

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-106688

(P2007-106688A)

(43) 公開日 平成19年4月26日(2007.4.26)

(51) Int.C1.	F 1	テーマコード (参考)
A61K 31/702 (2006.01)	A 61 K 31/702	4 C 0 5 7
A61K 31/728 (2006.01)	A 61 K 31/728	4 C 0 8 6
C07H 3/06 (2006.01)	C 07 H 3/06	
A61P 43/00 (2006.01)	A 61 P 43/00	1 1 1
A61P 19/02 (2006.01)	A 61 P 19/02	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2005-297991 (P2005-297991)	(71) 出願人	505192084
(22) 出願日	平成17年10月12日 (2005.10.12)		株式会社 精質科学研究所
			東京都文京区湯島一丁目5番45号
		(74) 代理人	100091096
			弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100096183
			弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(72) 発明者	浅利 晃
			東京都文京区湯島1-5-45 国立大学
			法人東京医科歯科大学3号館地下1階D-1057 株式会社精質科学研究所内
		(72) 発明者	山之口 裕子
			東京都練馬区石神井台5丁目4番19号
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】サイトカイン関連遺伝子及びケモカイン関連遺伝子の発現抑制剤

(57) 【要約】

【課題】サイトカイン関連遺伝子及びケモカイン関連遺伝子の発現抑制剤を提供する。

【解決手段】ヒアルロナンを有効成分として含有する薬剤である。ヒアルロナンとしては-D-グルクロン酸- -1, 3-D-N-アセチルグルコサミン- -1, 4-を1単位とし、これを2個含む4糖(HA4)であることが好ましい。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒアルロナンを有効成分とする、サイトカイン関連遺伝子の発現抑制剤。

【請求項 2】

上記ヒアルロナンは、-D-グルクロン酸- - 1 , 3 -D-N-アセチルグルコサミン- - 1 , 4 -を 1 単位とし、これを 2 個含む 4 糖であることを特徴とする請求項 1 記載のサイトカイン関連遺伝子の発現抑制剤。

【請求項 3】

上記サイトカイン関連遺伝子は、炎症性サイトカインに関連する遺伝子であることを特徴とする請求項 1 記載のサイトカイン関連遺伝子の発現抑制剤。

10

【請求項 4】

注射剤及び経口投与剤であることを特徴とする請求項 1 記載のサイトカイン関連遺伝子の発現抑制剤。

【請求項 5】

ヒアルロナンを有効成分とする、ケモカイン関連遺伝子の発現抑制剤。

【請求項 6】

上記ヒアルロナンは、-D-グルクロン酸- - 1 , 3 -D-N-アセチルグルコサミン- - 1 , 4 -を 1 単位とし、これを 2 個含む 4 糖であることを特徴とする請求項 5 記載のケモカイン関連遺伝子の発現抑制剤。

20

【請求項 7】

注射剤及び経口投与剤であることを特徴とする請求項 5 記載のケモカイン関連遺伝子の発現抑制剤。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、ヒアルロナンを有効成分とするサイトカイン関連遺伝子及びケモカイン関連遺伝子の発現抑制剤に関する。

【背景技術】**【0002】**

ヒアルロナンは、D - グルクロン酸と N - アセチル - D - グルコサミンとの 2 糖繰り返し単位から構成されている長鎖の多糖であり、一方、オリゴ糖も知られている。ヒアルロナンは鶏冠、さい体、皮膚、関節液などの生体組織からの抽出液、またはストレプトコッカス属の細菌を用いる発酵法などにより製造され、毒性学的および免疫学的作用が存在しないため、薬剤や化粧品として利用されており、例えばヒアルロナンの関節内注射による関節炎の治療がよく知られている。以下の説明において、4 糖のヒアルロナンを HA4 と記載する。

30

【0003】

HA4 には、臓器保存、肝障害および胃潰瘍に対する治療・抑制効果があることが報告されている（特許文献 1 参照）。また、HA4 には、ストレス蛋白発現増強作用および細胞死抑制作用があることが知られている（非特許文献 1 参照）。さらに、ヒアルロン酸オリゴ糖には、さまざまな生理活性があることも報告されている（非特許文献 2 参照）。

40

【0004】

一方、サイトカインは、細胞から放出され、免疫、炎症反応の制御作用、抗ウィルス作用、抗腫瘍作用、細胞増殖・分化の調節作用といった細胞間相互作用を媒介する蛋白性因子（多くは糖タンパク質）を総称した呼称である。サイトカインとしては、インターロイキン、インターフェロン、腫瘍壊死因子（TNF）等が知られている。また、ケモカインは、白血球走化性を有する因子群（chemotactic cytokine）として定義される。本明細書において、ケモカインはサイトカインに含まれない概念として定義する。

【0005】

また、サイトカイン関連遺伝子とは、サイトカインをコードする遺伝子及び当該遺伝子

50

の発現を調節する遺伝子の総称である。サイトカイン関連遺伝子としては種々知られており、サイトカイン関連遺伝子の発現亢進と疾患との関連性が指摘されている。サイトカイン関連遺伝子の発現を効果的に抑制することで、各種疾患の治療に大いに寄与することが指摘されている。

【特許文献1】WO 2002/004471

【非特許文献1】Xu H, Ito T, Tawada A, Maeda H, Yamanokuchi H, Isahara K, Yoshida K, Uchiyama Y, Asari A. Effect of hyaluronan oligosaccharides on the expression of heat shock protein 72. *J Biol Chem.* 2002;10;277(19):17308-14.

【非特許文献2】Asari A. Novel Functions of Hyaluronan Oligosaccharides. In *Science of Hyaluronan Today*. Editors: Vincent C. Hascall, Masaki Yanagishita. Glycoforum, (<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA12/HA12J.html>). 2005.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

そこで、本発明は、新規なサイトカイン関連遺伝子及びケモカイン関連遺伝子の発現抑制剤を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

上述した目的を達成した本発明に係る、サイトカイン関連遺伝子ケモカイン関連遺伝子の発現抑制剤は、ヒアルロナンを有効成分として含有する。すなわち、ヒアルロナンにはサイトカイン関連遺伝子及びケモカイン関連遺伝子の発現を抑制する新規な機能があることを見いだし、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明に係るサイトカイン関連遺伝子及びケモカイン関連遺伝子の発現抑制剤は、ヒアルロナンを有効成分とする。ここでヒアルロナンとしては、-D-グルクロン酸-1,3-D-N-アセチルグルコサミン-1,4-を1単位とし、これを2個含む4糖であることが望ましい。また、上記サイトカイン関連遺伝子として、特に炎症性のサイトカインに関連する遺伝子の発現を抑制することができる。

【発明の効果】

【0009】

本発明に係るサイトカイン関連遺伝子及びケモカイン関連遺伝子の発現抑制剤は、ヒアルロナンを有効成分とするものであるから、比較的安価にかつ容易に大量生産できる利点がある。また、ヒアルロナンは毒性や抗原性がほとんどないこと、生体が元来有している治療作用や疾患の防止作用を増強することから副作用の極めて少ない抑制剤として期待される。したがって、本発明によれば、サイトカイン関連遺伝子及びケモカイン関連遺伝子の発現亢進に起因する疾患の治療に有効な新規な薬剤を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

以下、本発明を詳細に説明する。本発明に係るサイトカイン関連遺伝子及びケモカイン関連遺伝子の発現抑制剤は、種々のサイトカイン関連遺伝子及びケモカイン関連遺伝子の発現を抑制する機能を有する剤である。サイトカイン関連遺伝子及びケモカイン関連遺伝子の発現を抑制するとは、未処理の動物細胞における当該遺伝子の発現量と、本剤で処理した動物細胞における当該遺伝子の発現量とを比較したときに、後者の発現量が有意に小であることを意味する。発現量は、多数のプローブDNAが基板に固定化されてなるDNAチップを使用して測定することができる。

【0011】

以下の説明において、本発明に係るサイトカイン関連遺伝子及びケモカイン関連遺伝子の発現抑制剤を単に薬剤と称する。

【0012】

本発明に係る薬剤に含まれるヒアルロナンとしては、基本的には-D-グルクロン酸

10

20

30

40

50

の1位と-D-N-アセチルグルコサミンの3位とが結合した2糖単位を少なくとも1個含む2糖以上のものでかつ-D-グルクロン酸と-D-N-アセチルグルコサミンとから基本的に構成されるものであれば、2糖単位が1個または複数個結合したものにこれらの要素が結合した糖であってもよく、またこれらの誘導体、例えば、アシル基等の加水分解性保護基を有したもの等も使用し得る。該糖は不飽和糖であってもよく、不飽和糖としては、非還元末端糖、通常、グルクロン酸の4,5位炭素間が不飽和のもの等が挙げられる。本発明で使用するヒアルロナンとしては、具体的には動物等の天然物から抽出されたもの、微生物を培養して得られたもの、化学的もしくは酵素的に合成されたものなどいずれも使用することができる。例えば鶏冠、さい体、皮膚、関節液などの生体組織から公知の抽出法と精製法によって得ることができる。またストレプトコッカス属の細菌等を用いた発酵法によっても製造できる。

10

【0013】

本発明においては、ヒアルロナンオリゴ糖もヒアルロナンに包含され、上記2糖単位1個からなる2糖およびその誘導体のような低分子量のヒアルロナンから、重量平均分子量400万程度の高分子量のヒアルロナンまで使用することができる。好ましくは組織における浸透性などの点で優れる重量平均分子量380程度~900,000程度のヒアルロナンが挙げられ、より好ましくは2~20糖程度のヒアルロナンを挙げることができる。

【0014】

ヒアルロナンのうち分子量の低いものは、具体的には、酵素分解法、アルカリ分解法、加熱処理法、超音波処理法(Biochem., 33(1994)p6503-6507)等の公知の方法によってヒアルロナンを低分子化する方法、化学的もしくは酵素的に合成する方法(Glycoconjugate J., (1993)p435-439、W093/20827)などで製造することができます。例えば酵素分解法としては、ヒアルロナン分解酵素(ヒアルロニダーゼ(睾丸由来)、ヒアルロニダーゼ(Streptomyces由来)、ヒアルロニダーゼSDなど)、コンドロイチナーゼAC、コンドロイチナーゼACII、コンドロイチナーゼACIII、コンドロイチナーゼABCなどのヒアルロナンを分解する酵素をヒアルロナンに作用させてヒアルロナンオリゴ糖を生成する方法(新生化学実験講座「糖質II-プロテオグリカンとグリコサミノグリカン-」p244-248、1991年発行、東京化学同人 参照)などが挙げられる。

20

【0015】

また、アルカリ分解法としては、例えばヒアルロナンの溶液に1N程度の水酸化ナトリウム等の塩基を加え、数時間加温して、低分子化させた後、塩酸等の酸を加えて中和して、低分子量のヒアルロナンを得る方法などが挙げられる。本発明で用いるヒアルロナンは、塩の形態を包含し、製剤上の必要に応じて、その薬学上許容できる塩を用いることができる。例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、トリ(n-ブチル)アミン塩、トリエチルアミン塩、ピリジン塩、アミノ酸塩等のアミン塩などであることができる。

30

【0016】

本発明の薬剤は、ある分子量のヒアルロナン単独又は種々の分子量のヒアルロナンを組み合わせたものなど特に限定することなく使用できる。本発明の薬剤は、ヒアルロナンを有効成分とするものであり、その有効量をヒトを含む哺乳動物に投与することによって生体に悪影響を与えることなく、ある種の活性化サイトカイン及びケモカイン関連遺伝子の発現を抑制することができる。

40

【0017】

本発明の薬剤は、ヒアルロナン又はその塩を、そのままたは必要に応じて担体、賦形剤、その他の添加物と共に、経口的あるいは非経口的に投与(関節内投与、静脈内、筋肉内、皮下などの組織内投与(注射)、経腸投与、経皮投与など)するための医薬品として、任意の剤形に製剤化することが可能であり、任意の投与方法で患者に投与される。特に、本発明に係る薬剤は、注射剤及び経口製剤とすることが好ましい。

【0018】

経口製剤としては、散剤、顆粒剤、カプセル剤、錠剤等の固形製剤；シロップ剤、エリ

50

キシル剤、乳剤等の液状製剤を挙げることができる。散剤は、例えば、乳糖、デンプン、結晶セルロース、乳酸カルシウム、リン酸水素カルシウム、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、無水ケイ酸等の賦形剤と混合して得ることができる。顆粒剤は、上記賦形剤のほか、必要に応じ、例えば白糖、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン等の結合剤や、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム等の結合剤や、カルボキシメチルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤をさらに加え、湿式又は乾式で造粒して得ることができる。錠剤は、上記散剤又は顆粒剤をそのまま、或いはステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤を加えて打錠して得ることができる。また、上記錠剤又は顆粒剤は、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、メタアクリル酸メチルコポリマー等の腸溶性基剤で被覆し、或いはエチルセルロース、カルナウバロウ、硬化油等で被覆し、これらを腸溶性或いは持続性製剤にすることができる。硬カプセル剤は、上記散剤又は顆粒剤を硬カプセルに充填して得ることができる。また軟カプセル剤は、ヒアルロナン又はその塩を、グリセリン、ポリエチレングリコール、ゴマ油、オリーブ油等に混合し、これをゼラチン膜で被覆して得ることができる。シロップ剤は、白糖、ソルビトール、グルセリン等の甘味剤とヒアルロナン又はその塩とを、水に溶解して得ることができる。また、甘味剤及び水のほかに、精油、エタノール等を加えてエリキシル剤とするか、或いはアラビアゴム、トラガカント、ポリソルベート80、カルボキシメチルセルロースナトリウム等を加えて乳剤又は懸濁剤にすることができる。またこれらの液状製剤には必要に応じ、香味剤、着色剤、保存剤等を加えることができる。

10

20

30

40

【0019】

非経口製剤としては、注射剤、直腸投与剤、ペッサリー、皮膚外用剤、吸入剤、エアゾール剤、点眼剤等を挙げることができる。注射剤は、ヒアルロナン又はその塩に塩酸、水酸化ナトリウム、乳酸、乳酸ナトリウム、リン酸一水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム等のpH調節剤；塩化ナトリウムウム、ブドウ糖等の等張化剤；及び注射用蒸留水を加え、滅菌濾過した後、アンプルに充填して得ることができる。また、更にマンニトール、デキストリン、シクロデキストリン、ゼラチン等を加えて真空凍結乾燥し、用時溶解型の注射剤とすることができる。またヒアルロナン又はその塩にレシチン、ポリソルベート80、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油等の乳化剤を加えた後、水中で乳化された注射用乳剤とすることもできる。

【0020】

直腸投与剤は、ヒアルロナン又はその塩にカカオ脂肪酸のモノ、ジ又はトリグリセリド、ポリエチレングリコール等の坐剤用基剤を加えた後、加温して溶解し、これを型に流し込んで冷却するか、或いはヒアルロナン又はその塩をポリエチレングリコール、大豆油等に混合した後、ゼラチン膜で被覆して得ることができる。皮膚外用剤は、ヒアルロナン又はその塩に、白色ワセリン、ミツロウ、流動パラフィン、ポリエチレングリコール等を加え、必要に応じて加温し、混練して得ることができる。テープ剤は、ヒアルロナン又はその塩を、ロジン、アクリル酸アルキルエステル重合体等の粘着剤と混練し、これを不織布等に展延して得ることができる。吸入剤は、例えば薬学的に許容される不活性ガス等の噴射剤に、ヒアルロナン又はその塩を溶解又は分散し、これを耐圧容器に充填して得ることができる。

【0021】

(投与方法) 本発明のヒアルロナンを有効成分とする薬剤の投与方法は、特に限定されないが、静脈内投与、経口投与および関節内投与を挙げることができる。

(投与量) 投与量は、対象とする疾患、患者の年令、健康状態、体重等に応じ適宜決定するが、一般には0.05~50mg/kgを1日1回あるはそれ以上に分けて投与する。

(毒性) 本発明で使用するヒアルロナンは、医薬としての生物活性を示す投与量において細胞毒性はほとんどしくは全く認められなかった。

【実施例】

【0022】

50

以下、本発明に係る薬剤を、実施例を用いてより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

【0023】

【実施例1】

本実施例では、本発明に係る薬剤によるサイトカイン関連遺伝子及びケモカイン関連遺伝子の発現抑制剤を、遺伝子の発現促進・発現抑制をモニターすることができるDNAチップを用いて評価した。

【0024】

実験方法

先ず、1、2群に分けてK562を上記RPMI培地で培養した。両群は、42で20分、次いで37で30分インキュベートする培養条件とした。なお、2群の培地には、HA4(10ng/ml)を添加した。 10

【0025】

次に、培養の後、1000rpmで遠心分離して培地を除去した。得られた細胞を-60ディープフリーザーにて保存した。保存した細胞から、次に、定法に従ってRNAを抽出した。抽出したRNAを用いてDNAチップにて遺伝子発現を解析した。DNAチップによる遺伝子発現解析はDNAチップ研究所に外注した。詳細には、DNAチップ研究所製、商品名：AceGene Human Oligo Chip 30K 1 Chip Versionを使用した。

【0026】

結果

DNAチップによる発現解析の結果、HA4を含む培地で培養した細胞においては、表1にあげる、細胞の賦活に関する多くの遺伝子の発現プロファイルに有意な変化が観察された。 20

【0027】

【表1】

	HA4(+)/HA4(-) ratio	機能
IFN- γ	0.11	Th1型のサイトカイン
Mig(CXCL9)	0.11	Th1型のC-X-Cタイプのケモカイン
IL-5	0.28	Th2型のサイトカイン
IL-17b	0.31	Th1型のサイトカイン
IL-18RAP	0.32	IL-18に結合し、レセプターへの結合を介助
CCL28	0.32	ケモカイン(上皮、KCが産生)
IL-1 β	0.36	炎症性サイトカイン
IFN- ω 1	0.5	NK細胞を活性化するサイトカイン

【0028】

表1に示すように、HA4処理によって、複数のサイトカイン関連遺伝子及びケモカイン関連遺伝子の発現が抑制されていることが明らかになった。表1に示したサイトカイン関連遺伝子及びケモカイン関連遺伝子のなかで、IFN- γ 遺伝子については、Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. J Leukoc Biol. 2004 75(2):163-89.を参照することができる。また、Mig(CXCL9)遺伝子については、Farber JM. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. J Leukoc Biol. 1997 61(3):246-57.を参照することができる。また、IL-5遺伝子については、Adachi T, Alam R. The mechanism of IL-5 signal transduction. Am J Physiol. 1998 275(3 Pt 1):C623-33.を参照することができる。さらに、IL-17b 40

30

40

50

については、Li H, Chen J, Huang A, Stinson J, Heldens S, Foster J, Dowd P, Gurney AL, Wood WI. Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 18 97(2):773-8.を参考することができる。さらにまた、IL-18RAPについては、Cheung H, Chen NJ, Cao Z, Ono N, Ohashi PS, Yeh WC. Accessory protein-like is essential for IL-18-mediated signaling. J Immunol. 2005 174(9):5351-7.を参考することができる。さらにまた、CC L28については、Wang W, Soto H, Oldham ER, Buchanan ME, Homey B, Catron D, Jenkins N, Copeland NG, Gilbert DJ, Nguyen N, Abrams J, Kershenovich D, Smith K, McClellan T, Vicari AP, Zlotnik A. Identification of a novel chemokine (CCL28), which binds CCR10 (GPR2). J Biol Chem. 2000 275(29):22313-23.を参考することができる。さらにまた、IL-1 については、Okamura H. IL-1 family (IL-1alpha/beta, IL-1Ra, IL-18), IL-16, IL-17. Nippon Rinsho. 2005 63 Suppl 4:226-33.を参考することができる。さらにまた、IFN- 1については、Bekisz J, Schmeisser H, Hernandez J, Goldman ND, Zoon KC. Human interferons alpha, beta and omega. Growth Factors. 2004 22(4):243-51.及びAdolf GR, Maurer-Fogy I, Kalsner I, Cantell K. Purification and characterization of natural human interferon omega 1. Two alternative cleavage sites for the signal peptidase. J Biol Chem. 1990 265(16):9290-5.を参考することができる。
10

【 0 0 2 9 】

考察

本実施例において、HA4の処理により、サイトカイン関連遺伝子及びケモカイン関連遺伝子の発現抑制が認められた。本例で使用したK562細胞は、白血球系の細胞であることから、本来的にサイトカイン関連遺伝子及びケモカイン関連遺伝子の発現がある。HA4はHsp 72発現を増強させる (Xu H, Ito T, Tawada A, Maeda H, Yamanokuchi H, Isahara K, Yoshida K, Uchiyama Y, Asari A. Effect of hyaluronan oligosaccharides on the expression of heat shock protein 72. J Biol Chem, 2002 10;277(19):17308-14.) ことから、In vivoでは、そのHsp72が T細胞に認識されてIL-10産生がおこり、そのIL-10が各種炎症性サイトカインやケモカイン産生を抑制することが考えられる。しかし、本実施例においては、 T細胞を含まないことから、炎症や自己免疫疾患に関与するサイトカイン関連遺伝子及びケモカイン関連遺伝子の発現がHA4処理により、直接抑制されたことを意味する。
30

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
	A 6 1 P 31/12	

F ターム(参考) 4C057 AA05 BB04

4C086 AA01 AA02 EA01 EA20 MA01 MA04 MA13 MA17 MA23 MA35
MA37 MA41 MA43 MA52 MA58 MA60 MA63 MA66 NA14 ZA75
ZA96 ZB21 ZB26 ZB33