

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5584618号
(P5584618)

(45) 発行日 平成26年9月3日(2014.9.3)

(24) 登録日 平成26年7月25日(2014.7.25)

(51) Int.Cl.

F 1

A 61 K 38/00	(2006.01)	A 61 K 37/02	Z N A
A 61 K 9/20	(2006.01)	A 61 K 9/20	
A 61 K 9/16	(2006.01)	A 61 K 9/16	
A 61 K 9/12	(2006.01)	A 61 K 9/12	
A 61 K 9/08	(2006.01)	A 61 K 9/08	

請求項の数 9 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-516366 (P2010-516366)
(86) (22) 出願日	平成20年7月14日 (2008.7.14)
(65) 公表番号	特表2010-533660 (P2010-533660A)
(43) 公表日	平成22年10月28日 (2010.10.28)
(86) 國際出願番号	PCT/DE2008/001138
(87) 國際公開番号	W02009/010045
(87) 國際公開日	平成21年1月22日 (2009.1.22)
審査請求日	平成23年5月16日 (2011.5.16)
(31) 優先権主張番号	102007033359.7
(32) 優先日	平成19年7月16日 (2007.7.16)
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)

(73) 特許権者	507038825 ヨハン ウォルfgang ゲーテーウニペ ルジテート フランクフルト アム マイ ン ドイツ 60325 フランクフルト アム マイン, ゼンケンベルグアンラー ゲ 31
(74) 代理人	100088904 弁理士 庄司 隆
(74) 代理人	100124453 弁理士 資延 由利子
(74) 代理人	100135208 弁理士 大杉 韶也
(74) 代理人	100152319 弁理士 曽我 亜紀

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】慢性疼痛の治療又は予防のためのグラニュリン又はグラニュリン様化合物の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

グラニュリン又はグラニュリン様化合物が、プログラニュリン、グラニュリン1、グラニュリン2、グラニュリン3、グラニュリン4、グラニュリン5、グラニュリン6、グラニュリン7、及びパラグラニュリンからなる群から選択される少なくとも1つの分子であって、前記グラニュリン又はグラニュリン様化合物を有効成分として含む、神経障害性疼痛のための予防治療剤。

【請求項 2】

前記グラニュリン又はグラニュリン様化合物が前記分子のうちの1つをコードする核酸である、請求項1記載の予防治療剤。 10

【請求項 3】

前記核酸が配列番号1～10のうちの1つによる核酸又はこれらの配列のうちの1つと少なくとも90%同一である核酸である、請求項2記載の予防治療剤。

【請求項 4】

前記グラニュリン又はグラニュリン様化合物がタンパク質又はペプチドである、請求項1記載の予防治療剤。

【請求項 5】

前記グラニュリン又はグラニュリン様化合物が配列番号11～20のうちの1つによるタンパク質若しくはペプチド、又はこれらの配列のうちの1つと少なくとも90%同一であるタンパク質若しくはペプチドである、請求項4記載の予防治療剤。 20

【請求項 6】

ヒトを含む哺乳類における神経障害性疼痛の治療又は予防のための薬学的組成物を製造するための請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の予防治療剤の使用。

【請求項 7】

神経障害性疼痛の低減のための薬学的組成物を製造するための請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の予防治療剤の使用。

【請求項 8】

ヒトを含む哺乳類における神経障害性疼痛の治療又は予防のための請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の予防治療剤を含む、薬学的組成物。

【請求項 9】

錠剤、糖衣錠、ピル、顆粒、エアロゾル、注入溶液、乳濁液、懸濁液又は溶液の形態である、請求項 8 に記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、慢性疼痛の治療又は予防のための薬学的組成物の製造のための、特に慢性疼痛の治療又は予防のための複数の薬学的組成物の製造のための、グラニュリン又はグラニユリン様化合物の使用に関する。さらに、本発明は、それぞれの薬学的組成物に関する。

【背景技術】**【0002】**

ニューロン損傷に罹患した患者において、外傷性、炎症性、感染性、腫瘍関連性、虚血性、変性、代謝性又は毒性のいずれであっても、多くの場合、続発性のニューロン損傷、例えば細胞死及び慢性疼痛、特に神経障害性疼痛が、これらのニューロン損傷の一因として起こる。

【0003】

神経障害性疼痛は、末梢及び中枢ニューロン細胞の多種多様な損傷から発生し得る。疼痛は、特に、糖尿病性又は毒性（例えば化学療法的治療による）多発性神経障害、切断後の幻肢痛、帶状疱疹後神経痛、三叉神経痛、圧迫症候群、例えば手根管症候群及び脊髄脱における坐骨神経痛、多発性硬化症における疼痛、並びに虚血後神経痛において共通である。当該技術水準から既知である非侵襲性の医薬的可能性は、異なる抗癲癇薬（例えばガバペンチン、プレガバリン）、抗うつ薬（例えばアミトリチリン（amitriptylin））、及びオピオイドの使用に限定され、これらは、それでも患者の約 30 %だけに耐容可能な副作用を同時的に伴う十分な鎮痛作用を達成し得るのみであり、ニューロン損傷に影響を及ぼさない。

【0004】

慢性の、特に神経障害性の疼痛の発生に関するメカニズムは、多様である。近年の実験的試験は、抑制性ニューロンの経シナプス的破壊と、これに本質的に付加される神経膠細胞の活性化を示す。

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0005】**

したがって、特に、部分的末梢ニューロン病変における再生を助けるために、そして続発性細胞死を防止するために、ニューロン損傷の治療又は予防のために用いられ得るそれぞれ方法又は手段を提供することが、本発明の目的である。

【課題を解決するための手段】**【0006】**

本発明の本質は、神経保護化合物の治療的使用による抑制性ニューロンの損失の低減並びに神経膠媒介性炎症反応の遮断、したがって連続的過剰興奮による進行性損傷を回避することにある。これは、慢性の、特に神経障害性の疼痛を低減し、再生過程を支持する。

【0007】

10

20

30

40

50

本発明の基礎を成す目的は、慢性疼痛の治療及び／又は予防のための薬学的組成物を製造するためのグラニュリン又はグラニュリン様化合物の使用により解決される。その点で、「慢性疼痛」という用語は、特に、神経障害性疼痛並びに炎症性及び腫瘍関連性疼痛を含む。

【0008】

急性又は慢性のニューロン損傷における慢性の、特に神経障害性の疼痛の治療又は予防のためのグラニュリン又はグラニュリン様化合物の使用は、利用可能な医薬的可能性（抗癲癇薬、抗うつ薬、オピオイド及びカンナビノイド）と対照して、病態生理学的基礎を成すメカニズムに正の影響を及ぼす新規の治療原理を表す。

【0009】

本発明によれば、抑制性介在ニューロンの破壊を回避することが可能である。そうする場合、興奮インパルスの不十分な遮断、したがって疼痛伝達路の過剰活性が回避される。したがって神経障害性疼痛の慢性化は、抑制性ニューロンのアポトーシスのために起こるリモデリング過程及び誤結合の結果的に生じる制限により低減される。これと対照して、今まで利用可能な薬剤は、ニューロン活性の全身性制動をもたらし、末梢又は中枢ニューロン損傷に起因する神経障害性疼痛における病態生理学的メカニズムに影響を及ぼさない。

【0010】

本発明の好ましい一実施の形態において神経障害性疼痛の治療又は予防のためのグラニュリン又はグラニュリン様化合物は、プログランニル、グラニュリン1、グラニュリン2、グラニュリン3、グラニュリン4、グラニュリン5、グラニュリン6、グラニュリン7、パラグラニュリン、プログランニルシグナル伝達分子、及びこれらの分子と機能的に等価であるこれらの分子の断片、並びにこれらの分子と機能的に等価であるアゴニストを含有する群から選択される少なくとも1つの分子である。下記でさらに説明されるように、アゴニストは特にペプチド模倣体であり得る。

【0011】

さらに、上記の群からのさまざまな分子の組合せの使用が、本発明に包含される。

【0012】

基本的に、本発明は、それぞれタンパク質又はペプチドの両方に、及び核酸、例えばDNA、cDNA又はRNA、並びにそれらの誘導体に関する。

【0013】

したがって、本発明の一実施の形態において、グラニュリン又はグラニュリン様化合物は、上記の分子のうちの1つをコードする核酸であり得る。特に、核酸は、配列番号1～10のうちの1つによる核酸、又はこれらの配列のうちの1つと少なくとも50%、好ましくは60%、70%、若しくは80%、特に好ましくは85%若しくは90%、最も好ましくは95%若しくは98%同一である核酸であり得る。それにより、核酸によりコードされるペプチド又はタンパク質は、有益には、配列番号11～20によるグラニュリン又はグラニュリン様化合物と機能的に等価である。

【0014】

核酸の断片は、グラニュリン又はグラニュリン様化合物をコードする核酸において見出されるグラニュリン又はグラニュリン様化合物の配列からの、少なくとも50%、好ましくは少なくとも150%、特に好ましくは少なくとも180連続ヌクレオチドの任意の配列を意味するものとする。

【0015】

機能的に等価な断片をコードする核酸は、配列番号11～20からの上記断片をコードする核酸に関して少なくとも50%、好ましくは60%、70%又は80%、特に85%又は90%、最も好ましくは95%又は98%同一である。

【0016】

「機能的に等価」とは、配列番号11～20によるグラニュリン又はグラニュリン様化合物と同一の定性的作用をニューロン及び神経膠細胞に及ぼす断片を意味するものとする

10

20

30

40

50

が、この場合、定量的作用は異なり得る。

【0017】

これに代わるものとして、本発明の別の実施の形態では、グラニュリン又はグラニュリン様化合物はタンパク質又はペプチドであり得る。特に、すでに上記したようなペプチド模倣体は、ここで言及されるべきである。

【0018】

特に好ましい一実施の形態では、グラニュリン又はグラニュリン様化合物は、配列番号11～20の1つによるタンパク質又はペプチド、あるいはこれらの配列のうちの1つと少なくとも50%、好ましくは60%、70%、又は80%、特に好ましくは85%又は90%、最も好ましくは95%又は98%同一であるペプチド又はタンパク質である。

10

【0019】

タンパク質又はペプチドの断片とは、グラニュリン又はグラニュリン様化合物の配列からの、少なくとも5、好ましくは少なくとも10又は少なくとも20、特に好ましくは少なくとも30、40、最も好ましくは少なくとも50連続アミノ酸のグラニュリン又はグラニュリン様化合物中に存在する任意の配列を意味するものとする。

【0020】

上記の化合物は、哺乳類における、特にヒトにおけるだけでなく、ペット及び家畜における、慢性の、特に神経障害性の疼痛の治療又は予防のための薬学的組成物の製造に適している。本発明は、ヒト核酸及びタンパク質／ペプチド配列に関して記載される。それにもかかわらず、ヒト配列に基づいて、既知の方法を用いて、公的に利用可能なデータベースに含有されない限り、他の種の配列も当業者は検出し得る。

20

【0021】

上記のような使用は、神経障害性疼痛の低減のための、損傷ニューロンの細胞死の回避のための、及び／又はニューロン再生の促進のための薬学的組成物の製造にも適している。

【0022】

本発明の根本的問題は、グラニュリン若しくは機能的に等価のグラニュリン断片、又はグラニュリン・アゴニストを含み且つ／又は含有する薬学的組成物によっても解決される。

【0023】

30

したがって、グラニュリン又はグラニュリン様化合物は、プログランニル、グラニュリン1、グラニュリン2、グラニュリン3、グラニュリン4、グラニュリン5、グラニュリン6、グラニュリン7、パラグラニュリン、プログランニルシグナル伝達分子、及び機能的に等価である上記分子の断片、並びに機能的に等価であるこれらの分子のアゴニスト（例えば上記断片のうちの1つではないペプチド模倣体）を含有する群から選択される少なくとも1つの分子である。

【0024】

上記の記載と同様に、薬学的組成物のグラニュリン又はグラニュリン様化合物は、上記の分子のうちの1つをコードする核酸、特に、配列番号1～10のうちの1つによる核酸、又はこれらの配列のうちの1つと少なくとも50%、好ましくは60%、70%、若しくは80%、特に好ましくは85%若しくは90%、最も好ましくは95%若しくは98%同一である核酸であり得る。したがって、コードされるペプチド又はタンパク質は、上記規定の意味で、効果において等価である。

40

【0025】

上記の核酸は、少なくとも1つの細胞中への、上記配列を含む構築物、例えばウイルス又はプラスミドの移入により、患者に投与され得る。構築物のトランスフェクションは、既知の方法により、例えばリポフェクション、バリスティック移入（「遺伝子銃」）などにより起こり得る。

【0026】

代替的な一実施の形態では、薬学的組成物のグラニュリン又はグラニュリン様化合物が

50

タンパク質又はペプチドである請求項1記載の使用。したがって、グラニュリン又はグラニュリン様化合物が配列番号11～20のうちの1つによるタンパク質若しくはペプチド、又はこれらの配列のうちの1つと少なくとも50%、好ましくは60%、70%、若しくは80%、特に好ましくは85%若しくは90%、最も好ましくは95%若しくは98%同一であるタンパク質若しくはペプチドである。

【0027】

上記の薬学的組成物は、好ましくは、哺乳類における、特にペット及び家畜における、そしてヒトにおける、慢性の、特に神経障害性の疼痛の治療又は予防のための薬学的組成物を製造するために用いられ得る。ここで示されるような配列はすべてヒトに由来するが、しかし、ここで示されるような配列に基づいて、当業者は他の生物体における対応する分子を同定し、単離し得る。10

【0028】

本発明によれば、薬学的組成物は、慢性の、特に神経障害性の疼痛の低減、損傷ニューロンの細胞死の回避、及び/又はニューロン再生の促進のための薬学的組成物を製造するためにも役立ち得る。

【0029】

本発明による薬学的組成物は、錠剤、糖衣錠、ピル、顆粒、エアロゾル、注入溶液、乳濁液、懸濁液又は溶液の形態で存在し得る。

【0030】

本発明による作用物質又は薬学的組成物の使用はそれぞれ、適切な既知の処方物を用いて行われ得る。20

【0031】

本発明による作用物質の使用は、不活性の、非毒性の、製薬上許容可能な担体又は溶媒を用いて、既知の方法で、一般的処方物、例えば錠剤、糖衣錠、ピル、顆粒、エアロゾル、乳濁液、懸濁液及び溶液に変えられ得る。これによって、グラニュリン又はグラニュリン様化合物に関する治療的有効濃度の作用物質は、それぞれ約0.1重量%～95重量%、好ましくは約0.5重量%～90重量%の濃度で、すなわち、標的化された場合に組織中に必要とされるような作用物質の濃度を達成するために十分である量で、全体的混合物中に存在する。

【0032】

処方物は、例えば、任意に乳化剤及び/又は分散剤を用いて、溶媒及び/又は担体で作用物質を薄めることにより製造されるが、ここで、例えば希釈剤として水を用いる場合、任意に有機溶媒が補助剤として用いられ得る。30

【0033】

補助剤として言及されるものは、例えば水、非毒性溶媒、例えばパラフィン（例えば、粗油留分）、植物油（例えば、落花生油、ゴマ油）、アルコール（例えば、エチルアルコール、グリセロール）、担体、例えば天然石粉（例えば、カオリン、アルミナ、タルカム、チョーク）、合成石粉（例えば、高分散シリカ、ケイ酸塩）、糖（例えば、ショ糖、乳糖及びブドウ糖）、乳化剤（例えば、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン脂肪酸エーテル）、分散剤（例えば、リグニン、亜硫酸パルプ廃液、メチルセルロース、デンプン及びポリビニルピロリドン）、並びに滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルカム、ステアリン酸及び硫酸ナトリウム）である。40

【0034】

適用は、一般的方法で、好ましくは経口的に又は非経口的に、特に経舌的に又は静脈内で行われる。本発明による薬剤の経口使用の場合、錠剤は、言及されたような担体のほかに、当然、添加剤、例えばクエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム及びリン酸二カルシウムも、いくつかの添加剤、例えばデンプン、好ましくはジャガイモデンプン、ゼラチン等と一緒に含有し得る。さらに、滑剤、例えばステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム及びタルカムが、錠剤成形のために含まれ得る。水性懸濁液の場合、上記の補助剤のほかに、いくつかの呈味改良剤又は着色剤が活性作用物質に付加され得る。非経口投与50

の場合、適切な液体担体物質を使用する活性作用物質の溶液が用いられ得る。

【0035】

本発明は、神経障害性疼痛の治療又は予防のための本明細書に記載されるようなグラニュリン若しくはグラニュリン様化合物の使用、又は本明細書に記載したようなグラニュリン若しくはグラニュリン様化合物及び神経障害性疼痛の治療又は予防のためのその使用にも関する。

【0036】

本発明は、グラニュリン若しくはグラニュリン様化合物、又は上記による薬学的組成物を用いた、個体の、特に患者の治療又は予防のための方法にも関する。

【0037】

実施例に基づいて本発明をさらに説明するが、本発明はこれらに限定されない。実施例に記載されるような実験の結果は、図に示されている。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】プログラニアリニンは高システインタンパク質であって、これは、なお未知のプロテアーゼにより、分泌される7つの異なるグラニュリンに切断され(図1)、そして出発物質のように、増殖因子及びサイトカイン様作用を示し、創傷治癒を促し、腫瘍増殖及びニューロン発達を調節する。今まで、細胞外及び細胞内「受容体」は分かっていない。ヒトにおいて、プログラニアリニン遺伝子の「機能損失」突然変異は、前頭側頭認知症を引き起こす。プログラニアリニンに関するヒト遺伝子Grnのイントロン-エキソン構造において、エキソンはボックスとして描かれる。プログラニアリニン-タンパク質は、プロテアーゼにより、7つの異なるグラニュリン(黒色ボックス)及びN末端「シグナル伝達ペプチド」に切断される。グラニュリンはすべて、グラニュリンA(Cx-Cx-CCx-CCx-CCx-Cx-C)と同様の構造を有する。C=システイン、X=他のアミノ酸の可変数。

【図2】坐骨神経(N. ischiadicus)の末梢病変後の脊髄及びDRGにおけるプログラニアリニン発現の調節。 A 神経障害性モデル、坐骨神経部分損傷(SNI、Decosterd & Woolf)、絞扼性神経損傷(Chronic Constriction Injury)(CCI、Bennett)、脊髄神経結紮(SNL、Chung)。 B 上に示したモデルにおける後角及びDRGにおけるプログラニアリニンmRNAのマイクロアレイ分析。 C SNIモデルにおけるプログラニアリニンmRNAの定量的RT-PCR。 D SNIモデルにおける脊髄におけるプログラニアリニンタンパク質発現のウエスタンプロット分析。 E SNI後のDRGにおけるプログラニアリニン-タンパク質。 F 糖尿病誘導の3ヶ月後のSTZ誘導性糖尿病多発性神経障害モデルにおけるDRGにおけるプログラニアリニン-タンパク質発現。

【図3】神経膠原纖維酸性タンパク質GFAP及び転写因子ATF-3に関するプログラニアリニンin situハイブリダイゼーション及び後in situ免疫蛍光法。

A 脊髄の後角におけるSNI後の星状細胞を例示するためのin situでのGrn(黒色)及びGFAP免疫蛍光(赤色)。 B Aの拡大図。プログラニアリニンは星状細胞中で発現されない。 C SNI後の脊髄の前角中の小神経膠細胞(小細胞)及び運動ニューロン(矢印)におけるin situでのGrn。 D ATF-3免疫蛍光法による損傷運動ニューロン(赤色)を示すCと同様の前角。 ATF-3は、損傷軸索を有するニューロンに関するマーカーである。

【図4】SNI後の脊髄における小神経膠細胞反応の全体像。補体因子3(CD11b)の受容体に関する免疫蛍光法による小神経膠細胞の実証。

【図5】SNI後の前角における小神経膠細胞反応。 A SNI後の脊髄の前角中の活性小神経膠細胞の実証のためのCD11b免疫蛍光。 B 運動ニューロン(赤色、ペリフェリン-免疫蛍光)の直ぐ近くの活性化小神経膠細胞(矢印)中のプログラニアリニンmRNA(in situハイブリダイゼーション、灰色)。

【図6】SNI後のプログラニアリニンmRNA(in situハイブリダイゼーション)

10

20

30

40

50

、灰色)の発現を伴う後根神経節のニューロン(ペリフェリンIR、赤色)。

【図7】SNI後のプログラニュリンsiRNAの連続脊髄注入時のプログラニュリンmRNA発現及びマウスの行動。A Grn siRNA及び対照オリゴヌクレオチドによる処置時の脊髄におけるSNI後のGrn mRNA。処置は、L3のレベルで終わる脊髄カテーテルを介して皮下埋め込み型浸透圧アルゼットポンプを用いて行われた。注入はSNI直後に始まり、SNIの4週間後に終了する。B 異なる侵害試験における、並びに運動遂行を測定するロータロッド試験における、Grn siRNA又は対照オリゴヌクレオチドによる処置時のSNI後のマウス(C57Bl/6)の行動。動的フォン・フレイ触覚計で「逃避」潜時を測定することにより、機械的異痛を測定したが、潜伏時間が短いほど、異痛(上左)は強かった。アセトン検定(上右)で、並びに10

の冷プレートを用いて(下右)、寒冷異痛を記録した。アセトン検定では、足裏に1滴のアセトンを適用後の足の反応(舐める、振り動かす、持ち上げる)の持続時間を測定したが、反応が長いほど、異痛は強かった。寒冷に対する露出後の反応潜伏時間は冷プレートを用いて測定されるが、短いほど、異痛は強い。マウスがどれだけ長く倒れずに回転する円筒体上を走るかを、ロータロッド試験で測定する。運動協調性及び消耗並びにニューロン病変後の補償のための abilities を測定する。行動実験は、Grn siRNAでの処置時の異痛の増大及び減損運動回復を示す。プログラニュリンsiRNAの脊髄注入によるマウスの処置は、SNI後に生じるプログラニュリンの上向き調節を遮断し、マウスにおける疼痛様行動の増大をもたらす。さらに、ロータロッド試験における運動機能のその回復は、対照オリゴヌクレオチドで処置された対照動物におけるものよりわずかに遅い。20

【図8】細胞及びマウス組織におけるプログラニュリン/グラニュリンタンパク質発現。プログラニュリン、グラニュリン1、2及び7に指向性があるN19抗体(SantaCruz Biotechnology)を用いたウエスタンプロット。グリコシル化プログラニュリンの分子量: 88 kDa、個々のグラニュリンの分子量: 6 kDa。小ペプチドを分離するために、トリシングルを用いた。略号: MF、マクロファージ; LPS、リポ多糖; SC、脊髄; DRG、後根神経節; HEK293、ヒト胚性腎細胞; MCF-7、乳癌細胞; PC12、クロム親和性細胞腫細胞(ニューロン様); PAGE、ポリアクリルアミド・ゲル・電気泳動。

【発明を実施するための形態】

【実施例】

【0039】

以下において、図に示したような結果を参考しながら、ここに記載する実験により本発明を説明する。

【0040】

方法 プログラニュリン

神経障害モデル及びRNAi処置

成体C57Bl/6マウスを用いた。坐骨神経部分損傷(SNI)モデルにおいて、坐骨神経の2つの枝、すなわち、腓骨神経及び脛骨神経を結紩し、遠位で切断した。腓腹神経は無傷のままである。浸透圧ポンプ(アルゼット浸透圧ポンプ2004; 0.25 μl/時)を用いて、アクログラニンに関するサイレンサーRNA(ステルスRNAi、Invitrogen)を、脊髄カテーテル(PTFE sub-ligate wallチューブ; OD/ID 0.15 mm / 0.05 mm)により連続的にクモ膜下腔内注入した。カテーテルの先端を腰髄のレベルにおいて、浸透圧ポンプを皮下組織中に固定した。SNI手術直後に注入を開始し、4週間継続した。3つの異なるアクログラニンRNAiの混合物(4週間の期間中、1 nmol / 各マウス)又は対照RNAiをそれぞれ用いた。さらに、FITC標識ダミーRNAi(20 nmol)を、その後の免疫組織学的位置確認のために注入した。注入溶液は、1:40希釈リポフェクタミンを有するリンガー溶液で構成された(195 μl リンガー + 5 μl リポフェクタミン / ポンプ)。

【0041】

侵害受容性行動

10

20

30

40

50

動物を、 3×30 分間、試験ケージに馴れさせた。処置について知ることなしに、行動の測定を実施した。後肢の機械的刺激に関する反応潜伏時間を、動的フォン・フレイ触覚計 (Dynamic aesthesiometer, UgoBasile, Italien) を用いて測定した。「冷プレート」(4)を用いて、寒冷に対する疼痛感受性を、90秒の期間の間の悪反応（舐める、跳び上がる、足を持ち上げる）を計数することにより測定した。52 「温熱プレート」を用いて、熱に対する疼痛感受性を、最初の反応までの潜伏時間を測定することにより確定した。問題損傷を回避するため、カットオフ潜伏時間は30秒であった。ロータロッド試験において、ニューロン病変後の運動協調性又は運動回復をそれぞれ測定した(90秒カットオフ)。

【0042】

10

マイクロアレイ

Qiagen RNA抽出キットにより均質化脊髄又はDRG組織から全RNAを抽出し、DNAに転写した。cDNA断片をPCRにより増幅し、pCR4ベクター(TAクローニングキット、Invitrogen)に結合した。ビオチニル化cRNAをin vitro転写により产生して、AffymetrixのRGU34Aチップのハイブリダイゼーションのために用いた。

【0043】

20

定量的RT-PCR

Qiagen RNA抽出キットにより均質化脊髄又はDRG組織から全RNAを抽出し、DNAに転写した。プロバイダー(Applied Biosystems)のマニュアルに従ってSybr-Green検出系を用いて、定量的実時間RT-PCRを実施した。プライマー組を、Primer Expressで選択した。アガロースゲル電気泳動により、特定PCR産物の増幅を検証した。

【0044】

30

ウエスタンプロット

脊髄又はDRG組織をPhosphoSafe抽出緩衝液(Novagen)中で均質化し、ホモジネートを遠心分離(40,000g、20分)して、上清中のタンパク質をそれぞれポリアクリルアミド又はトリシングル電気泳動により分離した。タンパク質を湿式プロットによりニトロセルロース膜上に移し、PBST-5%ミルク(5%低脂肪乳粉末を有する1mol/l PBS中0.05%トウイーン20)中で遮断し、アクログラニンに対する抗体(PBST中1:1000)と共に一晩インキュベートして、洗浄し、二次抗体と共に室温で2時間インキュベートして、Odysseyウエスタンプロットスキャナーを用いて評価した。

【0045】

40

in situハイブリダイゼーション

マウスをCO₂及び放血により屠殺して、L4/5 DRG及び脊髄を迅速に取り出し、OCT中に包埋して、ドライアイス上で凍結させ、クリオトームで14μm切片に切断した。切片を4%パラホルムアルデヒド中で後固定し、アセチル化した。DIG標識リボ試料をcDNA断片のin vitro転写及びジゴキシゲニン標識dUTPの組入れにより生成した(Dig標識キット、Roche)。切片を、室温で2時間、プレハイブリダイゼーション溶液(5×SSC、50%ホルムアミド、2×デンhardt、500μg/mlニシン精子DNA、250μg/ml酵母tRNA)中で前ハイブリダイズして、その後、オープン中で72で16時間、プレハイブリダイゼーション溶液中で250ng/mlのリボプローブ(アンチセンス及びセンス)とハイブリダイズした。切片を0.2×SSC中で68で2時間洗浄し、抗sig-AP抗体(0.1mol/lマレイン酸緩衝液中の1%遮断試薬(Roche)中で1:1000)と共に4で一晩インキュベートして、NBT/BCIP/レバミゾール(Boehringer Mannheim)で発色させた。切片をグリセロール/ゼラチン中に包埋し、又は、それぞれの抗体を用いて後in situ免疫蛍光法によりさらに発色させた。

【0046】

50

免疫蛍光法

固定のために、動物を $1 \times$ PBS で、その後、4% パラホルムアルデヒドで心臓内還流した。組織を調製し、4% PFA 中で 2 時間、後固定し、 $1 \times$ PBS 中の 20% スクロース中で一晩、冷凍人工物に対して保護し、OCT 中に包埋して、それぞれ $12 \mu\text{m}$ 又は $14 \mu\text{m}$ 切片をクリオトームで切断した。切片を、0.03% トリトン X-100 及び 1% 遮断試薬 (Roche) を有する $1 \times$ PBS 中で室温で 2 時間遮断し、4 の遮断溶液 (上記参照) 中の一次抗体と共に一晩インキュベートして、洗浄し、次に、室温で 2 時間、遮断溶液中で種特異的 Cy3、Alexa-488 又は FITC 標識二次抗体と共にインキュベートして、再び洗浄し、自己蛍光の低減のために 0.02% スーダンブラックで処理し、Vectashield で包埋した。それぞれ蛍光 (Nikon) 又はレーザー走査顕微鏡 (Zeiss) で、分析を行なった。

10

【0047】

以下の一次抗体を用いた：マウス NF 200、1:4000 (Sigma)；マウス CGR P、1:1000 (Sigma)；ウサギ ATF-3、1:300 (SantaCruz)；FITC 標識グリフォニア・シンプリシフォリア (griffoniasimplicifolia) イソレクチン B4 (Sigma)、1:500；ウサギ GFA P (1:1000, Chemicon)；ウサギ抗ペリフェリン (1:1000, Chemicon)；ウサギ Iba-1 (1:500, DAKO)。

【0048】

末梢ニューロン損傷後、小神経膠活性化が同側脊髄で起こり、これは神経障害性疼痛の発生のために重要である。これらの活性化小神経膠細胞は、マイクロアレイ (図 2)、Q RT-PCR (図 2)、ウェスタンプロット (図 2)、及び in situ ハイブリダイゼーション (図 3) により示されるように、プログラニュリンの強い発現を示す。ニューロン病変により直接損傷される DRG ニューロン及び運動ニューロンは、より弱い発現を示す (図 3~4)。

20

【図 1】

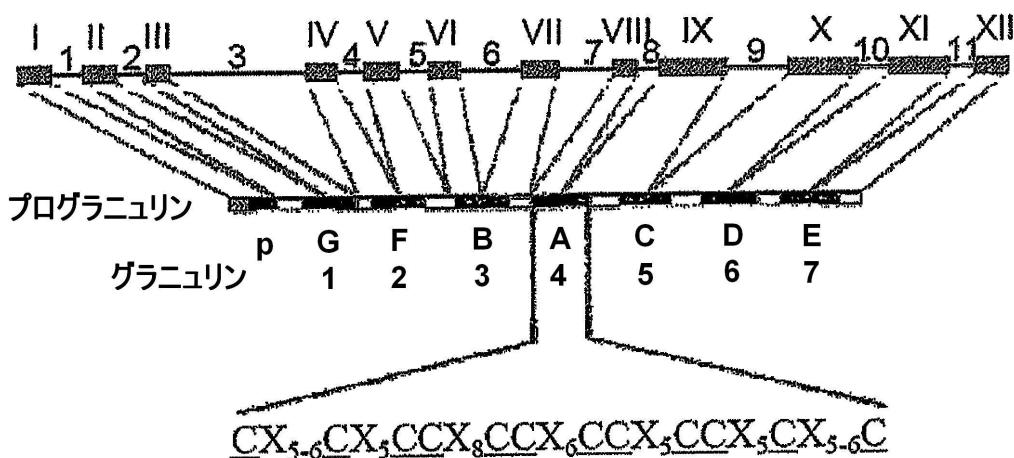


図1

【図2】

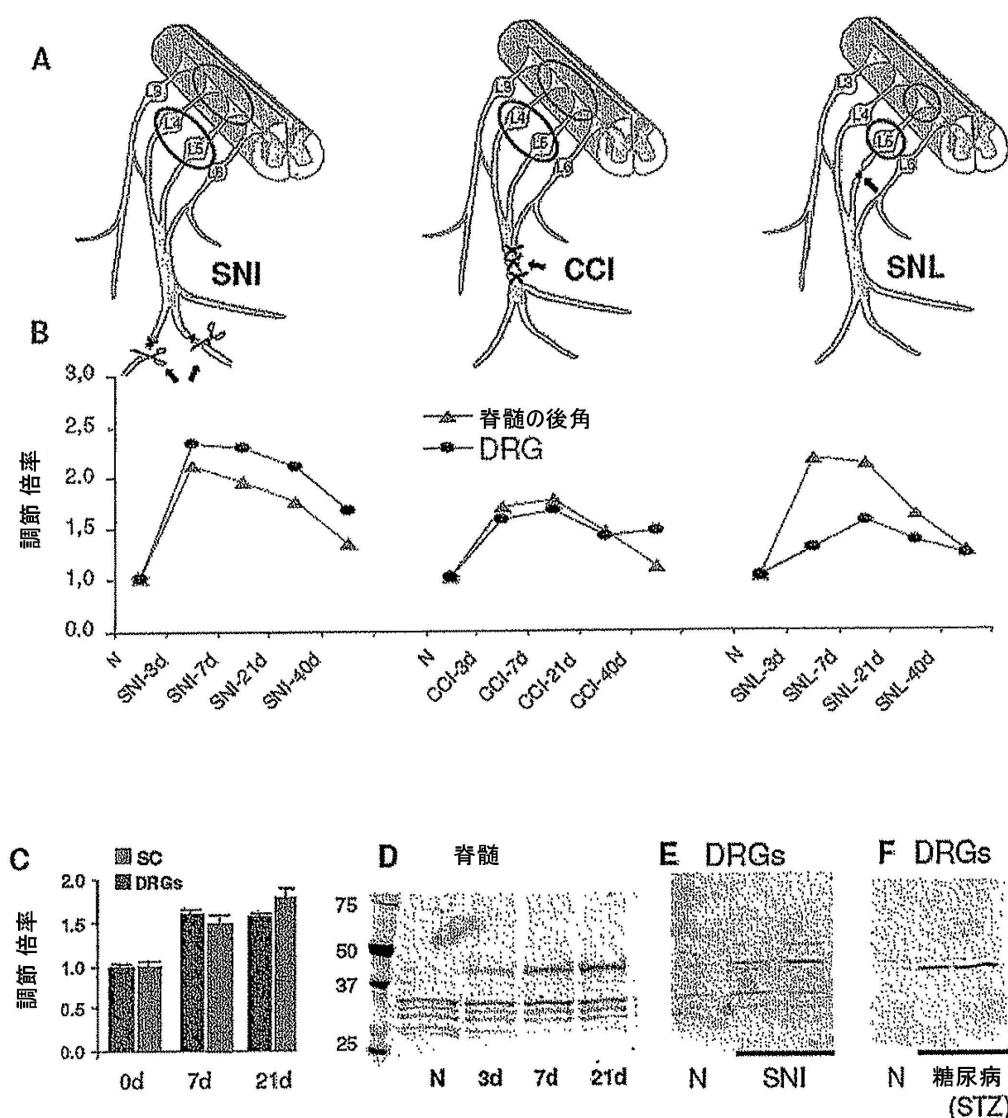


図2

【図3】

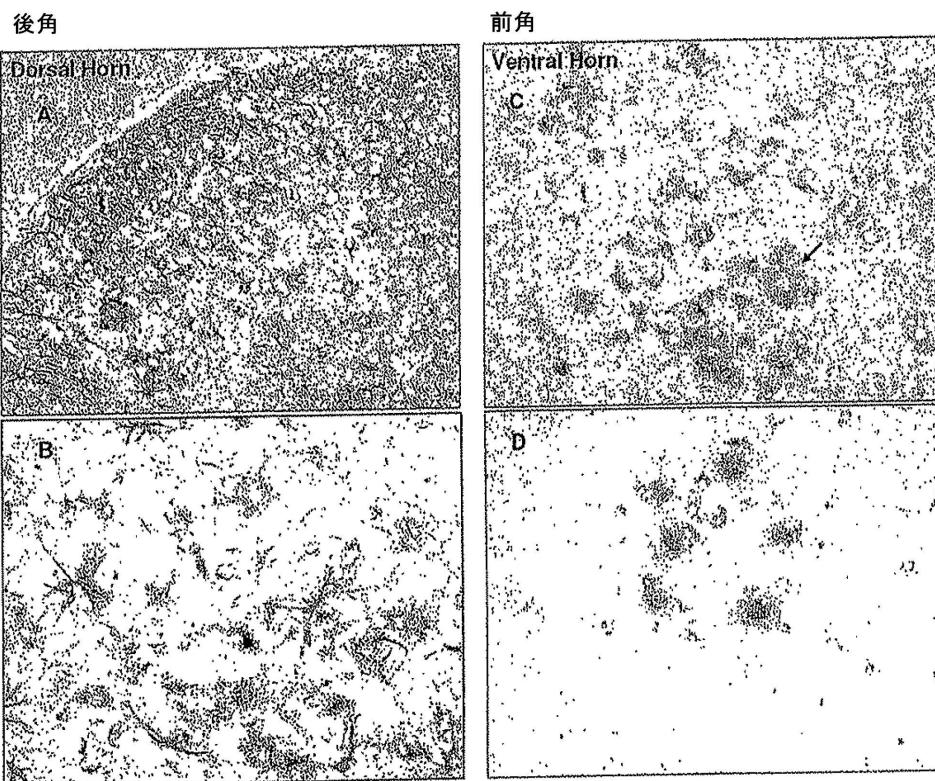


図3

【図4】

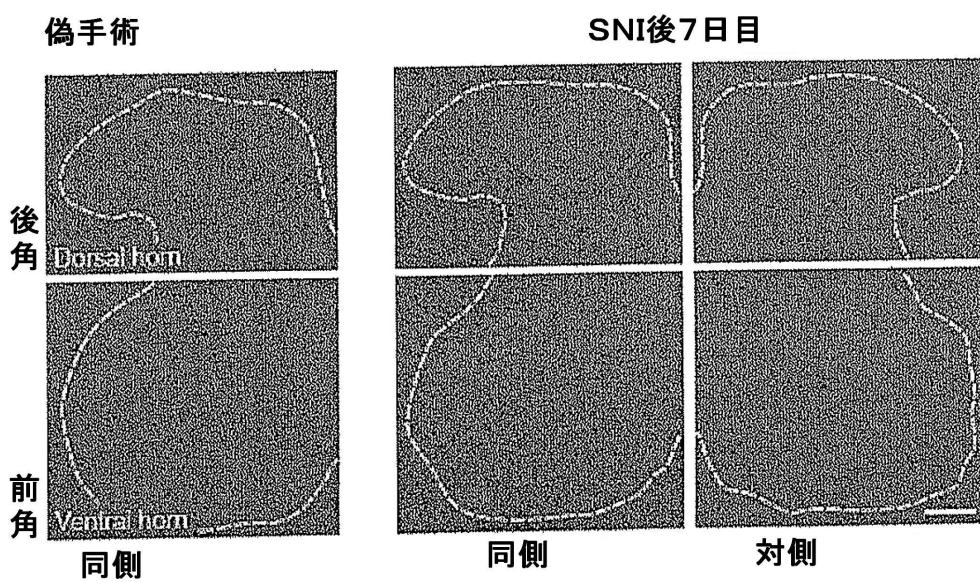


図4

【図5】

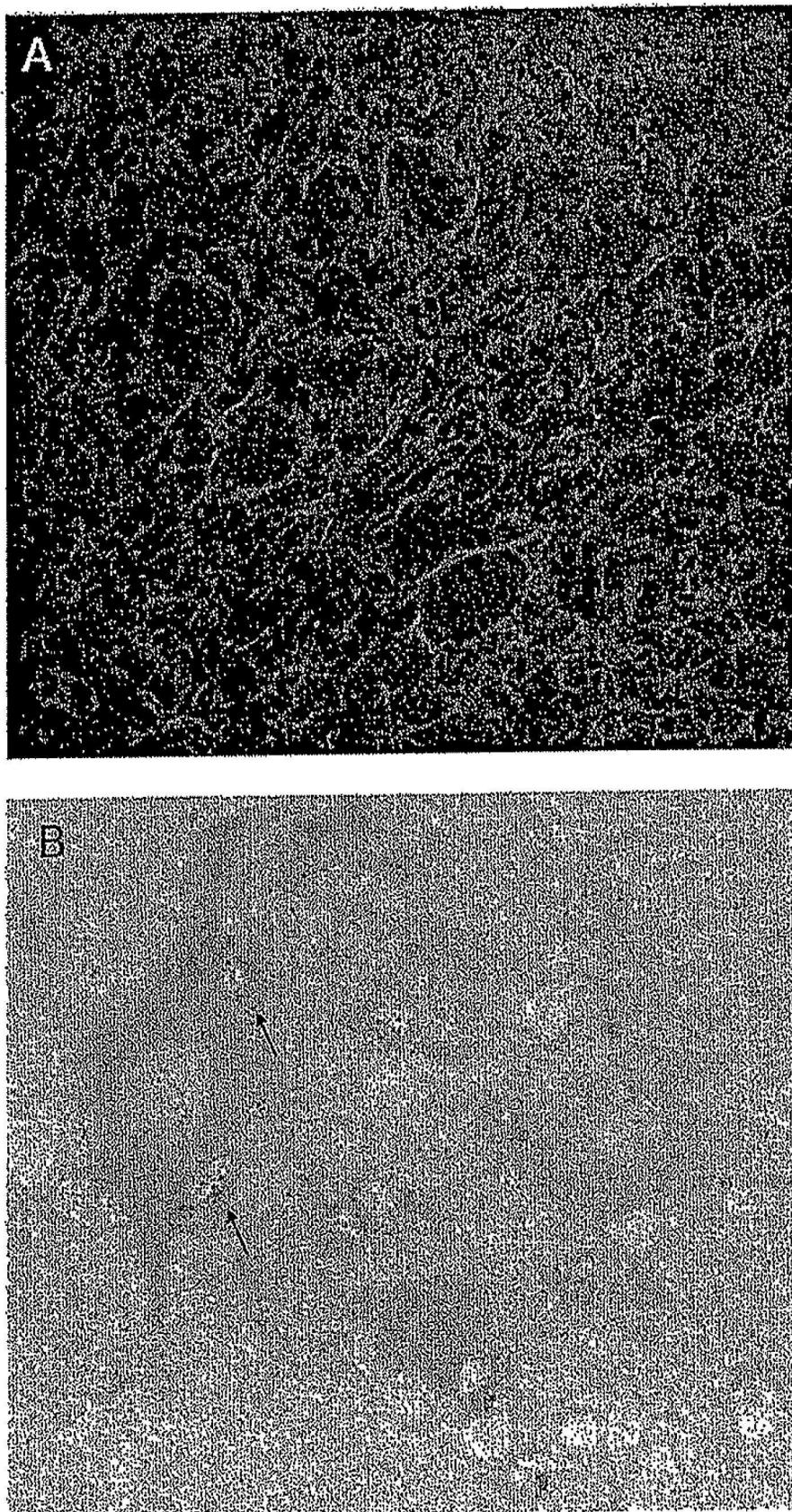


図5

【図6】

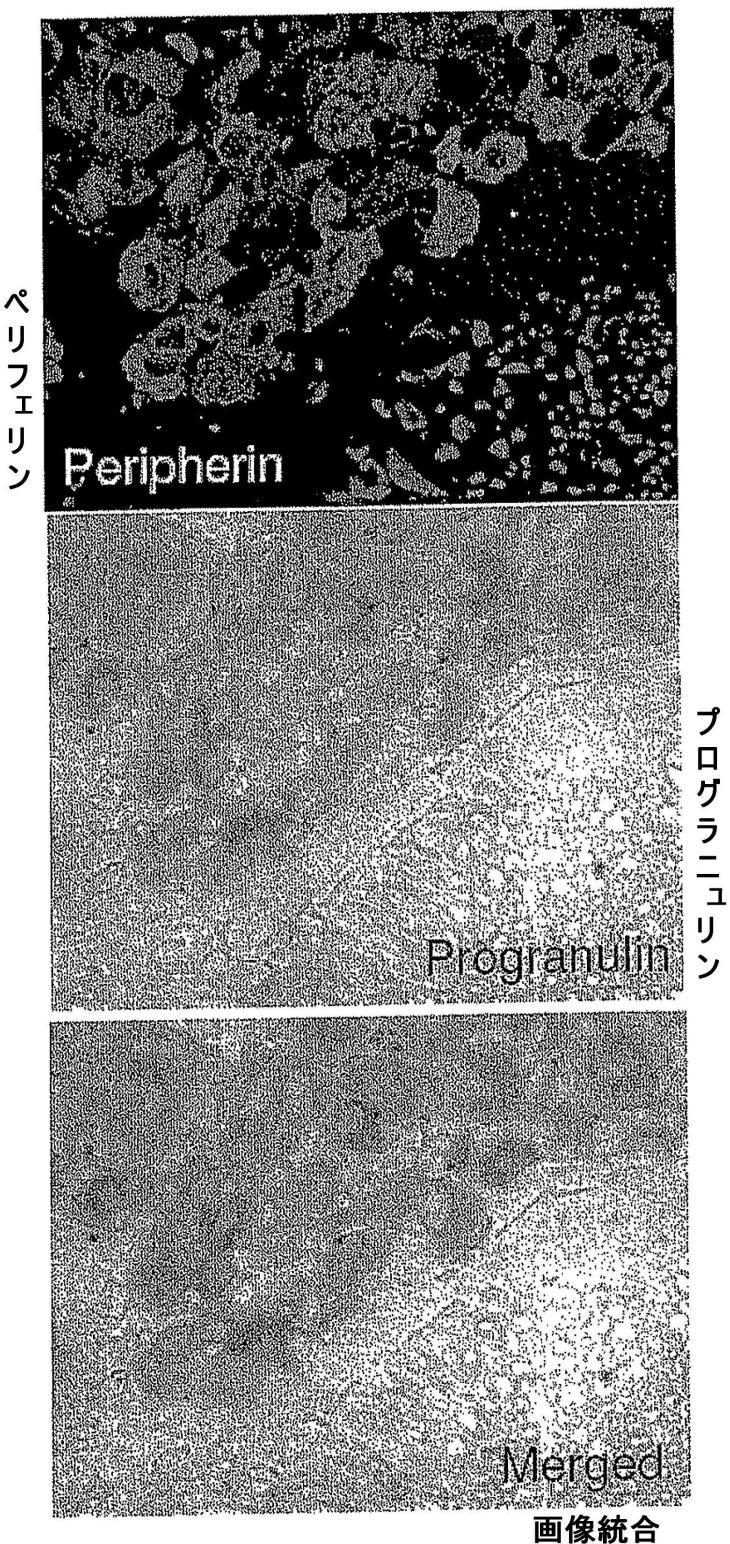


図6

【図7】

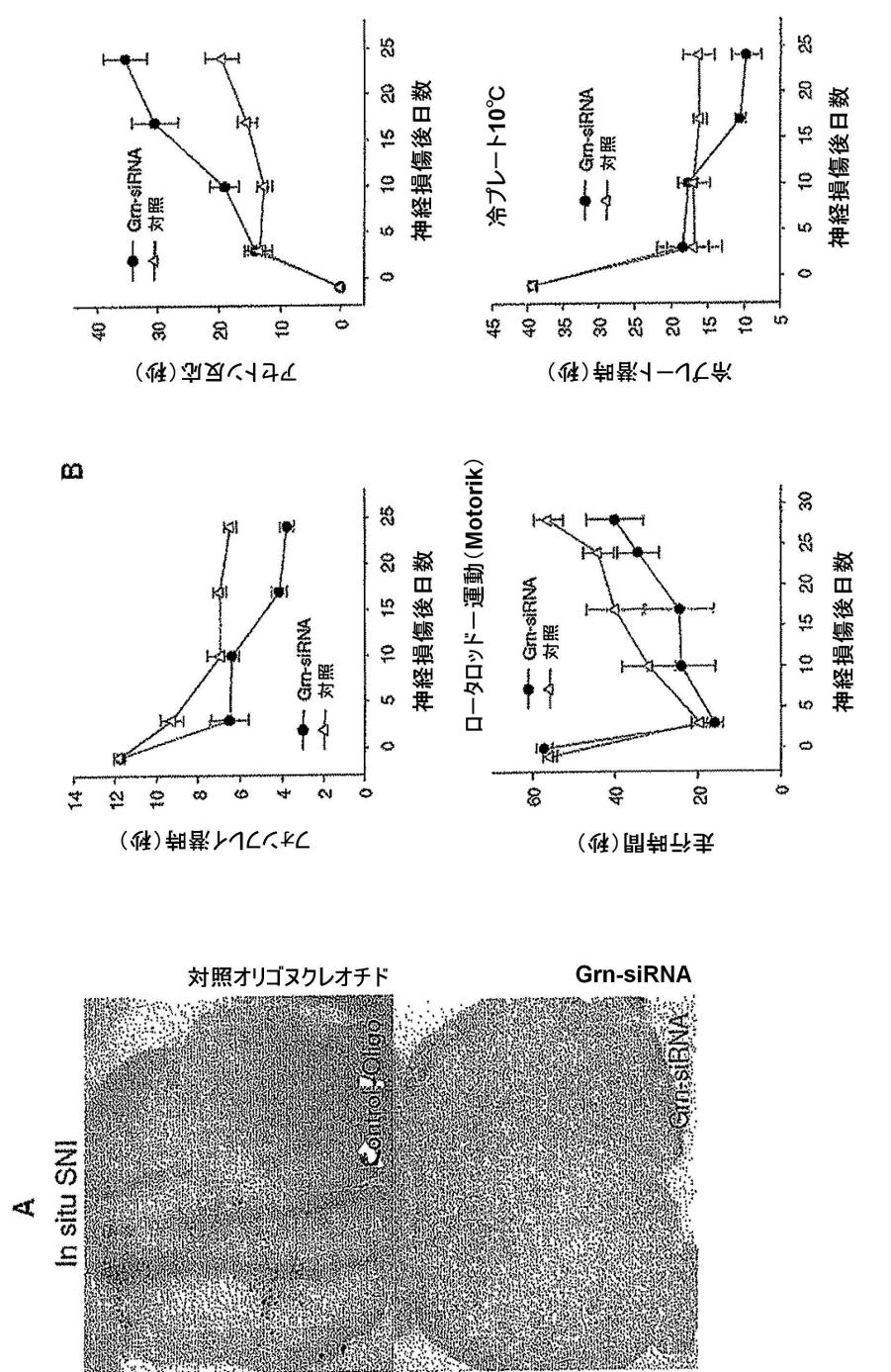
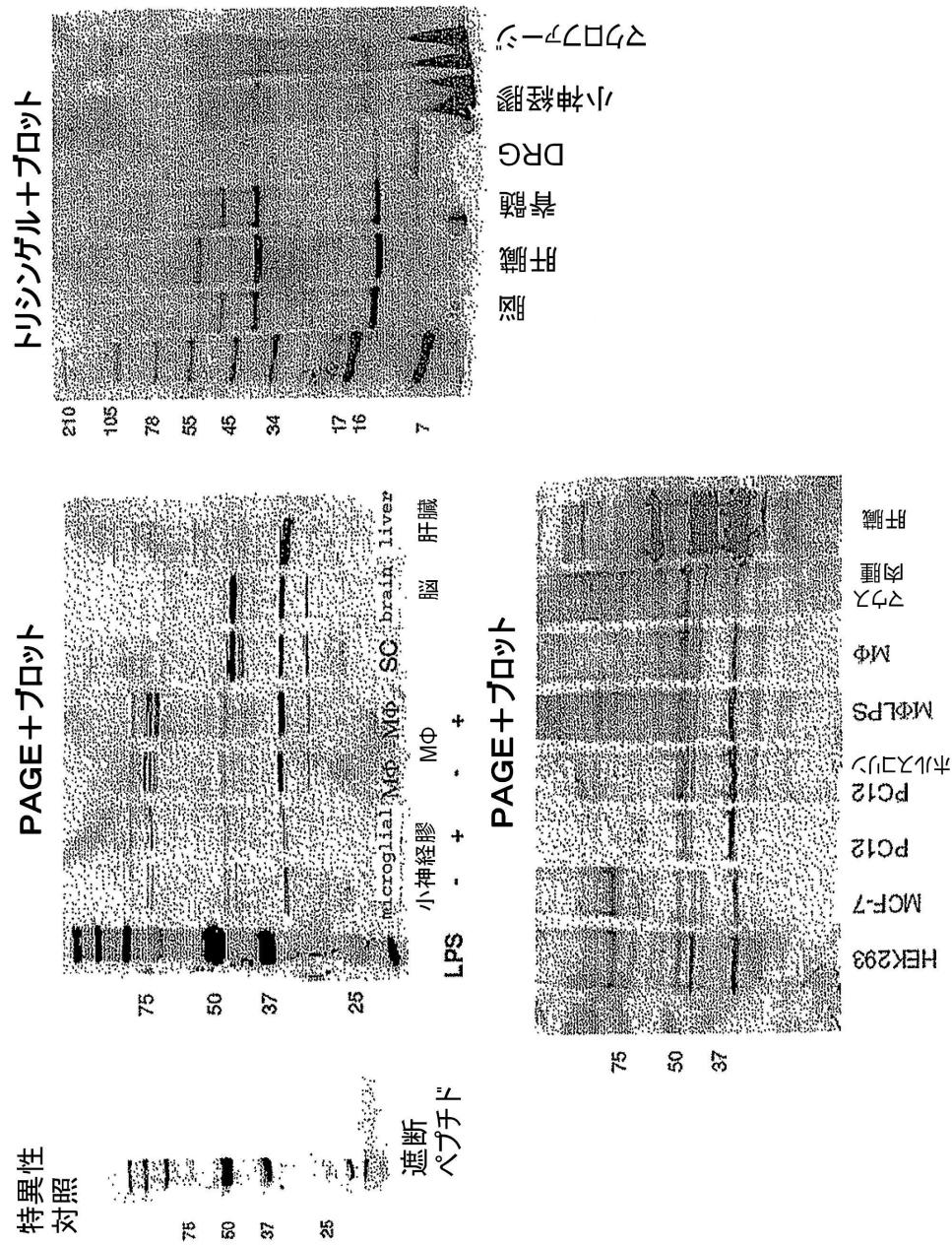


図7

【図8】

図8



【配列表】

0005584618000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			
A 6 1 K	9/10	(2006.01)	A 6 1 K	9/10	
A 6 1 P	25/04	(2006.01)	A 6 1 P	25/04	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 0 7 K	14/47	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A

(74)代理人 100163544

弁理士 平田 緑

(72)発明者 テジダー , イルムガルト

ドイツ , 6 0 5 9 8 フランクフルト , ダルムシュテッター ランドストラッセ 3 2 4

(72)発明者 ゲイスリンジャー , ゲルト

ドイツ , 6 5 8 1 2 バート ゾーデン , ドライ リンデンストラッセ 3 1

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 国際公開第2006 / 085688 (WO , A1)

国際公開第93 / 015195 (WO , A1)

特表2009 - 538631 (JP , A)

国際公開第2007 / 000924 (WO , A1)

特表2006 - 524484 (JP , A)

特開2002 - 335972 (JP , A)

国際公開第2005 / 020902 (WO , A1)

日本獣学会学術集会講演要旨集, 2006, 142nd, p.158, I-15欄

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I)

U n i P r o t / G e n e S e q