(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2010-222289
(P2010-222289A)
(43)公開日　平成22年10月7日(2010.10.7)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 31/7105	(2006.01)	A61K	31/7105	4B024
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	45/00	4C084
A61P 9/00	(2006.01)	A61P	9/00	4C086
A61P 9/10	(2006.01)	A61P	9/10	
A61P 43/00	(2006.01)	A61P	43/00　111	

審査請求 未請求　請求項の数 8　ＯＬ　（全 7 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2009-70529(P2009-70529)
(22)出願日　平成21年3月23日(2009.3.23)

(71)出願人　591063394
財団法人　東京都医学研究機構
東京都世田谷区上北沢２－１－６
(74)代理人　110000176
一色国際特許業務法人
(72)発明者　芝崎　太
東京都板橋区成増３－４０－３　シーズガーデン成増８０２号
(72)発明者　陳　リー
東京都江東区青海２－７９　東京国際交流館Ｃ棟７０１室

Ｆターム(参考)　4B024 AA01 CA04 CA11 GA11 HA17
4C084 AA13 AA19 NA14 ZA36 ZB21
4C086 AA01 AA02 EA16 MA04 NA14
ZA36 ZB21

(54)【発明の名称】細胞死を予防するための医薬剤

(57)【要約】
【課題】細胞死を予防するための医薬剤を提供すること。
【解決手段】患部においてＩｎｔ６タンパク質の機能を抑制することにより、細胞死の発生を予防することができるので、Ｉｎｔ６タンパク質の機能抑制物質を含有する医薬剤を作製し、細胞死を予防するための医薬剤とする。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
細胞死を予防するための医薬剤であって、
Ｉｎｔ６タンパク質の機能抑制物質を含有することを特徴とする医薬剤。
【請求項２】
請求項１に記載の医薬剤であって、
前記機能抑制物質が発現抑制物質であることを特徴とする医薬剤。
【請求項３】
請求項２に記載の医薬剤であって、
前記発現抑制物質がＩｎｔ６遺伝子に対するｓｉＲＮＡであることを特徴とする医薬剤。
【請求項４】
請求項１～３に記載の医薬剤であって、
前記細胞死が血管障害により引き起こされることを特徴とする医薬剤。
【請求項５】
請求項１～４に記載の医薬剤であって、
脳梗塞または心筋梗塞の治療薬であることを特徴とする医薬剤。
【請求項６】
請求項１～５に記載の医薬剤であって、
前記細胞死が起こる前に投与されることを特徴とする医薬剤。
【請求項７】
請求項４または５に記載の医薬剤であって、
前記血管障害の発生から６時間以内に投与されることを特徴とする医薬剤。
【請求項８】
請求項７に記載の医薬剤であって、
前記血管障害の発生から３時間以内に投与されることを特徴とする医薬剤。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は細胞死を予防するための医薬剤に関する。
【背景技術】
【０００２】
細胞死は、神経変性疾患、虚血障害、炎症性疾患など、様々な疾病と深く関わっている。中でも、細胞死が主な病理学的現象である脳梗塞や心筋梗塞は、重篤な疾病であり、世界でも主な死因の一つである（非特許文献１）。脳組織や心臓組織の細胞は一度死滅すると再生しないため、患者はたとえ死に至らなくても、重い後遺症を患うことが多い。例えば、脳梗塞の場合には運動障害、記憶障害、感情障害等、心筋梗塞の場合には心臓ポンプ機能低下、不整脈等の後遺症が残ることがある。
【０００３】
脳梗塞や心筋梗塞は、その症状の発生から短時間（この期間は急性期と呼ばれている）に、血管障害が原因で生じる細胞死の予防策を講じることができれば、病状の進行を抑制することができ、結果として患者の生存率上昇や梗塞の後遺症の軽減が可能となることが知られている。
【０００４】
現在、脳梗塞や心筋梗塞の原因である血管障害の外科的治療として、血管内にカテーテルを挿入して膨らませることによって詰まった血管を拡張し、再開通する方法（風船療法）が用いられている。この風船療法を実施するためには心臓カテーテル室などの特別な施設が必要である。また、内科的治療としては、血栓溶解薬（組織型プラスミノゲン・アクティベータ（アルテプラーゼ）等）を投与することによって、血管に詰まった血栓を溶かす方法（血栓溶解療法）（例えば、特許文献１、非特許文献２）も一般に用いられている

が、副作用として、脳出血を起こす危険性が指摘されている。
【特許文献１】特開２００８－２３０９６８公報
【非特許文献１】Suwanwela N, Koroshets WJ. Acute ischemic stroke: overview of recent therapeutic developments. Annual Review of Medicine 58: 89-106 (2007)
【非特許文献２】Fisher M, Bastan B. Treating acute ischemic stroke. Current Opinion in Drug Discovery and Development 11: 626-625 (2008)
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００５】
本発明は、細胞死を予防するための医薬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】
【０００６】
本発明者らは、心筋梗塞モデルマウスに、Ｉｎｔ６遺伝子に対するｓｉＲＮＡを投与し、Ｉｎｔ６タンパク質の発現を抑制すると、心筋梗塞の進行が抑制されることを見出し、本発明を完成するに至った。
【０００７】
なお、本明細書で「細胞死」とは、ヒトやヒト以外の哺乳動物における、「アポトーシス」と「壊死」の両方を含んでいる。また、「細胞死を予防する」とは、ある特定の細胞が細胞死を起こすことを予め防止することだけではなく、ある細胞集団において、細胞死が進行していくのを予め防止することも意味する。
【０００８】
本発明に係る医薬剤は、細胞死を予防するための医薬剤であって、Ｉｎｔ６タンパク質の機能抑制物質を含有することを特徴とする。ここで、この機能抑制物質は、Ｉｎｔ６タンパク質の発現抑制物質であってもよく、その発現抑制物質は、Ｉｎｔ６遺伝子に対するｓｉＲＮＡであってもよい。
【０００９】
ここで、細胞死は、血管障害によって引き起こされたものであってもよい。
【００１０】
また、本発明に係る医薬剤は、脳梗塞または心筋梗塞の治療薬であってもよい。
【００１１】
さらに、本発明に係る医薬剤は、細胞死が起こる前に投与されてもよく、血管障害の発生から６時間以内に投与開始されてもよく、血管障害の発生から３時間以内に投与開始されてもよい。
【発明の効果】
【００１２】
本発明により、細胞死を予防するための医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】
【００１３】
以下、上記知見に基づき完成した本発明の実施の形態を、実施例を挙げながら詳細に説明する。
【００１４】
実施の形態及び実施例に特に説明がない場合には、J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (Ed.), Molecular cloning, a laboratory manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2001); F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J.G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl (Ed.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Ltd.等の標準的なプロトコール集に記載の方法、あるいはそれを修飾したり、改変した方法を用いる。また、市販の試薬キットや測定装置を用いる場合には、特に説明が無い場合、それらに添付のプロトコールを用いる。
【００１５】

なお、本発明の目的、特徴、利点、及びそのアイデアは、本明細書の記載により、当業者には明らかであり、本明細書の記載から、当業者であれば、容易に本発明を再現できる。以下に記載された発明の実施の形態及び具体的な実施例等は、本発明の好ましい実施態様を示すものであり、例示又は説明のために示されているのであって、本発明をそれらに限定するものではない。本明細書で開示されている本発明の意図ならびに範囲内で、本明細書の記載に基づき、様々に修飾ができることは、当業者にとって明らかである。

【００１６】

本発明に係る、細胞死を予防するための医薬剤（以下、細胞死予防剤ともいう）は、投与対象である動物が有するＩｎｔ６タンパク質の機能抑制物質を含有することを特徴とする。

【００１７】

細胞死予防剤の投与対象となる動物に制限はないが、投与対象は、ヒトまたはヒト以外の脊椎動物であることが好ましく、ヒトであることがより好ましい。

【００１８】

ここでＩｎｔ６タンパク質とは、配列番号１に示されるヒトＩｎｔ６及びそのホモログ（オーソログを含む）を意味する。ホモログの由来する動物種は特に制限されず、ヒト以外の脊椎動物、例えば、マウス、ラット、チンパンジー、イヌ等であっても、ニワトリ等の鳥類やアフリカツメガエル等の両生類であってもよい。ここで、ホモログとヒトＩｎｔ６タンパク質との間のアミノ酸配列の相同性は、ホモログの由来する動物種によって異なるが、通常５０％以上、好ましくは８０％以上、より好ましくは９０％以上、最も好ましくは９５％以上であり、ホモログとＩｎｔ６タンパク質は、同様の機能を共有する場合もある。また、本発明に係るＩｎｔ６遺伝子は、ここに記載したＩｎｔ６タンパク質をコードする遺伝子であれば制限されない。

【００１９】

Ｉｎｔ６タンパク質の機能抑制物質は、投与対象の有するＩｎｔ６タンパク質の機能を細胞全体として低下させる物質であれば制限はなく、タンパク質自体の機能を抑制する低分子化合物やＩｎｔ６ΔＣ（Ｃ末端側１１９、１８５、または２９５アミノ酸が欠損したＩｎｔ６変異タンパク）（Chen et al., Journal of Biological Chemistry 282:12707-16, 2007を参照のこと）等のドミナントネガティブ型タンパク質変異体などであってもよい。あるいは、タンパク質の発現を抑制することによって結果的にＩｎｔ６タンパク質の機能を抑制する物質であってもよく、Ｉｎｔ６タンパク質の機能を完全に失わせる物質、特にＩｎｔ６タンパク質の発現を抑制する物質であることが好ましい。この発現抑制物質は、Ｉｎｔ６タンパク質の発現を抑制することができる物質であれば制限はなく、Ｉｎｔ６遺伝子の転写産物あるいはその一部に対するアンチセンス核酸、Ｉｎｔ６遺伝子の転写産物に対するリボザイム活性を持った核酸、Ｉｎｔ６遺伝子に対するｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｍｉＲＮＡなどが例示できる。これらの核酸を使用する方法は当業者の技術常識であり、そのための核酸も、当業者は容易に設計できる。

【００２０】

これらの核酸は、化学合成し、そのまま剤形化して用いることができるが、ＲＮＡの場合、そのＲＮＡを発現するように好適な発現ベクターを作製し、剤形化した後、患者等の投与対象に投与することによって、その体内でＲＮＡを発現させてもよい。

【００２１】

細胞死予防剤の予防対象となる細胞死は、それが起きる組織やその原因には制限がないが、血管障害によって引き起こされる細胞死であることが好ましい。また、脳梗塞または心筋梗塞の際に生じる細胞死であることがより好ましい。

【００２２】

細胞死予防剤の剤形化には、当業者に周知の薬学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤等の製剤用添加物が用いられる。その形態は本医薬剤を患者体内の患部に送達するために適切な剤形であれば特に特定されず、例えば、経口剤として、錠剤、カプセル、顆粒、散剤、シロップ、腸溶剤、徐放性カプセル、カシュー、咀嚼錠、ドロップ、丸剤、内用液剤

、菓子錠剤、徐放錠、徐放性顆粒等に剤形化してもよい。また、注射剤に剤形化してもよい。本医薬剤には、上記製剤用添加物の他、異なる医薬組成物を配合することもできる。

【００２３】

細胞死予防剤は、安全とされている投与量の範囲内において、ヒトを含む哺乳動物に対し、必要量を、適した方法で投与することができる。本発明の薬剤の投与量は、剤形の種類、投与方法、患者の年齢や体重、患者の症状等を考慮して、最終的には医師または獣医師の判断により適宜決定することができる。投与方法は、その剤形の医薬剤を患部に送達するために適した方法を用いればよいが、非経口投与が好ましく、例えば、患部組織に局部的に注射または塗付したり、あるいは、静脈注射、皮下注射、筋肉注射、腹腔内注射等により全身投与したりすることができる。

【００２４】

細胞死予防剤は、投与対象の動物内で、予防対象の細胞死が起こる前に投与することが好ましい。ここで、「投与する」とは、予防に対する有効量を投与し終えることを言う。また、「予防対象の細胞死が起こる前」とは、患者組織に細胞死が全く生じていない状態に加え、組織の一部が既に細胞死を起こした状態も含む。後者の場合、既に死した細胞周辺の健康な細胞に、細胞死が広がることを予防することによって、組織単位で細胞死の進行を抑制することができる。細胞死が血管障害により引き起こされる場合、本発明に係る医薬剤は、その血管障害の急性期に投与されることが好ましく、例えば、血管障害発生から６時間以内に投与が開始されることがより好ましく、３時間以内に投与が開始されることがさらに好ましい。

【実施例】

【００２５】

本実施例では、Ｉｎｔ６遺伝子に対するｓｉＲＮＡを用いてＩｎｔ６タンパク質の発現を抑制することによって、梗塞発生が予防され、心筋梗塞の症状進行が抑制されることを示す。

【００２６】

＝＝Ｉｎｔ６遺伝子に対するｓｉＲＮＡ導入発現ベクターの作製＝＝

以下に示す塩基配列を持ったＩｎｔ６に対するｓｉＲＮＡおよび陰性対照用ｓｉＲＮＡ合成は、Silencer siRNA construction kit（Ambion社）を用い、マウスのゲノム ＤＮＡを鋳型とした下記プライマーを用いたＰＣＲによって調製した。ここで得られた各siRNAをpSilencer 1.0-U6ベクター（Ambion社）に挿入し、それぞれ、マウス、のＩｎｔ６遺伝子に対するｓｉＲＮＡを有する発現ベクター(マウス-siRNA-Int6ベクター)、および陰性対照ｓｉＲＮＡベクターを作製した。

マウスsiRNA-Int6: AAGAACCACAGTTGTTGCG(配列番号１)

陰性対照siRNA: GTACCGCACGTCATTCGTA(配列番号２)

用いたプライマー：

マウスsiRNA-Int6:

５′-プライマー(配列番号３):

AAGAACCACAGTTGTTGCGTTCAAGAGACGCAACAACTGTGGTTCTTTTTTTT

３′-プライマー(配列番号４)：

AATTAAAAAAAAGAACCACAGTTGTTGCGTCTCTTGAACGCAACAACTGTGGTTCTTGGCC

陰性対照siRNA:

５′-プライマー(配列番号５):

GTACCGCACGTCATTCGTATTCAAGAGATACGAATGACGTGCGGTACTTTTTT

３′-プライマー(配列番号６):

AATTAAAAAAGTACCGCACGTCATTCGTATCTCTTGAATACGAATGACGTGCGGTACGGCC

【００２７】

＝＝Int6-siRNAによるマウス心筋梗塞の抑制＝＝

マウス（C57B6、８週令、雄、体重２５ｇ前後）を酸素５０％＋笑気ガス５０％＋イソフルレ４％による麻酔の後に挿管し、酸素５０％＋笑気ガス５０％＋イソフルレ２％で人

工呼吸（１回換気量０．７ｍｌ、換気回数１２０回）を行った。この全身麻酔下で左肋間（５－６肋間）を開胸し、前下行枝冠動脈を結紮することにより心臓血管障害を誘発した。この心臓血管障害によって血流のなくなった組織において、通常心筋梗塞が引き起こされた。

【００２８】

上記のように作製した各ベクターを、１０μｇ/μｌの濃度で生理食塩水に溶解した。上記のように血管障害を誘発したマウスの心臓の血管を結紮した部位より末梢の心筋に２００μｇのsiRNA-Int6ベクターあるいは陰性対照ベクターの溶液を投与した。その後、胸部を縫合し、マウスが回復した後飼育を続けた。

【００２９】

上記手術から２週間後、マウスから心臓を摘出し、凍結保存後、凍結切片を作製した。この切片をポリリジンコーティングスライドグラス（松浪硝子工業株式会社）にマウントし、３％ホルマリンで固定した後、ヘマトキシリン－エオシン染色法で染色し、顕微鏡下で心筋梗塞の状態を観察した。

【００３０】

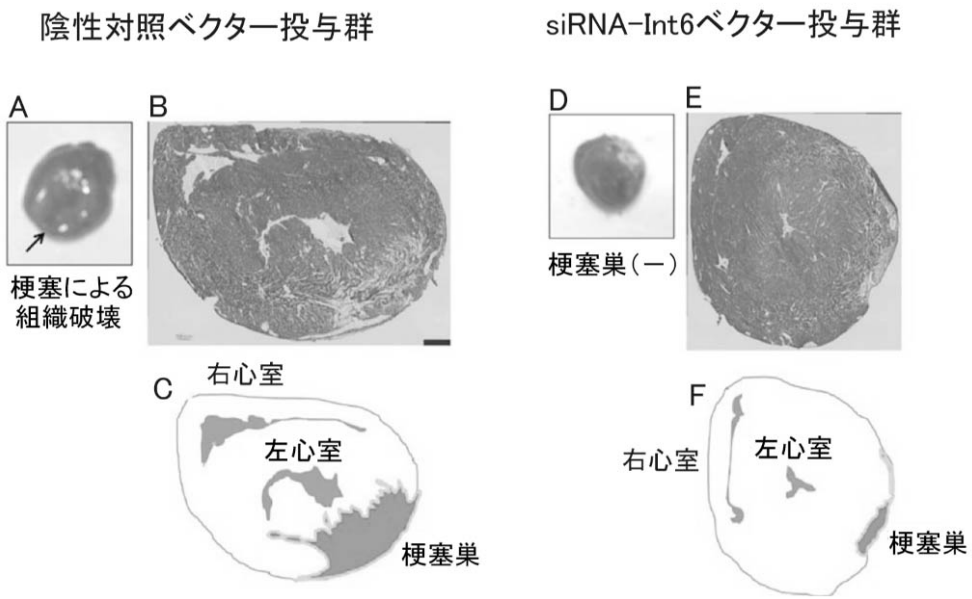
図１に示すように、結紮により血管障害を誘発した個体において、siRNA-Int6ベクターを投与された個体では、陰性対照siRNAベクターを投与された個体に比較して心筋梗塞巣が小さかった。このように、siRNA-Int6ベクターが、心筋梗塞に伴う細胞死を抑制し、心筋梗塞の進行を予防した。

【図面の簡単な説明】

【００３１】

【図１】本発明の一実施例で、血管障害誘発手術後に陰性対照ベクターを投与した個体（Ａ、Ｂ、Ｃ）、およびsiRNA-Int6ベクターを投与した個体（Ｄ、Ｅ、Ｆ）における、２週間後の心臓の様子を示した図である。

【図１】



【配列表】

2010222289000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C12N 15/09	*(2006.01)*	C12N 15/00	ZNAA	