

(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
2016 年 8 月 4 日(04.08.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/121862 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 31/155 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) *C07C 279/04* (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) *C07C 279/16* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *C07C 279/18* (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)
A61P 29/00 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/052470

(22) 国際出願日: 2016 年 1 月 28 日(28.01.2016)

(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 2015-014829 2015 年 1 月 28 日(28.01.2015) JP
特願 2015-176745 2015 年 9 月 8 日(08.09.2015) JP

(71) 出願人: 国立大学法人九州大学(KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目 1 〇 番 1 号 Fukuoka (JP).

(72) 発明者: 大戸 茂弘(OHDO Shigehiro); 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目 1 〇 番 1 号 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 松永 直哉(MATSUNAGA Naoya); 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目 1 〇 番 1 号 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 王子田 彰夫(OJIDA Akio); 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目 1 〇 番 1 号 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 進藤 直哉(SHINDO Naoya); 〒8128581 福岡県福岡市東

区箱崎六丁目 1 〇 番 1 号 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP).

(74) 代理人: 棚井 澄雄, 外(TANAI Sumio et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目 9 番 2 号 Tokyo (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, 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, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: ANTI-INFLAMMATORY DRUG AND USES THEREOF

(54) 発明の名称: 抗炎症剤及びその使用

(57) Abstract: This anti-inflammatory drug, which contains a G0/G1 switch 2 (G0S2) inhibitor as the active ingredient, is useful as a novel anti-inflammatory drug.

(57) 要約: G0/G1 Switch 2 (G0S2) 阻害剤を有効成分として含有する抗炎症剤は、新たな抗炎症剤として有用である。



WO 2016/121862 A1

明 細 書

発明の名称：抗炎症剤及びその使用

技術分野

[0001] 本発明は、抗炎症剤及びその使用に関する。より具体的には、抗炎症剤、抗炎症剤のスクリーニング方法及び新規化合物に関する。本願は、2015年1月28日に日本に出願された特願2015-14829号、及び2015年9月8日に日本に出願された特願2015-176745号に基づき優先権を主張し、それらの内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 炎症は様々な疾患に認められる症状の一つである。現在、炎症を抑制する医薬品は数多く存在するが、炎症関連疾患には、未だアンメットメディカルニーズの高い疾患が存在する。炎症関連疾患としては、例えば、癌が挙げられる。癌は炎症を伴う難治性疾患の一つである。癌は日本における死因第1位の疾患であり、世界中でも癌による死者数は年々増加し問題視されている。

[0003] 癌は多くの臓器で認められるが、中でも肝臓癌（肝細胞癌）は死亡率や再発率の高い癌種である。肝臓癌の原因はウイルス感染によるものが90%近くを占め、ウイルス感染後から始まる肝炎、肝硬変という長期間の慢性肝炎の病態を経て発癌する（例えば、非特許文献1を参照。）。その病態の中で、慢性炎症は、細胞の遺伝子変異による癌細胞の発現を促進することが知られている。しかしながら肝臓癌発症の原因は、ウイルス自体によるものか慢性的な炎症によるものか、未だ明らかとされていない状況にある（例えば、非特許文献2、3を参照。）。また、肝臓癌に対する化学療法は、抗癌剤に抵抗性を示しやすい等の理由から、肝臓癌に対する標準的な療法が確立されていないのが現状である。そのため、慢性肝炎及び肝臓癌の画期的な診断薬や新たな治療・予防戦略の構築が求められている。

[0004] ところで、地球上の多くの生物には、体内時計と呼ばれる生体恒常性維持

に重要な機能システムが備わっている。これら体内時計は、時計遺伝子と呼ばれる一連の遺伝子群による転写・翻訳のフィードバックループ機構によって構成されている。様々な生体機能、睡眠覚醒、体温、ホルモン分泌、代謝等に約24時間周期の変動（日周リズム）が認められるが、これらは体内時計機構により調節されていることが知られている。

[0005] 近年、体内時計機構の変容が、様々な疾患、例えば生活習慣病として糖尿病、高血圧、痛風等の発症に関わることが明らかにされている（例えば、非特許文献4、5を参照）。また、癌に関しても、発癌や癌細胞の性質、抗癌剤に体する感受性が、体内時計機構により影響を受けることが指摘されている（例えば、非特許文献6を参照。）。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1: Bosch FX, et al., Primary liver cancer: worldwide incidence and trends., Gastroenterology, 127, S5-S16, 2004.

非特許文献2: Portolani N, et al., Early and late recurrence after liver resection for hepatocellular carcinoma: prognostic and therapeutic implications., Ann. Surg., 243, 229-235, 2006.

非特許文献3: Freeman AJ, et al., Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection., Hepatology, 134, 809-816, 2001.

非特許文献4: Filipski E, et al., Effects of light and food schedules on liver and tumor molecular clocks in mice., J. Nat. Cancer Inst., 97, 507-517, 2005.

非特許文献5: Ohdo S, et al., Molecular basis of chronopharmaceutics., J. Pharm. Sci., 100, 3560-3576, 2011.

非特許文献6: Innominato PF, et al., Chronotherapy and the molecular clock: Clinical implications in oncology., Adv. Drug Deliv. Rev., 62, 979-1001, 2010.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] しかしながら、炎症と体内時計機構との関連性には未解明な点が多い。そこで、本発明は、炎症に体内時計機構が関与しているか否かを明らかにし、新たな抗炎症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

[0008] 本発明は以下の態様を含む。

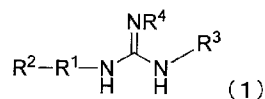
[1] G O / G 1 S w i t c h 2 (G O S 2) 阻害剤を有効成分として含有する抗炎症剤。

[2] 前記 G O S 2 阻害剤が、G O S 2 遺伝子又は H y d r o x y s t e r o i d (1 7 - β) D e h y d r o g e n a s e 4 (H s d 1 7 b 4) 遺伝子に対する s i R N A 、 s h R N A 、 m i R N A 、 リボザイム又はアンチセンス核酸である、[1] に記載の抗炎症剤。

[3] 前記 G O S 2 阻害剤が、G O S 2 タンパク質又は H s d 1 7 b 4 タンパク質に対する特異的結合物質である、[1] に記載の抗炎症剤。

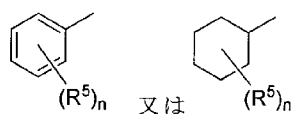
[4] 前記 G O S 2 阻害剤が、下記式(1)で表される化合物、その薬学的に許容される塩又はそれらの溶媒和物である、[1] に記載の抗炎症剤。

[化1]



[式(1)中、R¹は単結合又は炭素数1～3のアルキレン基を表し、R²は

[化2]



(ここで、R⁵は炭素数1～3のハロゲン化アルキル基を表し、nは0～5の整数を表す。)を表し、R³は炭素数1～15のアルキル基を表し、R⁴は水

素原子又はカルボン酸エステル基を表す。nが2以上の整数である場合、複数存在するR⁵は互いに同一であっても異なってもよい。]

[5] 前記GOS2阻害剤がHsd17b4に対する結合能を有する、[4]に記載の抗炎症剤。

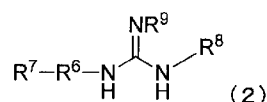
[6] 鎮痛作用を示す、[1]～[5]のいずれかに記載の抗炎症剤。

[7] 被検物質の存在下で細胞中のGOS2遺伝子の発現量を測定する工程と、前記発現量が、前記被検物質の非存在下における前記細胞中のGOS2遺伝子の発現量と比較して低下していた場合に、前記被検物質は抗炎症剤であると判定する工程と、を備える、抗炎症剤のスクリーニング方法。

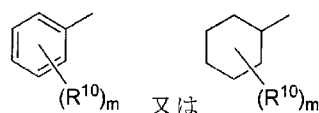
[8] 被検物質の存在下でHsd17b4タンパク質の活性を測定する工程と、前記活性が、前記被検物質の非存在下におけるHsd17b4タンパク質の活性と比較して低下していた場合に、前記被検物質は抗炎症剤であると判定する工程と、を備える、抗炎症剤のスクリーニング方法。

[9] 下記式(2)で表される化合物、その薬学的に許容される塩又はそれらの溶媒和物。

[化3]



[式(2)中、R⁶は単結合又は炭素数1～3のアルキレン基を表し、R⁷は
[化4]



(ここで、R¹⁰は炭素数1～3のハロゲン化アルキル基を表し、mは0～5の整数を表す。)を表し、R⁸は炭素数1～15のアルキル基を表し、R⁹は水素原子又はカルボン酸エステル基を表す。R⁸がヘキシル基である場合、mは1～5の整数であり、mが2以上の整数である場合、複数存在するR¹⁰は

互いに同一であっても異なってもよい。]

発明の効果

[0009] 本発明によれば、新たな抗炎症剤を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]肝臓癌が発症する過程を示す模式図である。

[図2]実験例2において、500 μ L培地中に、GOS2に対するsiRNAを、0、12.5、25及び50 pmol添加した細胞におけるNF- κ B応答エレメントの活性を示すグラフである。各値は平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3)を示す。ボンフェローニ・ダン検定によりsiRNA非投与群の結果と比較した結果、「**」は危険率1%未満で有意差があることを示す。

[図3]実験例3において、GOS2に対するsiRNA又は対照siRNAを投与したジエチルニトロソアミン(DEN)暴露マウスの肝臓における、NF- κ B応答エレメント(NRE)へのNF- κ Bの結合活性を示すグラフである。各値は平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3)を示す。スチューデントt検定により対照siRNA投与群の結果と比較した結果、「*」は危険率5%未満で有意差があることを示す。

[図4A]実験例3における、対照siRNA投与群(図中、「対照siRNA」と示す。)のマウスの肝臓の病理顕微鏡写真である。

[図4B]実験例3における、対照siRNA投与群のマウスから摘出した肝臓の写真である。

[図4C]実験例3における、GOS2 siRNA投与群(図中、「GOS2 siRNA」と示す。)のマウスの肝臓の病理顕微鏡写真である。

[図4D]実験例3における、GOS2 siRNA投与群のマウスから摘出した肝臓の写真である。

[図5]実験例4において、GOS2 siRNA投与群のマウス及び対照siRNA投与群のマウスの肝臓におけるCcl2のmRNAの発現量の測定結果を示すグラフである。

[図6A]実験例5における、化合物ライブラリーの一次スクリーニングの結果

を示すグラフである。細胞を $10\ \mu\text{M}$ の各化合物に暴露した後、24 時間目の GOS2 プロモーター ($-2030 \rightarrow -1378$) 活性 (相対値) を、2 を底とする対数で示す。各値は平均値を示す ($n=3$)。

[図6B] 実験例 5 における、化合物ライブラリーの二次スクリーニングの結果を示すグラフである。細胞を $10\ \mu\text{M}$ の各化合物に暴露した後、24 時間目の ATP 活性 (相対値) を、2 を底とする対数で示す。各値は平均値を示す ($n=3$)。

[図7A] 実験例 6 における、化合物のスクリーニングの結果を示すグラフである。細胞を $10\ \mu\text{M}$ の各化合物に暴露した後、24 時間目の GOS2 プロモーター ($-2030 \rightarrow +10$) 活性 (相対値) を、2 を底とする対数で示す。各値は平均値を示す ($n=3$)。

[図7B] 実験例 6 において、細胞を $10\ \mu\text{M}$ の各化合物に暴露した後、24 時間目の Bmal1 プロモーター活性 (相対値) を、2 を底とする対数で示す。各値は平均値を示す ($n=3$)。

[図7C] 実験例 6 において、細胞を $10\ \mu\text{M}$ の各化合物に暴露した後、24 時間目の Per2 プロモーター活性 (相対値) を、2 を底とする対数で示す。各値は平均値を示す ($n=3$)。各化合物投与群と DMSO 投与群における Per2 プロモーター活性 (相対値) に有意な差は認められなかった。

[図8A] 実験例 7 において、細胞に $10\ \mu\text{M}$ の化合物 No. 1 ~ No. 3 を暴露した後 24 時間目の GOS2 遺伝子の mRNA の発現量 (相対値) を示すグラフである。各値は平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n=3$) を示す。ボンフェローニ・ダン検定により DMSO 投与群の結果と比較した結果、「*」は危険率 5 % 未満で有意差があることを示し、「**」は危険率 1 % 未満で有意差があることを示す。

[図8B] 実験例 7 において、細胞に $10\ \mu\text{M}$ の化合物 No. 1 ~ No. 3 を暴露した後 24 時間目の RAR α 遺伝子の mRNA の発現量 (相対値) を示すグラフである。各値は平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n=3$) を示す。ボンフェローニ・ダン検定により DMSO 投与群の結果と比較した結果、「**」は危険率

1%未満で有意差があることを示す。

[図8C]実験例7において、細胞に10 μ Mの化合物No. 1～No. 3を暴露した後24時間目のCc12遺伝子のmRNAの発現量（相対値）を示すグラフである。各値は平均値±標準偏差（n=3）を示す。ボンフェローニ・ダン検定によりDMSO投与群の結果と比較した結果、「*」は危険率5%未満で有意差があることを示し、「**」は危険率1%未満で有意差があることを示す。

[図8D]実験例7において、細胞に10 μ Mの化合物No. 1～No. 3を暴露した後24時間目のIL-6遺伝子のmRNAの発現量（相対値）を示すグラフである。各値は平均値±標準偏差（n=3）を示す。ボンフェローニ・ダン検定によりDMSO投与群の結果と比較した結果、「**」は危険率1%未満で有意差があることを示す。

[図8E]実験例8において、化合物No. 1の濃度に対するルシフェラーゼ活性を示すグラフである。

[図8F]実験例8において、化合物No. 2の濃度に対するルシフェラーゼ活性を示すグラフである。

[図9A]実験例9において、化合物No. 2を投与したマウスの肝臓におけるGOS2 mRNAの一過性発現プロファイルを示すグラフである。各値は平均値±標準偏差（n=3～5）を示す。2way-ANOVA解析の結果、危険率1%未満で対照群と化合物No. 2投与群との間に有意な差が認められた。「**」は、Scheffe検定の結果、危険率1%未満で有意差があることを示す。

[図9B]実験例9において、化合物No. 2を投与したマウスの肝臓におけるGOS2タンパク質の一過性発現プロファイルを示すグラフである。各値は平均値±標準偏差（n=3）を示す。「**」は、ボンフェローニ・ダン検定により対照群の結果と比較した結果、危険率1%未満で有意差があることを示す。

[図10A]実験例10において、化合物No. 2（10 μ M）及びLPS（10

0 ng/mL) の暴露から12時間目のHepa1-6細胞におけるCcl2 mRNAの発現を示すグラフである。各値は平均値±標準偏差 (n=3) を示す。「**」は、ボンフェローニ・ダン検定によりDMSO投与群の結果と比較した結果、危険率1%未満で有意差があることを示す。「##」は、ボンフェローニ・ダン検定によりLPS投与群の結果と比較した結果、危険率1%未満で有意差があることを示す。

[図10B]実験例10において、化合物No. 2 (10 µM) 及びTNFα (200 ng/mL) の暴露から12時間目のHepa1-6細胞におけるCcl2 mRNAの発現を示すグラフである。各値は平均値±標準偏差 (n=3) を示す。「**」は、ボンフェローニ・ダン検定によりDMSO投与群の結果と比較した結果、危険率1%未満で有意差があることを示す。「##」は、ボンフェローニ・ダン検定によりLPS投与群の結果と比較した結果、危険率1%未満で有意差があることを示す。

[図10C]実験例10において、LPSを尾静脈投与した後6時間目のマウスの肝臓におけるCcl2 mRNAの発現に対する、化合物No. 2 (5 mg/Kg、尾静脈投与) の影響を示すグラフである。各値は平均値±標準偏差 (n=3) を示す。「**」は、ボンフェローニ・ダン検定によりDMSO投与群の結果と比較した結果、危険率1%未満で有意差があることを示す。

「##」は、ボンフェローニ・ダン検定によりLPS投与群の結果と比較した結果、危険率1%未満で有意差があることを示す。

[図11A]実験例11において、対照群、LPS投与群、LPS+化合物No. 2投与群のマウスの肝臓におけるGOS2タンパク質の定量結果を示すグラフである。各値は平均値±標準偏差 (n=3~5) を示す。「**」は、対照群との対比において、Scheffé検定の結果、危険率1%未満で有意差があることを示す。「##」は、LPS投与群との対比において、Scheffé検定の結果、危険率1%未満で有意差があることを示す。

[図11B]実験例11において、対照群、LPS投与群、LPS+化合物No. 2投与群のマウスの肝臓におけるp65タンパク質の核内存在量の定量結果

を示すグラフである。各値は平均値±標準偏差（ $n = 3 \sim 5$ ）を示す。「*」は、対照群との対比において、S c h e f f e検定の結果、危険率1%未満で有意差があることを示す。「##」は、L P S投与群との対比において、S c h e f f e検定の結果、危険率1%未満で有意差があることを示す。

[図11C]実験例11において、対照群、L P S投与群、L P S+化合物No. 2投与群のマウスの肝臓におけるC c l 2のm R N Aの発現量の定量結果を示すグラフである。各値は平均値±標準偏差（ $n = 3 \sim 5$ ）を示す。「*」は、対照群との対比において、S c h e f f e検定の結果、危険率5%未満で有意差があることを示す。「#」は、L P S投与群との対比において、S c h e f f e検定の結果、危険率5%未満で有意差があることを示す。

[図12]実験例12において、担癌14日目のマウスにおける化合物No. 2（15mg/kg）又は生理食塩水の腹腔内投与後のP W Tのタイムコースを示すグラフである。各値は平均値±標準偏差（ $n = 6$ ）を示す。2 w a y - A N O V A解析の結果、危険率1%未満で対照群（0.05%DMSO-生理食塩水）と化合物No. 2投与群との間に有意な差が認められた。「*」は、S c h e f f e検定の結果、危険率5%未満で対照群（0.05%DMSO-生理食塩水）と化合物No. 2投与群との間に有意差があることを示す。「**」は、S c h e f f e検定の結果、危険率1%未満で対照群（0.05%DMSO-生理食塩水）と化合物No. 2投与群との間に有意差があることを示す。「a a」は、S c h e f f e検定の結果、危険率1%未満で、0.05%DMSO-生理食塩水投与前と0.05%DMSO-生理食塩水投与後との間に有意差があることを示す。「b b」は、S c h e f f e検定の結果、危険率1%未満で、化合物No. 2投与前と化合物No. 2投与後との間に有意差があることを示す。

[図13A]実験例14において、化合物No. 2及びその誘導体（10 μ M）の暴露から24時間目のH e p a 1 - 6細胞におけるG O S 2 m R N Aの発現量を示すグラフである。各値は平均値±標準偏差（ $n = 3$ ）を示す。「*」

」は、ボンフェローニ・ダン検定によりDMSO投与群の結果と比較した結果、危険率5%未満で有意差があることを示す。「**」は、ボンフェローニ・ダン検定によりDMSO投与群の結果と比較した結果、危険率1%未満で有意差があることを示す。

[図13B]実験例14において、化合物No. 2及びその誘導体(10 μ M)の暴露から24時間目のNIH3T3細胞の生存率(相対値)を示すグラフである。各値は平均値 $\pm$ 標準偏差(n=3)を示す。「**」は、ボンフェローニ・ダン検定によりDMSO投与群の結果と比較した結果、危険率1%未満で有意差があることを示す。

[図13C]実験例14において、化合物No. 2及びその誘導体(10 μ M)の暴露から24時間目のHepG2細胞におけるGOS2 mRNAの発現量を示すグラフである。各値は平均値 $\pm$ 標準偏差(n=3)を示す。「**」は、ボンフェローニ・ダン検定によりDMSO投与群の結果と比較した結果、危険率1%未満で有意差があることを示す。

[図13D]実験例14において、化合物No. 2及びその誘導体(2.5又は5 μ M)の暴露から48時間目のHepa1-6細胞におけるGOS2 mRNAの発現量を示すグラフである。各値は平均値 $\pm$ 標準偏差(n=3)を示す。「*」は、ボンフェローニ・ダン検定によりDMSO投与群の結果と比較した結果、危険率5%未満で有意差があることを示す。「**」は、ボンフェローニ・ダン検定によりDMSO投与群の結果と比較した結果、危険率1%未満で有意差があることを示す。「##」は、ボンフェローニ・ダン検定により化合物No. 2の5 μ M投与群の結果と比較した結果、危険率1%未満で有意差があることを示す。

[図14A]実験例15において、化合物No. 2とその誘導体である実施例2の化合物(NS-3-011)とのIC₅₀を比較した結果を示すグラフである。各化合物の暴露後24時間目のO-4000E細胞のGOS2プロモーター活性(相対値)を示す。各値は平均値 $\pm$ 標準偏差(n=3)を示す。

[図14B]実験例15において、0.5~5 μ Mの化合物No. 2とその誘導体

である実施例2の化合物（NS-3-011）の暴露から48時間目のHepa1-6細胞におけるGOS2 mRNAの発現量を示すグラフである。各値は平均値±標準偏差（n=3）を示す。「*」は、ボンフェローニ・ダン検定により化合物No. 2の同用量投与群の結果と比較した結果、危険率5%未満で有意差があることを示す。「**」は、ボンフェローニ・ダン検定により化合物No. 2の同用量投与群の結果と比較した結果、危険率1%未満で有意差があることを示す。

[図14C]実験例15において、0.5～5 μ Mの化合物No. 2とその誘導体である実施例2の化合物（NS-3-011）の暴露から48時間目のHepa1-6細胞におけるCcl2 mRNAの発現量を示すグラフである。各値は平均値±標準偏差（n=3）を示す。「*」は、ボンフェローニ・ダン検定により化合物No. 2の同用量投与群の結果と比較した結果、危険率5%未満で有意差があることを示す。「**」は、ボンフェローニ・ダン検定により化合物No. 2の同用量投与群の結果と比較した結果、危険率1%未満で有意差があることを示す。

[図14D]実験例15において、各化合物（1又は5 μ M）の暴露から24時間目のNIH3T3細胞の生存率（相対値）を示すグラフである。各値は平均値±標準偏差（n=3～6）を示す。「**」は、Scheffé検定によりDMSO投与群の結果と比較した結果、危険率1%未満で有意差があることを示す。

[図15]実験例16において、対照細胞と、GOS2ノックダウン細胞におけるGOS2及びCcl2のmRNAの発現量を示すグラフである。各値は平均値±標準偏差（n=3）を示す。スチューデントt検定により対照細胞の結果と比較した結果、「**」は危険率1%未満で有意差があることを示す。

[図16]実験例17において、実施例2、実施例3、実施例10の化合物を投与した肝炎モデルマウスの肝臓におけるCcl2のmRNAの発現量を示すグラフである。「ベヒクル」はLPSを投与しなかったマウスを表し、「対

照」は化合物の代わりに生理食塩水を投与したマウスを表す。各値は平均値±標準偏差（ $n = 3 \sim 5$ ）を示す。シェッフェ検定によりベヒクル群の結果と比較した結果、「*」は危険率5%未満で有意差があることを示す。

[図17]実験例18において、実施例2の化合物の標的タンパク質を同定するプルダウンアッセイにおける、アクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す写真である。

[図18A]実験例19において、対照マウス及び実施例1の化合物を投与したNASHモデルマウスの肝臓におけるCcl2のmRNAの発現量を示すグラフである。各値は平均値±標準偏差（ $n = 8 \sim 9$ ）を示す。シェッフェ検定により対照マウスの結果と比較した結果、「*」は危険率5%未満で有意差があることを示す。

[図18B]実験例19における、実施例1の化合物の血中薬物濃度を示すグラフである。各値は平均値±標準偏差（ $n = 3 \sim 5$ ）を示す。「 $P = 0.14$ 」は、スチューデントt検定により対照細胞の結果と比較した結果、危険率14%未満で有意差があることを示す。

[図18C]実験例19において、対照マウス及び実施例1の化合物を投与したNASHモデルマウスの肝臓における、 α SMAのmRNAの発現量を示すグラフである。各値は平均値±標準偏差（ $n = 8 \sim 9$ ）を示す。シェッフェ検定により対照マウスの結果と比較した結果、「*」は危険率5%未満で有意差があることを示す。

[図18D]実験例19において、対照マウス及び実施例1の化合物を投与したNASHモデルマウスの肝臓における、コラーゲンタイプI $\alpha 2$ (Col1 $\alpha 2$)のmRNAの発現量を示すグラフである。各値は平均値±標準偏差（ $n = 8 \sim 9$ ）を示す。シェッフェ検定により対照マウスの結果と比較した結果、「*」は危険率5%未満で有意差があることを示す。

[図18E]実験例19において、対照マウス及び実施例1の化合物を投与したNASHモデルマウスの肝臓における、コラーゲンタイプI $\alpha 1$ (Col1 $\alpha 1$)のmRNAの発現量を示すグラフである。各値は平均値±標準偏差

($n = 8 \sim 9$) を示す。シェッフェ検定により対照マウスの結果と比較した結果、「 $P = 0.0673$ 」は危険率 6.73%未満で有意差があることを示す。

[図19]実験例 20 において、実施例 1 の化合物の血中薬物濃度を示すグラフである。各値は平均値±標準偏差 ($n = 3 \sim 10$) を示す。「 $P = 0.0522$ 」は、スチューデント t 検定により対照マウスの結果と比較した結果、危険率 5.22%未満で有意差があることを示す。

[図20]実験例 21 において、実施例 1 の化合物の血中薬物濃度を示すグラフである。各値は平均値±標準偏差 ($n = 5$) を示す。

[図21A]実験例 22 において、DENによるマウス肝炎肝臓癌発症モデルの血清中ALT活性に及ぼす実施例 10 の化合物の影響を示すグラフである。DENの飲水投与開始から 8 週間後の結果を示す。各値は平均値±標準偏差 ($n = 8 \sim 10$) を示す。シェッフェ検定により対照マウスの結果と比較した結果、「**」は危険率 1%未満で有意差があることを示す。また、シェッフェ検定により DEN 投与群の結果と比較した結果、「\$」は危険率 5%未満で有意差があることを示す。

[図21B]実験例 22 において、DENによるマウス肝炎肝臓癌発症モデルの血清中ALT活性に及ぼす実施例 10 の化合物の影響を示すグラフである。DENの飲水投与開始から 12 週間後の結果を示す。各値は平均値±標準偏差 ($n = 7 \sim 8$) を示す。シェッフェ検定により対照マウスの結果と比較した結果、「**」及び「##」は危険率 1%未満で有意差があることを示す。また、シェッフェ検定により DEN 投与群の結果と比較した結果、「\$\$」は危険率 1%未満で有意差があることを示す。

[図22A]実験例 23 において、Hsd17b4 に対する siRNA を用いて Hsd17b4 遺伝子をノックダウンした結果を示すグラフである。各値は平均値±標準偏差 ($n = 3$) を示す。スチューデント t 検定により対照 siRNA 投与群の結果と比較した結果、「**」は危険率 1%未満で有意差があることを示す。

[図22B]実験例23において、化合物No. 2の存在下又は非存在下（図中、「DMSO」と示す。）において、細胞に、Hsd17b4に対するsiRNA又は対照siRNAをトランスフェクションし、リアルタイムPCRにより、GOS2遺伝子の発現量を定量した結果を示すグラフである。各値は平均値±標準偏差（n=3）を示す。スチューデントt検定により、化合物No. 2の非存在下における結果と比較した結果、「*」は危険率5%未満で有意差があることを示す。

[図23A]実験例24において、細胞に、Hsd17b4の発現ベクター（Hsd17b4-pcDNA3.1）をトランスフェクションし、リアルタイムPCRにより、Hsd17b4遺伝子の発現量を定量した結果を示すグラフである。各値は平均値±標準偏差（n=3）を示す。スチューデントt検定により、空のベクター（pcDNA3.1）をトランスフェクションした結果と比較した結果、「**」は危険率1%未満で有意差があることを示す。

[図23B]実験例24において、細胞に、Hsd17b4の発現ベクター（Hsd17b4-pcDNA3.1）をトランスフェクションし、リアルタイムPCRにより、GOS2遺伝子の発現量を定量した結果を示すグラフである。各値は平均値±標準偏差（n=3）を示す。スチューデントt検定により、空のベクター（pcDNA3.1）をトランスフェクションした結果と比較した結果、「**」は危険率1%未満で有意差があることを示す。

[図24]実験例25において、GOS2の転写活性調節領域の下流にルシフェラーゼのcDNAを連結した発現ベクターを安定発現させた細胞を用いて、化合物No. 2の存在下又は非存在下（図中、「DMSO」と示す。）でルシフェラーゼ活性を測定した結果を示すグラフである。各値は平均値±標準偏差（n=3）を示す。スチューデントt検定により、化合物No. 2の非存在下における結果と比較した結果、「**」は危険率1%未満で有意差があることを示す。

[図25A]GOS2転写活性調節領域の構造を示す図である。

[図25B]実験例26において、GOS2の転写活性調節領域の下流にルシフェ

ラーゼの cDNA を連結した発現ベクターと、STAT5 発現ベクター又は空のベクター (pcDNA3.1、対照) とを共発現させた細胞のルシフェラーゼ活性を測定した結果を示すグラフである。各値は平均値±標準偏差 (n=3) を示す。スチューデント t 検定により、対照と比較した結果、「**」は危険率 1%未満で有意差があることを示す。

[図26]実験例27において、培地に化合物No. 2を添加した細胞の核内STAT5タンパク質の存在量をウエスタンブロッティングにより測定した結果を示すグラフである。各値は平均値±標準偏差 (n=3) を示す。スチューデント t 検定により、対照又は 2.5 μ M 添加群と比較した結果、「**」は危険率 1%未満で有意差があることを示す。

[図27A]実験例28において、化合物No. 2を経口投与したマウスの血液中の薬物濃度を測定した結果を示すグラフである。

[図27B]実験例28において、化合物No. 2を経口投与したマウスの肝臓中の薬物濃度を測定した結果を示すグラフである。

[図28A]実験例29における、対照群のマウスの肝臓の代表的な写真である。

[図28B]実験例29における、DEN飲水群のマウスの肝臓の代表的な写真である。

[図28C]実験例29における、DEN及び実施例10の化合物を投与した群のマウスの肝臓の代表的な写真である。

発明を実施するための形態

[0011] 図1は、炎症関連疾患の一例として、肝臓癌が発症する過程を示す模式図である。肝臓癌の9割は肝炎、肝硬変という長期間の慢性肝炎の病態を経て発癌する。なお、図1に示す過程におけるGOS2及び炎症シグナルの影響は、発明者らが今回明らかにしたものであり、詳細は後述する。

[0012] ジエチルニトロソアミン (DEN) を飲水に投与することにより、動物に慢性肝炎、肝硬変、肝臓癌発症に至る過程を再現することができる。この実験モデルは、ヒトにおける肝臓癌発症機構を解明する有用な実験系である。発明者らは、DENによるマウス肝炎肝臓癌発症モデルを用い、分子時計機

構に着目した肝炎肝臓癌発症の機構を解析した。その結果、肝炎肝臓癌発症に細胞周期調節因子であるGOS2 (G0/G1 switch gene 2) が関与していることを見出した。

[0013] [抗炎症剤]

1実施形態において、本発明は、G0/G1 Switch 2 (GOS2) 阻害剤を有効成分として含有する抗炎症剤を提供する。GOS2阻害剤としては、例えばGOS2の転写を抑制する化合物、GOS2の活性を阻害する物質等が挙げられる。

[0014] 本実施形態の抗炎症剤が治療又は予防の対象とする炎症関連疾患としては、例えば肝炎、小腸炎、大腸炎 (IBD)、肝臓癌、リウマチ、喘息、アテローム性動脈硬化症、多発性硬化症、ヘリコバクター・ピロリ関連胃炎等が挙げられる。

[0015] 本実施形態の抗炎症剤は、GOS2遺伝子に対する (GOS2の発現を阻害する) siRNA、shRNA、miRNA、リボザイム又はアンチセンス核酸であってもよい。

[0016] また、実施例において後述するように、発明者らは、GOS2遺伝子の発現が、Hydroxysteroid (17- β) Dehydrogenase 4 (Hsd17b4) タンパク質を介して制御されていることが明らかにした。すなわち、GOS2遺伝子の発現の上流でHsd17b4タンパク質が作用していることを明らかにした。

[0017] したがって、Hsd17b4遺伝子の発現を阻害する物質は、GOS2阻害剤であるということもできる。すなわち、Hsd17b4遺伝子の発現を阻害する物質は、抗炎症剤として使用することができる。

[0018] したがって、本実施形態の抗炎症剤は、Hsd17b4遺伝子に対する siRNA、shRNA、miRNA、リボザイム又はアンチセンス核酸であってもよい。

[0019] siRNA (small interfering RNA) またはmiRNA (microRNA) は、RNA干渉による遺伝子サイレンシングの

ために用いられる21～23塩基対の低分子2本鎖RNAである。細胞内に導入されたsiRNAまたはmiRNAは、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)と結合する。この複合体はsiRNAまたはmiRNAと相補的な配列を持つmRNAに結合し切断する。これにより、配列特異的に遺伝子の発現を抑制する。

[0020] siRNAまたはmiRNAは、センス鎖及びアンチセンス鎖オリゴヌクレオチドをDNA/RNA自動合成機でそれぞれ合成し、例えば、適当なアニーリング緩衝液中、90～95℃で約1分程度変性させた後、30～70℃で約1～8時間アニーリングさせることにより調製することができる。

[0021] shRNA(short hairpin RNA)は、RNA干渉による遺伝子サイレンシングのために用いられるヘアピン型のRNA配列である。shRNAは、ベクターによって細胞に導入し、U6プロモーター又はH1プロモーターで発現させてもよいし、shRNA配列を有するオリゴヌクレオチドをDNA/RNA自動合成機で合成し、siRNAと同様の方法によりセルフアニーリングさせることによって調製してもよい。細胞内に導入されたshRNAのヘアピン構造は、siRNAへと切断され、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)と結合する。この複合体はsiRNAと相補的な配列を持つmRNAに結合し切断する。これにより、配列特異的に遺伝子の発現を抑制する。

[0022] miRNAは、細胞内に存在する長さ20から25塩基程度のRNAであり、他の遺伝子の発現を調節する機能を有すると考えられているncRNA(ノンコーディングRNA)の一種である。近年、人工的なmiRNAを用いて標的遺伝子のノックダウンを行うことが可能となっている。

[0023] 人工的なmiRNAは、哺乳動物の細胞中で発現ベクターからPol2プロモーターにより発現させるとよい。細胞内に導入されたmiRNAは、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)と結合する。この複合体はmiRNAと相補的な配列を持つmRNAに結合し切断する。これにより、配列特異的に遺伝子の発現を抑制する。

[0024] リボザイムは、触媒活性を有するRNAである。リボザイムには種々の活性を有するものがあるが、RNAを切断する酵素としてのリボザイムの研究により、RNAの部位特異的な切断を目的とするリボザイムの設計が可能となっている。リボザイムは、グループIイントロン型、RNAsePに含まれるM1RNA等の400ヌクレオチド以上の大きさのものであってもよく、ハンマーヘッド型、ヘアピン型等と呼ばれる40ヌクレオチド程度のものであってもよい。

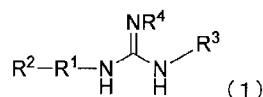
[0025] アンチセンス核酸は、標的配列に相補的な核酸である。アンチセンス核酸は、三重鎖形成による転写開始阻害、RNAポリメラーゼによって局所的に開状ループ構造が形成された部位とのハイブリッド形成による転写抑制、合成の進みつつあるRNAとのハイブリッド形成による転写阻害、イントロンとエクソンとの接合点でのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、mRNAとのハイブリッド形成による核から細胞質への移行抑制、キャッピング部位やポリ(A)付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、開始コドン近傍のリボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、mRNAの翻訳領域やポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長阻止、核酸とタンパク質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制等により、標的遺伝子の発現を抑制することができる。

[0026] 本実施形態において、siRNA、shRNA、リボザイム及びアンチセンス核酸は、安定性や活性を向上させるために、種々の化学修飾を含んでもよい。例えば、ヌクレアーゼ等の加水分解酵素による分解を防ぐために、リン酸残基を、例えば、ホスホロチオエート(PS)、メチルホスホネート、ホスホロジチオネート等の化学修飾リン酸残基に置換してもよい。また、少なくとも一部をペプチド核酸(PNA)等の核酸類似体により構成してもよい。

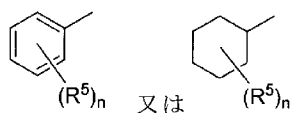
- [0027] 本実施形態の抗炎症剤は、G O S 2 タンパク質又はH s d 1 7 b 4 タンパク質に対する特異的結合物質であってもよい。上記の特異的結合物質は、G O S 2 タンパク質又はH s d 1 7 b 4 タンパク質に特異的に結合してそれらの機能を阻害することにより、抗炎症効果を発揮する。
- [0028] 特異的結合物質としては、例えば、抗体、抗体断片、アプタマー、低分子化合物等が挙げられる。抗体は、例えば、マウス等の動物に抗原を免疫することにより作製することができる。あるいは、ファージライブラリー等の抗体ライブラリーのスクリーニング等により作製することができる。
- [0029] 抗体断片としては、F v、F a b、s c F v等が挙げられる。上記の抗体又は抗体断片は、ポリクローナルであってもよく、モノクローナルであってもよい。また、上記の抗体又は抗体断片は、例えばポリエチレングリコール等の化合物が結合したものであってもよい。ポリエチレングリコールを結合することにより、例えば血中安定性を高めること等が可能になる。
- [0030] アプタマーとは、標識物質に対する特異的結合能を有する物質である。アプタマーとしては、核酸アプタマー、ペプチドアプタマー等が挙げられる。G O S 2 タンパク質又はH s d 1 7 b 4 タンパク質に特異的結合能を有する核酸アプタマーは、例えば、systematic evolution of ligand by exponential enrichment (S E L E X) 法等により選別することができる。また、G O S 2 タンパク質又はH s d 1 7 b 4 タンパク質に対する特異的結合能を有するペプチドアプタマーは、例えば酵母を用いたT w o - h y b r i d 法等により選別することができる。
- [0031] 特異的結合物質は、上記の他にも、例えば、対象物質に対する結合性を指標として、化合物ライブラリー等からスクリーニングしたものであってもよい。
- [0032] 実施例において後述するように、D E N によるマウス肝炎肝臓癌発症モデルのマウスに、G O S 2 に対するs i R N A を投与することにより、肝炎及び肝臓癌の発症を抑制することができる。したがって、本実施形態の抗炎症剤は、肝炎又は肝臓癌の治療又は予防剤であるということもできる。

[0033] 本実施形態の抗炎症剤は、下記式（１）で表される化合物、その薬学的に許容される塩又はそれらの溶媒和物であってもよい。

[0034] [化5]



[0035] 式（１）中、 R^1 は単結合又は炭素数１～３のアルキレン基を表し、 R^2 は
[化6]



（ここで、 R^5 は炭素数１～３のハロゲン化アルキル基を表し、 n は０～５の整数を表す。）を表し、 R^3 は炭素数１～１５のアルキル基を表し、 R^4 は水素原子又はカルボン酸エステル基を表す。 n が２以上の整数である場合、複数存在する R^5 は互いに同一であっても異なってもよい。

[0036] 本実施形態の抗炎症剤において、上記式（１）で表される化合物は、フリー体であってもよく、薬学的に許容される塩であってもよく、フリー体の溶媒和物であってもよく、薬学的に許容される塩の溶媒和物であってもよい。

[0037] 薬学的に許容される塩としては、例えば、金属塩、アンモニウム塩、有機アミン付加塩、アミノ酸付加塩等が挙げられる。より具体的には、例えば、塩酸塩、硫酸塩、臭化水素酸塩、硝酸塩、リン酸塩、ヨウ化水素酸塩等の無機酸塩；酢酸塩、メシル酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、安息香酸塩、メタンスルホン酸塩、２－ヒドロキシエタンスルホン酸塩、ｐ－トルエンスルホン酸塩、トリフルオロ酢酸塩、プロパン酸塩、シュウ酸塩、マロン酸塩、グルタル酸塩、アジピン酸塩、リンゴ酸塩、マンデル酸塩等の有機酸塩；ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩；マグネシウム塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩；アルミニウム塩、亜鉛塩等の金属塩；アンモニウム塩、テトラメチルアンモニウム塩

等のアンモニウム塩；モルホリン、ピペリジン等の有機アミン付加塩；グリシン、フェニルアラニン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸等のアミノ酸付加塩等が挙げられる。

[0038] 溶媒和物としては、薬学的に許容される溶媒和物であれば特に制限されず、例えば、水和物、有機溶媒和物等が挙げられる。

[0039] 上記式（１）で表される化合物、その薬学的に許容される塩又はそれらの溶媒和物は、H s d 1 7 b 4 (P e r o x i s o m a l m u l t i f u n c t i o n a l e n z y m e t y p e 2) に対する結合能を有するものであってもよい。

[0040] 実施例において後述するように、発明者らは、上記式（１）で表される化合物がH s d 1 7 b 4 に特異的に結合することを明らかにした。H s d 1 7 b 4 は、ペルオキシソーム等に存在することが知られるタンパク質であり、脂肪酸を β 酸化する等の活性を有する酵素である。ヒトH s d 1 7 b 4 のU n i p r o t アクセッション番号はP 5 1 6 5 9であり、マウスH s d 1 7 b 4 のU n i p r o t アクセッション番号はP 5 1 6 6 0である。

[0041] 実施例において後述するように、本実施形態の抗炎症剤は、鎮痛作用を示す。したがって、本実施形態の抗炎症剤は鎮痛剤であるということもいえる。

[0042] [医薬組成物]

本実施形態の抗炎症剤は、それ自体を投与してもよいし、薬学的に許容される担体と混合した医薬組成物として製剤化したものを投与してもよい。

[0043] 医薬組成物は、例えば錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤等の経口的に使用される剤型に製剤化されていてもよく、例えば注射剤、軟膏、貼付剤等の非経口的に使用される剤型に製剤化されていてもよい。

[0044] 薬学的に許容される担体としては、例えば、滅菌水、生理食塩水等の溶媒；ゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴム等の結合剤、結晶性セルロース等の賦形剤；コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸等の膨化剤等が挙げられる。

[0045] 医薬組成物は添加剤を含んでいてもよい。添加剤としては、ステアリン酸マグネシウム等の潤滑剤；ショ糖、乳糖、サッカリン等の甘味剤；ペパーミント、アカモノ油等の香味剤；ベンジルアルコール、フェノールの安定剤；リン酸塩、酢酸ナトリウム等の緩衝剤；安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等の溶解補助剤；酸化防止剤；防腐剤；界面活性剤；乳化剤等が挙げられる。

[0046] 医薬組成物は、上記の担体及び添加剤を適宜組み合わせて、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することができる。

[0047] 医薬組成物が注射剤である場合、注射剤用の溶媒としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウム等の補助薬を含む等張液が挙げられる。注射剤用の溶媒は、エタノール等のアルコール；プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等のポリアルコール；ポリソルベート80（商標）、HCO-50等の非イオン性界面活性剤等を含有していてもよい。

[0048] 抗炎症剤の患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射等のほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、経皮的又は経口的に当業者に公知の方法により行いうる。

[0049] 抗炎症剤の投与量は、患者の症状等により差異はあるが、経口投与の場合、1日あたり、例えば5～20mg/kg等が挙げられる。また、非経口的に投与する場合、その投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば皮下投与の場合には、例えば10～25mg/kgを1日あたり1回投与することが挙げられる。投与量が上記範囲を超えると、肝障害が生じる場合がある。また、静脈注射の場合の致死量は約25mg/kgである。

[0050] [抗炎症剤のスクリーニング方法]

1 実施形態において、本発明は、被検物質の存在下で細胞中のGOS2遺伝子の発現量を測定する工程と、前記発現量が、前記被検物質の非存在下に

おける前記細胞中のG O S 2 遺伝子の発現量と比較して低下していた場合に、前記被検物質は抗炎症剤であると判定する工程と、を備える、抗炎症剤のスクリーニング方法を提供する。実施例において後述するように、本実施形態のスクリーニング方法により、抗炎症剤をスクリーニングすることができる。

[0051] 被検物質としては、例えば化合物ライブラリー等を用いることができる。被検物質は、例えば細胞の培地中に添加すればよい。G O S 2 遺伝子の発現量の測定方法は特に制限されず、例えばリアルタイムPCRにより行ってもよいし、例えばウエスタンブロッティング、ELISA等によりタンパク質レベルで行ってもよい。

[0052] あるいは、G O S 2 プロモーターの下流に、例えばルシフェラーゼ遺伝子等のレポーター遺伝子を連結した発現ベクターを作製し、この発現ベクターを遺伝子導入した細胞等を用いたレポーターアッセイにより、G O S 2 遺伝子の発現量を測定してもよい。

[0053] 被検物質の存在下で、対照（被検物質の非存在下）と比較してG O S 2 遺伝子の発現量と比較して低下していた場合には、前記被検物質は抗炎症剤であると判定することができる。

[0054] 1 実施形態において、本発明は、被検物質の存在下でH s d 1 7 b 4 タンパク質の活性を測定する工程と、前記活性が、前記被検物質の非存在下におけるH s d 1 7 b 4 タンパク質の活性と比較して低下していた場合に、前記被検物質は抗炎症剤であると判定する工程と、を備える、抗炎症剤のスクリーニング方法を提供する。

[0055] 実施例において後述するように、発明者らは、G O S 2 の上流でH s d 1 7 b 4 タンパク質が機能していることを明らかにした。したがって、H s d 1 7 b 4 タンパク質の活性を低下させる被検物質は、G O S 2 の阻害剤であるといえることができる。すなわち、H s d 1 7 b 4 タンパク質の活性を低下させる被検物質は、抗炎症剤であるといえることができる。

[0056] 本実施形態のスクリーニング方法は、細胞レベルで行ってもよいし、精製

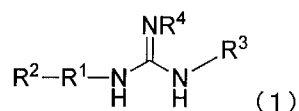
したHsd17b4タンパク質を用いて試験管内で行ってもよい。被検物質としては、上述したものと同様のものを使用することができる。

[0057] Hsd17b4タンパク質の活性としては、脂肪酸を β 酸化する活性が挙げられる。Hsd17b4タンパク質の活性は、例えば、2-methyl-branched-chain fatty acids、胆汁酸中間体、又は超長鎖脂肪酸の代謝量を測定すること等により測定することができる。なお、発明者らは、コンピューター解析結果より、Hsd17b4の酵素活性部位にNS-3-011等の化合物が結合する結果、Hsd17b4の活性が低下することを明らかにした。また、Hsd17b4にはNS-3-011以外の化合物も結合し得る。

[0058] [その他の実施形態]

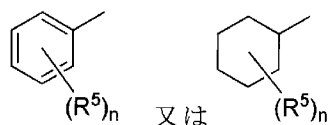
1実施形態において、本発明は、GOS2に対するsiRNA、shRNA、miRNA、リボザイム、アンチセンス核酸、又は下記式(1)で表される化合物、その薬学的に許容される塩又はそれらの溶媒和物を、治療を必要とする患者又は患畜に投与する工程を備える、炎症関連疾患の治療又は予防方法を提供する。

[化7]



[式(1)中、R¹は単結合又は炭素数1～3のアルキレン基を表し、R²は

[化8]



(ここで、R⁵は炭素数1～3のハロゲン化アルキル基を表し、nは0～5の整数を表す。)を表し、R³は炭素数1～15のアルキル基を表し、R⁴は水素原子又はカルボン酸エステル基を表す。nが2以上の整数である場合、複

数存在する R^5 は互いに同一であっても異なってもよい。]

[0059] 1 実施形態において、本発明は、GOS2 に対する siRNA、shRNA、miRNA、リボザイム、アンチセンス核酸、又は上記式(1)で表される化合物、その薬学的に許容される塩又はそれらの溶媒和物を、治療を必要とする患者又は患畜に投与する工程を備える、疼痛の治療又は予防方法を提供する。

[0060] 1 実施形態において、本発明は、GOS2 に対する siRNA、shRNA、miRNA、リボザイム、アンチセンス核酸、又は上記式(1)で表される化合物、その薬学的に許容される塩又はそれらの溶媒和物を、治療を必要とする患者又は患畜に投与する工程を備える、肝炎又は肝臓癌の治療又は予防方法を提供する。

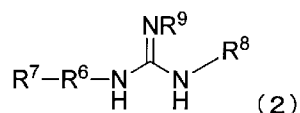
[0061] 1 実施形態において、本発明は、炎症関連疾患の治療若しくは予防、又は疼痛の治療若しくは予防のための、GOS2 に対する siRNA、shRNA、miRNA、リボザイム、アンチセンス核酸、若しくは上記式(1)で表される化合物、その薬学的に許容される塩若しくはそれらの溶媒和物を提供する。

[0062] 1 実施形態において、本発明は、炎症関連疾患の治療剤若しくは予防剤、又は疼痛の治療剤若しくは予防剤を製造するための、GOS2 に対する siRNA、shRNA、miRNA、リボザイム、アンチセンス核酸、若しくは上記式(1)で表される化合物、その薬学的に許容される塩若しくはそれらの溶媒和物の使用を提供する。

[0063] [新規化合物]

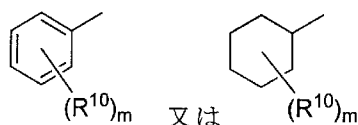
発明者らはまた、下記式(2)で表される化合物を見出した。

[0064] [化9]



式(2)中、 R^6 は単結合又は炭素数1～3のアルキレン基を表し、 R^7 は

[化10]

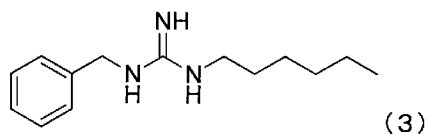


ここで、 R^{10} は炭素数1～3のハロゲン化アルキル基を表し、 m は0～5の整数を表す。)を表し、 R^8 は炭素数1～15のアルキル基を表し、 R^9 は水素原子又はカルボン酸エステル基を表す。 R^8 がヘキシル基である場合、 m は1～5の整数であり、 m が2以上の整数である場合、複数存在する R^{10} は互いに同一であっても異なってもよい。

[0065] 上記式(2)で表される化合物は、上記式(1)で表される化合物と同様に、フリー体であってもよく、薬学的に許容される塩であってもよく、フリー体の溶媒和物であってもよく、薬学的に許容される塩の溶媒和物であってもよい。薬学的に許容される塩及び溶媒和物としては上述したものと同様である。

[0066] 後述するように、本実施形態の化合物は、下記式(3)で表される化合物(化合物No. 2)と比較して、顕著に高いGOS2の発現抑制効果を奏する。したがって、本実施形態の化合物は、例えば抗炎症剤として利用することができる。

[0067] [化11]



[0068] 本実施形態の化合物は、上記式(1)で表される化合物と同様に医薬組成物として製剤化してもよい。この場合、医薬組成物の剤型、投与方法、投与量は、上述したものと同様である。

実施例

[0069] 次に実験例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実験

例に限定されるものではない。

[0070] [実験例 1]

(GOS2の同定)

DENによるマウス肝炎肝臓癌発症モデルを対象に、体内時計機構の変容を観察した。その結果、GOS2 (G0/G1 switch gene 2) の発現リズムに変容が認められた。マウスGOS2の塩基配列を配列番号1に示し、ヒトGOS2の塩基配列を配列番号2に示す。

[0071] [実験例 2]

(GOS2の機能解析)

培養細胞におけるGOS2をノックダウンし、炎症性シグナルにより活性化される転写因子であるNF- κ Bに対する影響を検討した。

[0072] まず、NF- κ B応答エレメントを用いたレポーターアッセイを行った。マウス胎仔由来線維芽細胞株であるNIH3T3に、NF- κ B応答エレメントの下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結した発現カセットを安定発現させた細胞を作製した。続いて、この細胞の培地（容量500 μ L）に、0、12.5、25及び50 pmolのGOS2に対するsiRNAを添加し、48時間静置した。GOS2に対するsiRNAとしては、市販されているもの（ライフテクノロジーズ社、商品名「Stealth siRNA」、カタログ番号「#1320001」、配列番号3にアンチセンス鎖の塩基配列を示す。）を使用した。

[0073] 続いて各細胞を回収して破碎し、発光基質（商品名「Dual-Luciferase (R) Reporter Assay System」、プロメガ社製）を反応させて発光量を計測し、NF- κ B応答エレメントの活性を測定した。図2は、測定結果を示すグラフである。その結果、GOS2に対するsiRNAを培地に添加することにより、NIH3T3細胞におけるNF- κ B応答エレメントの活性が低下することが明らかとなった。

[0074] 以上の結果から、GOS2は炎症性シグナルの転写活性の調節因子であることが明らかとなった。

[0075] [実験例3]

(GOS2のノックダウン)

ジエチルニトロソアミン (DEN) によるマウス肝炎肝臓癌発症モデルのマウスを2群に分け、一方にGOS2に対するsiRNAを投与し (GOS2 siRNA投与群)、他方に陰性対照のsiRNAを投与した (対照siRNA投与群)。マウスへのsiRNAの投与は、核酸導入試薬 (商品名「LipoTrust (商標) EX Oligo<in vivo>」、北海道システム・サイエンス社) を用いて、1.6nmol/匹を尾静脈投与することにより行った。GOS2に対するsiRNAとしては、市販されているもの (ライフテクノロジーズ社、商品名「Stealth siRNA」、カタログ番号「#1320001」、配列番号3にアンチセンス鎖の塩基配列を示す。) を使用した。対照siRNAとしては市販されているもの (ライフテクノロジーズ社、配列番号4にアンチセンス鎖の塩基配列を示す。) を使用した。

[0076] マウスへのsiRNAの投与の1日後からDENを80mg/Lの濃度で飲水に添加した。マウスへのsiRNAの投与3日後に肝臓を採取し、NF-κB応答エレメント配列を含むDNA断片を用いたゲルシフトアッセイを行い、NF-κBとNF-κB応答エレメントとの結合量を測定した。

[0077] 図3は、測定結果を示すグラフである。その結果、GOS2に対するsiRNAを投与することにより、マウス肝炎肝臓癌発症モデルの肝臓におけるNF-κB応答エレメント (NRE) へのNF-κBの結合活性が低下することが明らかとなった。

[0078] 続いて、上記と同様のGOS2 siRNA投与群及び対照siRNA投与群のマウスを用意した。マウスへのsiRNAの投与の1日後からDENを80mg/Lの濃度で飲水に添加し、14週間飼育した後にと殺し、解析を行った。その結果、GOS2 siRNA投与群のマウスにおいては肝臓癌の発症が抑制された。これに対し、対照siRNA投与群のマウスにおいては、肝臓癌の発症が認められた。

[0079] 図4 Aは、対照 s i R N A 投与群（図中、「対照 s i R N A」と示す。）のマウスの肝臓の病理顕微鏡写真であり、図4 Bは、対照 s i R N A 投与群のマウスから摘出した肝臓の写真である。図4 A中の矢印は癌細胞を示し、図4 B中の矢印は発症した肝臓癌を示す。

[0080] また、図4 Cは、G O S 2 s i R N A 投与群（図中、「G O S 2 s i R N A」と示す。）のマウスの肝臓の病理顕微鏡写真であり、図4 Dは、G O S 2 s i R N A 投与群のマウスから摘出した肝臓の写真である。

[0081] [実験例4]

（C c l 2 の発現量の検討）

実験例3のG O S 2 s i R N A 投与群のマウス及び対照 s i R N A 投与群のマウスの肝臓において、ケモカインC c l 2 のm R N A の発現量をq R T - P C R 法により測定した。図5は、各群のマウスの肝臓におけるC c l 2 のm R N A の発現量の測定結果を示すグラフである。図中の*印は、危険率5%未満で有意差があることを意味する。

[0082] その結果、G O S 2 s i R N A 投与群（図中、「G O S 2 s i R N A」と示す。）のマウスにおいては、対照 s i R N A 投与群（図中、「対照 s i R N A」と示す。）のマウスと比較して、C c l 2 の発現が有意に抑制されていることが明らかとなった。

[0083] [実験例5]

（化合物ライブラリーを用いた一次、二次スクリーニング）

G O S 2 遺伝子転写抑制薬を探索した。探索するにあたり、東京大学創薬オープンイノベーションセンターから9600化合物からなる化合物ライブラリー（C o r e l i b r a r y）の提供を受けた。この化合物ライブラリーを対象に384 w e l l p l a t e を用いてルシフェラーゼ活性への影響を評価することにより、一次スクリーニングを行った。G O S 2 プロモーター（-2030→-1378）の下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結した発現カセットを安定発現させた細胞株を用いて、各化合物（終濃度10 μ M）について薬効評価を3回ずつ検討し、すべての検討でルシフェラーゼ

活性を 1 / 4 未満に低下させた化合物を抽出した結果、175 個の化合物がヒットした。図 6 A に一次スクリーニングの結果を示す。

[0084] 次に、これらの化合物（終濃度 10 μ M）が、マウス線維芽細胞由来の細胞である O-4000E 細胞株の生存率に与える影響を、細胞内の ATP 存在量を指標に評価することにより二次スクリーニングを行った。図 6 B に二次スクリーニングの結果を示す。その結果、細胞生存率を有意に低下させる化合物はほとんど存在しなかった。そこで、細胞生存率に影響を与えず、かつ一次スクリーニングで O-4000E 細胞株のルシフェラーゼ活性を 1 / 10 未満まで下げる 50 個の化合物を候補化合物とした。

[0085] [実験例 6]

（GOS2 プロモーターに対する選択性によるスクリーニング）

より肝臓での環境に近づけるため、マウス肝癌由来の細胞である Hepa 1-6 細胞に、GOS2 プロモーター（-2030 $\rightarrow$ +10）の下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結した発現カセットを安定発現させた細胞を作製した。この細胞を使用して、上述した一次スクリーニング時と同様に候補化合物のルシフェラーゼ活性に対する影響を評価した。図 7 A にスクリーニングの結果を示す。

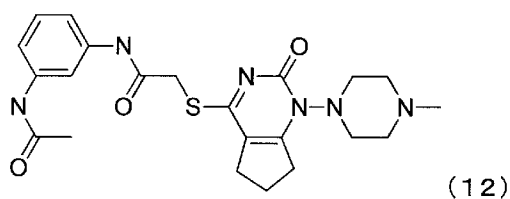
[0086] さらに、ヒット化合物の転写抑制作用が GOS2 プロモーターに対する選択性を有するものかどうかを検討するため、生体において多くの遺伝子発現に関与し生体の恒常性維持に関わる時計遺伝子群に着目し検討を行った。

[0087] 発明者らの研究より、時計遺伝子が、GOS2 遺伝子の転写制御を行う核内受容体 RAR α の発現にも関与していることが示唆されている。そこで、正常な細胞における時計遺伝子に影響を及ぼす化合物を除外するため、Bmal1 プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結した発現カセットを安定発現させた MEF 細胞株を用いた検討を行った。結果を図 7 B に示す。

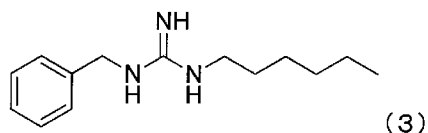
[0088] その結果、多くの化合物で有意に Bmal1 のプロモーター活性を抑制する可能性が示唆された。そこで、Bmal1 プロモーター活性に有意な変化

がなく、GOS2プロモーター（ $-2030 \rightarrow +10$ ）の活性を1/2未満まで低下させる化合物を抽出した結果、化合物No. 1、化合物No. 2及び化合物No. 3の3つの化合物が候補として残った。下記式（12）、（3）及び（13）に、それぞれ化合物No. 1、化合物No. 2（以下、「NS-3-008」という場合がある。）及び化合物No. 3の化学式を示す。

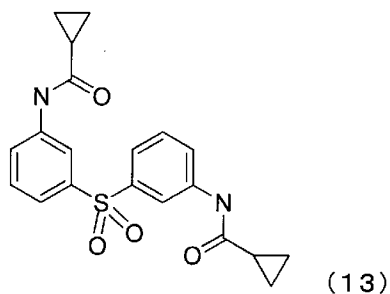
[0089] [化12]



[0090] [化13]



[0091] [化14]



[0092] そこで更にPer2プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結した発現カセットを安定発現させたMEF細胞株を用いて、この3つの化合物の薬効評価を行った結果、残ったヒット化合物の3つはいずれもPer2プロモーター活性に影響を与えなかった。結果を図7Cに示す。

[0093] [実験例7]

(ヒット化合物の内因性mRNA発現への影響)

これまでに抽出された3つの化合物について、GOS2遺伝子のmRNA発現量に及ぼす影響を評価した。Hepa1-6細胞を播種して24時間後に、ヒット化合物を10 μ Mで暴露し、24時間後にサンプリング及び全RNAの抽出を行った。続いて、qRT-PCR法によりGOS2遺伝子のmRNA発現量変化を測定した。

[0094] その結果、図8Aに示すように、いずれの化合物においてもGOS2遺伝子のmRNA発現量が約半分まで低下していることが明らかとなった。さらに、図8Bに示すように、GOS2の転写制御に関与することが知られている核内受容体RAR α の発現量は、化合物No. 1と化合物No. 2では変化がなかったが、化合物No. 3で有意な減少が認められた。また、図8C及び図8Dに示すように、GOS2が調節因子として寄与しているNF- κ Bシグナルの下流因子であるCcl2及びインターロイキン(IL)-6のmRNA発現量は、いずれの化合物の暴露によっても有意な減少が認められた。これらの結果より、化合物No. 3を候補から外し、化合物No. 1及び化合物No. 2を候補化合物とした。

[0095] [実験例8]

(ヒット化合物のIC₅₀の算出)

ヒット化合物である化合物No. 1及びNo. 2の薬効評価のため、IC₅₀の算出を行った。O-4000E細胞株を播種し、化合物No. 1及びNo. 2をそれぞれ終濃度0.15625 μ M～10 μ Mとなるよう8段階に段階希釈して暴露した。暴露から24時間後にルシフェラーゼ活性を測定し、カーブフィッティングを行ってIC₅₀を算出した。その結果、図8Eに示すように化合物No. 1のIC₅₀は5.00 μ Mであり、図8Fに示すように化合物No. 2のIC₅₀は2.25 μ Mと算出された。

[0096] [実験例9]

(正常マウスに対する化合物No. 2の薬効評価)

IC₅₀がより低値を示した化合物No. 2について、正常マウスの肝臓に

におけるGOS2 mRNA発現量に及ぼす影響について検討を行った。ICR雄性マウスに対し15mg/kgで化合物No. 2を背部皮下投与し、投与後30分、1、2、4、6、12、24時間目の肝臓におけるGOS2 mRNAの発現量を測定した。その結果、図9Aに示すように、投与から4時間目においてGOS2 mRNA発現量が約半分にまで低下する傾向が認められ、2時間目および12時間目で、有意に減少していることが分かった。さらに、図9Bに示すように、投与後2時間目から12時間目の肝臓におけるGOS2タンパク質発現量を測定したところ、投与後4時間目と6時間目の化合物No. 2投与群で有意な低下が認められた。

[0097] [実験例10]

(化合物No. 2の炎症シグナルへの拮抗作用の評価1)

次に、生体内での効果が認められた化合物No. 2が炎症シグナルの活性化に拮抗する作用を持つか否かの検討を行った。GOS2タンパク質が調節因子として働くNF- κ Bを活性化させるリポポリサッカライド(LPS)又はTNF α をHepa1-6細胞に暴露すると同時に化合物No. 2を10 μ Mで暴露した。図10A、図10Bに示すように、暴露から12時間後に細胞を回収しCcl2 mRNA発現量を測定したところ、LPS又はTNF α の暴露によって増大したCcl2 mRNA発現が化合物No. 2の暴露によって有意に抑制された。また、マウスにLPS 25 μ gを尾静脈より投与し、肝炎モデルを作製した。LPS投与30分後に化合物No. 2 (5mg/kg)を尾静脈投与し、6時間目に肝臓をサンプリングした。その結果、図10Cに示すように、肝臓のCcl2 mRNA発現量は、対照群(生理食塩水投与群)と比較し有意に発現量が増加したが、化合物No. 2を投与した群ではその発現は有意に抑制された。

[0098] [実験例11]

(化合物No. 2の炎症シグナルへの拮抗作用の評価2)

実験例10とは異なる条件下で、インビボにおいて化合物No. 2が炎症シグナルの活性化に拮抗する作用を持つか否かの検討を行った。

[0099] ICR雄性マウスにLPS（10 μ g／匹）を尾静脈投与し、LPS投与群とした。また、LPSの代わりに生理食塩水を投与したマウスを用意し、対照群とした。続いて、LPS投与群を2つに分け、一方の群に、LPSの投与から1時間後に化合物No. 2を5mg／kgとなるよう背部皮下投与し、LPS＋No. 2投与群とした。続いて、化合物No. 2の投与から5時間後に、各群のマウスをと殺し肝臓を採取した。

[0100] 続いて、得られた各群のマウスの肝臓におけるGOS2タンパク質の発現量をウエスタンブロット法により定量した。図11Aは、GOS2タンパク質の定量結果を示すグラフである。

[0101] その結果、GOS2の発現は、対照群と比較してLPS投与群で有意に上昇した。さらに、GOS2の発現は、LPS投与群と比較してLPS＋No. 2投与群で有意に抑制された。

[0102] また、各群のマウスの肝臓について、NF- κ Bの構成タンパク質の1つであるp65タンパク質の核内存在量をウエスタンブロット法により定量した。図11Bは、p65タンパク質の定量結果を示すグラフである。

[0103] その結果、p65タンパク質の核内存在量は、対照群と比較してLPS投与群で有意に上昇した。さらに、p65タンパク質の核内存在量は、LPS投与群と比較してLPS＋No. 2投与群で有意に低下した。

[0104] また、各群のマウスの肝臓について、NF- κ Bの標的遺伝子であるCcl2のmRNA発現量をリアルタイムPCRにより定量した。図11Cは、Ccl2のmRNAの発現量の定量結果を示すグラフである。

[0105] その結果、Ccl2のmRNAの発現量は、対照群と比較してLPS投与群で有意に上昇した。さらに、Ccl2のmRNAの発現量は、LPS投与群と比較してLPS＋No. 2投与群で有意に低下した。

[0106] 以上の結果は、化合物No. 2が*in vivo*において炎症シグナルに拮抗し、NF- κ Bを介したケモカインの発現亢進を抑制する作用を持つことを更に支持するものである。

[0107] [実験例12]

(化合物 No. 2 の神経障害性疼痛への薬効評価)

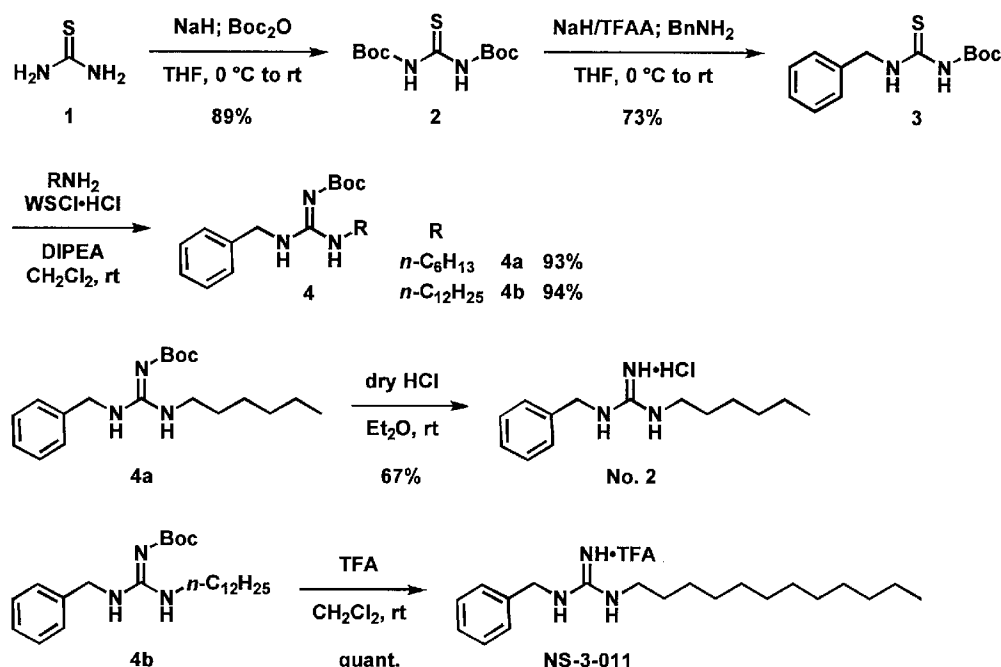
炎症モデルで効果が認められた化合物 No. 2 が神経障害性疼痛に拮抗する作用を持つか否かの検討を行った。癌移植による神経障害性疼痛モデルは NF- κ B を活性化させる。そこで癌移植後 2 週間目にボンフェロニーテストを行い、疼痛強度を測定し疼痛が惹起されていることを確認したモデルマウスに、化合物 No. 2 を 15 mg/kg で皮下投与した。図 12 に示すように、投与後経時的に疼痛強度を測定した結果、4、6、8 時間目に有意に化合物 No. 2 投与群で痛みが緩和された。また、坐骨神経部分損傷モデルマウスにおいても同様な効果が認められた。

[0108] [実験例 13]

(化合物の合成)

下記スキームにしたがって、実施例 1 及び実施例 2 の化合物を合成した。

[化15]



[0109] まず、水素化ナトリウム存在下チオ尿素（化合物 1）と二炭酸ジ-tert-ブチルとの反応により化合物 2 を得た。続いて、化合物 2 を化合物 3 に変換したのち (Yin B, et al., Tetrahedron Lett., 49, 3687, 2008. を参

照。)、水溶性カルボジイミド存在下ヘキシルアミンとの縮合によって化合物4 aを(Poss MA, et al., Tetrahedron Lett., 33, 5933, 1992. を参照。)、ドデシルアミンとの縮合によって化合物4 bをそれぞれ収率93%及び94%で得た。化合物4 aに対し塩化水素エーテル溶液を作用させることで、実施例1の化合物(化合物No. 2)が収率67%で得られた。

(化合物No. 2)

^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ 8.10 (1H, bs), 7.79 (1H, bs), 7.56 (2H, bs), 7.41–7.27 (5H, m), 4.43 (2H, d, $J=6.2\text{ Hz}$), 3.15 (2H, q, $J=6.8\text{ Hz}$), 1.51–1.41 (2H, m), 1.32–1.21 (6H, m), 0.87 (3H, t, $J=6.7\text{ Hz}$)。

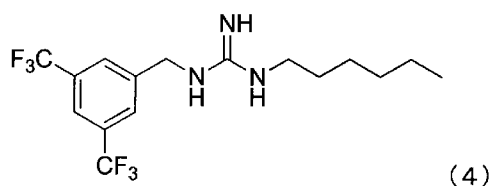
[0110] また、化合物4 bをジクロロメタン中トリフルオロ酢酸と反応させることで、実施例2の化合物(NS-3-011)が定量的に得られた。

(NS-3-011)

^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ 7.99 (1H, bs), 7.66 (1H, t, $J=5.2\text{ Hz}$), 7.50 (2H, bs), 7.42–7.35 (2H, m), 7.33–6.26 (3H, m), 4.41 (2H, d, $J=6.1\text{ Hz}$), 3.14 (2H, q, $J=6.8\text{ Hz}$), 1.53–1.41 (3H, m), 1.32–1.16 (17H, m), 0.86 (3H, t, $J=6.8\text{ Hz}$)。

[0111] また、下記式(4)で表される実施例3の化合物(NS-3-054)も合成した。

[化16]

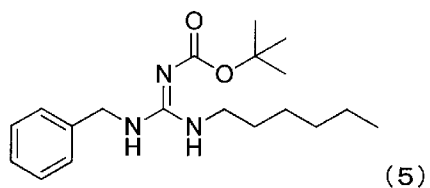


(NS-3-054)

^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ 8.21 (1H, t, $J=6.4\text{ Hz}$), 8.07 (1H, s), 8.01 (2H, s), 7.82 (1H, t, $J=5.6\text{ Hz}$), 7.61 (2H, bs), 4.61 (2H, d, $J=6.4\text{ Hz}$), 3.15 (2H, q, $J=6.8\text{ Hz}$), 1.50–1.38 (2H, m), 1.29–1.12 (6H, m), 0.84 (3H, t, $J=6.8\text{ Hz}$)。

[0112] また、下記式(5)で表される実施例4の化合物(NS-3-005)も合成した。

[化17]

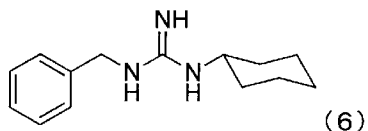


(NS-3-005)

^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 7.38–7.28 (5H, m), 4.48 (2H, bs), 3.15 (2H, bs), 1.62–1.48 (11H, m), 1.35–1.16 (6H, m), 0.86 (3H, t, $J=6.5\text{ Hz}$)。

[0113] また、下記式(6)で表される実施例5の化合物(NS-3-010)も合成した。

[化18]



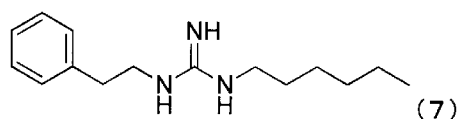
(NS-3-010)

^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ 7.77 (1H, bs), 7.45 (2H, bs), 7.42–7.37 (3H, m), 7.34–

7. 28 (3 H, m), 4. 41 (2 H, d, J=6. 1 H z), 3. 47-3. 37 (1 H, m), 1. 86-1. 77 (2 H, m), 1. 73-1. 65 (2 H, m), 1. 61-1. 53 (1 H, m), 1. 35-1. 08 (5 H, m)。

[0114] また、下記式 (7) で表される実施例 6 の化合物 (NS-3-013) も合成した。

[化19]

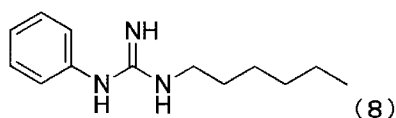


(NS-3-013)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7. 50-7. 41 (2 H, m), 7. 37 (2 H, bs), 7. 34-7. 29 (2 H, m), 7. 28-7. 21 (3 H, m), 3. 43-3. 35 (2 H, m), 3. 09 (2 H, q, J=7. 6 H z), 2. 80 (2 H, t, J=6. 8 H z), 1. 48-1. 38 (2 H, m), 1. 34-1. 20 (6 H, m), 0. 88 (3 H, t, J=6. 8 H z)。

[0115] また、下記式 (8) で表される実施例 7 の化合物 (NS-3-014) も合成した。

[化20]



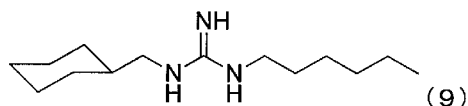
(NS-3-014)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9. 66 (1 H, bs), 8. 03-7. 90 (1 H, m), 7. 71 (2 H, bs), 7. 48-7. 41 (2 H, m), 7. 28 (1 H, t, J=7. 4 H z), 7. 22 (

2 H, d, $J = 7.7$ Hz), 3.22 (2 H, q, $J = 6.8$ Hz), 1.59–1.48 (2 H, m), 1.39–1.22 (6 H, m), 0.89 (3 H, t, $J = 6.8$ Hz)。

[0116] また、下記式 (9) で表される実施例 8 の化合物 (NS-3-015) も合成した。

[化21]

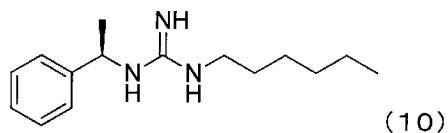


(NS-3-015)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7.41–7.34 (2 H, m), 7.31 (2 H, bs), 3.11 (2 H, q, $J = 6.9$ Hz), 2.97 (2 H, t, $J = 6.4$ Hz), 1.76–1.58 (5 H, m), 1.54–1.41 (3 H, m), 1.36–1.07 (9 H, m), 0.96–0.82 (5 H, m)。

[0117] また、下記式 (10) で表される実施例 9 の化合物 (NS-3-016) も合成した。

[化22]



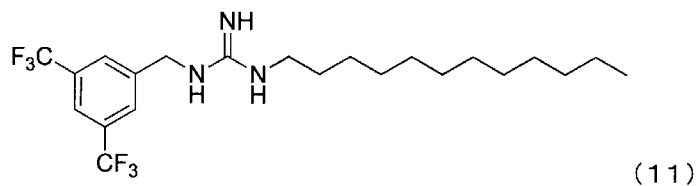
(NS-3-016)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7.94–7.84 (1 H, m), 7.48–7.35 (5 H, m), 7.35–7.27 (3 H, m), 4.87–4.78 (1 H, m), 3.18–3.03 (2 H, m), 1.50–1.34 (5 H, m), 1.31–1.13 (6 H, m), 0.85 (3 H, t, $J = 6.8$ Hz)。

[0118] また、下記式 (11) で表される実施例 10 の化合物 (NS-3-086

) も合成した。

[化23]

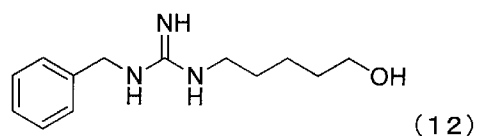


(NS-3-086)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.09 (1H, bs), 8.07 (1H, s), 8.00 (2H, s), 7.73 (1H, t, $J=5.2$ Hz), 7.56 (2H, bs), 4.60 (2H, d, $J=6.4$ Hz), 3.14 (2H, q, $J=6.7$ Hz), 1.48–1.38 (2H, m), 1.32–1.10 (18H, m), 0.86 (3H, t, $J=6.8$ Hz)。

[0119] また、下記式(12)で表される比較例1の化合物(NS-3-060)も合成した。

[化24]



(NS-3-060)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.83 (1H, bs), 7.52 (1H, bs), 7.45 (2H, bs), 7.41–7.36 (2H, m), 7.34–7.27 (3H, m), 4.40 (2H, d, $J=6.1$ Hz), 4.38 (1H, t, $J=6.5$ Hz), 3.39 (2H, t, $J=6.4$ Hz), 3.19–3.10 (2H, m), 1.75–1.66 (1H, m), 1.55–1.37 (3H, m), 1.36–1.23 (2H, m)。

[0120] [実験例 1 4]

(化合物 No. 2 の誘導体の創製と薬効評価)

化合物 No. 2 の誘導体 7 種 (実施例 2、4～9) を H e p a 1 - 6 細胞に $10\ \mu\text{M}$ で暴露し、24 時間後の G O S 2 mRNA 発現量への影響を評価した。その結果、図 1 3 A に示すように、実施例 4 (NS-3-005) 及び実施例 6 (NS-3-013) の化合物において、化合物 No. 2 と同等程度まで G O S 2 mRNA 発現量を低下させる作用が認められた。

[0121] また、図 1 3 B に示すように、これらの化合物について A T P assay により細胞生存率に対する影響を評価したところ、実施例 2 (NS-3-011) の化合物でのみ有意な低下が認められた。

[0122] また、図 1 3 C に示すように、ヒト H e p G 2 細胞に対する薬効を mRNA レベルで評価したところ、実施例 6 (NS-3-013) の化合物で有意な低下が認められ、実施例 2 (NS-3-011) の化合物において化合物 No. 2 と同程度の効果が確認された。

[0123] そこで、マウス肝癌由来細胞 H e p a 1 - 6 細胞とヒト肝癌由来細胞 H e p G 2 細胞で共通して薬効が認められた実施例 6 (NS-3-013) の化合物と $10\ \mu\text{M}$ では細胞死が認められた実施例 2 (NS-3-011) の化合物について、 $10\ \mu\text{M}$ 未満の濃度での薬効評価を行った。

[0124] その結果、図 1 3 D に示すように、H e p a 1 - 6 細胞に対し化合物 No. 2、実施例 2 (NS-3-011)、実施例 6 (NS-3-013) の化合物を 2.5 及び $5\ \mu\text{M}$ で 48 時間暴露したところ、化合物 No. 2 は $5\ \mu\text{M}$ 、実施例 2 (NS-3-011)、実施例 6 (NS-3-013) の化合物は $5\ \mu\text{M}$ と 2.5 μM 暴露の両方で G O S 2 mRNA 発現量が有意に低下した。更に、実施例 2 (NS-3-011) の化合物は、いずれの濃度においても化合物 No. 2 の $5\ \mu\text{M}$ 暴露群と比較して G O S 2 mRNA 発現量の有意な低下が認められた。

[0125] [実験例 1 5]

(化合物 No. 2 と実施例 2 の化合物の薬効比較)

これまでの検討から10 μ M未満での薬効が認められ、化合物No. 2以上の効果が期待される実施例2の化合物（NS-3-011）について、低濃度での詳細な薬効評価を行った。まず、O-4000E細胞を用いて、化合物No. 2及び実施例2の化合物（NS-3-011）のGOS2プロモーター活性に対する IC_{50} の算出を行った。その結果、図14Aに示すように、化合物No. 2では IC_{50} が2.31 μ Mであったのに対し、実施例2の化合物（NS-3-011）では IC_{50} が0.21 μ Mとなり、約10分の1の量で同等の薬効を示すことが分かった。

[0126] そこで、Hepa1-6細胞に対し0.5～5 μ Mの範囲で化合物No. 2及び実施例2の化合物（NS-3-011）を暴露し48時間後の内因性GOS2 mRNA発現量への影響を評価した。その結果、図14Bに示すように、実施例2の化合物（NS-3-011）は、1～5 μ Mの範囲で化合物No. 2よりも有意に高い作用を示し、 IC_{50} は約1 μ Mであった。

[0127] また、同様にCc12 mRNA発現量の評価を行ったところ、図14Cに示すように、実施例2の化合物（NS-3-011）は、1～2.5 μ Mの範囲で化合物No. 2よりも有意に高い効果を示した。また、図14Dに示すように、この際の細胞生存率をATP assayによって評価したところ、実施例2の化合物（NS-3-011）の5 μ M暴露時には有意に細胞生存率の低下が認められた。しかし、実施例2の化合物（NS-3-011）の1 μ Mの濃度においては細胞生存率の低下は認められず、かつ1 μ Mで化合物No. 2よりも強い作用を示したことから、実施例2の化合物（NS-3-011）は、化合物No. 2よりも有用な化合物であることが示唆された。

[0128] [実験例16]

（miRNAによるGOS2のノックダウン）

配列番号5及び6に示す塩基配列を有するDNA断片を合成し、ハイブリダイズさせて2本鎖DNA断片を形成した。続いて、形成した2本鎖DNA断片を、miRNA用発現ベクター（商品名「BLOCK-iT（商標）P

oligo miR RNAi Expression Vector Kits」、インビトロジェン社製)に連結した。続いて、作製した発現ベクターをNIH3T3細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションから48時間後に、リアルタイムPCRによりGOS2及びCc12のmRNAの発現量を定量した。

[0129] 図15は、リアルタイムPCRの結果を示すグラフである。その結果、対照の細胞と比較して、GOS2をノックダウンした細胞では、GOS2及びCc12のmRNAの発現量が低下したことが明らかとなった。

[0130] [実験例17]

(化合物の薬効評価)

LPS 10 μ gをマウスに腹腔内投与し、肝炎モデルを作製した。LPS投与から1時間後に、実施例2の化合物(NS-3-011)、実施例3の化合物(NS-3-054)及び実施例10の化合物(NS-3-086)を背部皮下投与した。各化合物の投与から5時間後に各マウスから肝臓を採取し、リアルタイムPCRによりCc12の発現量を定量した。

[0131] 図16は、リアルタイムPCRの結果を示すグラフである。図中、「ベヒクル」はLPSを投与しなかったマウスを表し、「対照」は化合物の代わりに生理食塩水を投与したマウスを表す。

[0132] その結果、対照群のマウスと比較して、化合物投与群のマウスはCc12のmRNAの発現量が低下したことが明らかとなった。いずれの化合物についてもCc12のmRNAの発現量の低下が認められた。

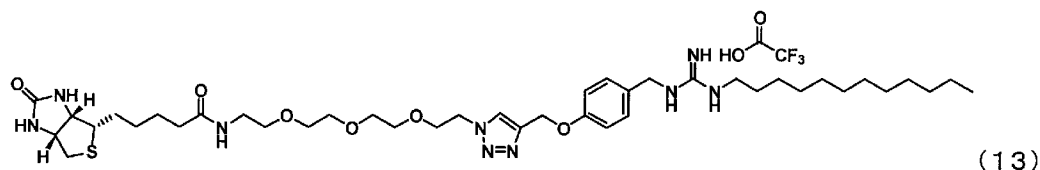
[0133] [実験例18]

(実施例2の化合物の標的タンパク質の同定)

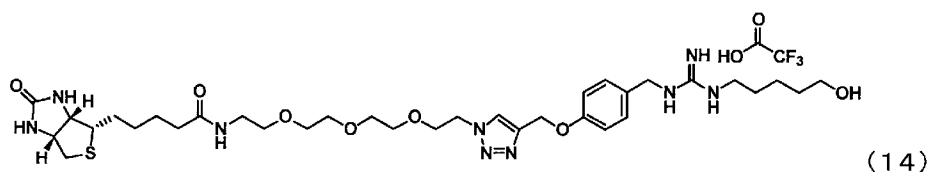
マウス肝臓細胞をホモジナイズして、細胞質及び核からそれぞれタンパク質を抽出した。その後、GOS2の発現を抑制する実施例2の化合物(NS-3-011)をペグビオチン化した化合物(#142)、又はGOS2の発現を抑制しない比較例1の化合物(NS-3-060)をペグビオチン化した化合物(#151)を、上記のタンパク質と混合し、インキュベーション

ンした。化合物# 1 4 2 及び# 1 5 1 の化学式を、それぞれ下記式 (1 3) 及び (1 4) に示す。

[0134] [化25]



[0135] [化26]



[0136] その後、アビジンを標識したマグネットビーズ（以下、「アビジンビーズ」という場合がある。）でプルダウンアッセイを行い、アビジンビーズに結合した化合物及びタンパク質をアクリルアミドゲル電気泳動した。電気泳動後のアクリルアミドゲルは、ネガティブ染色し、化合物# 1 4 2 に特異的に結合したタンパク質のバンドを切り出し、LC/MS/MS解析によりタンパク質を同定した。

[0137] 図17は、アクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す写真である。図中の矢印で示す約75kDaのタンパク質のバンドを解析した結果、Hsd17b4 (Peroxisomal multifunctional enzyme type 2、Uniprotアクセッション番号:P51660) であることが明らかとなった。

[0138] [実験例19]

(非アルコール性肝炎モデルマウスを用いた実施例1の化合物の薬効評価)

非アルコール性肝炎 (NASH) モデルの初期炎症に及ぼす化合物の影響を確認するために、NASHモデル作製用飼料 (型式「A06071302」、リサーチダイエツト社) を1週間摂食させた。摂食開始日から連日19

時に実施例1の化合物（2.5、5.0 mg/kg）を経口投与した。対照としては、通常の飼料を与え、0.5% DMSOを添加した水を化合物と同容量経口投与したマウスを使用した。

[0139] 摂食開始から1週間後に肝臓を採取し、Ccl2、 α SMA、コラーゲンタイプI α 2、コラーゲンタイプI α 1遺伝子の発現量をリアルタイムPCRにより測定した。なお、 α SMA、コラーゲンタイプI α 2、コラーゲンタイプI α 1は、肝臓の線維化の指標となるマーカーである。

[0140] また、摂食開始から1週間後に血液を採取し、薬物投与2時間後の血中薬物濃度をLC/MS/MSを用い測定した。

[0141] 図18AはNASHモデルマウスの肝臓におけるCcl2の発現量を示すグラフである。図18Aに示すように、化合物の投与によりCcl2の発現量が低下することが明らかとなった。

[0142] 図18Bは実施例1の化合物の血中薬物濃度を示すグラフである。図18Bに示すように、実施例1の化合物の平均血中濃度は、32 nMであった。

[0143] 図18C、図18D、図18Eは、それぞれ、 α SMA、コラーゲンタイプI α 2（Col1 α 2）、コラーゲンタイプI α 1（Col1 α 1）遺伝子の発現量を定量した結果を示すグラフである。図18C、図18D、図18Eに示すように、実施例1の化合物を5 mg/kg投与した群において、 α SMA、コラーゲンタイプI α 2、コラーゲンタイプI α 1遺伝子の発現量が有意に低下することが明らかとなった。

[0144] [実験例20]

（実施例1の化合物の連日投与実験）

連日19時にマウスに実施例1の化合物（5 mg/kg）を経口投与した。化合物の投与開始から21日後に血液を採取し、薬物投与から24時間後の化合物の血中濃度をLC/MS/MSを用い測定した。対照としては、通常の飼料を与え、0.5% DMSOを添加した水を化合物と同容量経口投与したマウスを使用した。

[0145] 図19は実施例1の化合物の血中薬物濃度を示すグラフである。図19に示すように、実施例1の化合物の平均血中濃度は、0.8 nMであった。

[0146] [実験例21]

(実施例1の化合物の血中濃度の測定)

ICRマウスに実施例1の化合物(15 mg/kg)を背部皮下投与した。化合物の投与から0.5、1、2、4、6、12及び24時間後に血液を採取し、化合物の血中濃度をLC/MS/MSを用いて測定した。図20は実施例1の化合物の血中薬物濃度を示すグラフである。

[0147] [実験例22]

(DENによるマウス肝炎肝臓癌発症モデルの血清中ALT活性に及ぼす化合物の影響の検討)

ジエチルニトロソアミン(DEN)を80 mg/Lの濃度で水に溶解したものを飲水として、ICRマウスに飲水投与し、肝臓に慢性的な炎症を起こした。また、DENの飲水投与開始直後より実施例10の化合物(NS-3-086)を15 mg/kg飲水投与させた群を用意した。対照群としては、飲水として水道水を与えた群を使用した。

[0148] 続いて、DENの飲水投与開始から8週間後及び12週間後に各群のマウスから尾採血し、血清中アラニン・アミノトランスフェラーゼ(ALT)活性を市販のキット(型式「トランスアミナーゼCII-テストワコー」、和光純薬工業社製)を用いて測定した。

[0149] 図21A及び図21Bは、DENの飲水投与開始から8週間後(図21A)及び12週間後(図21B)の血清中ALT活性を示すグラフである。図21A及び図21B中、「Vehicle」は対照群の結果を示し、「DEN」はDEN投与群の結果を示し、「DEN+実施例10」は、DEN及び実施例10の化合物を投与した群の結果を示す。

[0150] その結果、対照群と比較して、DEN飲水群はALT活性が有意に高いことが明らかとなった。また、DEN飲水による血清中ALT活性の上昇は、実施例10の化合物を同時に投与することにより抑制されたことが明らかと

なった。

[0151] 以上の結果は、DENによる肝臓の炎症が、実施例10の化合物の投与により抑制されたことを示す。

[0152] [実験例23]

(GOS2 mRNA発現量及び化合物の薬効に及ぼすHsd17b4ノックダウンの影響の検討)

マウス肝癌由来細胞であるHepa1-6細胞を2つに分け、一方にHsd17b4に対するsiRNAを、他方に対照siRNAをトランスフェクションした。Hsd17b4に対するsiRNAのセンス鎖の塩基配列を配列番号7に示し、アンチセンス鎖の塩基配列を配列番号8に示す。また、対照siRNAとしては市販されているもの（ライフテクノロジーズ社、配列番号4にアンチセンス鎖の塩基配列を示す。）を使用した。

[0153] 続いて、48時間後に各細胞を回収し、全RNAをそれぞれ抽出した。続いて、リアルタイムPCRにより、Hsd17b4遺伝子の発現量を定量した。

[0154] 図22AはリアルタイムPCRの結果を示すグラフである。その結果、Hsd17b4に対するsiRNAのトランスフェクションにより、Hsd17b4の発現が抑制されたことが確認された。

[0155] 続いて、化合物No. 2の存在下（10 μ M）又は非存在下（図22B中、「DMSO」と示す。）において、Hepa1-6細胞に、Hsd17b4に対するsiRNA又は対照siRNAをトランスフェクションした。続いて、48時間後に各細胞を回収し、全RNAをそれぞれ抽出した。続いて、リアルタイムPCRにより、GOS2遺伝子の発現量を定量した。

[0156] 図22BはリアルタイムPCRの結果を示すグラフである。その結果、化合物No. 2の存在下において、GOS2遺伝子の発現量が有意に低下することが明らかとなった。更に、Hsd17b4に対するsiRNAのトランスフェクションにより、化合物No. 2によるGOS2遺伝子の発現量の低下の効果が消失したことが明らかとなった。

[0157] 以上の結果より、化合物No. 2は、Hsd17b4タンパク質を介してGOS2遺伝子の発現を制御していることが明らかとなった。

[0158] [実験例24]

(GOS2 mRNA発現量に及ぼすHsd17b4遺伝子の過剰発現の影響の検討)

マウス肝癌由来細胞であるHepa1-6細胞に、Hsd17b4の発現ベクター(Hsd17b4-pcDNA3.1)又は空のベクター(pcDNA3.1)をトランスフェクションした。

[0159] 続いて、48時間後に各細胞を回収し、全RNAをそれぞれ抽出した。続いて、リアルタイムPCRにより、Hsd17b4遺伝子又はGOS2遺伝子の発現量を定量した。

[0160] 図23A及び図23BはリアルタイムPCRの結果を示すグラフである。図23AはHsd17b4遺伝子の発現量を定量した結果を示し、図23BはGOS2遺伝子の発現量を定量した結果を示す。

[0161] その結果、図23Aに示すように、Hsd17b4の発現ベクターのトランスフェクションにより、Hsd17b4遺伝子の発現量が有意に上昇したことが確認された。また、図23Bに示すように、Hsd17b4の発現ベクターのトランスフェクションにより、GOS2遺伝子の発現量が有意に上昇したことが明らかとなった。

[0162] 以上の結果より、GOS2遺伝子の発現量は、Hsd17b4タンパク質を介して制御されていることが明らかとなった。

[0163] [実験例25]

(GOS2の転写活性調節領域に及ぼす化合物の影響の検討)

図24に示すように、各長さのGOS2転写活性調節領域の下流にルシフェラーゼのcDNAを連結した発現ベクターを作製した。続いて、これらの発現ベクターをマウス線維芽細胞であるNIH3T3細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼの安定発現細胞を作製した。

[0164] 続いて、各細胞の培地に、終濃度10 μ Mの化合物No. 2又はDMSO

(対照)を添加した。続いて、24時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

[0165] 図24は、各細胞のルシフェラーゼ活性を測定した結果を示すグラフである。その結果、GOS2転写活性調節領域に存在するSTAT5/6結合領域がなくなると、化合物No. 2の添加によるルシフェラーゼの発現抑制効果が低減することが明らかとなった。

[0166] 以上の結果より、化合物No. 2は、STAT5又はSTAT6の転写を介して作用している可能性が考えられた。

[0167] [実験例26]

(GOS2の転写活性に及ぼすSTAT5の影響の検討)

GOS2の転写活性調節領域の下流にルシフェラーゼのcDNAを連結した発現ベクターと、STAT5発現ベクター又は空のベクター(p cDNA 3.1、対照)とを、マウス線維芽細胞であるNIH3T3細胞にトランスフェクションした。続いて、24時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

[0168] 図25Aは、GOS2の転写活性調節領域の構造を示す図である。また、図25Bは、ルシフェラーゼ活性を測定した結果を示すグラフである。その結果、対照群と比較して、STAT5発現ベクターをトランスフェクションした細胞は、有意に高いルシフェラーゼ活性を示すことが明らかとなった。

[0169] 以上の結果より、GOS2遺伝子の転写活性は、STAT5により直接制御されていることが明らかとなった。

[0170] [実験例27]

(核内STAT5タンパク質の存在量に及ぼす化合物の影響の検討)

マウス線維芽細胞であるNIH3T3細胞の培地に終濃度2.5、5、10 μ Mの化合物No. 2又はDMSO(対照)を添加した。続いて、24時間後に細胞を回収し、核内タンパク質を調製し、ウエスタンブロッティングによりSTAT5タンパク質の存在量を測定した。

[0171] 図26は、ウエスタンブロッティングの結果を示すグラフである。その結

果、対照と比較して、化合物N o. 2を添加した細胞では、化合物N o. 2の用量依存的に核内S T A T 5タンパク質の存在量が低下した。

[0172] 以上の結果より、化合物N o. 2は、核内S T A T 5の存在量を調節することにより、G O S 2遺伝子の発現を制御していることが明らかとなった。

[0173] [実験例28]

(化合物N o. 2の血中及び肝臓中濃度の測定)

マウスに化合物N o. 2 (15 mg/kg)を経口投与した。化合物N o. 2の投与から0分、5分、15分、30分、1時間、2時間、4時間、6時間及び12時間後に血液を採取し、化合物の血中濃度をLC/MS/MSを用いて測定した。また、化合物N o. 2の投与から0分、5分、15分、30分、1時間及び6時間後に肝臓を採取し、化合物の肝臓中濃度をLC/MS/MSを用いて測定した。

[0174] 図27Aは血液中の化合物N o. 2の濃度を示すグラフである。また、図27Bは肝臓中の化合物N o. 2の濃度を示すグラフである。その結果、血液中の化合物N o. 2の濃度は投与後15分目に最高濃度になり、肝臓中の化合物N o. 2の濃度は投与後5分目に最高濃度になることが明らかとなった。

[0175] [実験例29]

(DENによるマウス肝炎肝臓癌発症モデルの肝臓に及ぼす化合物の影響の検討)

ジエチルニトロソアミン (DEN) を80 mg/Lの濃度で水に溶解したものを飲水として、ICRマウスに飲水投与し、肝臓に慢性的な炎症及び肝癌を発症させた。また、DENの飲水投与開始直後より実施例10の化合物 (NS-3-086) を15 mg/kg飲水投与させた群を用意した。対照群としては、飲水として水道水を与えた群を使用した。

[0176] 続いて、DENの飲水投与開始から14週間後に各群のマウスをと殺し、肝臓を摘出して解析した。図28A、図28B及び図28Cは、DENの飲水投与開始から14週間後の肝臓の写真である。

[0177] 図28Aは対照群（図中、「Vehicle」と示す。）のマウスの肝臓の代表的な写真であり、図28BはDEN飲水群（図中、「DEN」と示す。）のマウスの肝臓の代表的な写真であり、図28CはDEN及び実施例10の化合物を投与した群（図中、「DEN+実施例10」と示す。）のマウスの肝臓の代表的な写真である。

[0178] その結果、対照群と比較して、DEN飲水群のマウスの肝臓には、多数の腫瘍が認められ、また、肝臓の硬化が認められた。一方、DEN及び実施例10の化合物を投与した群のマウスの肝臓では、腫瘍の形成が抑制され、また、肝臓の硬化も抑制された。下記表1に、各群のマウスの肝臓中の腫瘍の数を示す。

[0179] [表1]

腫瘍の数	0個	1個	多数
対照群(匹)	0	0	0
DEN飲水群(匹)	0	0	6
DEN+実施例10投与群(匹)	3	3	0

[0180] 以上の結果は、DENによる肝臓の癌化及び硬化が、実施例10の化合物の投与により抑制されたことを示す。

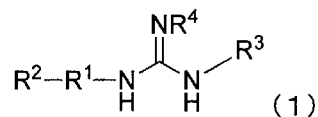
産業上の利用可能性

[0181] 本発明によれば、新たな抗炎症剤を提供することができる。

請求の範囲

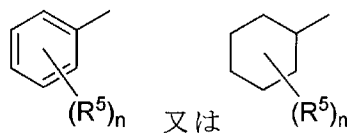
- [請求項1] G O / G 1 S w i t c h 2 (G O S 2) 阻害剤を有効成分として含有する抗炎症剤。
- [請求項2] 前記 G O S 2 阻害剤が、G O S 2 遺伝子又は H y d r o x y s t e r o i d (1 7 - β) D e h y d r o g e n a s e 4 (H s d 1 7 b 4) 遺伝子に対する s i R N A 、 s h R N A 、 m i R N A 、 リボザイム又はアンチセンス核酸である、請求項 1 に記載の抗炎症剤。
- [請求項3] 前記 G O S 2 阻害剤が、G O S 2 タンパク質又は H s d 1 7 b 4 タンパク質に対する特異的結合物質である、請求項 1 に記載の抗炎症剤。
- [請求項4] 前記 G O S 2 阻害剤が、下記式 (1) で表される化合物、その薬学的に許容される塩又はそれらの溶媒和物である、請求項 1 に記載の抗炎症剤。

[化1]



[式 (1) 中、R¹は単結合又は炭素数 1 ～ 3 のアルキレン基を表し、R²は

[化2]



(ここで、R⁵は炭素数 1 ～ 3 のハロゲン化アルキル基を表し、n は 0 ～ 5 の整数を表す。) を表し、R³は炭素数 1 ～ 15 のアルキル基を表し、R⁴は水素原子又はカルボン酸エステル基を表す。n が 2 以上の整数である場合、複数存在する R⁵は互いに同一であっても異な

っていてもよい。]

[請求項5] 前記G O S 2 阻害剤がH s d 1 7 b 4 に対する結合能を有する、請求項4 に記載の抗炎症剤。

[請求項6] 鎮痛作用を示す、請求項1 ～5 のいずれか一項に記載の抗炎症剤。

[請求項7] 被検物質の存在下で細胞中のG O S 2 遺伝子の発現量を測定する工程と、

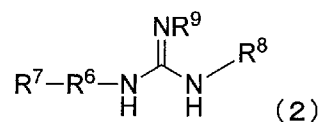
前記発現量が、前記被検物質の非存在下における前記細胞中のG O S 2 遺伝子の発現量と比較して低下していた場合に、前記被検物質は抗炎症剤であると判定する工程と、を備える、抗炎症剤のスクリーニング方法。

[請求項8] 被検物質の存在下でH s d 1 7 b 4 タンパク質の活性を測定する工程と、

前記活性が、前記被検物質の非存在下におけるH s d 1 7 b 4 タンパク質の活性と比較して低下していた場合に、前記被検物質は抗炎症剤であると判定する工程と、を備える、抗炎症剤のスクリーニング方法。

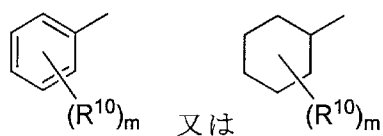
[請求項9] 下記式（2）で表される化合物、その薬学的に許容される塩又はそれらの溶媒和物。

[化3]



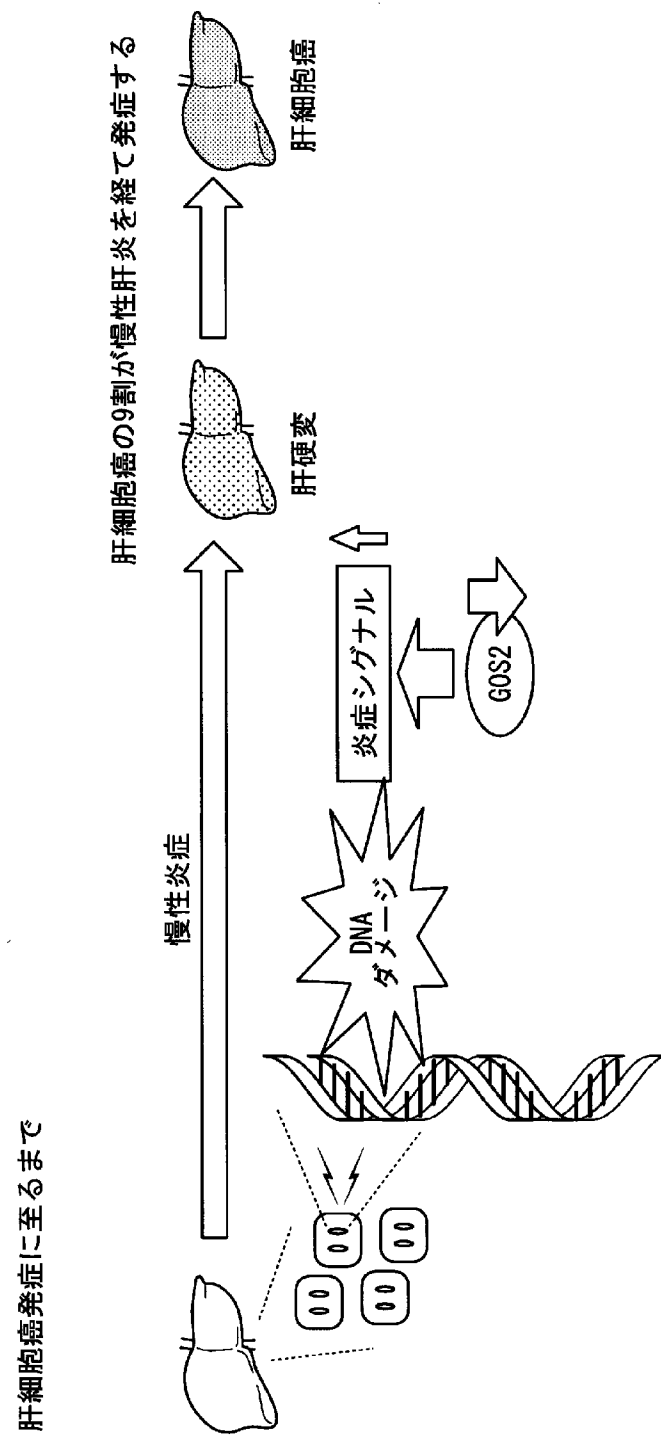
[式（2）中、R⁶は単結合又は炭素数1～3のアルキレン基を表し、R⁷は

[化4]

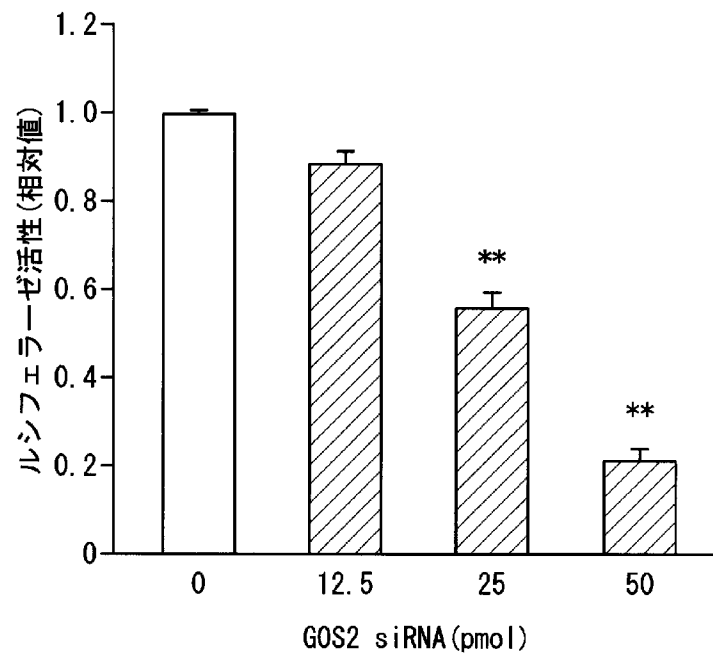


(ここで、 R^{10} は炭素数1～3のハロゲン化アルキル基を表し、 m は0～5の整数を表す。)を表し、 R^8 は炭素数1～15のアルキル基を表し、 R^9 は水素原子又はカルボン酸エステル基を表す。 R^8 がヘキシル基である場合、 m は1～5の整数であり、 m が2以上の整数である場合、複数存在する R^{10} は互いに同一であっても異なってもよい。]

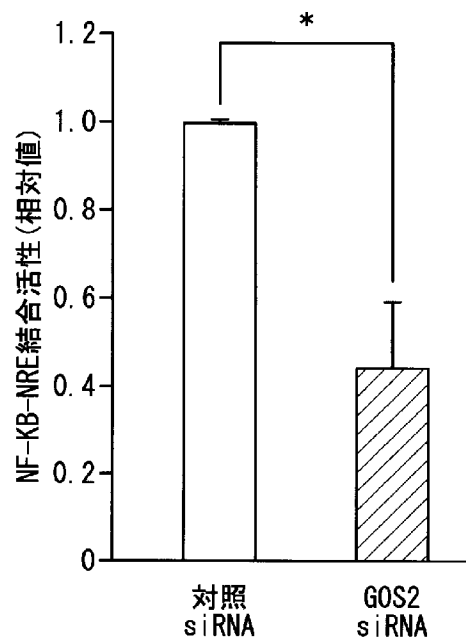
[図1]



[図2]

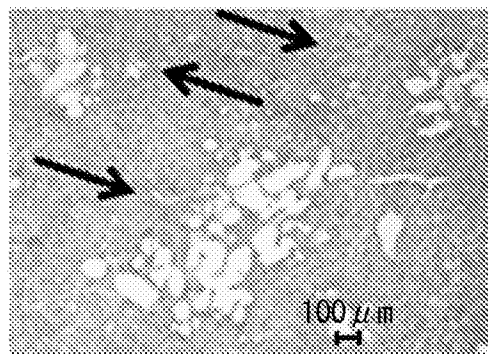


[図3]

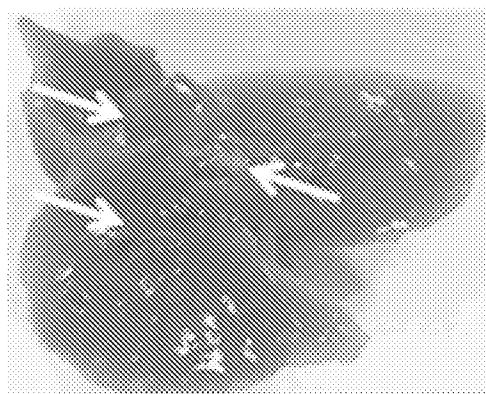


[図4A]

対照siRNA

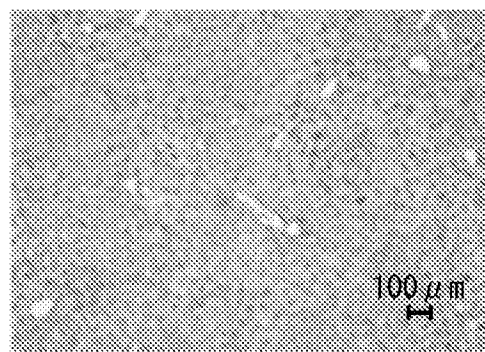


[図4B]



[図4C]

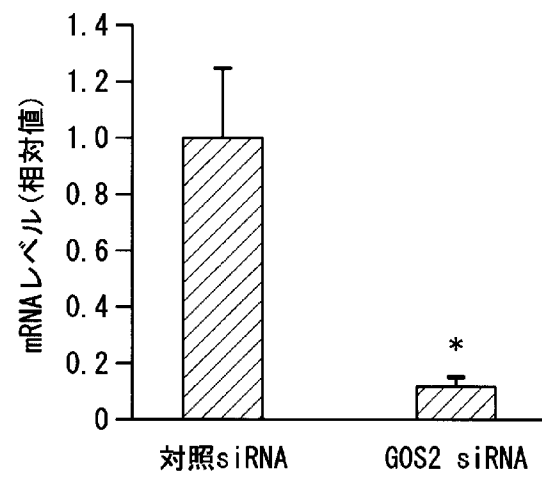
GOS2 siRNA



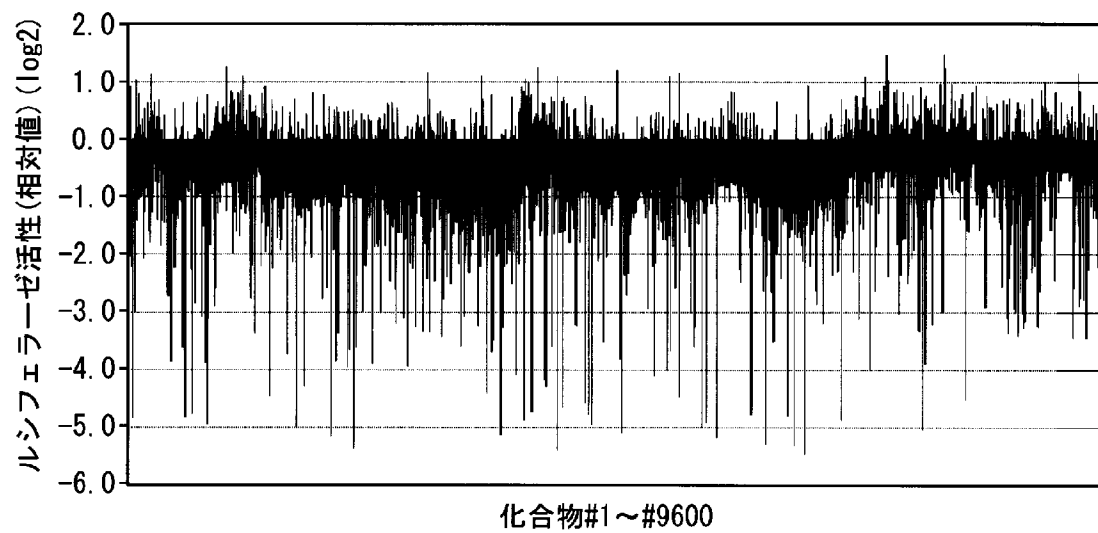
[図4D]



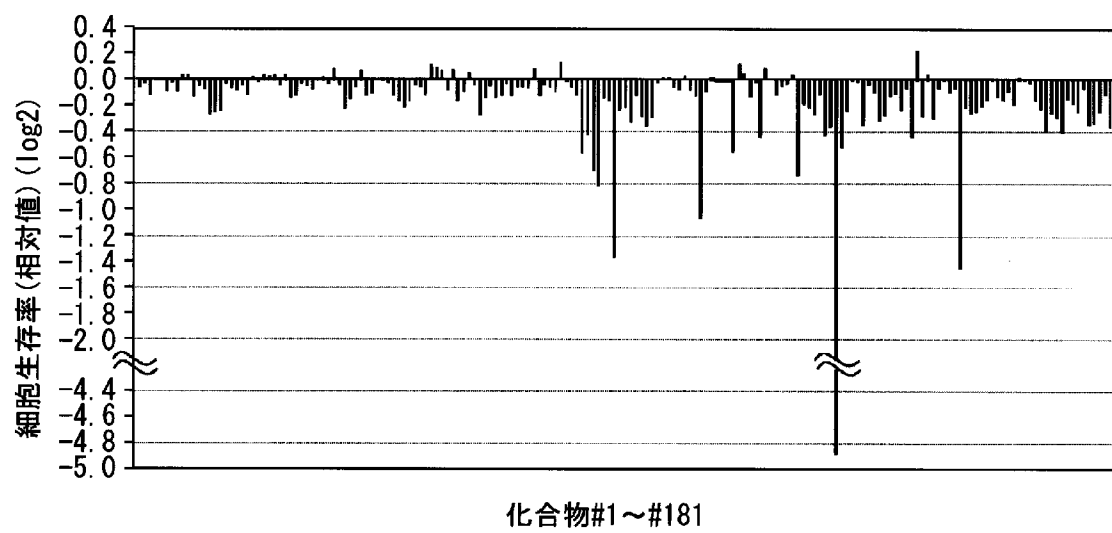
[図5]



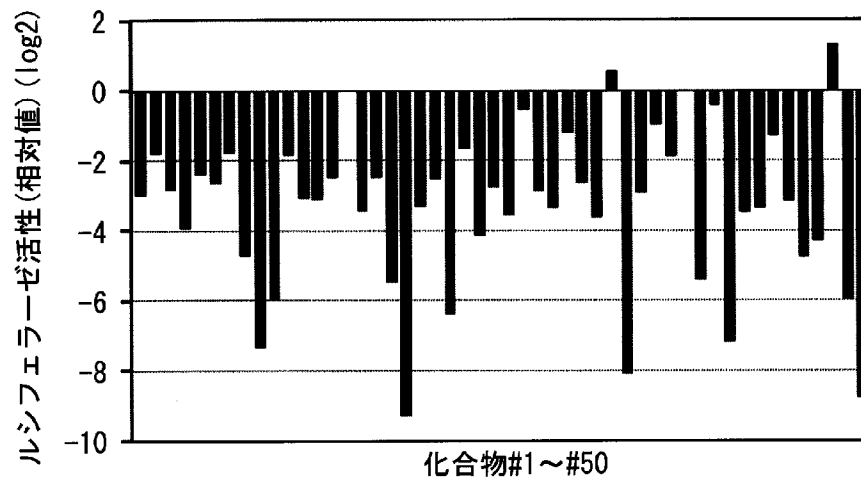
[図6A]



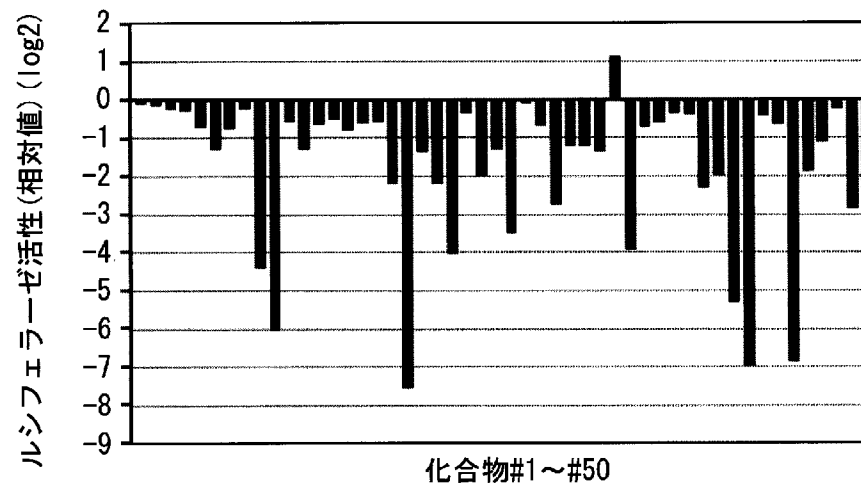
[図6B]



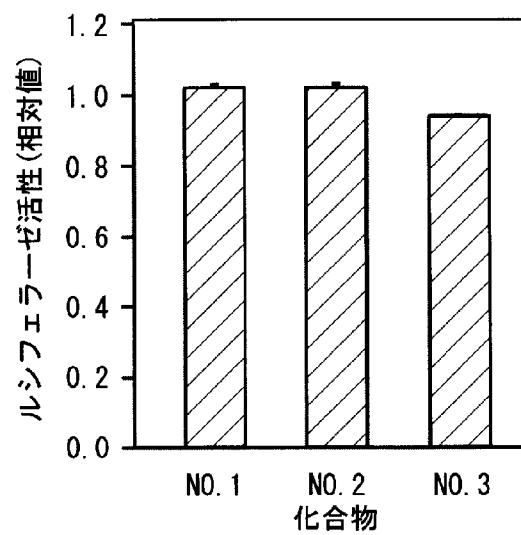
[図7A]



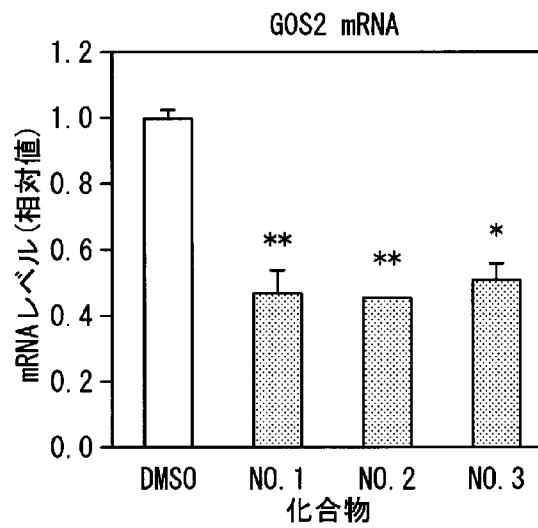
[図7B]



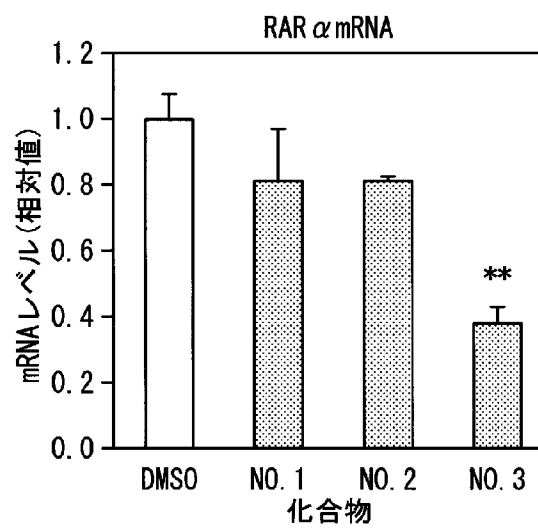
[図7C]



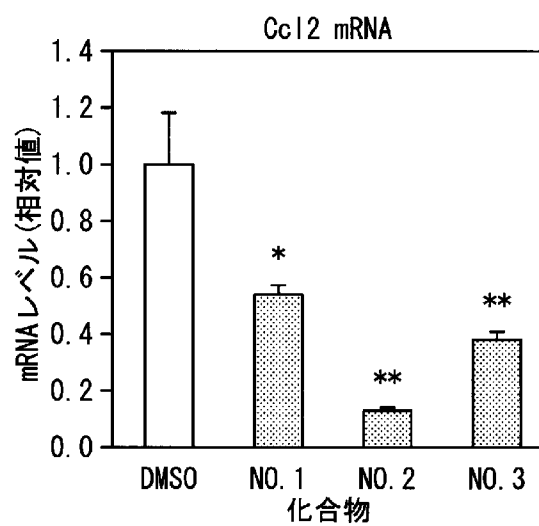
[図8A]



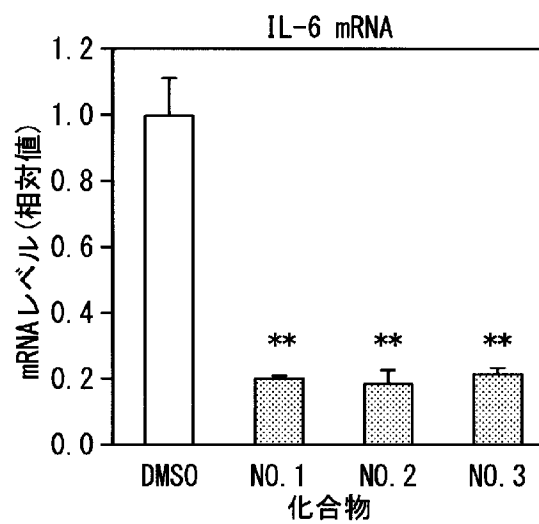
[図8B]



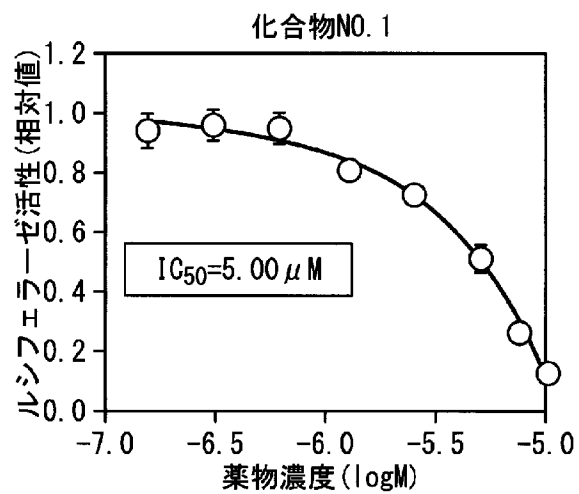
[図8C]



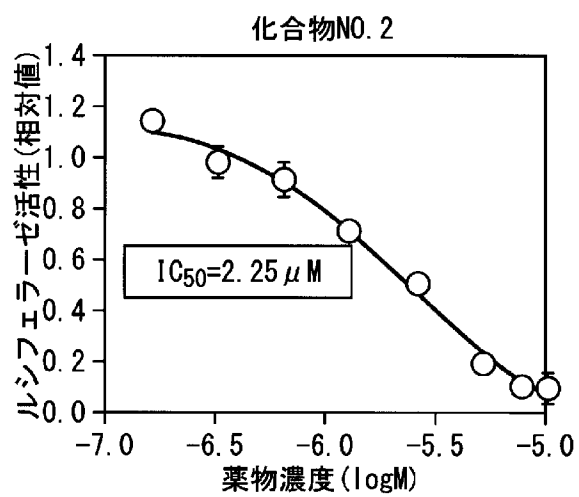
[図8D]



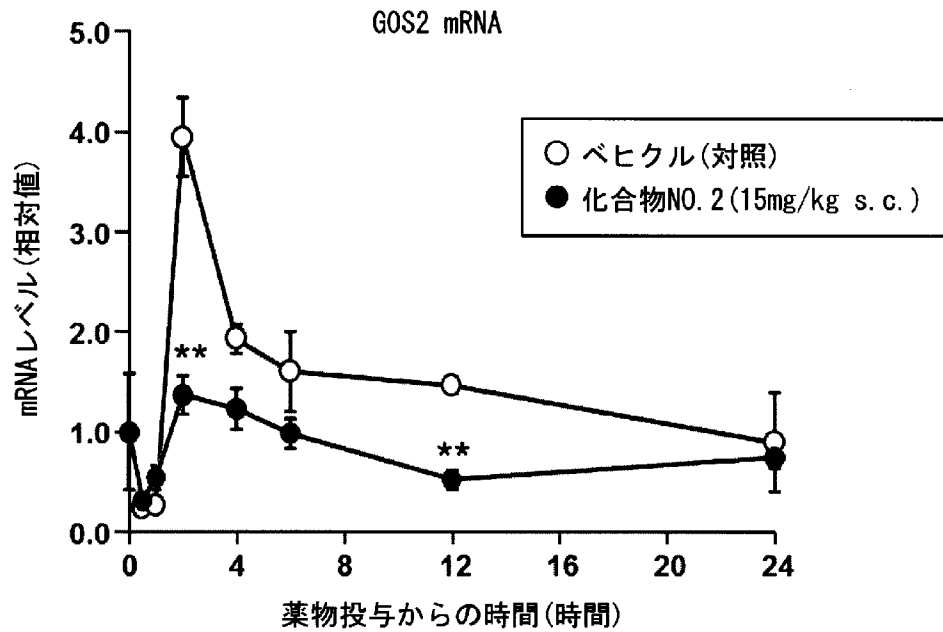
[図8E]



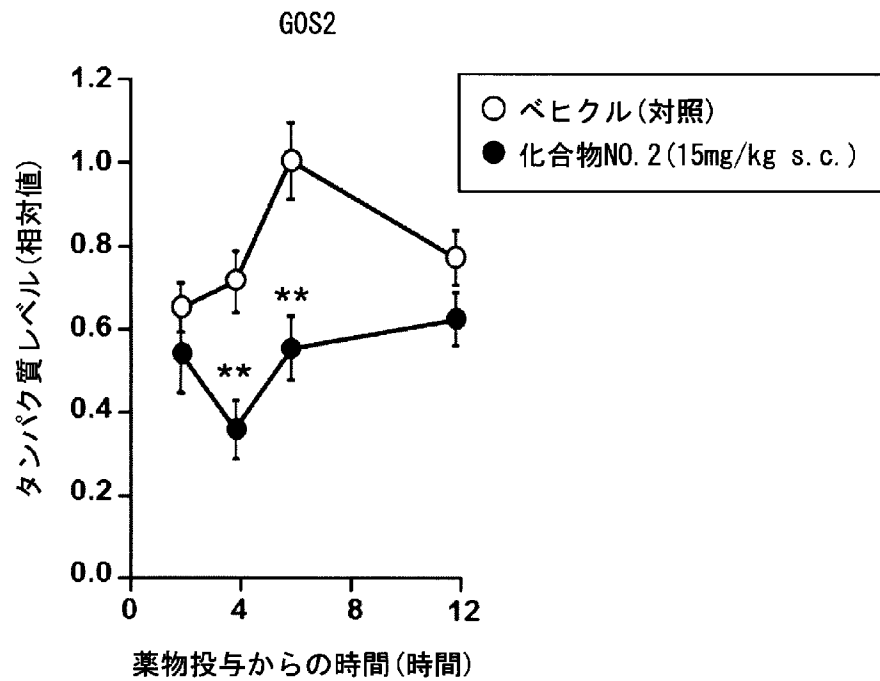
[図8F]



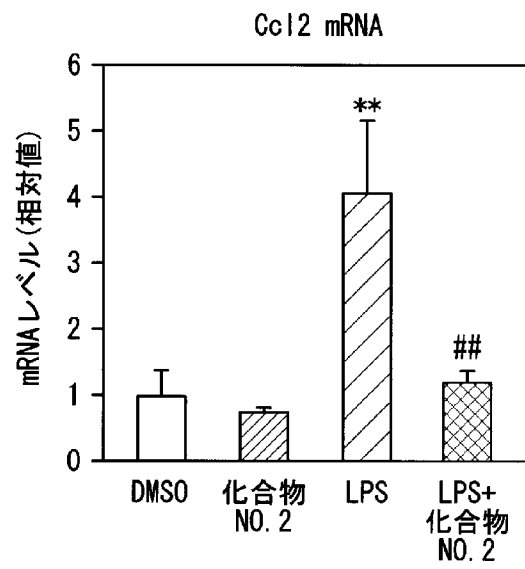
[図9A]



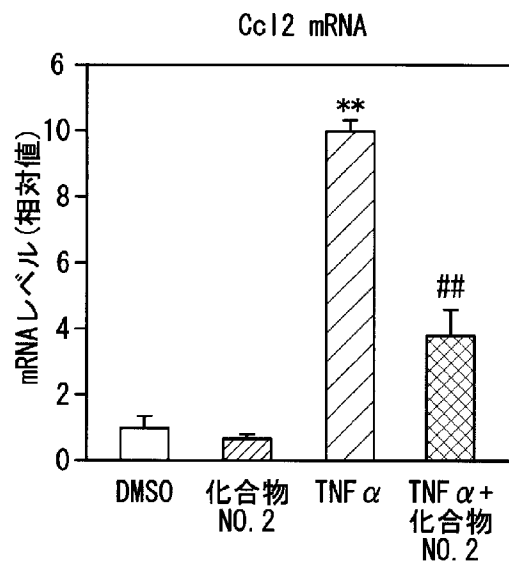
[図9B]



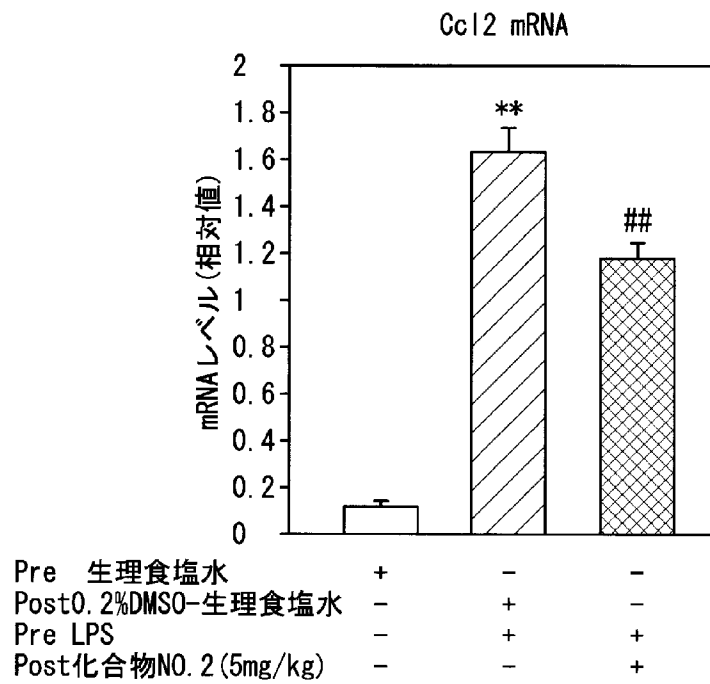
[図10A]



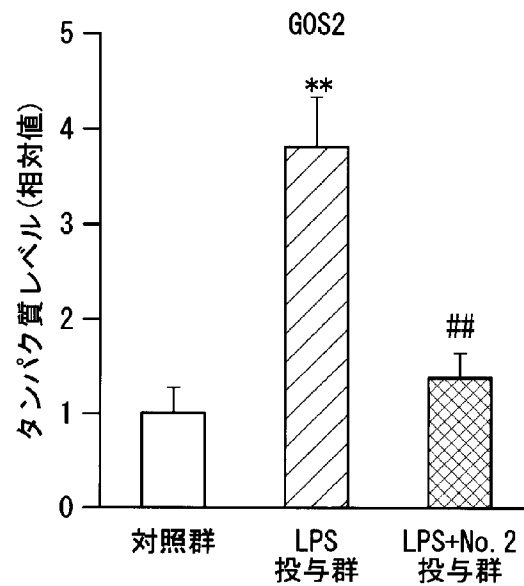
[図10B]



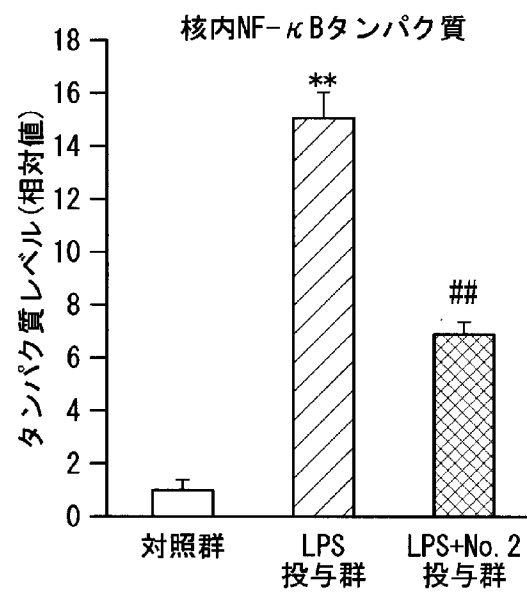
[図10C]



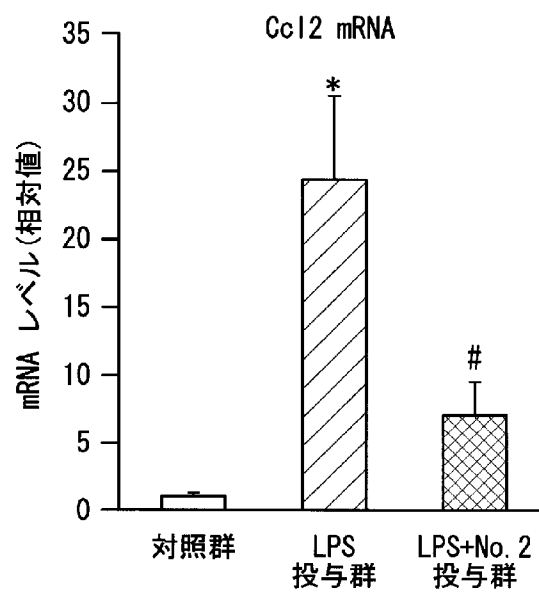
[図11A]



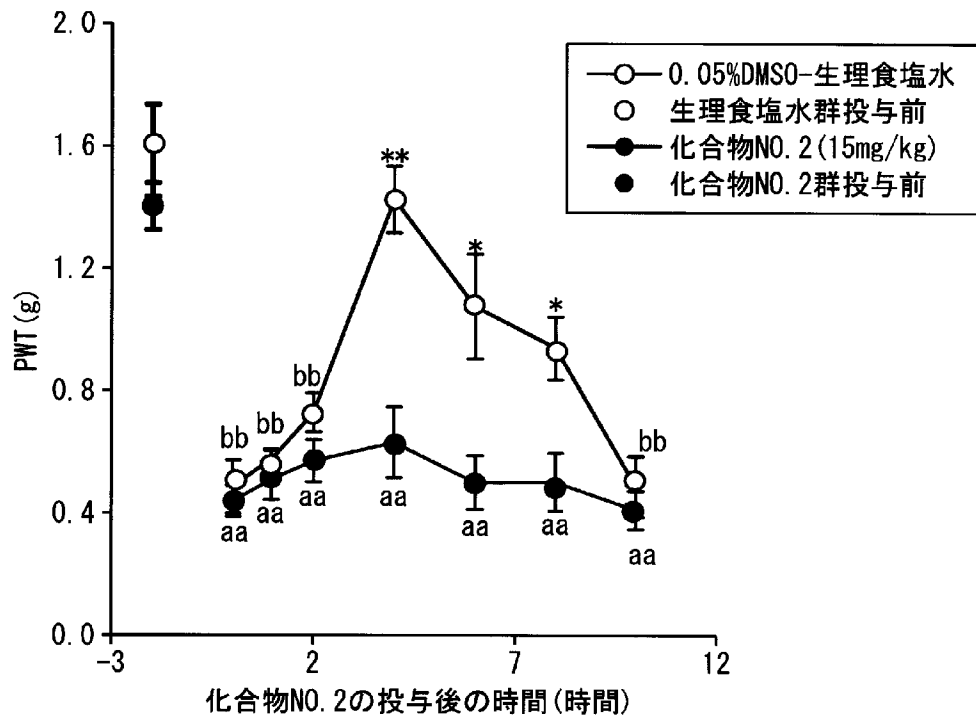
[図11B]



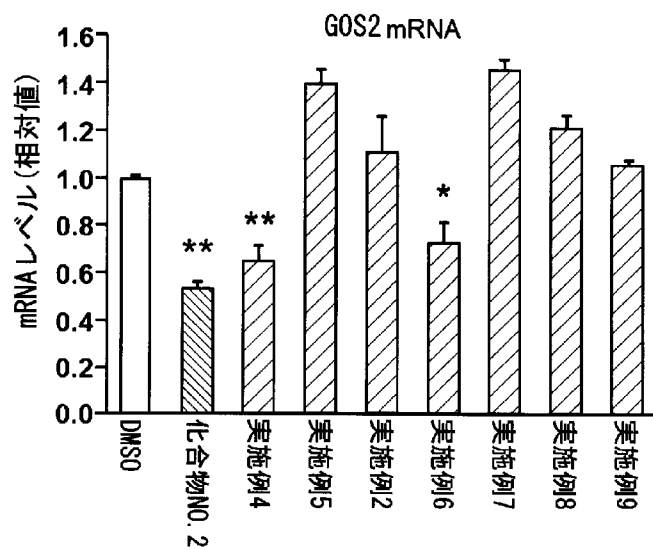
[図11C]



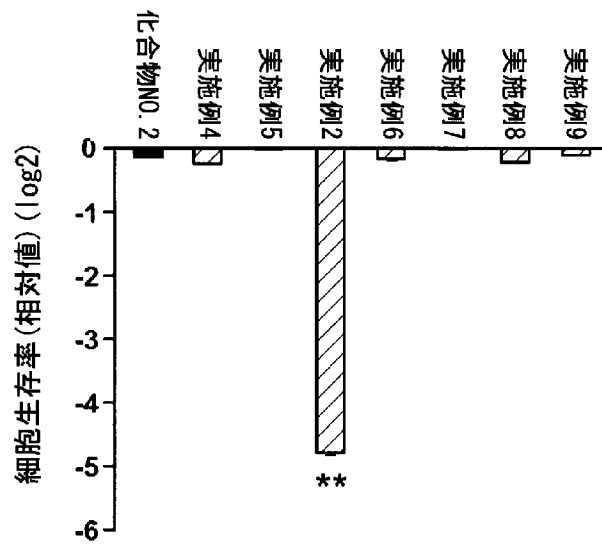
[図12]



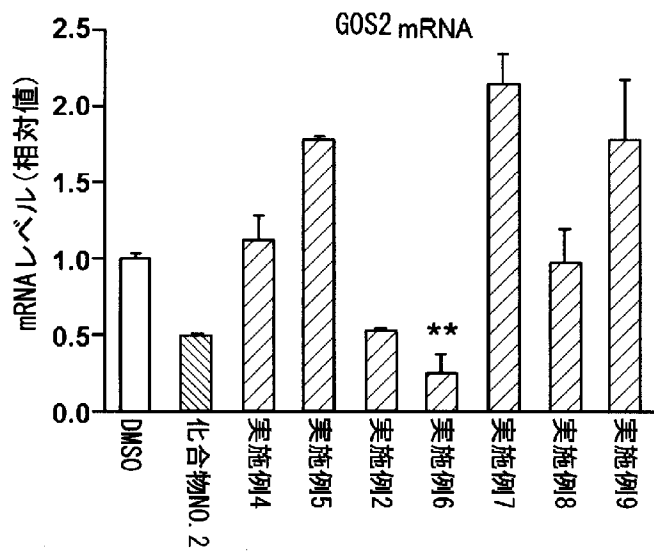
[図13A]



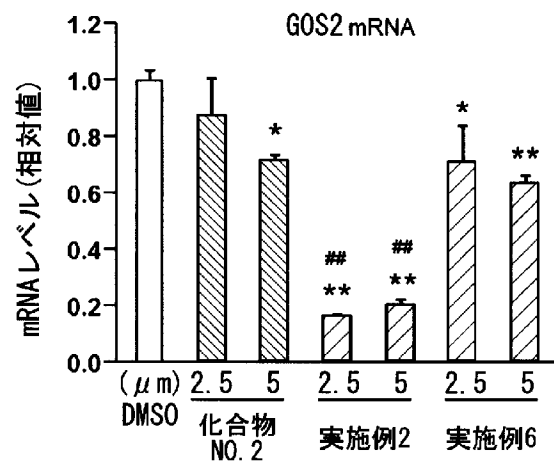
[図13B]



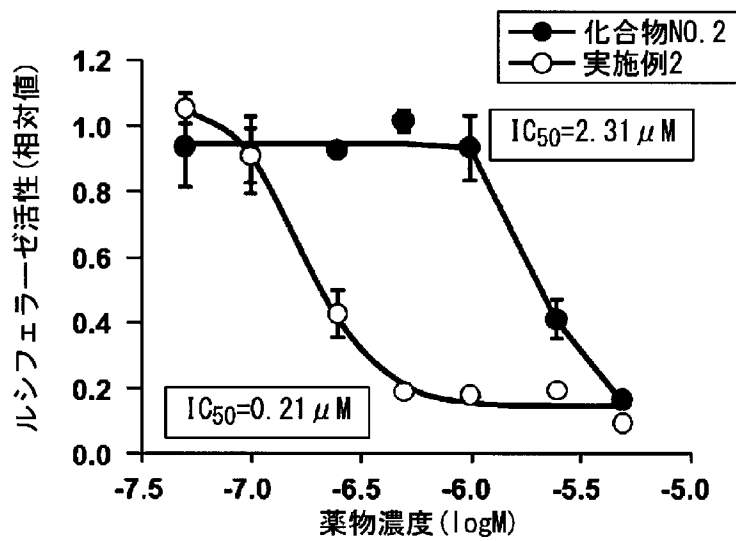
[図13C]



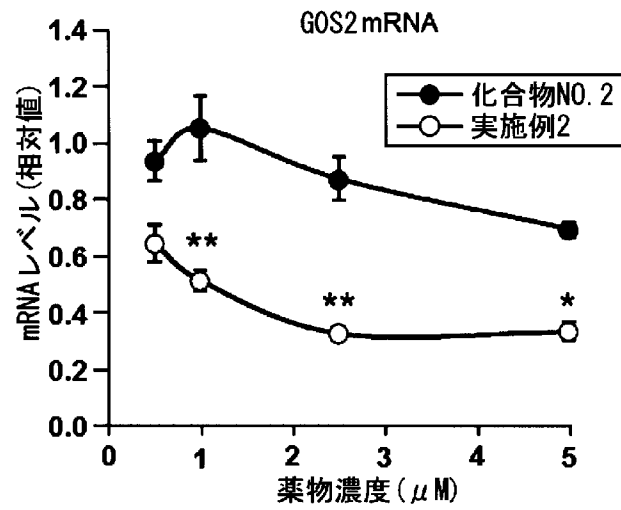
[図13D]



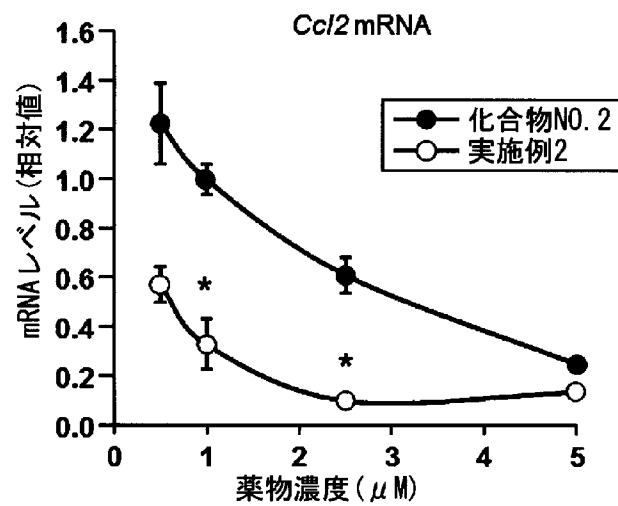
[図14A]



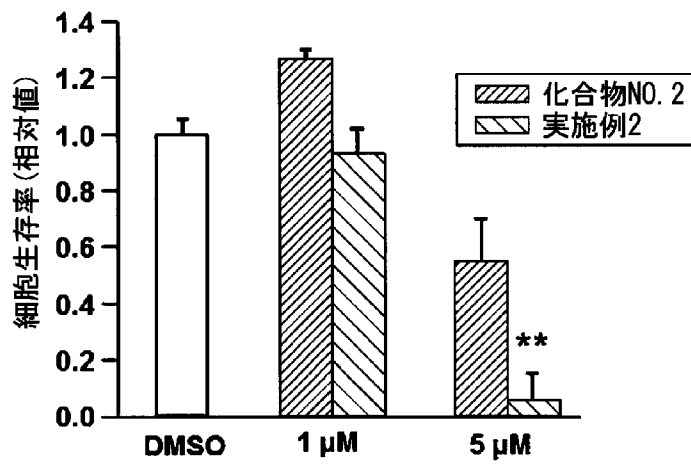
[図14B]



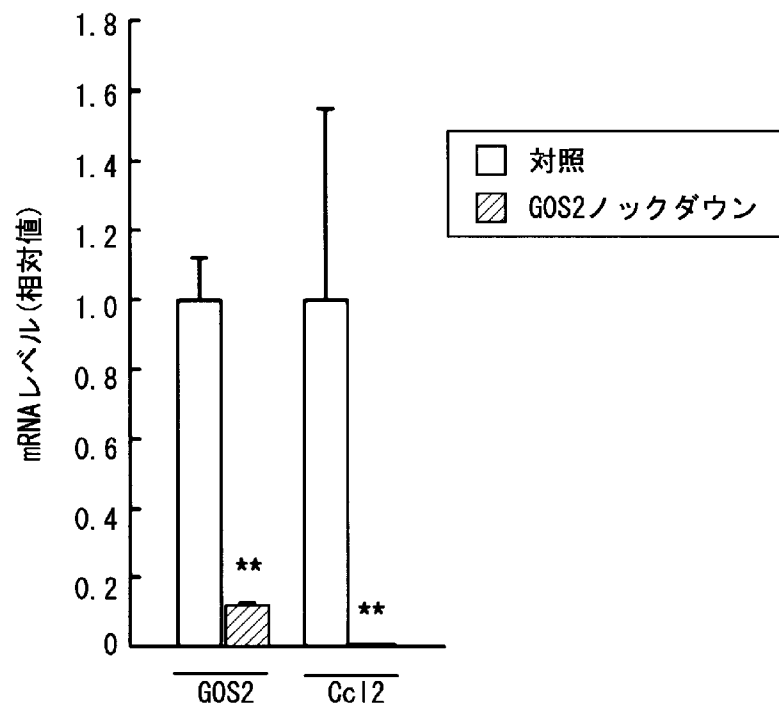
[図14C]



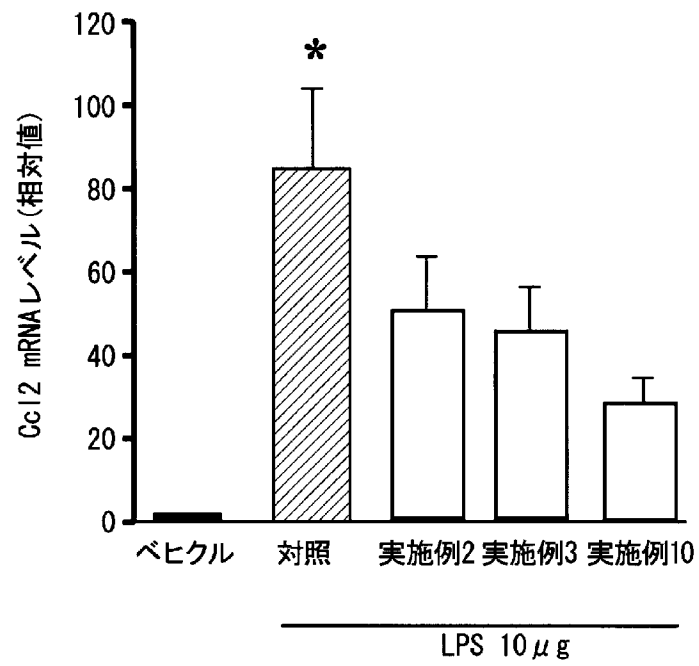
[図14D]



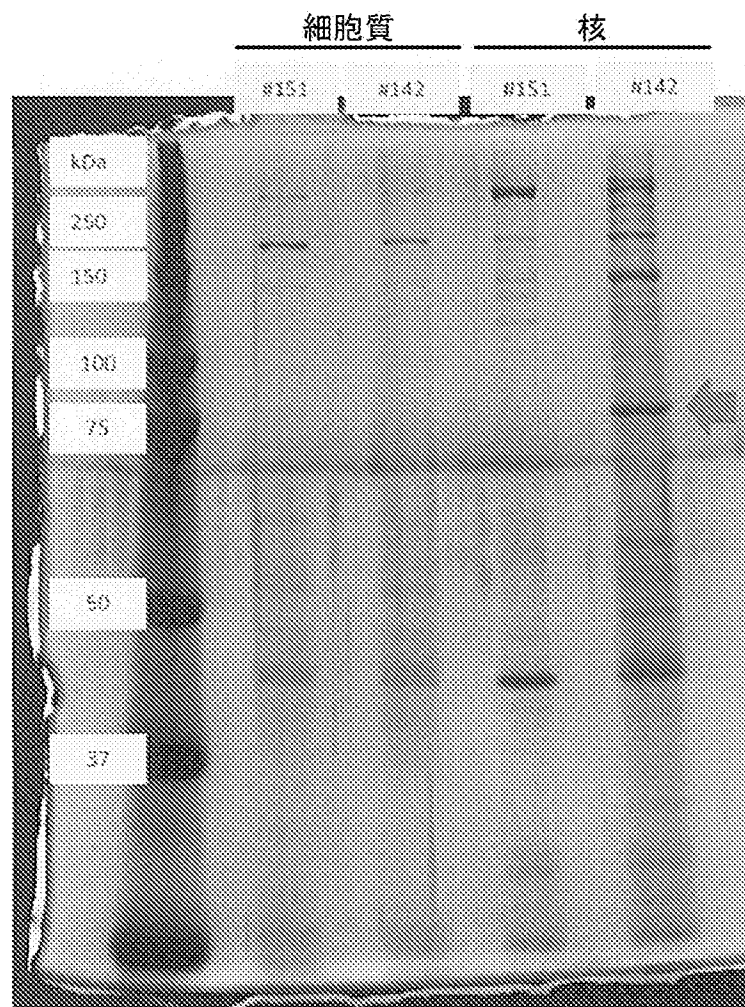
[図15]



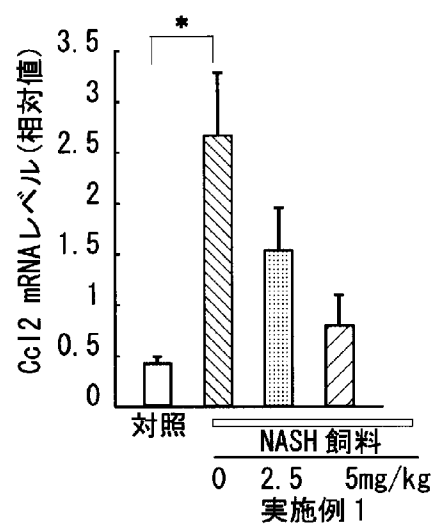
[図16]



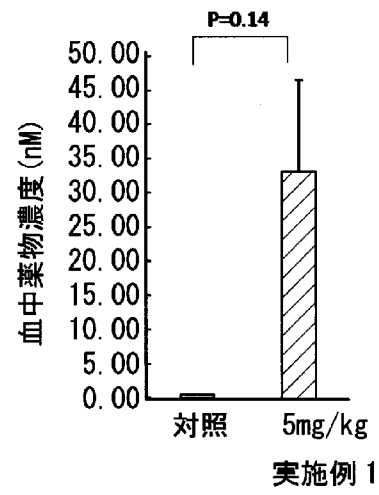
[図17]



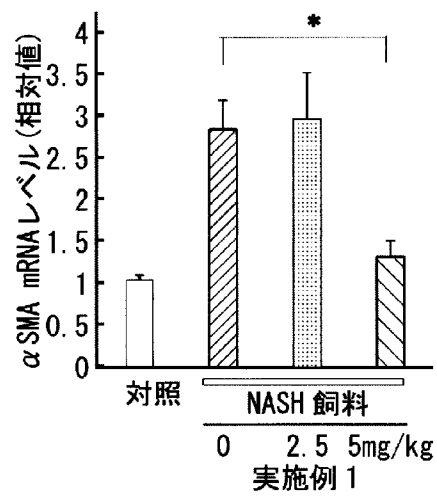
[図18A]



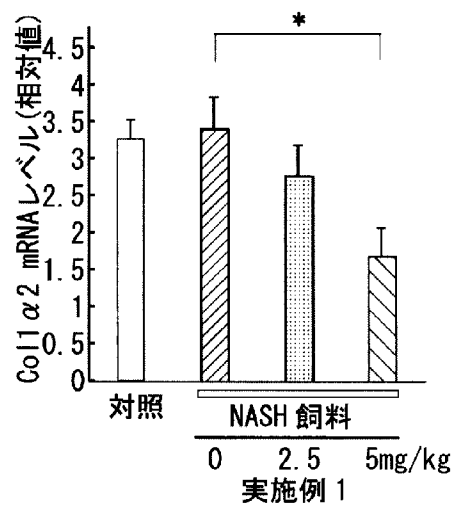
[図18B]



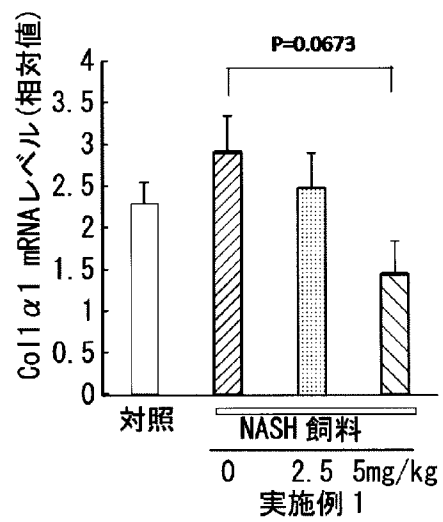
[図18C]



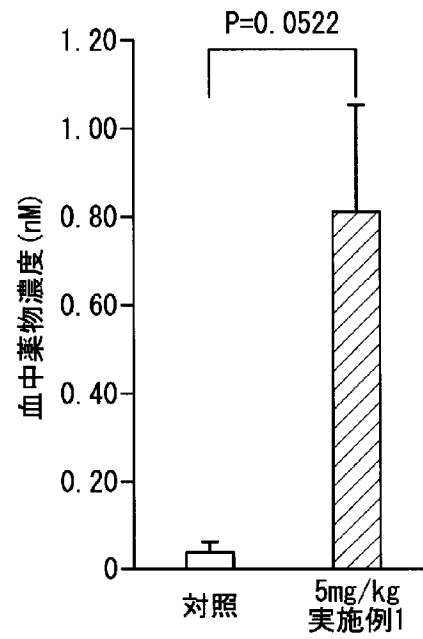
[図18D]



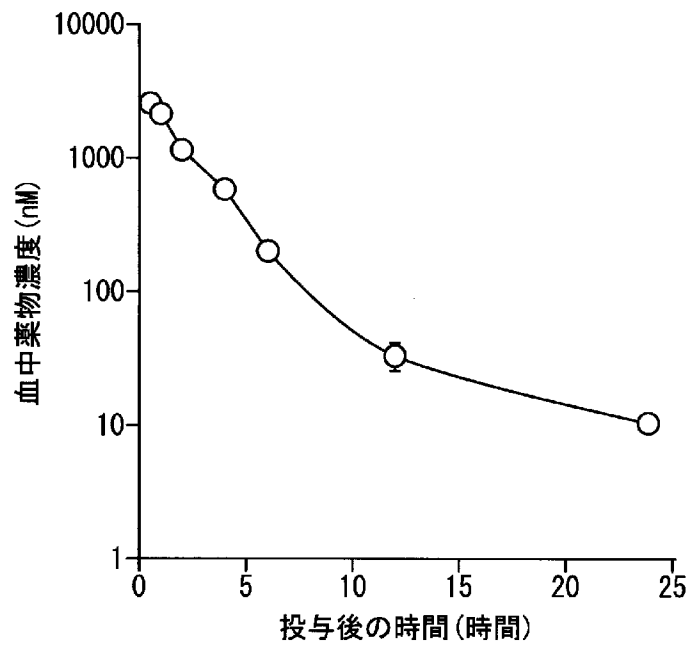
[図18E]



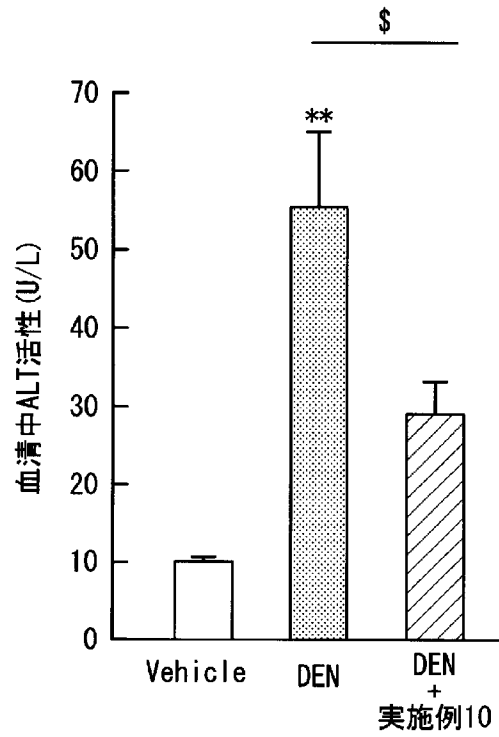
[図19]



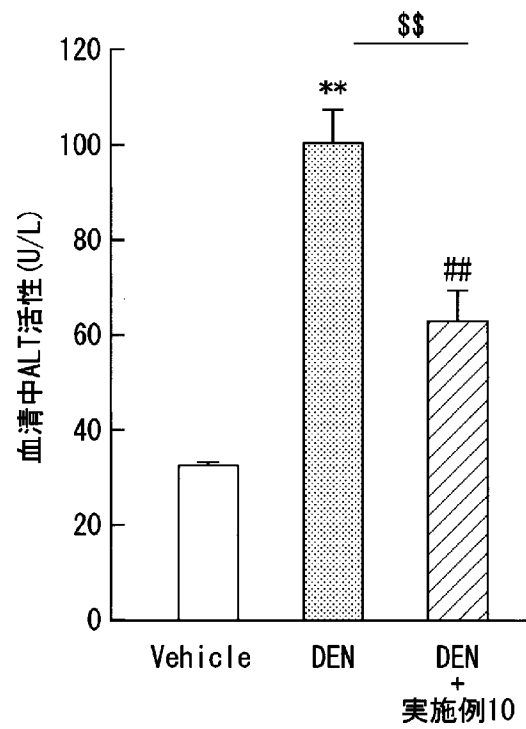
[図20]



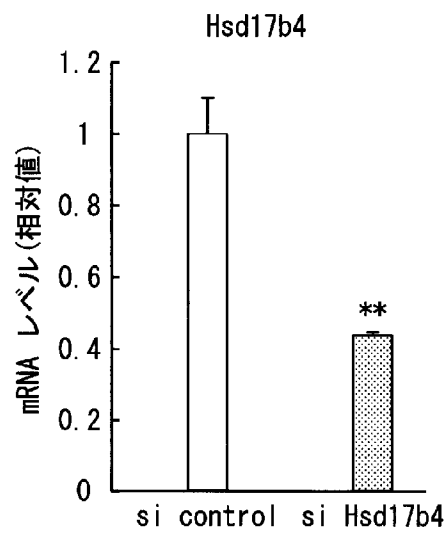
[図21A]



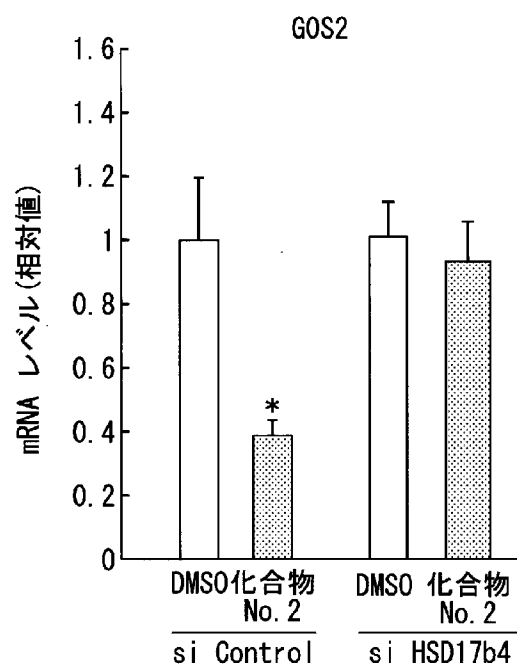
[図21B]



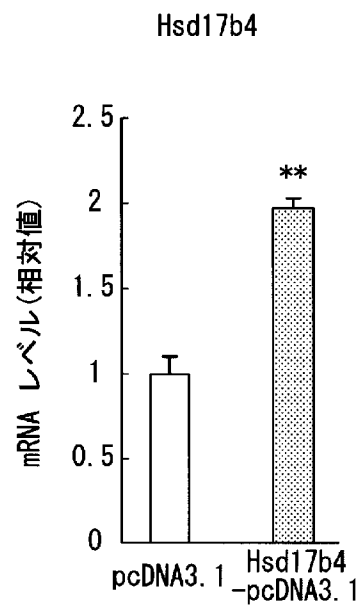
[図22A]



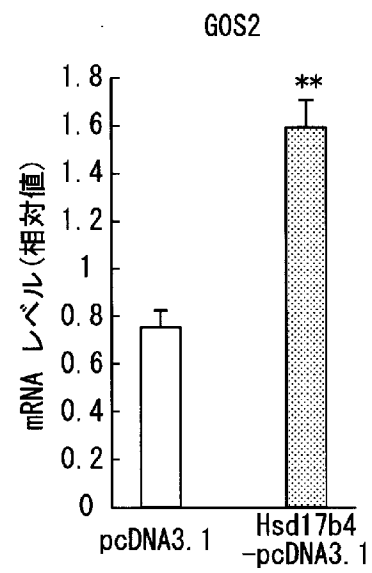
[図22B]



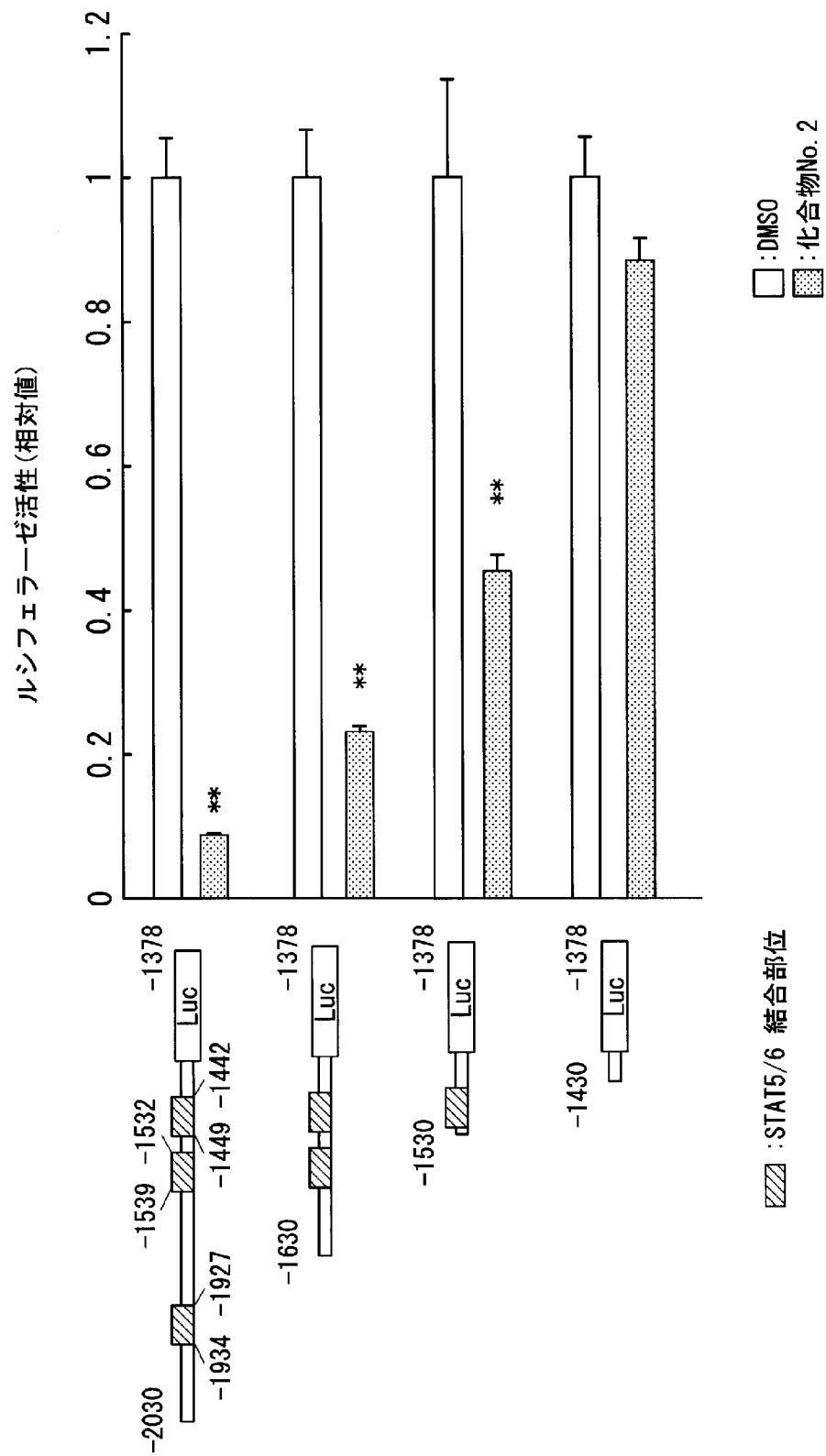
[図23A]



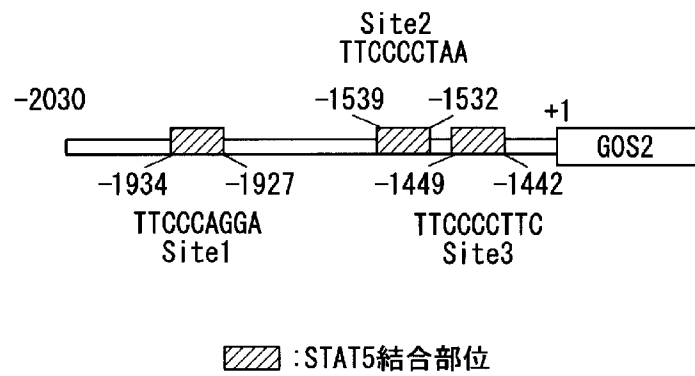
[図23B]



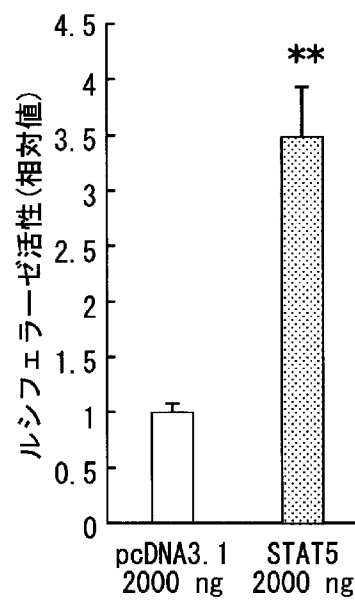
[図24]



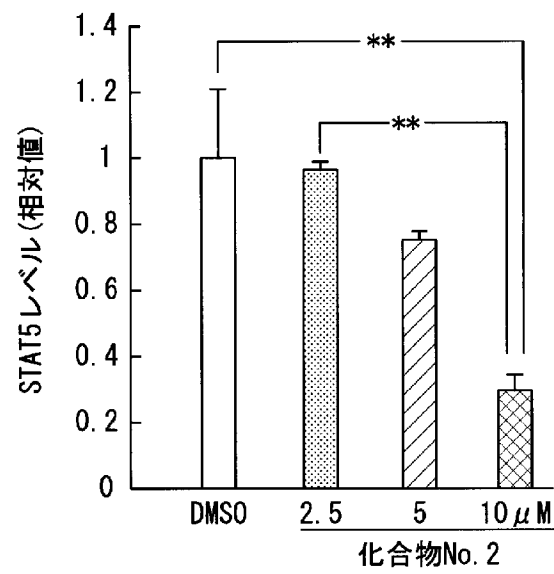
[図25A]



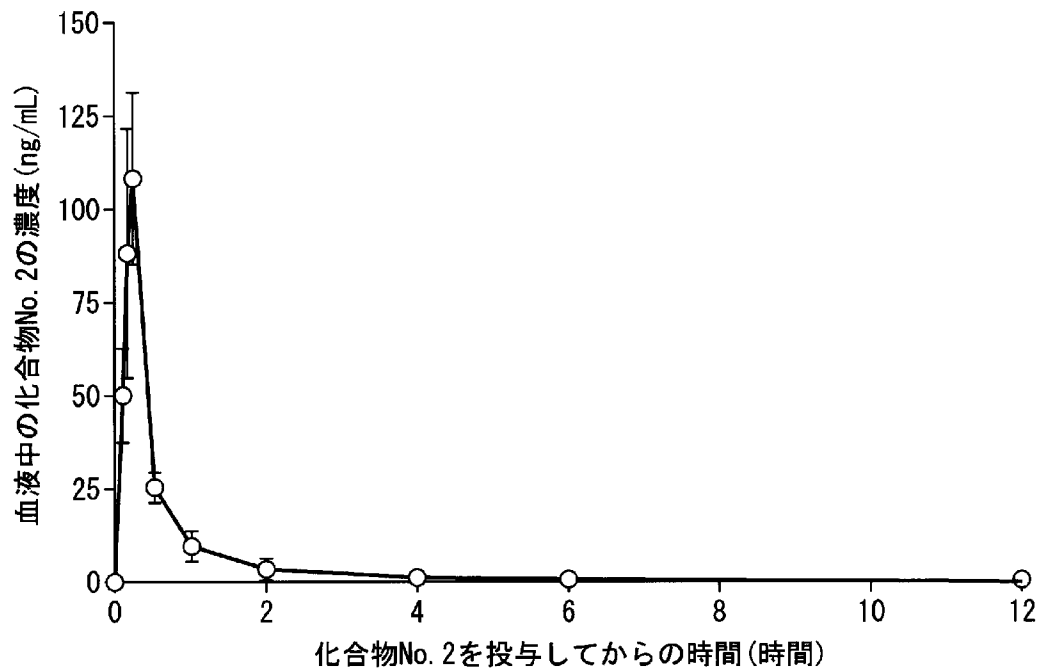
[図25B]



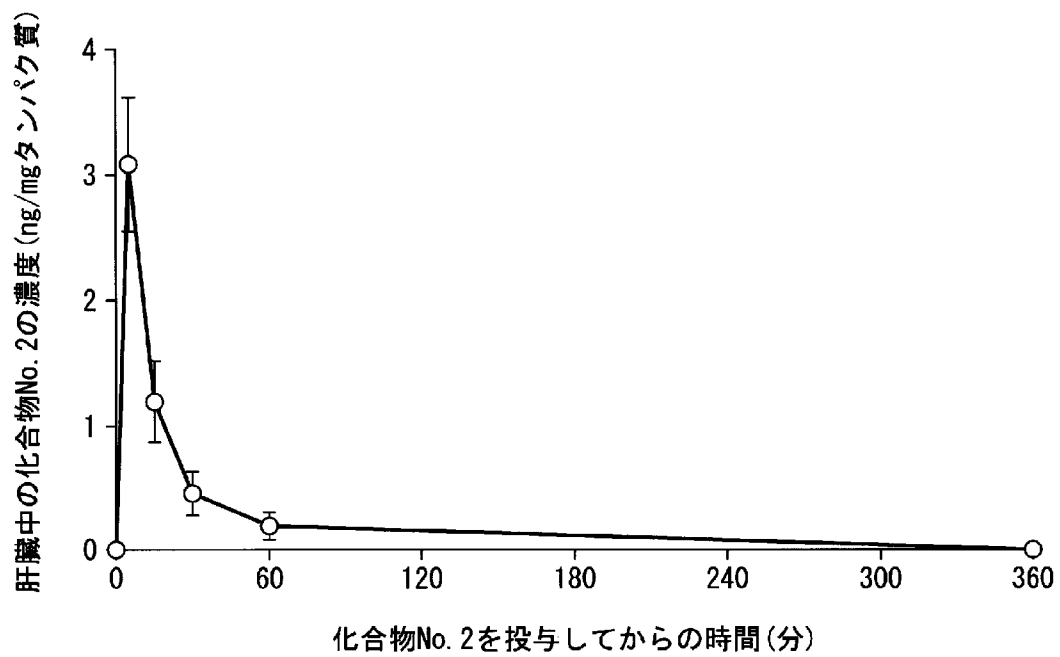
[図26]



[図27A]

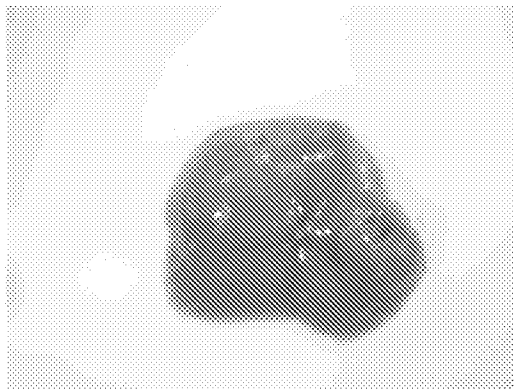


[図27B]



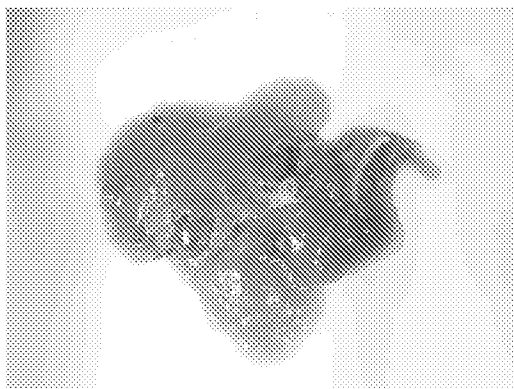
[図28A]

Vehicle



[図28B]

DEN



[図28C]

DEN+ 実施例 10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/052470

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet.

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)

A61K45/00, A61K31/155, A61K31/7105, A61K31/713, A61K48/00, A61P1/16, A61P29/00, A61P35/00, A61P43/00, C07C279/04, C07C279/16, C07C279/18, C12N15/113, C12Q1/68

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	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII),
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Cristillo, A.D. et al., Cyclosporin A inhibits early mRNA expression of G0/G1 switch gene 2 (GOS2) in cultured human blood mononuclear cells, DNA Cell Biol. 1997, vol.16, no.12, p.1449-58, particularly, Abstract	1-3, 6, 7
X	Edited by Chikako TANAKA et al., 'NEW Yakurigaku', Nankodo Co., Ltd., 1997, pages 467 to 469, particularly, page 468	1
X	Xin Lu et al, NF-κB increased expression of 17β-hydroxysteroid dehydrogenase 4 promotes HepG2 proliferation via inactivating estradiol, Mol. Cell Endocrinol., 2015, vol.401, p.1-11, particularly, Abstract	1-3, 6, 8

☒ 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
05 April 2016 (05.04.16)

Date of mailing of the international search report
26 April 2016 (26.04.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/052470

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 2014-530813 A (Universidad Nacional de Quilmes), 20 November 2014 (20.11.2014), particularly, claim 12; page 8, lines 18 to 21 & WO 2013/053726 A1 claim 12; page 13, lines 21 to 24 & US 2014/0228388 A1 & EP 2766342 A1	1, 4-6, 9
X	JP 6-506455 A (Cambridge Neuroscience, Inc.), 21 July 1994 (21.07.1994), particularly, table 1 & US 5403861 A table I & WO 92/14697 A1 & EP 0584088 A4	9
X	JP 9-255589 A (Shiseido Co., Ltd.), 30 September 1997 (30.09.1997), particularly, claims (Family: none)	9
X	JP 2000-515895 A (Cambridge Neuroscience, Inc.), 28 November 2000 (28.11.2000), particularly, page 7, lines 24, 25 & WO 98/04131 A1 page 68, lines 24, 25 & US 2003/0027801 A1 & EP 0918460 A1	9
X	WO 99/02145 A1 (Cambridge Neuroscience, Inc.), 21 January 1999 (21.01.1999), page 8, lines 17, 18, 25, 26 & AU 8278498 A	9
X	Chen, Chun-Yen et al., One-flask' transformation of isocyanates and isothiocyanates to guanidines hydrochloride by using sodium bis(trimethylsilyl)amide, Tetrahedron, 2010, vol.66, no.10, p.1892-7, particularly, p.1894,1895	9
X	Boguszewski, Paul A. et al., Modular Three- Component Solid-Phase Synthesis of Unsymmetrical Guanidines via Resin Capture of Carbodiimides, Journal of Combinatorial Chemistry, 2004, vol.6, no.1, p.32-4, particularly, Table 1	9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/052470

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Goessnitzer, Edith et al., Novel high energy intermediate analogues with a triazasterol structure as potential ergosterol biosynthesis inhibitors IV: Antimicrobial activity of mono-, bi-, and tricyclic 8,13,15-triazasteroid analogues including the synthesis of novel 4-alkylamino- and 4-alkenylamino-9-hydroxypyrimidoisoquinolines, Archiv der Pharmazie, 2003, vol.336, no.6-7, p.336-44, particularly, Table 2	9
X	Goessnitzer, Edith et al., Novel high energy intermediate analogs with triazasterol-related structures as inhibitors of ergosterol biosynthesis. Part I: Synthesis and antifungal activity of N-alkyl-N'-(phenethyl- and cyclohexenylethyl)guanidines and N2-substituted 2-imidazolinamines, Archiv der Pharmazie, 2002, vol.335, no.11-12, p. 535-46, particularly, Scheme 1	9
X	McKay, A. F. et al., Bacteriostats. VI. Bacteriostatic activities of some substituted guanidines, Journal of Medicinal Chemistry, 1963, vol. 6, no.5, p.587-95, particularly, Table III	9
X	FR 2147881 A1 (All-Union Scientific-Research Institute of Chemicals for Plant Protection), 16 March 1973 (16.03.1973), particularly, table 8 (Family: none)	9
X	US 3109859 A (Monsanto Canada Ltd.), 05 November 1963 (05.11.1963), particularly, examples XI to XIV & GB 944021 A	9
X	Neidlein, Richard et al., N-Acylcarbodiimides, Archiv der Pharmazie, 1966, vol.299, no.8, p.709-14, particularly, Table 1	9
X	O'Donovan, Daniel H. et al., A concise synthesis of asymmetrical N,N'-disubstituted guanidines, Tetrahedron Letters, 2011, vol.52, no.32, p.4117-9, particularly, Table 1	9
X	Ma, Dawei et al., Aromatic Nucleophilic Substitution or CuI-Catalyzed Coupling Route to Martinelllic Acid, Journal of Organic Chemistry, 2003, vol.68, no.2, p.442-51, particularly, Table 1	9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/052470

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Linton, Brian R. et al., A Versatile One-Pot Synthesis of 1,3-Substituted Guanidines from Carbamoyl Isothiocyanates, Journal of Organic Chemistry, 2000, vol. 65, no.5, p.1566-8, particularly, Table 2	9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/052470

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(International Patent Classification (IPC))

A61K45/00(2006.01)i, A61K31/155(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i,
A61K31/713(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i,
A61P29/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i,
C07C279/04(2006.01)i, C07C279/16(2006.01)i, C07C279/18(2006.01)i,
C12N15/113(2010.01)i, C12Q1/68(2006.01)n

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

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. 特別ページ参照

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. A61K45/00, A61K31/155, A61K31/7105, A61K31/713, A61K48/00, A61P1/16, A61P29/00, A61P35/00, A61P43/00, C07C279/04, C07C279/16, C07C279/18, C12N15/113, C12Q1/68

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	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	Cristillo, A.D. et al., Cyclosporin A inhibits early mRNA expression of G0/G1 switch gene 2 (GOS2) in cultured human blood mononuclear cells, DNA Cell Biol. 1997, vol.16, no.12, p.1449-58, 特に、Abstract	1-3, 6, 7
X	田中千賀子他編, 「NEW 薬理学」, 株式会社南江堂, 1997, p.467-9, 特に、p.468	1

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ 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

の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

05.04.2016

国際調査報告の発送日

26.04.2016

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)

平林 由利子

4 B

3634

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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
X	Xin Lu et al, NF- κ B increased expression of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 4 promotes HepG2 proliferation via inactivating estradiol, Mol. Cell Endocrinol., 2015, vol.401, p.1-11, 特に、Abstract	1-3, 6, 8
X	JP 2014-530813 A (ユニベルシダッド ナショナル デ キルメス) 2014.11.20, 特に、請求項12、p.8, l.18-21 & WO 2013/053726 A1 (Claim 12, p.13, l.21-24) & US 2014/0228388 A1 & EP 2766342 A1	1, 4-6, 9
X	JP 6-506455 A (ケンブリッジ・ニューロサイエンス・インコーポレイテッド) 1994.07.21, 特に、表1 & US 5403861 A (Table I) & WO 92/14697 A1 & EP 0584088 A4	9
X	JP 9-255589 A (株式会社資生堂) 1997.09.30, 特に、特許請求の範囲 (ファミリーなし)	9
X	JP 2000-515895 A (ケンブリッジ ニューロサイエンス インク.) 2000.11.28, 特に、p.7, l.24, 25 & WO 98/04131 A1 (p.68, l.24, 25) & US 2003/0027801 A1 & EP 0918460 A1	9
X	WO 99/02145 A1 (CAMBRIDGE NEUROSCIENCE, INC.) 1999.01.21, p.8, l.17, 18, 25, 26 & AU 8278498 A	9
X	Chen, Chun-Yen et al., One-flask' transformation of isocyanates and isothiocyanates to guanidines hydrochloride by using sodium bis(trimethylsilyl)amide, Tetrahedron, 2010, vol.66, no.10, p.1892-7, 特に、p.1894, 1895	9
X	Boguszewski, Paul A. et al., Modular Three-Component Solid-Phase Synthesis of Unsymmetrical Guanidines via Resin Capture of Carbodiimides, Journal of Combinatorial Chemistry, 2004, vol.6, no.1, p.32-4, 特に、Table 1	9
X	Goessnitzer, Edith et al., Novel high energy intermediate analogues with a triazasterol structure as potential ergosterol biosynthesis inhibitors IV: Antimicrobial activity of mono-, bi-, and tricyclic 8,13,15-triazasteroid analogues including the synthesis of novel 4-alkylamino- and 4-alkenylamino-9-hydroxypyrimidoisoquinolines, Archiv der Pharmazie, 2003, vol.336, no.6-7, p.336-44, 特に、Table 2	9

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
X	Goessnitzer, Edith et al., Novel high energy intermediate analogs with triazasterol-related structures as inhibitors of ergosterol biosynthesis. Part I: Synthesis and antifungal activity of N-alkyl-N'-(phenethyl- and cyclohexenylethyl)guanidines and N2-substituted 2-imidazolinamines, Archiv der Pharmazie, 2002, vol.335, no.11-12, p. 535-46, 特に、Scheme 1	9
X	McKay, A. F. et al., Bacteriostats. VI. Bacteriostatic activities of some substituted guanidines, Journal of Medicinal Chemistry, 1963, vol. 6, no.5, p.587-95, 特に、Table III	9
X	FR 2147881 A1 (All-Union Scientific-Research Institute of Chemicals for Plant Protection) 1973.03.16, 特に、Table 8 (ファミリーなし)	9
X	US 3109859 A (Monsanto Canada Ltd.) 1963.11.05, 特に、Example XI-XIV & GB 944021 A	9
X	Neidlein, Richard et al., N-Acylcarbodiimides, Archiv der Pharmazie, 1966, vol.299, no.8, p.709-14, 特に、Table 1	9
X	O'Donovan, Daniel H. et al., A concise synthesis of asymmetrical N,N'-disubstituted guanidines, Tetrahedron Letters, 2011, vol.52, no.32, p.4117-9, 特に、Table 1	9
X	Ma, Dawei et al., Aromatic Nucleophilic Substitution or CuI-Catalyzed Coupling Route to Martinelllic Acid, Journal of Organic Chemistry, 2003, vol.68, no.2, p.442-51, 特に、Table 1	9
X	Linton, Brian R. et al., A Versatile One-Pot Synthesis of 1,3-Substituted Guanidines from Carbamoyl Isothiocyanates, Journal of Organic Chemistry, 2000, vol. 65, no.5, p.1566-8, 特に、Table 2	9

発明の属する分野の分類

A61K45/00(2006.01)i, A61K31/155(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i,
A61K31/713(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i,
A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07C279/04(2006.01)i,
C07C279/16(2006.01)i, C07C279/18(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)i, C12Q1/68(2006.01)n