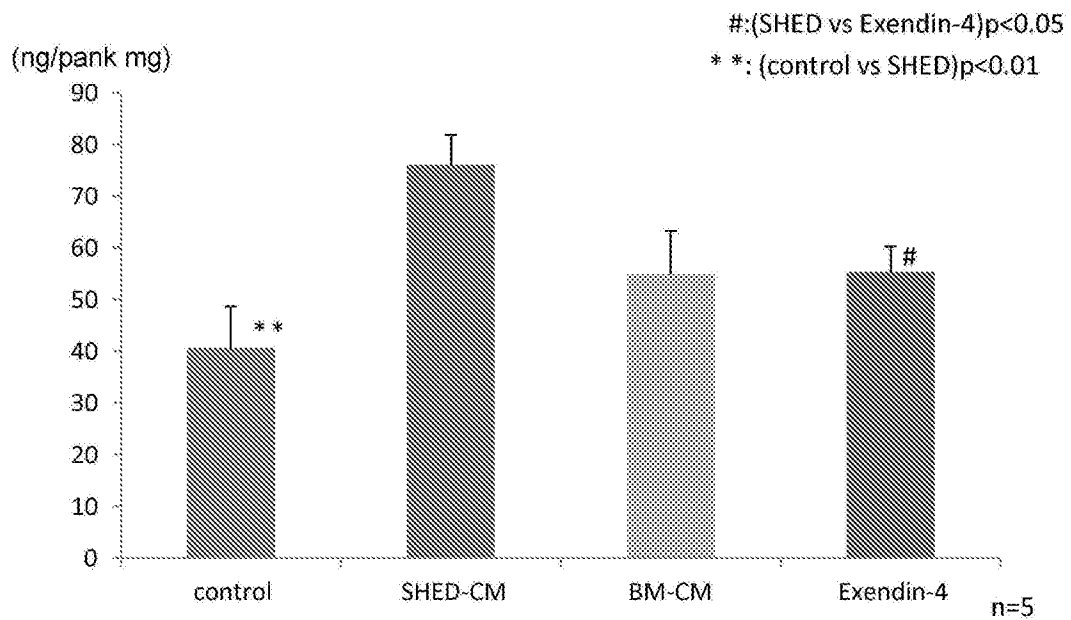
[図4]



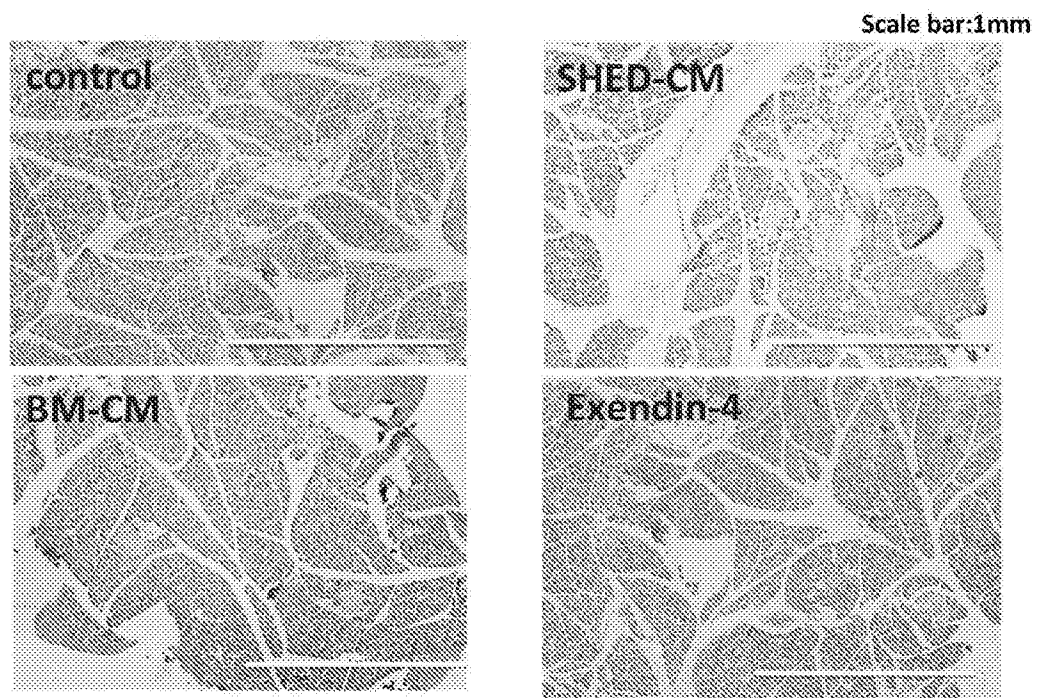
[図5]



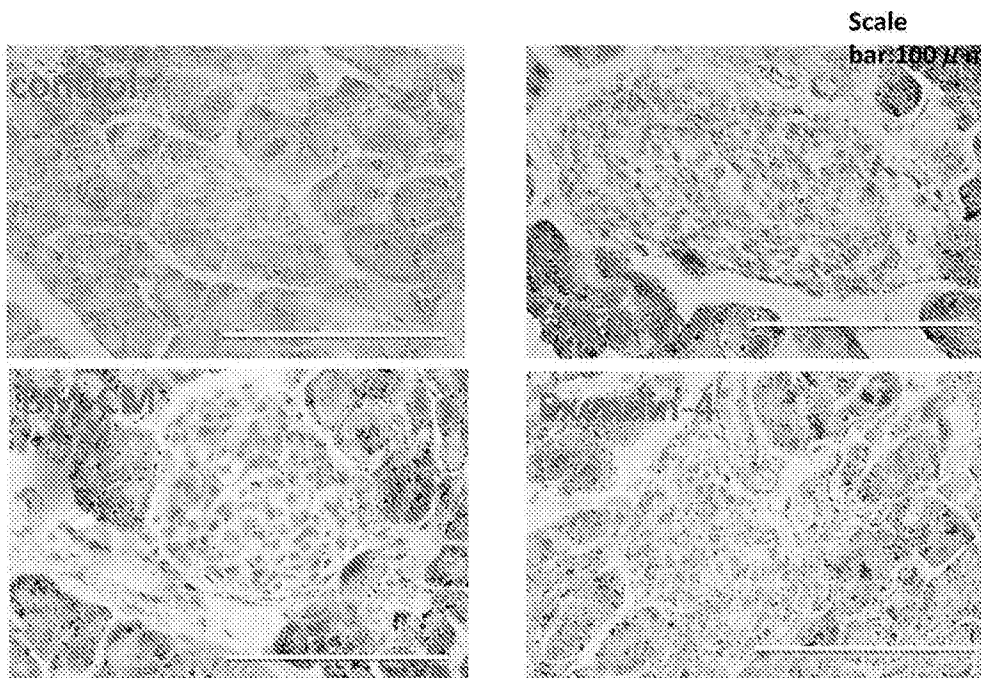
[図6]



[図7]



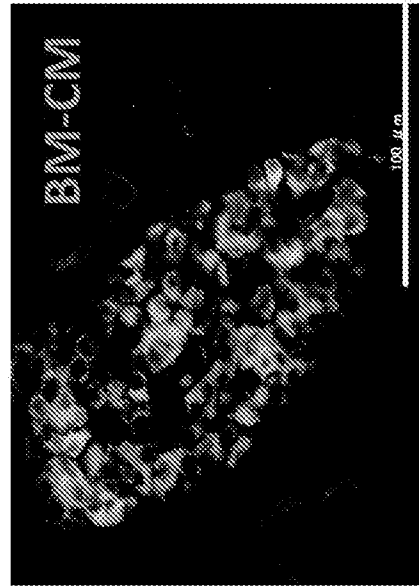
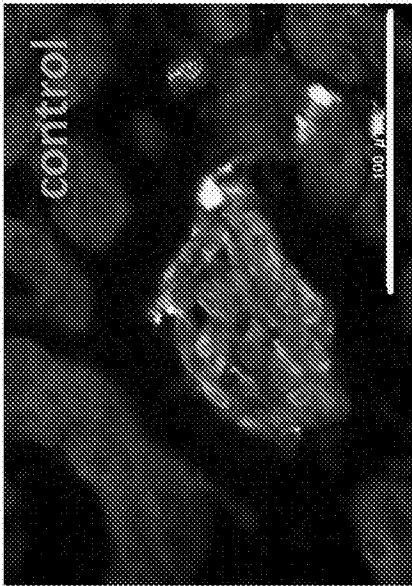
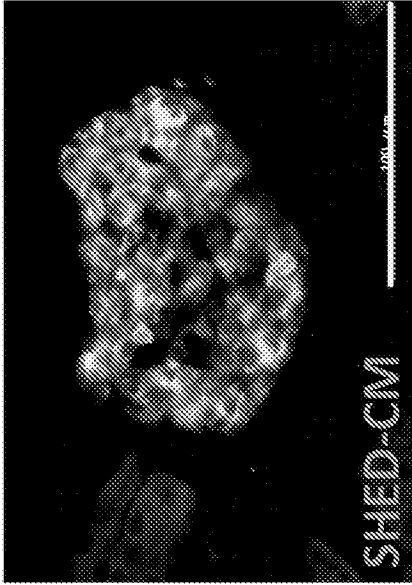
[図8]



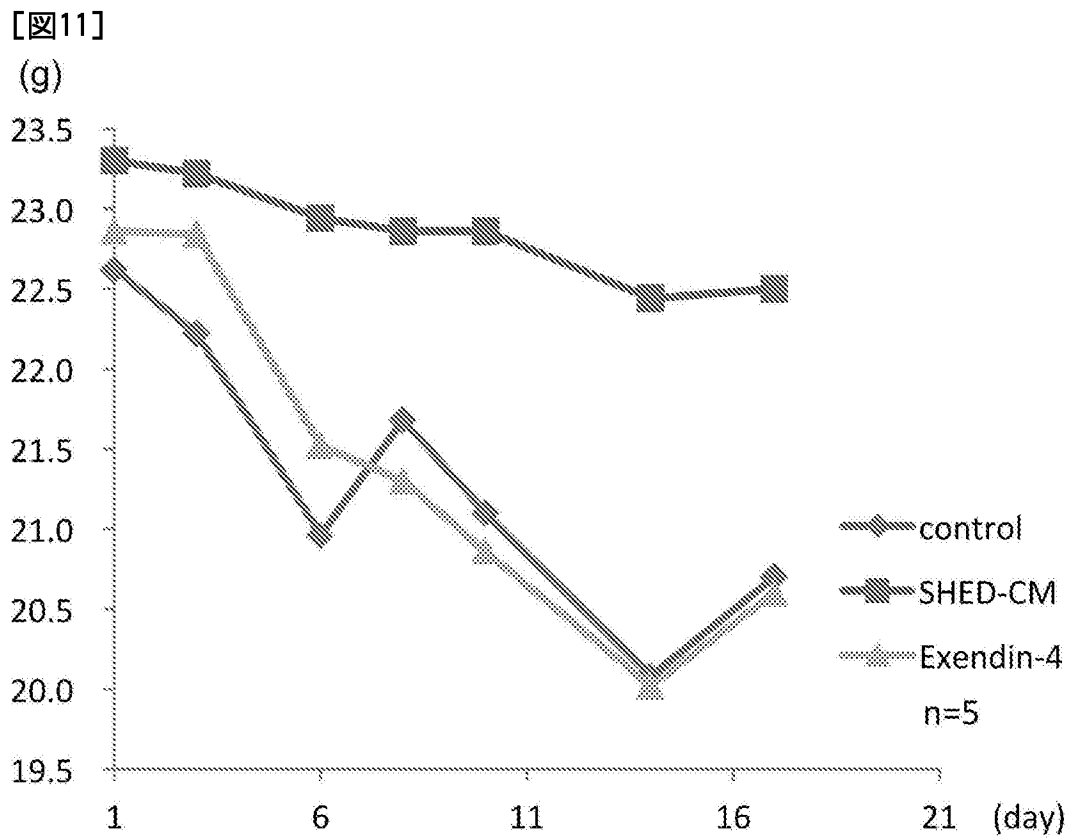
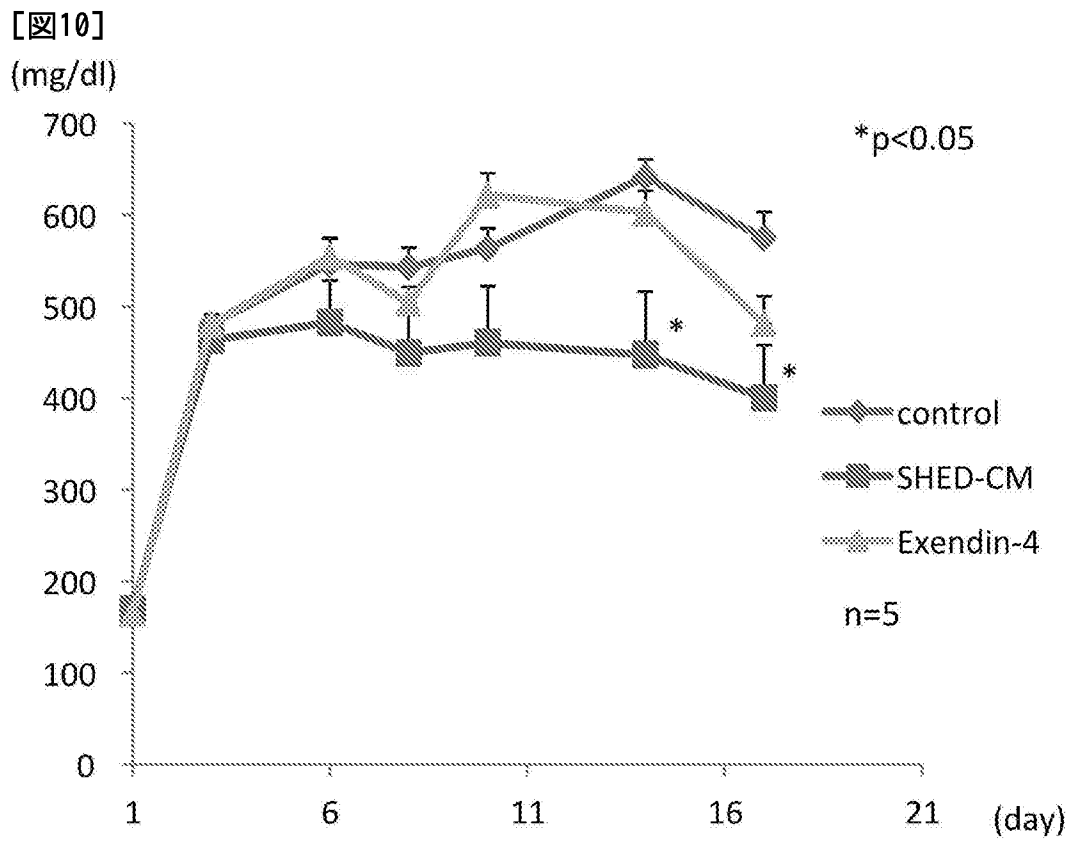


[9]

Scale  
bar:100  $\mu$  m

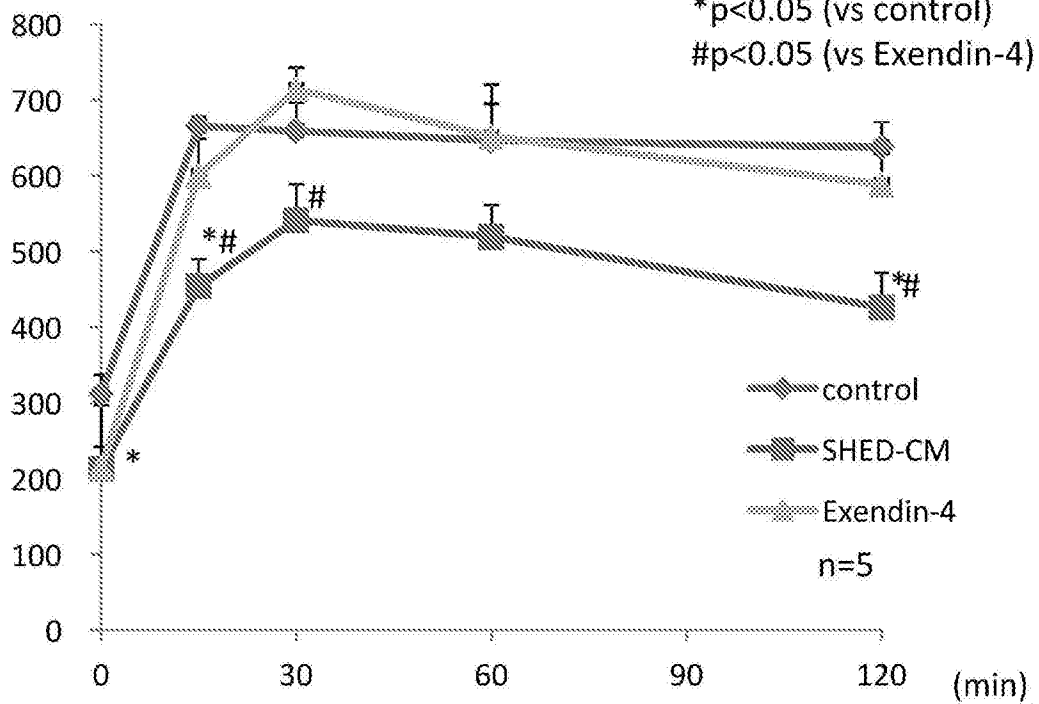


Red:glucagon  
Green:insulin



[図12]

(mg/dl)



[図13]

300

250

200

150

100

50

0

1

51

101

151

201

251

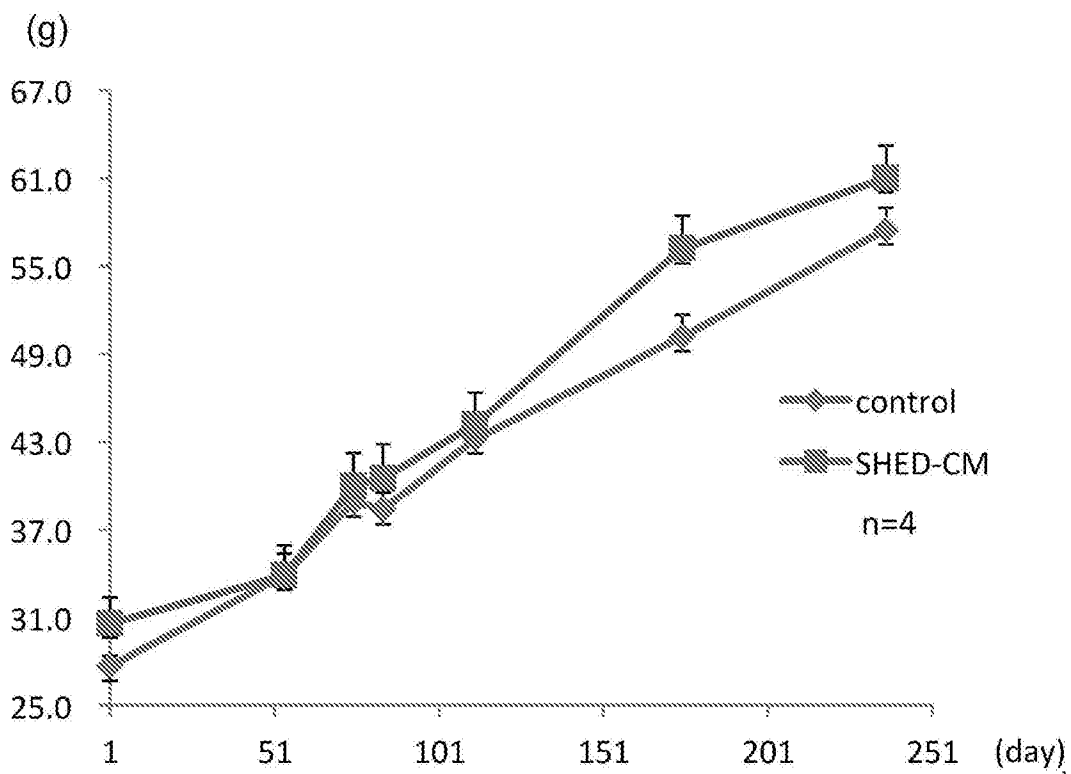
(day)

\*p&lt;0.05

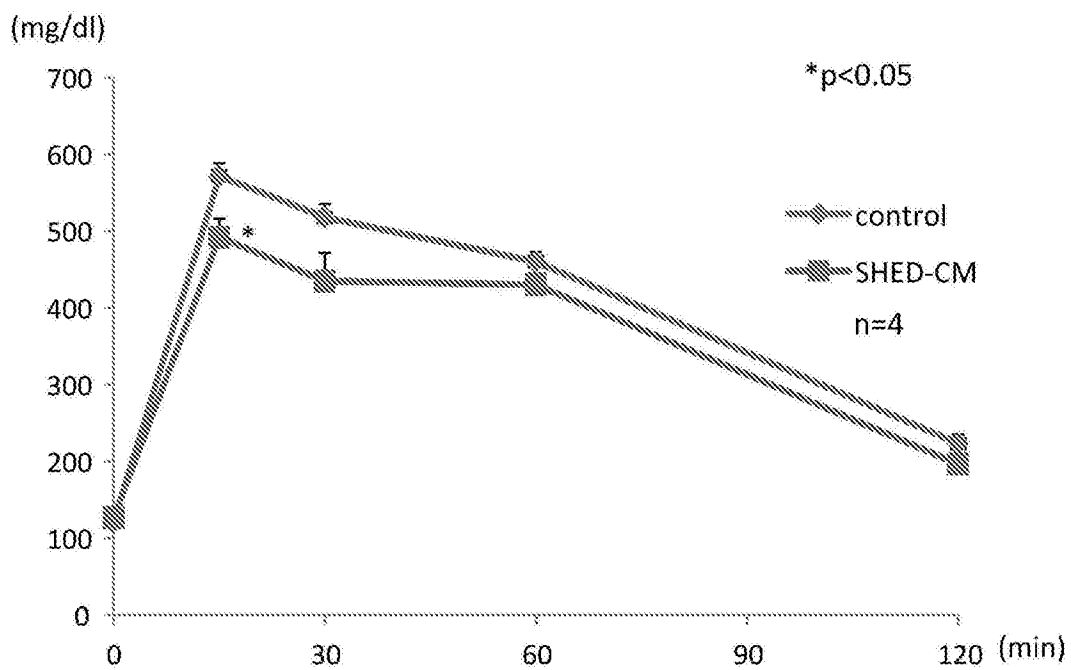
control

SHED-CM

[図14]

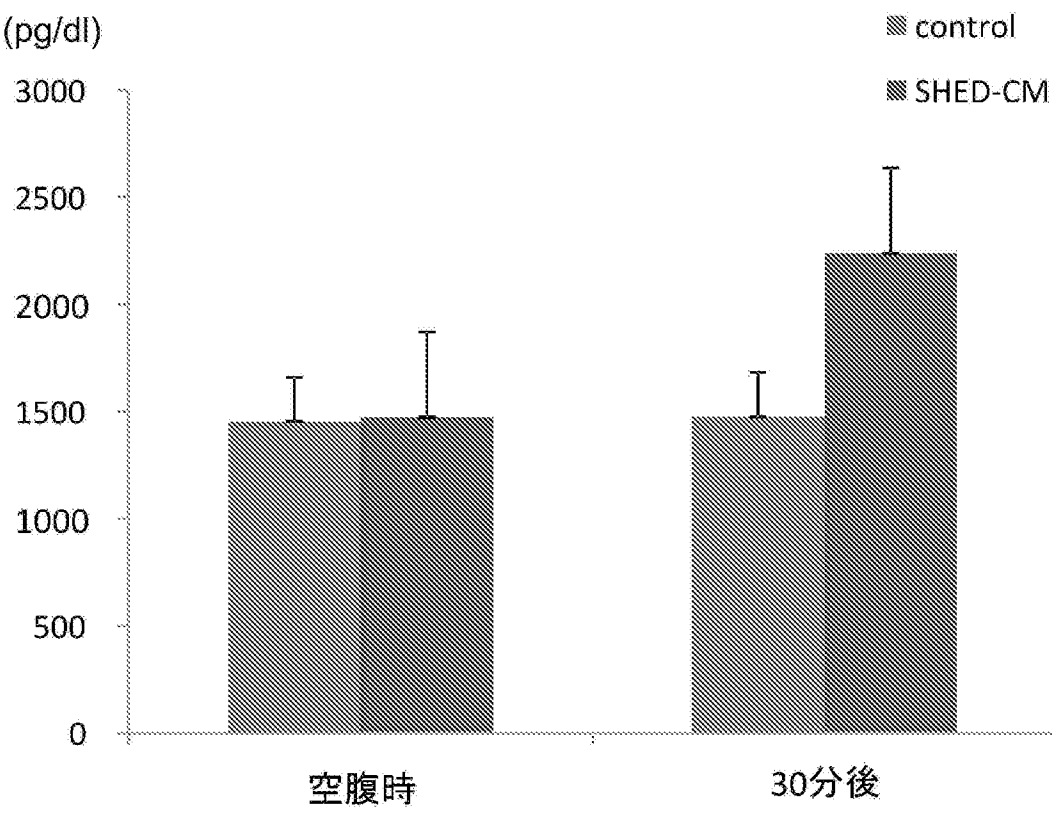


[図15]

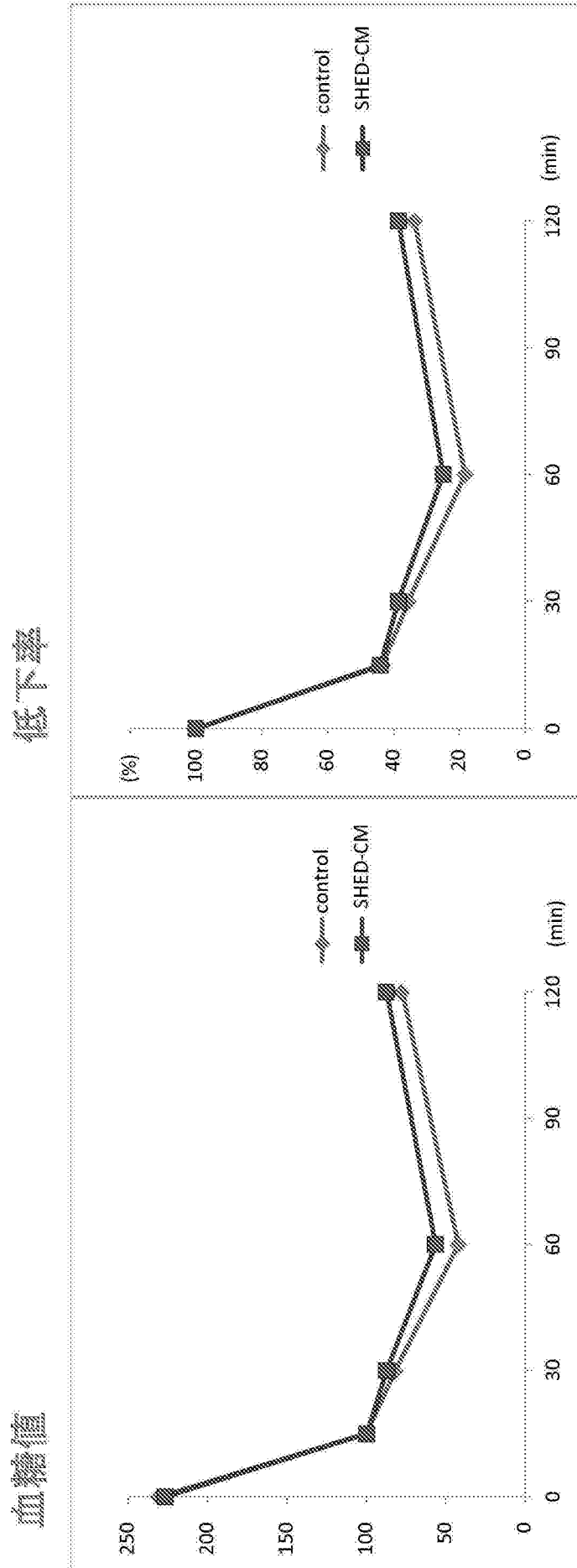


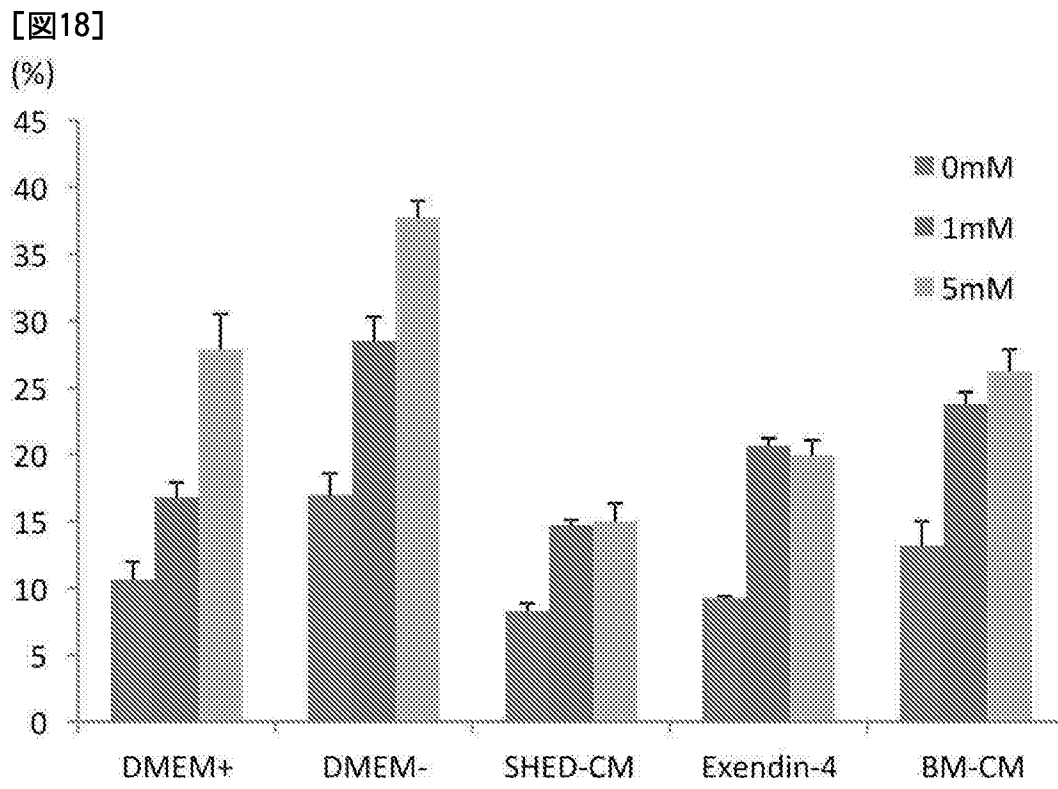
[図16]

(pg/dl)

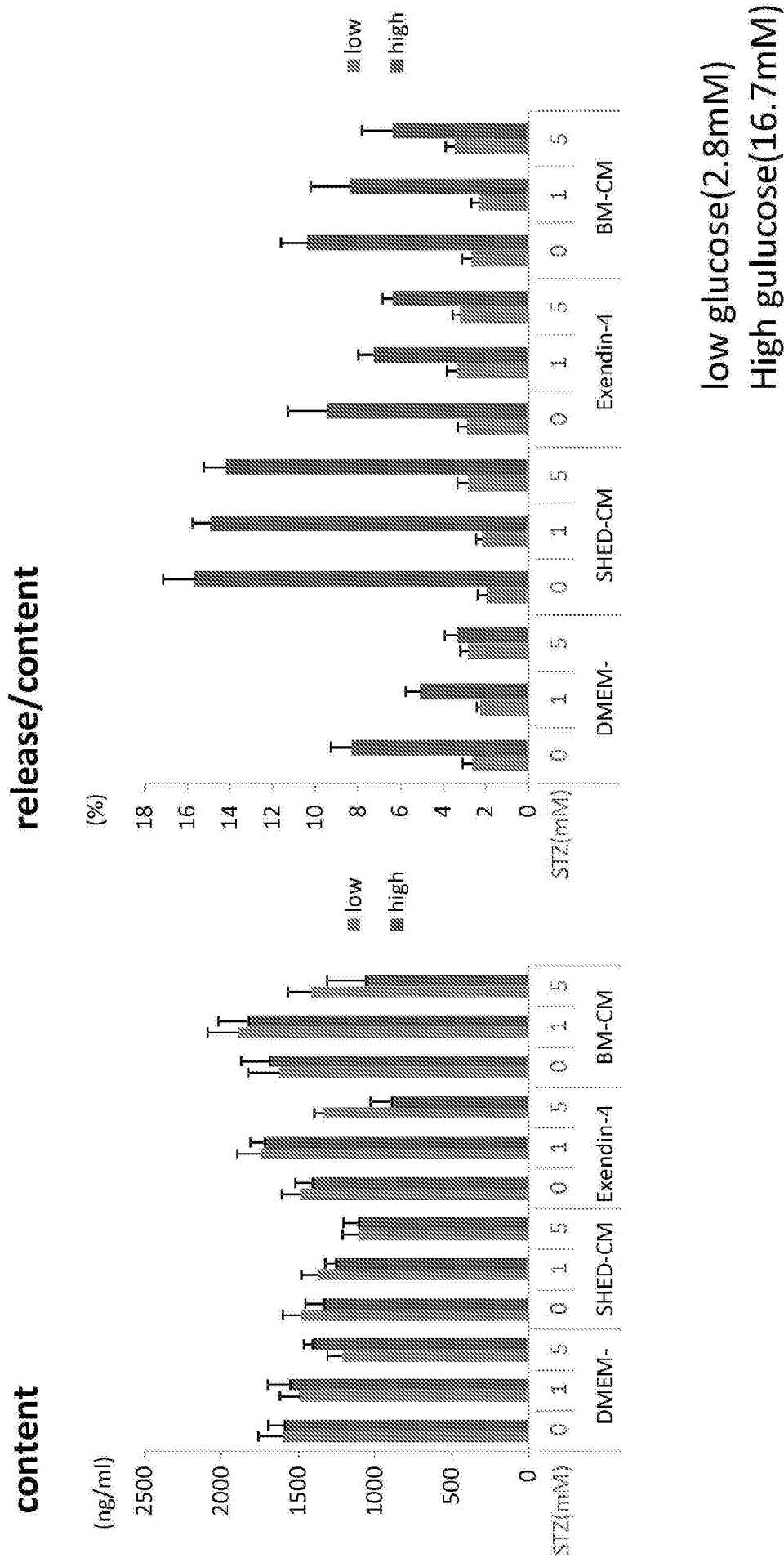


[図17]





[19]

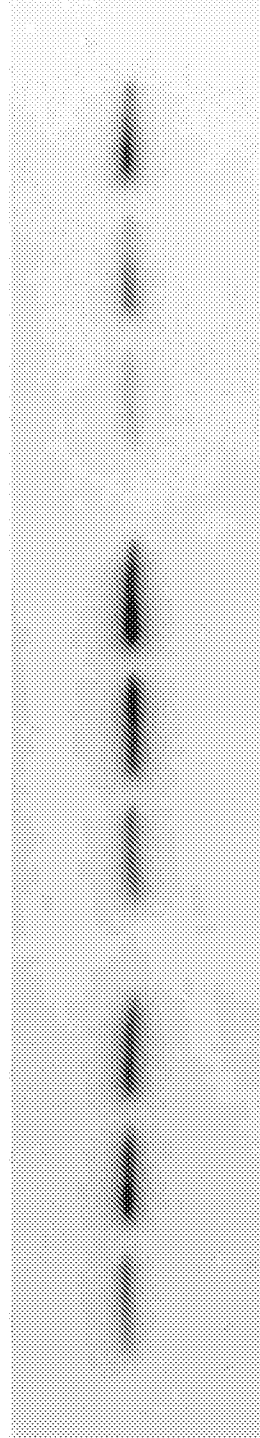




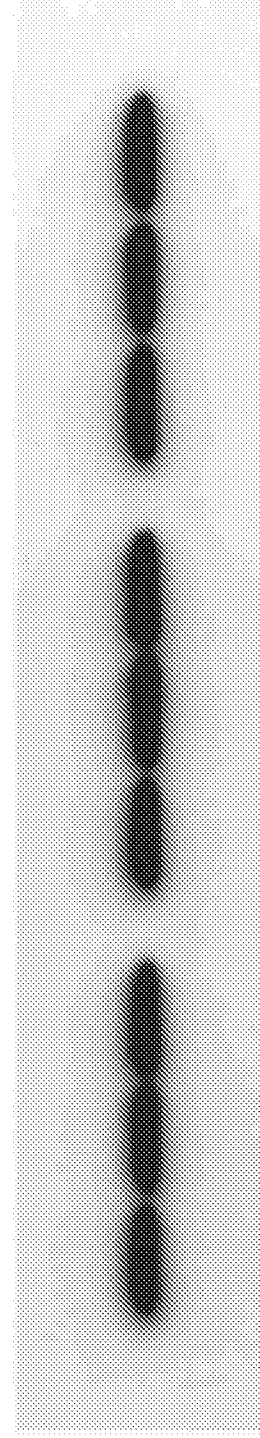
[20]

# caspase3

STZ(mM)	DMEM			BM-CM			SHED-CM		
	0	5	10	0	5	10	0	5	10



Cleaved caspase3

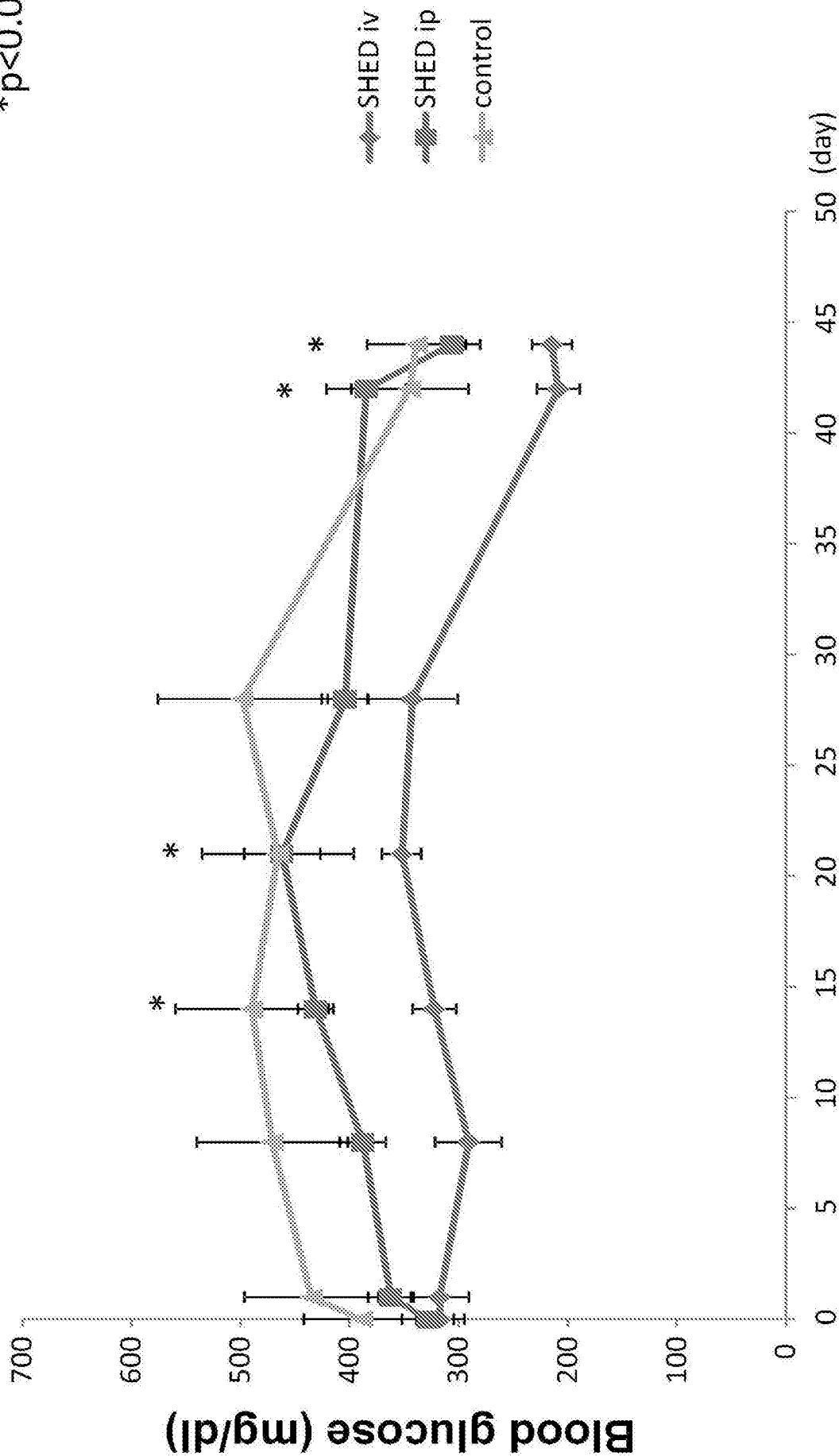


caspase3

[図21]

n=4

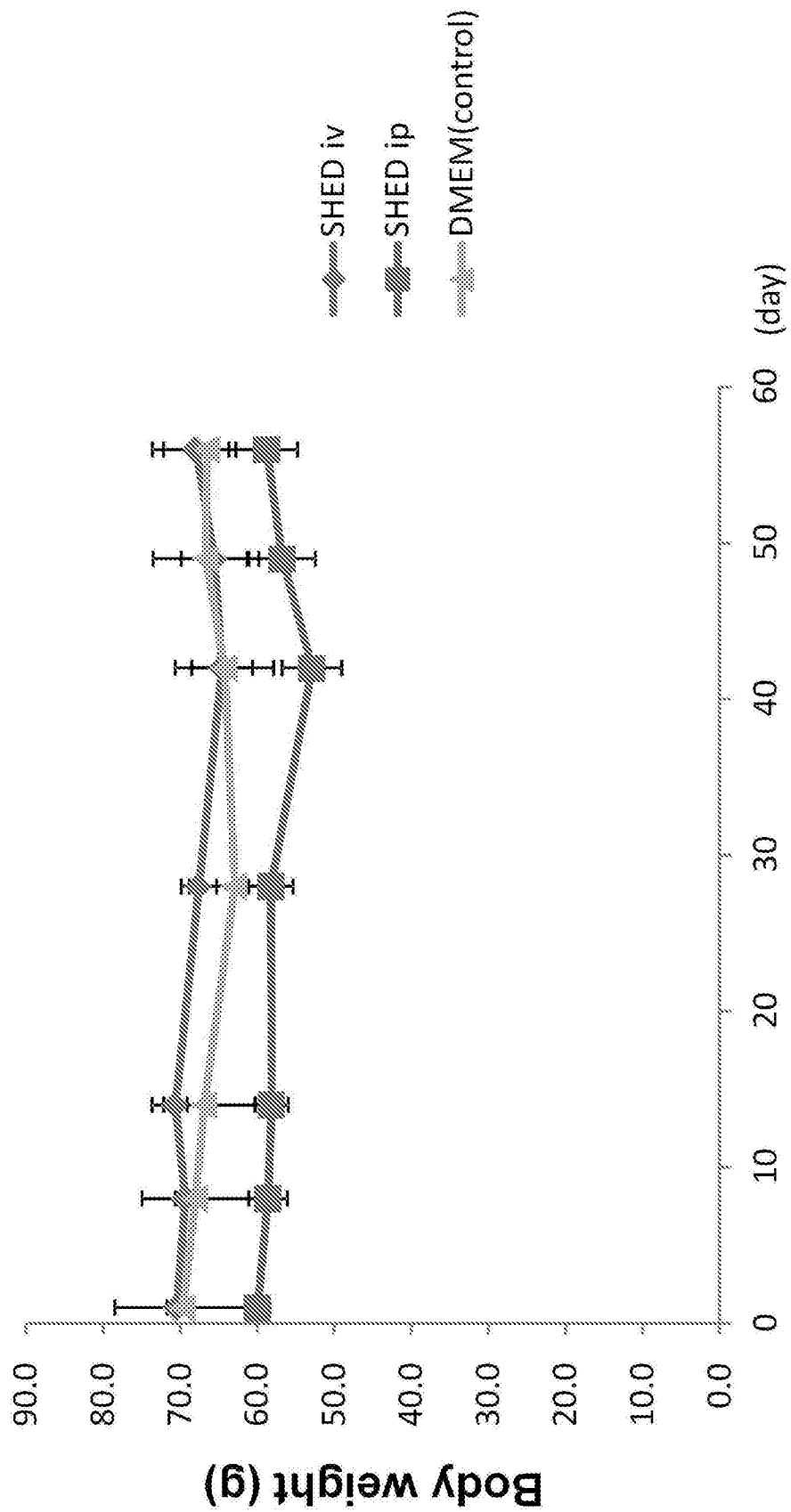
\*p<0.05



[図22]

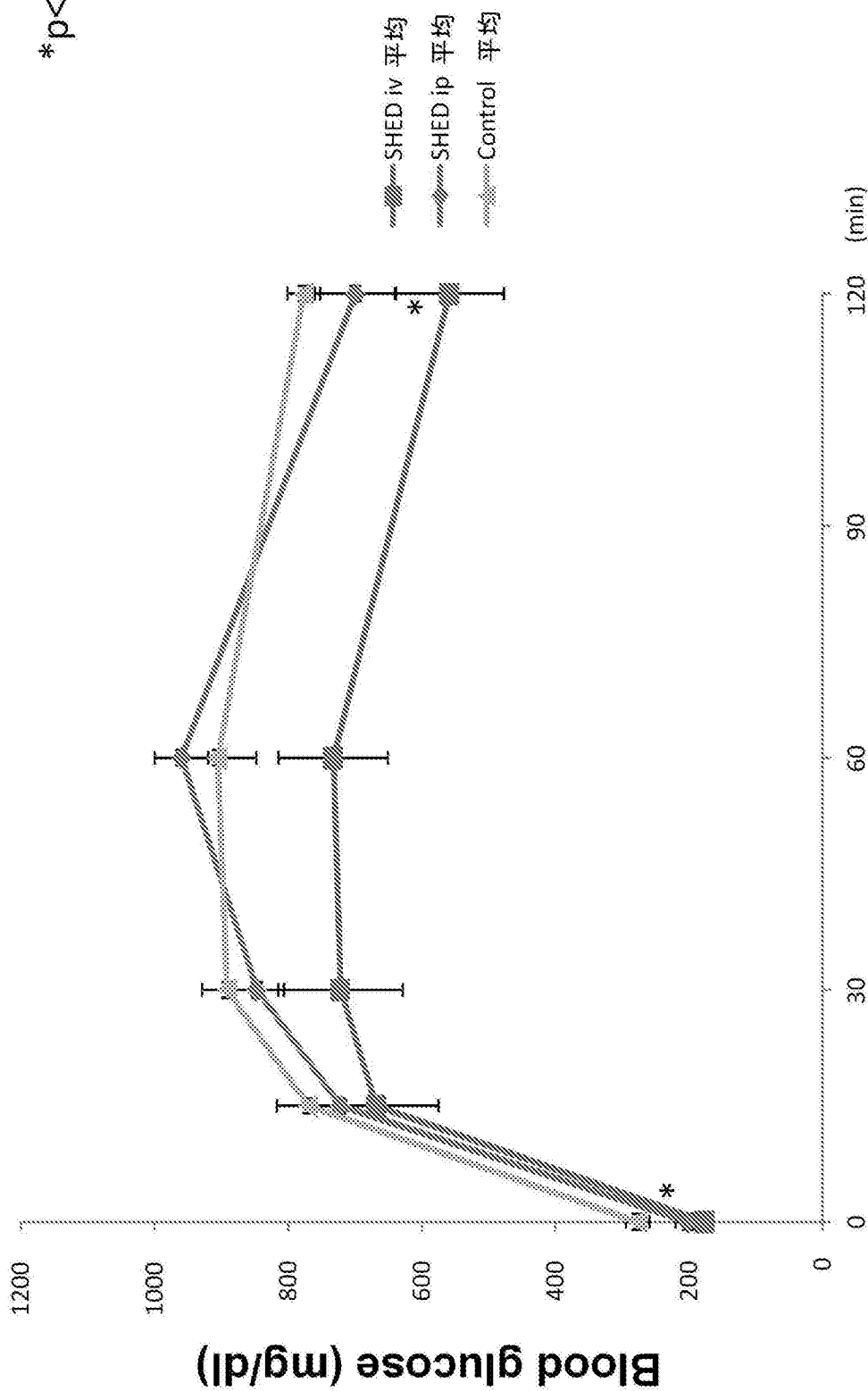
n=4

有意差なし



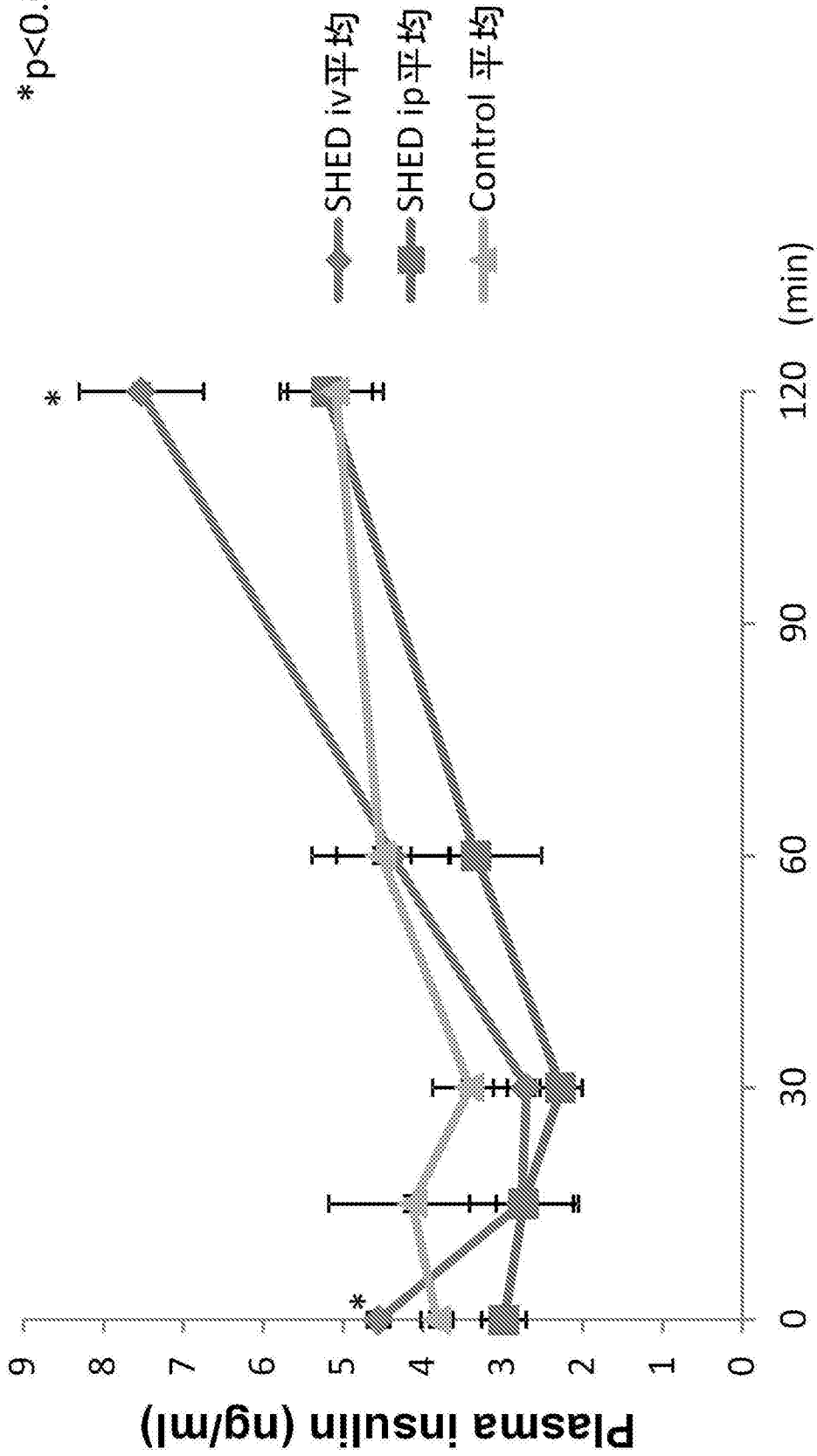
[圖23]

n=4  
\*p<0.05



[圖24]

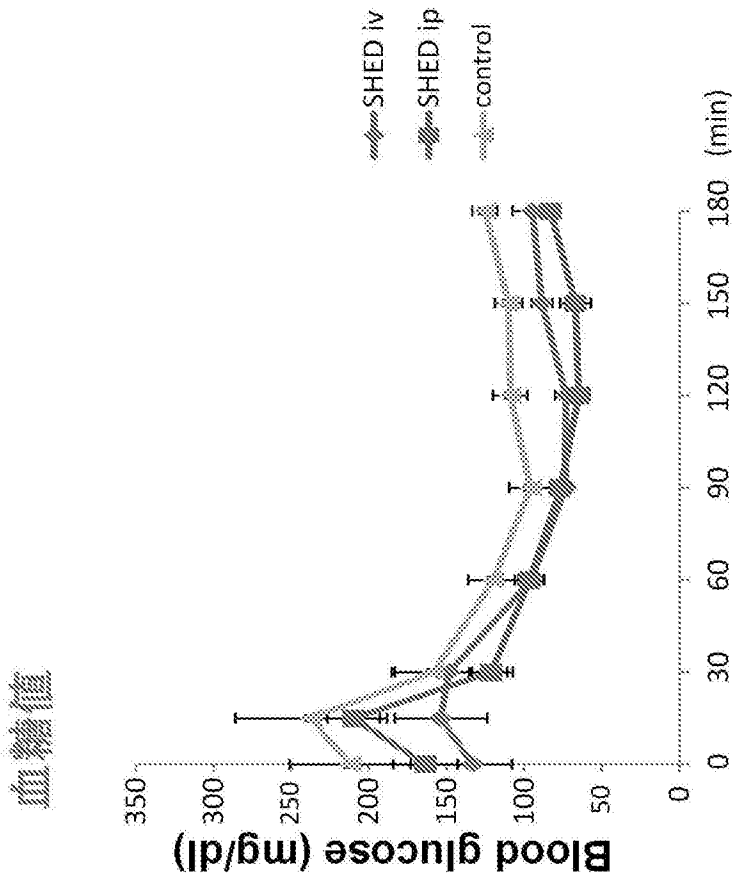
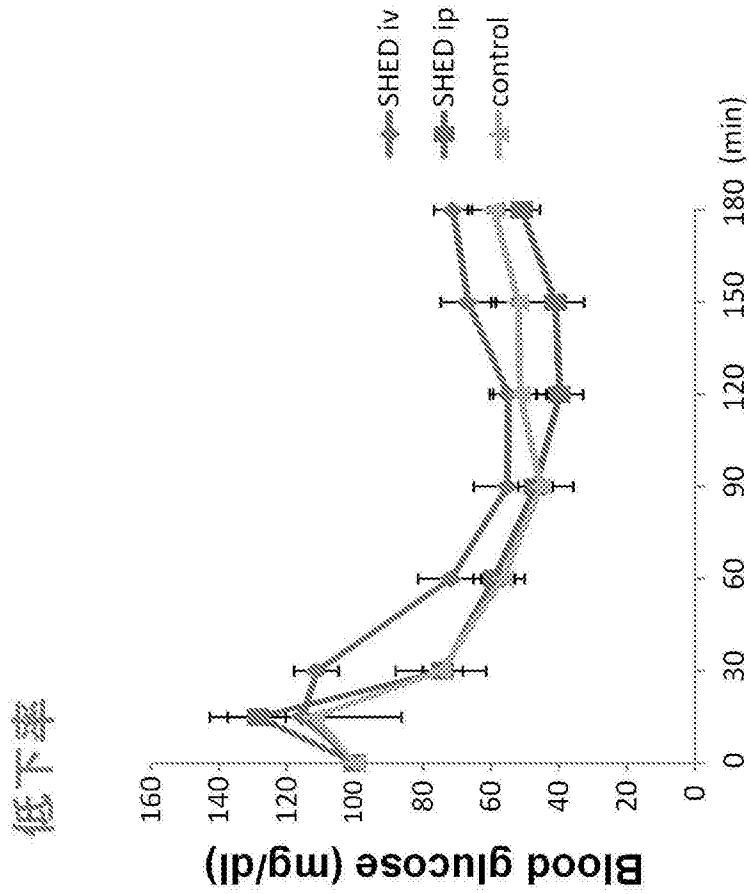
n=4  
\* p<0.05



[図25]

n=4

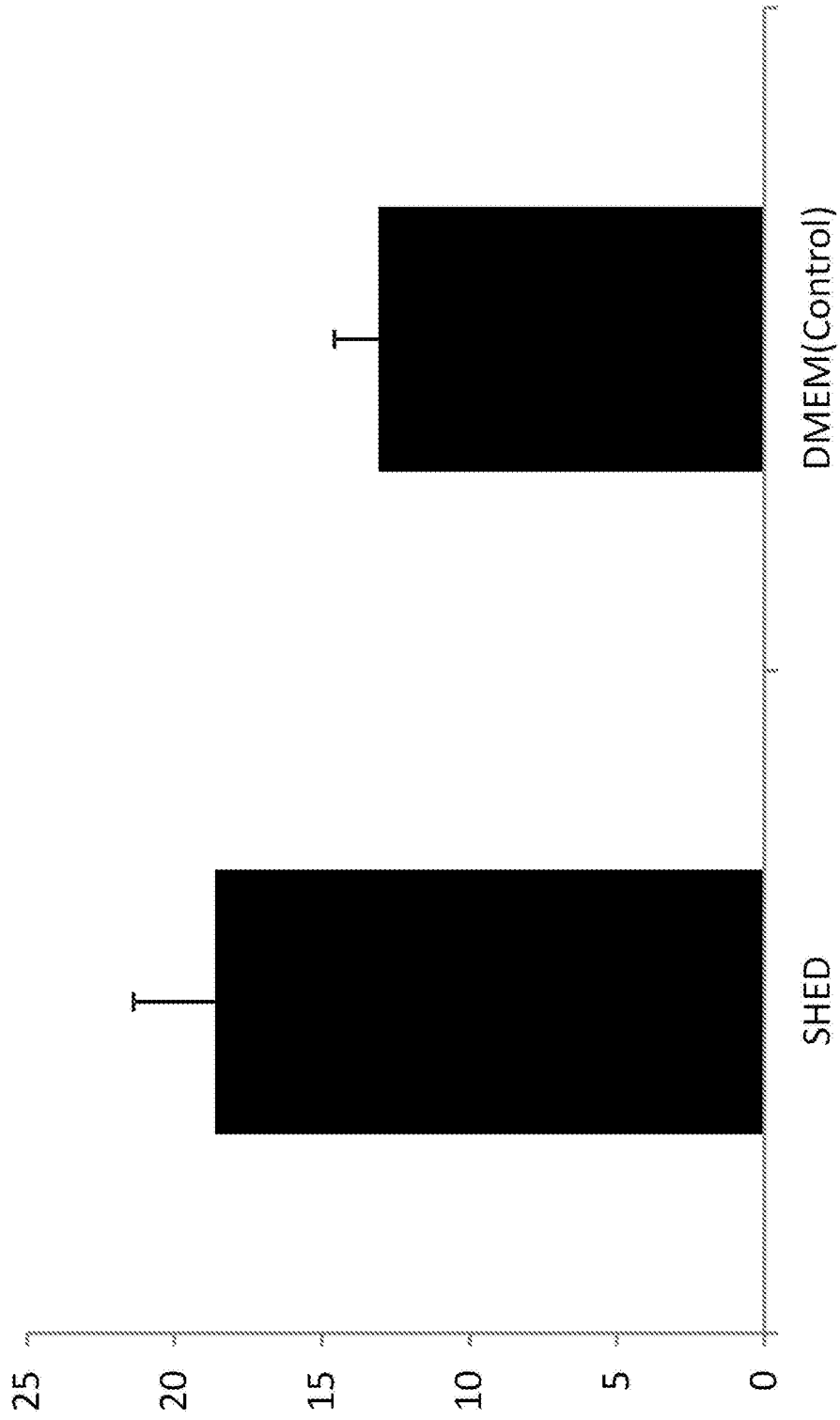
\*p<0.05



[26]

n=4

\*p<0.05



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2014/053382

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 A61K35/32(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)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)  
 A61K35/32, A61P3/10, G01N33/15, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
 Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2014  
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011/118795 A1 (Nagoya University), 29 September 2011 (29.09.2011), claims; examples & US 2013/0195991 A1 & EP 2554175 A1 & KR 10-2013-0008594 A & CN 103037872 A	1-4, 7
Y	WO 2005/118781 A1 (Kyoto University), 15 December 2005 (15.12.2005), examples & US 2007/0231897 A1 & EP 1767618 A1	1-4, 7
Y	Renyu Xue, et al., Lowering the blood glucose of diabetes mellitus mice by oral administration with transgenic human insulin-like growth factor I silkworms, J Agric Food Chem, 2012, 60, 6559-64 See Table 1	1-4, 7

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 another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  
 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 30 April, 2014 (30.04.14)	Date of mailing of the international search report 20 May, 2014 (20.05.14)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2014/053382

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2010-268715 A (Nagoya University), 02 December 2010 (02.12.2010), claims; paragraph [0035] (Family: none)	1, 2, 4, 7
X	JP 2009-107929 A (Sapporo Medical University), 21 May 2009 (21.05.2009), claims; examples & US 2010/0254953 A1      & EP 2194121 A1 & WO 2009/034708 A1      & AU 2008298816 A & CA 2699236 A              & KR 10-2010-0072240 A & CN 101802174 A	1, 2, 4, 7

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2014/053382

**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.: 5, 6  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 5 and 6 pertain to "methods for treatment of the human body by surgery or therapy" and thus relate to a subject matter on which it is not required to carry out an international search under the provision of PCT 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 additional 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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K35/32(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K35/32, A61P3/10, G01N33/15, G01N33/50		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2011/118795 A1 (国立大学法人名古屋大学) 2011.09.29, 請求項、 実施例等 & US 2013/0195991 A1 & EP 2554175 A1 & KR 10-2013-0008594 A & CN 103037872 A	1-4, 7
Y	WO 2005/118781 A1 (国立大学法人京都大学) 2005.12.15, 実施例等 & US 2007/0231897 A1 & EP 1767618 A1	1-4, 7
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 30.04.2014	国際調査報告の発送日 20.05.2014	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 安藤 公祐 電話番号 03-3581-1101 内線 3439	4U 4496

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	Renyu Xue, et al., Lowering the blood glucose of diabetes mellitus mice by oral administration with transgenic human insulin-like growth factor I silkworms, J Agric Food Chem, 2012, 60, 6559-64 See Table 1	1-4, 7
X	JP 2010-268715 A (国立大学法人名古屋大学) 2010. 12. 02, 請求項、段落【0035】等 (ファミリーなし)	1, 2, 4, 7
X	JP 2009-107929 A (北海道公立大学法人札幌医科大学) 2009. 05. 21, 請求項、実施例等 & US 2010/0254953 A1 & EP 2194121 A1 & WO 2009/034708 A1 & AU 2008298816 A & CA 2699236 A & KR 10-2010-0072240 A & CN 101802174 A	1, 2, 4, 7

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求項 5,6 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項5,6は「手術又は治療による人体を処置する方法」であって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2.  請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。