

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4585611号  
(P4585611)

(45) 発行日 平成22年11月24日 (2010.11.24)

(24) 登録日 平成22年9月10日 (2010.9.10)

(51) Int. Cl.	F I	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 38/43 (2006.01)	A 6 1 K 37/48	
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
請求項の数 2 (全 76 頁)		

(21) 出願番号	特願2009-547912 (P2009-547912)	(73) 特許権者	505156709
(86) (22) 出願日	平成20年12月26日 (2008.12.26)		株式会社ステリック再生医科学研究所
(86) 国際出願番号	PCT/JP2008/004025		東京都港区東麻布1-9-15
(87) 国際公開番号	W02009/084232	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成21年7月9日 (2009.7.9)		弁理士 清水 初志
審査請求日	平成22年3月4日 (2010.3.4)	(74) 代理人	100102118
(31) 優先権主張番号	特願2007-336518 (P2007-336518)		弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成19年12月27日 (2007.12.27)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 山口 裕孝
早期審査対象出願		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74) 代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一
		(74) 代理人	100148699
			弁理士 佐藤 利光
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 糖鎖関連遺伝子、およびその利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

GaINAc4S-6ST、GaINAc4ST-1、またはGaINAc4ST-2の遺伝子発現を抑えるsiRNAを成分とする、腸管線維形成抑制剤。

【請求項 2】

腸管線維形成性疾患の治療用または予防用の、請求項 1 に記載の薬剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、糖鎖関連遺伝子阻害による、生体組織レベルの線維形成の抑制剤に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、核酸とタンパク質については精力的な研究がなされ多くの事が判明してきた。しかしながら逆にヒトの遺伝子がわずか2万2千個程度に過ぎない事や、タンパク質の翻訳後修飾が生体内では重要である事もまた明らかになり、従来の研究アプローチの限界もまた示されたのである。近年、ポストゲノム、ポストプロテオミクスの流れの中で糖鎖の重要性が再認識されている (Nature誌446号: 2007年4月26日発行 (非特許文献 1 ~ 7) においても糖鎖特集が大々的に組まれた)。糖鎖に関しては構造解析が困難である等の理由から従来あまり解析されておらず、癌、炎症、免疫、ウイルス感染などに関わる可能性が考えられているものの、現段階においてその役割等は不明な部分が多く、その解明が待たれる

10

20

。

【 0 0 0 3 】

糖鎖を構成する糖（単糖）としては、これまでに種々の糖が知られている。例えば、グルコース(Glc)、ガラクトース(Gal)、マンノース(Man)、グルクロン酸(GlcUA)、イズロン酸(IdoA)、フコース(Fuc)、グルコサミン(GlcN)、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、キシロース(Xyl)、シアル酸(SA)などが知られている。

。

【 0 0 0 4 】

また、糖鎖を構成する糖は、種々の化学修飾を受けることが報告されている。例えば、メチル化、アセチル化、ホルミル化、ミリストイル化、アミド化、ユビキチン化、アシル化、リン酸化、エピマー化、硫酸化などが知られている。さらに、シアル化、アシアロ化、フコシル化、グリコシル化、ガラクトシル化、ラクトシル化、マンナン化などの化学修飾を例示することができる。

10

糖において、これらの化学修飾を受ける部位は複数存在する。例えば、GlcNAcにおいては、1位～6位の炭素の全てが化学修飾を受けることが知られている。その他の糖においても、種々の部位において化学修飾を受けることが報告されている。

【 0 0 0 5 】

【非特許文献1】Danica P. Galonic and David Y. Gin, Nature 446: 1000-1007 (2007)

【非特許文献2】Christopher J. Thibodeaux et. Al., Nature 446: 1008-1016 (2007)

【非特許文献3】Gerald W. Hart et. Al., Nature 446: 1017-1022 (2007)

20

【非特許文献4】Ajit Varki, Nature 446: 1023-1029 (2007)

【非特許文献5】Joseph R. Bishop et. Al., Nature 446: 1030-1037 (2007)

【非特許文献6】Christopher N. et. Al., Nature 446: 1038-1045 (2007)

【非特許文献7】Peter H. Seeberger and Daniel B. Werz, Nature 446: 1046-1051 (2007)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 6 】

本発明は、糖鎖に関連する遺伝子についての研究によって、新たに見出された知見に基づくものである。本発明は、糖鎖関連遺伝子の新たな用途の提供を課題とする。具体的には、糖鎖関連遺伝子の機能を阻害することによる、生体組織レベルの線維形成を抑制する薬剤、並びに、該薬剤のスクリーニング方法の提供を課題とする。

30

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 7 】

糖鎖の生体内における役割は非常に重要であることが示唆されているものの、糖鎖の生体内における機能については不明な部分が多い。

上述のように、糖鎖を構成する糖には複数の種類が知られており、糖は複数の部位において種々の化学修飾を受けることによって、生体内において重要な生理作用を担うものと考えられている。

上述のように、糖鎖を構成する糖の種類、糖を標的とする化学修飾の種類およびその化学修飾される部位は多数存在することから、糖鎖は無数のバリエーションからなるものと考えられる。従って、ある役割を担う糖鎖の構造を特定することは非常に困難であり、また、ある疾患に起因する病態と、糖鎖の具体的な作用との関連性を見出すことは極めて困難を伴うことである。

40

【 0 0 0 8 】

本発明者は鋭意研究の結果、糖鎖を構成する糖の中の一つであるGalNAcの4位または6位の硫酸化を阻害することにより、生体レベルにおいて組織の線維形成を抑制できることを見出すことに初めて成功した。さらに本発明者は、GalNAcの、4位または6位の硫酸化インヒビターが、種々の疾患モデル動物を利用した研究から、組織の線維形成に起因する疾患（組織線維形成性疾患）に対して、治療効果を有することを実証した。

50

## 【 0 0 0 9 】

本発明は、糖鎖関連遺伝子の機能を阻害することによる、生体組織レベルの線維形成を抑制する薬剤、並びに、該薬剤のスクリーニング方法に関し、より具体的には、

〔 1 〕 N - アセチルガラクトサミンの 4 位または 6 位の硫酸化インヒビターを成分とする、組織線維形成抑制剤、

〔 2 〕 生体組織の線維形成に対して抑制効果を有することを特徴とする、〔 1 〕に記載の薬剤、

〔 3 〕 前記インヒビターが N - アセチルガラクトサミンの 4 位または 6 位の硫酸基転移酵素の機能を阻害する活性を有する、〔 1 〕または〔 2 〕に記載の薬剤、

〔 4 〕 前記インヒビターが、N - アセチルガラクトサミンの 4 位または 6 位の硫酸基転移酵素遺伝子の発現を抑える siRNA である、〔 3 〕に記載の薬剤、

〔 5 〕 前記インヒビターが N - アセチルガラクトサミンの 4 位または 6 位の硫酸基の脱硫酸化酵素である、〔 1 〕または〔 2 〕に記載の薬剤、

〔 6 〕 線維形成性疾患の治療用または予防用の、〔 1 〕～〔 5 〕のいずれかに記載の薬剤、

〔 7 〕 糖鎖を構成する N - アセチルガラクトサミンの 4 位または 6 位の硫酸化を阻害する化合物を選択する工程を含む、組織線維形成抑制剤のスクリーニング方法、

〔 8 〕 以下の工程 ( a ) ～ ( c ) を含む、組織線維形成抑制剤のスクリーニング方法、  
( a ) N - アセチルガラクトサミンまたは N - アセチルガラクトサミンを含有する糖鎖と、被検化合物を接触させる工程

( b ) N - アセチルガラクトサミンの 4 位または 6 位について硫酸化の程度を測定する工程

( c ) 被検化合物を接触させない場合と比較して、硫酸化の程度を低下させる化合物を選択する工程

〔 9 〕 以下の工程 ( a ) ～ ( c ) を含む、組織線維形成抑制剤のスクリーニング方法、  
( a ) N - アセチルガラクトサミンの 4 位または 6 位の硫酸基転移酵素と、被検化合物を接触させる工程

( b ) 前記酵素の硫酸基転移活性を測定する工程

( c ) 被検化合物を接触させない場合と比較して、前記活性を低下させる化合物を選択する工程

〔 1 0 〕 以下の工程 ( a ) ～ ( c ) を含む、組織線維形成抑制剤のスクリーニング方法、

( a ) N - アセチルガラクトサミンの 4 位または 6 位の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子を発現する細胞に、被検化合物を接触させる工程

( b ) 前記細胞における遺伝子の発現量を測定する工程

( c ) 被検化合物を接触させない場合と比較して、前記遺伝子の発現量を低下させる化合物を選択する工程

〔 1 1 〕 以下の工程 ( a ) ～ ( c ) を含む、組織線維形成抑制剤のスクリーニング方法、

( a ) N - アセチルガラクトサミンの 4 位または 6 位の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子の転写調節領域とレポーター遺伝子とが機能的に結合した構造を有する DNA を含む細胞または細胞抽出液と、被検化合物を接触させる工程

( b ) 前記レポーター遺伝子の発現量を測定する工程

( c ) 被検化合物を接触させない場合と比較して、前記レポーター遺伝子の発現量を低下させる化合物を選択する工程

〔 1 2 〕 以下の工程 ( a ) および ( b ) を含む、線維形成性疾患の治療または予防のための医薬組成物の製造方法、

( a ) 被検試料から、〔 7 〕～〔 1 1 〕のいずれかに記載の方法により、組織線維形成抑制剤を選択する工程

( b ) 前記薬剤と医薬的に許容される担体とを混合する工程

10

20

30

40

50

を、提供するものである。

さらに本発明は以下に関する。

〔 1 3 〕 N - アセチルガラクトサミンの 4 位または 6 位の硫酸化インヒビターを個体へ投与する工程を含む、組織線維形成を抑制する方法。

〔 1 4 〕 N - アセチルガラクトサミンの 4 位または 6 位の硫酸化インヒビターの、組織線維形成抑制剤の製造における使用。

〔 1 5 〕 組織線維形成抑制における使用のための N - アセチルガラクトサミンの 4 位または 6 位の硫酸化インヒビター。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 0 】

10

【図 1】DOX気管内投与により誘導された心筋症モデルマウスの遺伝子発現について、定量逆転写PCR法を用いて検討した結果について示した結果の図である。検討項目は、siRNAの標的遺伝子であるGalNAc4S-6ST、線維形成マーカーである  $\alpha$ -SMAとI型コラーゲンとした。グラフは目的遺伝子とhouse keeping Gene (リボソーム18S)との相対比を示している。 $*P<0.001$  (t-検定)

【図 2】塩酸ドキシルピシン (DOX:協和発酵社製) 腹腔内投与により誘導された心筋症モデルマウスにおける心重量・体重比について解析した結果について示している図である。 $*P<0.05$  (t-検定)

【図 3】DOX気管内投与により誘導された心筋症モデルマウスにおけるsiRNA治療群のI型コラーゲン沈着の抑制効果を示す組織所見を示す写真である。倍率100倍。

20

【図 4】DOX気管内投与により誘導された心筋症モデルマウスにおけるsiRNA治療群のIII型コラーゲン沈着の抑制効果を示す組織所見を示す写真である。倍率100倍。

【図 5】DOX気管内投与により誘導された心筋症モデルマウスsiRNA治療群の線維芽細胞の集積抑制効果について示した写真である。倍率50倍。

【図 6】DSSにより誘導されたマウス腸管線維形成モデルの臨床像を示すグラフである。GalNAc 4S-6ST siRNA投与により、臨床スコア (左)、大腸長の短縮 (右)とも有意に抑制されている。

【図 7】マウス腸管線維形成モデルにおける線維形成関連遺伝子の発現を示すグラフである。大腸組織におけるGalNAc 4S-6STならびに線維形成マーカーである  $\alpha$ -SMAとI型コラーゲンを検討した。グラフは目的遺伝子とhouse keeping Gene (リボソーム18S)との相対比を示している。GalNAc 4S-6ST siRNAのサイレンシング効果 (上)により、I型コラーゲン (下左)、 $\alpha$ -SMA (下右)の発現増強が有意に抑制される。

30

【図 8】マウス腸管線維形成モデルにおけるコラーゲンの組織沈着を示す写真である。大腸組織のマッソン染色像 (青)。X100。GalNAc 4S-6ST siRNAにコラーゲンの組織沈着が軽減する。

【図 9】マウス腸管線維形成モデルにおける線維芽細胞浸を示す写真である。大腸組織の線維芽細胞染色像 (茶)。X100。GalNAc 4S-6ST siRNAにより、線維芽細胞の全層性の浸潤が抑制される。

【図 10】マウス腸管線維形成モデルにおけるマクロファージ浸潤像を示す写真である。大腸組織のマクロファージ染色像 (茶)。X100。GalNAc 4S-6ST siRNAによりマクロファージの全層性の浸潤が抑制される。

40

【図 11】マウス腸管線維形成モデルにおける大腸長を示すグラフである。GalNAc 4ST siRNAにより、大腸の短縮が有意に抑制される。

【図 12】PPEにより誘導されたマウス肺気腫モデルの臨床像を示す写真である。C6ST-1 siRNA投与により、組織学的な肺胞壁破壊が顕著に抑制されている。X100。

【図 13】マウス肺気腫モデルにおける線維形成関連遺伝子の発現を示すグラフである。肺組織におけるC6ST-1ならびに線維形成マーカーである  $\alpha$ -SMAとI型コラーゲンを検討した。グラフは目的遺伝子とhouse keeping Gene (リボソーム18S)との相対比を示している。C6ST-1 siRNAのサイレンシング効果 (左)により、I型コラーゲン (中央)、 $\alpha$ -SMA (右)の発現増強が有意に抑制される。

50

【図 1 4】マウス肺気腫モデルにおける線維芽細胞浸を示す写真である。肺組織の線維芽細胞染色像（茶）。X200。C6ST-1 siRNAにより、線維芽細胞の肺胞間質における浸潤が抑制される。

【図 1 5】マウス肺気腫モデルにおけるマクロファージ浸潤像を示す写真である。肺組織のマクロファージ染色像（茶）。X200。C6ST-1 siRNAによりマクロファージの肺胞間質における浸潤が抑制される。

【図 1 6】マウス肺気腫モデルにおける静肺コンプライアンス（Cst）を示すグラフである。C6ST-1 siRNAにより、Cstは有意に低下する。

【図 1 7】マウス肺気腫モデルにおける右肺の容量（ $\mu$ l）を示すグラフである。C6ST-1 siRNAにより、肺容量は有意に低下する。

10

【図 1 8】マウス肺気腫モデルにおける線維形成関連遺伝子の発現を示すグラフである。肺組織における線維形成マーカーである  $\alpha$ -SMA、I型コラーゲンならびにTGF- $\beta$  を検討した。グラフは目的遺伝子とhouse keeping Gene（リボソーム18S）との相対比を示している。GalNACST siRNAのサイレンシングにより、各線維形成マーカーの発現増強が有意に抑制される。

【図 1 9】マウス肺気腫モデルにおける静肺コンプライアンス（Cst）を示すグラフである。GalNACST siRNAにより、Cstは有意に低下する。

【図 2 0】マウス肺気腫モデルにおける右肺の容量（ $\mu$ l）を示すグラフである。GalNACST siRNAにより、肺容量は有意に低下する。

【図 2 1】マウス 2 型糖尿病モデルにおける肥満の推移を示すグラフである。C4ST-1 siRNA、C4ST-2 siRNA、C4ST-3 siRNAにより肥満抑制傾向を示す。C4ST-2 siRNA、C4ST-3 siRNAに関しては、有意な抗肥満効果を示す。

20

【図 2 2】マウス 2 型糖尿病モデルにおけるインスリン抵抗性を示すグラフである。C4ST-1 siRNA、C4ST-2 siRNA、C4ST-3 siRNAにより、インスリン抵抗性が有意に改善する。

【図 2 3】マウス 2 型糖尿病モデルにおける膵臓組織の遺伝子発現を示す写真である。C4ST-1 siRNA、C4ST-2 siRNA、C4ST-3 siRNAにより、膵臓組織のC4ST-1、C4ST-2、C4ST-3遺伝子発現が抑制される。

【図 2 4】マウス 2 型糖尿病モデルにおける膵臓isletへのAPP沈着を示す写真である。C4ST-2 siRNAにより、isletのAPP（緑）沈着が抑制される。細胞核（赤）、x400。

【図 2 5】マウス 2 型糖尿病モデルにおける膵臓isletへの線維芽細胞浸潤を示す写真である。C4ST-1 siRNA、C4ST-2 siRNA、C4ST-3 siRNAにより、isletへの線維芽細胞（茶）浸潤が抑制される。X200。

30

【図 2 6】マウス 2 型糖尿病モデルにおける膵臓isletへのマクロファージ浸潤を示す写真である。C4ST-1 siRNA、C4ST-2 siRNA、C4ST-3 siRNAにより、isletへのマクロファージ（茶）浸潤が抑制される。X200。

【図 2 7】マウス 2 型糖尿病モデルにおけるインスリン抵抗性を示す図である。GalNACST siRNA投与により、インスリン負荷後の血糖降下が良好に行なわれる、すなわち、インスリン抵抗性が改善していることを示す。

【図 2 8】マウス糖尿病性腎症モデルにおける線維芽細胞の腎組織間質集積を示すグラフ及び写真である。C4ST-1 siRNAにより、線維芽細胞（茶）の集積が有意に抑制される。X200。

40

【図 2 9】マウス糖尿病性腎症モデルにおけるマクロファージの腎組織間質集積を示すグラフ及び写真である。C4ST-1 siRNAにより、マクロファージ（茶）の集積が有意に抑制される。X200。

【図 3 0】マウス糖尿病性腎症モデルにおける  $\alpha$ -SMA陽性細胞の腎組織間質集積を示す写真である。C4ST-1 siRNAにより、 $\alpha$ -SMA陽性細胞（茶）の集積が有意に抑制される。X200。

【図 3 1】マウス糖尿病性腎症モデルにおける抗線維形成効果を示すグラフである。GalNAC4S-6ST（G#1）siRNAの投与により、腎組織におけるGalNAC4S-6ST（G#1）、 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$  の発現増強が有意に抑制される。ARB；アンギオテンシン受容体拮抗剤（バルサルタン

50

)。

【図32】マウス糖尿病性腎症モデルにおける線維芽細胞の腎組織間質集積を示す写真及びグラフである。GalNAc4S-6ST (G#1) siRNAにより、線維芽細胞 (茶) の集積が有意に抑制される。X200。

【図33】マウス糖尿病性腎症モデルにおけるマクロファージの腎組織間質集積を示す写真及びグラフである。GalNAc4S-6ST (G#1) siRNAにより、マクロファージ (茶) の集積が有意に抑制される。X200。

【図34】マウス糖尿病性腎症モデルにおけるタイプIVコラーゲンの蓄積を示す写真及びグラフである。GalNAc4S-6ST (G#1) siRNAにより、タイプIVコラーゲン (茶) 陽性で確認できる糸球体基底膜の肥厚が有意に抑制される。X400。

【図35】マウス糖尿病性腎症モデルにおける腎保護作用を示すグラフである。GalNAc4S-6ST (G#1) siRNAにより、腎組織のアンギオテンシノーゲンならびにACEの発現増強が有意に抑制される。

【図36】マウス糖尿病性腎症モデルにおける腎機能保護作用を示すグラフである。GalNAc4S-6ST (G#1) siRNAにより、血清クレアチニンの増加すなわち腎機能低下が抑制される。

【図37】マウス糖尿病性腎症モデルにおける遺伝子発現を示すグラフである。GalNAcST siRNAにより、腎組織におけるGalNAc4ST-1、GalNAc4ST-2、GalNAc4S-6STの発現増強が有意に抑制される。

【図38】マウス糖尿病性腎症モデルにおける抗線維形成効果を示すグラフである。GalNAcST siRNAにより、腎組織におけるCTGF、SMA、タイプIコラーゲン、ACEの発現増強が有意に抑制される。

【図39】マウス薬剤性間質性腎炎における遺伝子発現を示すグラフである。GalNAc4S-6ST (G#1) siRNAにより、腎組織のGalNAc4S-6ST (G#1) の発現増強が有意に抑制される。

【図40】マウス薬剤性間質性腎炎におけるコラーゲン沈着を示す写真である。GalNAc4S-6ST (G#1) siRNAにより、腎間質へのタイプIコラーゲン (茶) の沈着が明確に減少する。X200。

【図41】マウスUUO線維形成モデルにおける抗線維形成効果を示すグラフである。C6ST siRNAにより、腎組織におけるC6ST-2 (G#10)、TGF、SMA、タイプIコラーゲン、CTGFの発現増強が有意に抑制される。

【図42】マウスUUO線維形成モデルにおける線維芽細胞の間質集積を示すグラフ及び写真である。C6ST siRNAにより、線維芽細胞 (茶) の傍糸球体から間質における集積が有意に抑制される。X200。

【図43】マウスUUO線維形成モデルにおけるマクロファージの間質集積を示すグラフ及び写真である。C6ST siRNAにより、マクロファージ (茶) の傍糸球体から間質における集積が有意に抑制される。X200。

【図44】マウスUUO線維形成モデルにおけるコラーゲンの沈着を示すグラフ及び写真である。C6ST siRNAにより、タイプIVコラーゲン (茶) で確認される糸球体基底膜の肥厚が有意に抑制される。X400。

【図45】マウスUUO線維形成モデルにおける組織集積線維芽細胞の活性化を示す写真である。C6ST siRNAにより、SMA陽性細胞 (茶) の傍糸球体から間質における集積が有意に抑制される。X400。

【図46】マウスUUO線維形成モデルにおけるACE産生細胞の間質集積を示す写真である。C6ST siRNAにより、ACE産生細胞 (茶) の傍糸球体から間質における集積が有意に抑制される。X400。

【図47】マウス糖尿病性網膜症モデルにおけるタイプIVコラーゲンの組織蓄積を示す写真である。GalNAc4S-6ST (G#1) siRNAにより、タイプIVコラーゲン (茶) の集積が抑制される。X200。GCL; 神経節細胞層、INL; 内顆粒層、ONL; 外顆粒層。

【図48】マウス糖尿病性網膜症モデルにおけるCSPGの組織蓄積を示す写真である。GalNAc4S-6ST (G#1) siRNAにより、CSPG (茶) の集積が抑制される。特にGCL、ONLから色素上

10

20

30

40

50

皮細胞層における抑制効果が顕著である。X200。

【図 4 9】マウス糖尿病性網膜症モデルにおけるGFAP陽性細胞を示す写真である。GalNac4S-6ST (G#1) siRNAにより、GFAP陽性細胞（茶）がINLからGCLにかけて顕著に増加している。X200。

【図 5 0】マウス糖尿病性網膜症モデルにおける神経節細胞数を示すグラフである。GCLにおける神経節細胞数のカウント。GalNac4S-6ST (G#1) siRNAにより神経節細胞数の減少が有意に抑制できる。

【図 5 1】マウス糖尿病性網膜症モデルにおける視神経再生効果を示すグラフである。GalNac4S-6ST (G#1) siRNAにより、眼組織のGSの発現が有意に上昇する。

【図 5 2】マウス脂肪性肝障害モデルにおける遺伝子発現を示すグラフである。GalNac4S-6STの肝臓組織における発現増強と、GalNacST siRNAによる有意な抑制。

【図 5 3】マウス脂肪性肝障害モデルにおける線維形成関連遺伝子発現を示すグラフである。タイプIコラーゲン、SAMの肝臓組織における発現増強と、GalNacST siRNAによる有意な抑制。

【図 5 4】マウス脂肪性肝障害モデルにおける線維形成細胞浸潤を示す写真である。GalNacST siRNAにより、線維芽細胞（茶）の肝臓組織におけるブリッジ様集積が抑制されている。X100。

【図 5 5】マウス脂肪性肝障害モデルにおける臨床的線維形成スコアを示すグラフである。GalNacST siRNAにより、肝臓組織の線維形成スコアの上昇が有意に抑制されている。

【図 5 6】マウス脂肪性肝障害モデルにおけるマクロファージ浸潤を示す写真である。GalNacST siRNAにより、マクロファージ（茶）の肝臓組織における集積が抑制されている。X100。

【図 5 7】マウス脂肪性肝障害モデルにおける脂質代謝関連遺伝子発現を示すグラフである。GalNacST siRNAにより、肝臓組織におけるChREBP、ACC2の発現上昇が有意に抑制される。

【図 5 8】マウス脂肪性肝障害モデルにおける線維形成細胞浸潤を示す写真である。C4ST-1 siRNA、C4ST-2 siRNA、C4ST-3 siRNAにより、線維芽細胞（茶）の肝臓組織におけるブリッジ様集積が抑制されている。X100。

【図 5 9】マウス脂肪性肝障害モデルにおける臨床的線維形成スコアを示すグラフである。C4ST-1 siRNA、C4ST-2 siRNA、C4ST-3 siRNAにより、肝臓組織の線維形成スコアの上昇が有意に抑制されている。

【図 6 0】マウス脂肪性肝障害モデルにおける臨床的肝障害を示すグラフである。C4ST-1 siRNA、C4ST-2 siRNA、C4ST-3 siRNAにより、肝細胞障害の指標である、ALTの上昇が抑制されている。

【図 6 1】マウス肝線維症モデルにおける線維芽細胞浸潤を示す写真である。C6ST siRNAにより、線維芽細胞（茶）の肝臓組織における集積が抑制されている。X50。

【図 6 2】マウス肝線維症モデルにおける臨床的線維形成スコアを示すグラフである。C6ST siRNAにより、肝臓組織の線維形成スコアの上昇が有意に抑制されている。

【図 6 3】マウス肝線維症モデルにおける抗線維形成効果を示すグラフである。C6ST siRNAにより、ある SMA、タイプIコラーゲン、CTGF、TGF の発現が有意に抑制される。

【図 6 4】マウスパーキンソン病モデルにおける抗線維形成効果を示すグラフである。GalNac4S-6ST siRNAにより、脳組織のGalNac4S-6ST、TGF、タイプIコラーゲン、SMAの発現が有意に抑制される。

【図 6 5】マウスパーキンソン病モデルにおける線維芽細胞集積を示す写真である。GalNac4S-6ST siRNAにより、線維芽細胞（茶）の脳組織集積が激減する。X200。

【図 6 6】マウスパーキンソン病モデルにおける神経保護作用を示すグラフである。GalNac4S-6ST siRNAにより、GDNF、Nurr1の発現が有意に増強する。

【図 6 7】マウスパーキンソン病モデルにおけるドーパミン神経再生効果を示す写真である。GalNac4S-6ST siRNAにより、TH陽性ドーパミン神経（緑）の損失が抑制される。X200。

。

10

20

30

40

50

【図68】マウスパーキンソン病モデルにおけるドーパミン神経再生効果を示す写真である。GalNAc4ST siRNAにより、TH陽性ドーパミン神経（緑）の損失が抑制される。X200。

【図69】2型糖尿病性網膜症モデルマウスにおける、C4-サルファターゼのCSPGの減弱効果を示す写真である。2型糖尿病モデルマウス網膜におけるCSPG（CS56）染色像（茶色、矢印）を示す。

【図70】2型糖尿病性網膜症モデルマウスにおける、C4-サルファターゼの血管増殖抑制効果を示す写真である。2型糖尿病モデルマウス網膜における血管内皮細胞（CD31）染色像（茶色、矢印）を示す。

【図71】2型糖尿病性網膜症モデルマウスにおける、C4-サルファターゼのコラーゲン増殖抑制効果を示す写真である。2型糖尿病モデルマウス網膜におけるIV型コラーゲン染色像（茶色、矢印）を示す。

【図72】マウス2型糖尿病モデルの肝臓におけるC4-サルファターゼの線維芽細胞の集積抑制効果について示した写真である。倍率50倍と100倍。

【図73】マウス2型糖尿病モデルの肝臓におけるマクロファージ浸潤抑制効果について示した写真である。倍率50倍と100倍。

【図74】マウス2型糖尿病モデルの血清中の生化学検査（AST, ALT, TG）の結果について示すグラフである。グラフ中、未治療群はunt、対照群はnor、C4-サルファターゼはC4sulと表記する。

【図75】脳組織におけるCSPGの局在を示す写真である。当該写真は、脳組織中におけるCSPGの発現動態について酵素抗体免疫染色法を用いて解析を行った結果である。一次抗体はCS-56（生化学工業社製）、マウスステインキットを用いて染色を行った。

【図76】脳組織中におけるドーパミン作動性神経の局在を示す写真である。蛍光免疫染色法を用いて解析を行った結果である。

【図77】Real-time PCR法によるTNF- $\alpha$ の遺伝子発現解析の結果を示すグラフである。グラフは線維化マーカーであるTGF- $\beta$ 、マクロファージ浸潤に伴う炎症の指標であるTNF- $\alpha$ の発現についてReal-time PCRにて検討した結果について示している。

【図78】Real-time PCR法によるNurr1遺伝子発現解析の結果を示すグラフである。グラフは、脳組織中におけるNurr1の遺伝子発現について、Cyber premix kit（タカラバイオ社製）とReal-time PCR thermal cycler DICE（タカラバイオ社製）を用いて行った。また、グラフはNurr1とhouse keeping Gene（ $\beta$ -actin）との相対比を示している。

【0011】

〔発明を実施するための形態〕

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、糖鎖を構成する糖の中の一つであるN-アセチルガラクトサミンにおいて、その4位または6位の部位の硫酸化を阻害することを機序とする、組織線維形成抑制剤に関する。

即ち本発明は、N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸化インヒビター（本明細書において、「本発明のインヒビター」あるいは単に「インヒビター」と記載する場合あり）を成分とする、組織線維形成抑制剤を提供する。

【0012】

本発明の「N-アセチルガラクトサミン（N-acetylgalactosamine；GalNAc）」とは、ヘキソサミンの一種であるガラクトサミンのN-アセチル体である。

また、N-アセチルガラクトサミンは、1～6位の部位が化学修飾を受けることが知られている。

本発明は、N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の部位の硫酸化を阻害することを特徴とする。

本発明のインヒビターによって阻害される部位は、具体的には下記のGalNAcの化学式において矢印で表される部位である。

【0013】

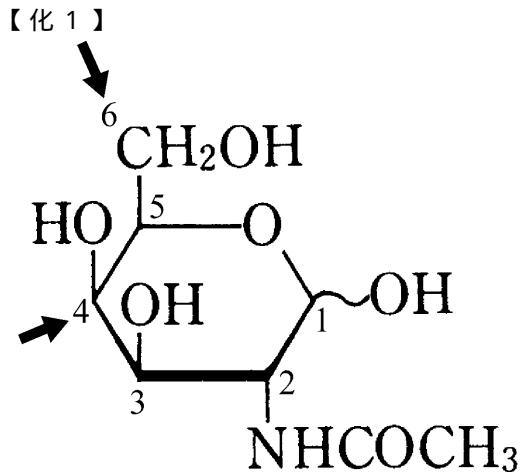
10

20

30

40





10

## 【 0 0 1 4 】

本発明のインヒビターにおいて硫酸化が阻害されるGlcNAc上の部位は、4位もしくは6位であるが、4位と6位の双方の硫酸化が阻害される場合も本発明に含まれる。また、本発明のGlcNAcは、好ましくは、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)中に含まれる糖である。

## 【 0 0 1 5 】

本発明において硫酸化が阻害されるとは、GlcNAc上の4位もしくは6位の部位に硫酸基が転移されるのを阻害すること、または、既に硫酸化された部位から硫酸基が取り除かれる、あるいは別の化学修飾に置換されること等を意味する。

20

## 【 0 0 1 6 】

本発明における組織線維形成抑制剤（本明細書において、「本発明の薬剤」と記載する場合あり）は、好ましくは、生体組織(in vivo)における線維形成に対して抑制効果を有することを特徴とする。

## 【 0 0 1 7 】

本発明の薬剤によって線維形成が抑制される組織としては、特に制限されないが、例えば、心臓組織、消化管組織、肺組織、膵臓組織、腎臓組織、眼組織、肝臓組織、脳神経組織、または皮膚組織等を挙げることができる。

30

## 【 0 0 1 8 】

本発明において「線維形成」は、「Fibrogenesis」と表現することもできる。また、「組織上の線維形成性病変」、「線維形成性組織変化」、「組織線維新生」等のような表現を用いて表すことができる。

## 【 0 0 1 9 】

本発明のインヒビターとしては、N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸化を阻害する作用を有する物質であれば特に限定されない。

本発明におけるインヒビターの好ましい態様としては、例えば、N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素の機能を阻害する活性を有する物質を挙げることができる。

40

## 【 0 0 2 0 】

前記物質の好ましい態様としては、例えば以下の(a)～(c)からなる群より選択される化合物(核酸)を挙げることができる。

(a) N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子の転写産物またはその一部に対するアンチセンス核酸

(b) N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子の転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有する核酸

(c) N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子の発現をRNAi効果により阻害する作用を有する核酸(硫酸基転移酵素遺伝子の発現を抑えるsiRNA)

50

## 【 0 0 2 1 】

また「硫酸化阻害作用を有する物質」としては、例えば以下の( a ) ~ ( c ) からなる群より選択される化合物を挙げることができる。

- ( a ) N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素と結合する抗体
- ( b ) N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素変異体
- ( c ) N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素と結合する低分子化合物

## 【 0 0 2 2 】

本発明のインヒビターの他の態様としては、例えばN-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基を脱硫酸化させる作用を有する物質を挙げることができる。該物質としては、例えば、N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基を脱硫酸化させる酵素(脱硫酸化酵素)を挙げることができる。

N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基の「脱硫酸化」とは、N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基が除去されることを指す。

脱硫酸化酵素としては、例えば、Chondroitin-4-sulfatase ( C4-サルファターゼ )、Chondroitin-6-sulfatase等が挙げられる。

## 【 0 0 2 3 】

本発明における硫酸基転移酵素としては、GalNAcの4位または6位に硫酸基を転移する活性を有する酵素であれば特に制限されないが、例えば、以下の酵素を挙げることができる。

- 1 ) GalNAc4ST-1: N-acetylgalactosamine 4-sulfotransferase-1  
別名CHST8:Carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-O) sulfotransferase 8
- 2 ) GalNAc4ST-2  
別名CHST9:Carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-O) sulfotransferase 9
- 3 ) C4ST-1: chondroitin-4-O-sulfotransferase-1  
別名CHST11:Carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 11
- 4 ) C4ST-2  
別名CHST12
- 5 ) C4ST-3  
別名CHST13
- 6 ) C6ST-1: chondroitin-6-O-sulfotransferase-1  
別名CHST3: Carbohydrate (chondroitin 6) sulfotransferase 3
- 7 ) GalNAc4S-6ST: N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O sulfotransferase
- 8 ) D4ST-1:dermatan 4 sulfotransferase 1
- 9 ) C6ST-2: chondroitin-6-O-sulfotransferase-2  
別名CHST7: Carbohydrate (chondroitin 6) sulfotransferase 7

## 【 0 0 2 4 】

また、このような特徴を共有する酵素群は、必ずしもゲノムDNA上の一遺伝子に対応するものではない。例えば、chondroitin-4-sulfatase、chondroitin-6-sulfataseは、ともにゲノムデータベース上の複数のアクセッション番号で参照される配列(例えばGenbank アクセッション番号NT\_039500(その一部はアクセッション番号CAAA01098429(配列番号: 1)としてあらわされる)、NT\_078575、NT\_039353、NW\_001030904、NW\_001030811、NW\_001030796、NW\_000349)として公共遺伝子データベースGenbankから取得することができる。

## 【 0 0 2 5 】

本発明における硫酸基転移酵素の公共遺伝子データベースGenbankにおけるアクセッション番号、塩基配列、アミノ酸配列としては、以下を例示することができる。  
GalNAc4ST-1(アクセッション番号NM\_175140、塩基配列の配列番号: 2、アミノ酸配列の配列番号: 3)

GalNAc4ST-2(アクセッション番号NM\_199055、塩基配列の配列番号: 4、アミノ酸配列の

10

20

30

40

50

配列番号：5)

C4ST-1 (アクセッション番号NM\_021439、塩基配列の配列番号：6、アミノ酸配列の配列番号：7)

C4ST-2 (アクセッション番号NM\_021528、塩基配列の配列番号：8、アミノ酸配列の配列番号：9)

C4ST-3 (アクセッション番号XM\_355798、塩基配列の配列番号：10、アミノ酸配列の配列番号：11)

D4ST (アクセッション番号NM\_028117、塩基配列の配列番号：12、アミノ酸配列の配列番号：13)

C6ST-1 (アクセッション番号NM\_016803、塩基配列の配列番号：14、アミノ酸配列の配列番号：15)

C6ST-2 (アクセッション番号AB046929、塩基配列の配列番号：16、アミノ酸配列の配列番号：17)

GaINAc4S-6ST (アクセッション番号NM\_015892、塩基配列の配列番号：18、アミノ酸配列の配列番号：19)

【0026】

上記以外のタンパク質であっても、例えば配列表に記載された配列と高い相同性（通常70%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）を有し、かつ、上記タンパク質が有する機能（例えば細胞内の構成成分と結合する機能等）を持つタンパク質は、本発明の上記タンパク質に含まれる。上記タンパク質とは、例えば、配列番号：3、5、7、9、11、13、15、17のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が付加、欠失、置換、挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、通常変化するアミノ酸数が30アミノ酸以内、好ましくは10アミノ酸以内、より好ましくは5アミノ酸以内、最も好ましくは3アミノ酸以内である。

【0027】

本発明における上記遺伝子には、例えば、配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAに対応する他の生物における内在性の遺伝子（ヒトの上記遺伝子のホモログ等）が含まれる。

【0028】

また、配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAに対応する他の生物の内在性のDNAは、一般的に、それぞれ配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16のいずれかに記載のDNAと高い相同性を有する。高い相同性とは、50%以上、好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上（例えば、95%以上、さらには96%、97%、98%または99%以上）の相同性を意味する。この相同性は、mBLASTアルゴリズム (Altschul et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-8; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-7) によって決定することができる。また、該DNAは、生体内から単離した場合、それぞれ配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16に記載のDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズすると考えられる。ここで「ストリンジентな条件」としては、例えば「2×SSC、0.1% SDS、50℃」、「2×SSC、0.1% SDS、42℃」、「1×SSC、0.1% SDS、37℃」、「よりストリンジентな条件として「2×SSC、0.1% SDS、65℃」、「0.5×SSC、0.1% SDS、42℃」および「0.2×SSC、0.1% SDS、65℃」の条件を挙げることができる。

【0029】

当業者は、上記の高い相同性を持つタンパク質から、上記のタンパク質に機能的に同等なタンパク質を、N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の脱硫酸化作用または硫酸化阻害作用の活性測定方法を用いることにより適宜取得することができる。

【0030】

また当業者においては、他の生物における上記遺伝子に相当する内在性の遺伝子を、上記遺伝子の塩基配列を基に適宜取得することが可能である。なお、本明細書においては、

ヒト以外の生物における上記タンパク質および遺伝子に相当する上記タンパク質および遺伝子、あるいは、上述のタンパク質および遺伝子と機能的に同等な上記タンパク質および遺伝子も、単に上記の名称で記載する場合がある。

【0031】

本発明の上記タンパク質は、天然のタンパク質としてのほか、遺伝子組み換え技術を利用した組換えタンパク質として調製することができる。天然のタンパク質としては、例えば上記タンパク質が発現していると考えられる細胞（組織）の抽出液に対し、上記タンパク質に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いる方法により調製することが可能である。一方、組換えタンパク質は、例えば、上記タンパク質をコードするDNAで形質転換した細胞を培養することにより、調製することが可能である。本発明の上記タンパク質は、例えば、後述のスクリーニング方法において好適に用いられる。

10

【0032】

本発明における「核酸」とはRNAまたはDNAを意味する。また所謂PNA (peptide nucleic acid) 等の化学合成核酸アナログも、本発明の核酸に含まれる。PNAは、核酸の基本骨格構造である五単糖・リン酸骨格を、グリシンを単位とするポリアミド骨格に置換したもので、核酸によく似た3次元構造を有する。

【0033】

特定の内在性遺伝子の発現を阻害する方法としては、アンチセンス技術を利用する方法が当業者によく知られている。アンチセンス核酸が標的遺伝子の発現を阻害する作用としては、以下のような複数の要因が存在する。即ち、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作られた部位とのハイブリッド形成による転写阻害、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におけるハイブリッド形成によるスプライシング阻害、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阻害、mRNAとのハイブリッド形成による核から細胞質への移行阻害、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阻害、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阻害、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阻害、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害、および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阻害などである。このようにアンチセンス核酸は、転写、スプライシングまたは翻訳など様々な過程を阻害することで、標的遺伝子の発現を阻害する（平島および井上，新生化学実験講座2 核酸IV遺伝子の複製と発現，日本生化学会編，東京化学同人，1993，319-347.）。

20

30

【0034】

本発明で用いられるアンチセンス核酸は、上記のいずれの作用により、上述の硫酸基転移酵素のいずれかをコードする遺伝子の発現および/または機能を阻害してもよい。

【0035】

一つの態様としては、上述の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子のmRNAの5'端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的と考えられる。また、コード領域もしくは3'側の非翻訳領域に相補的な配列も使用することができる。このように、上述の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子の翻訳領域だけでなく、非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含む核酸も、本発明で利用されるアンチセンス核酸に含まれる。使用されるアンチセンス核酸は、適当なプロモーターの下流に連結され、好ましくは3'側に転写終結シグナルを含む配列が連結される。このようにして調製された核酸は、公知の方法を用いることで所望の動物（細胞）に形質転換することができる。アンチセンス核酸の配列は、形質転換される動物（細胞）が有する内在性の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を有効に抑制できる限りにおいて、完全に相補的でなくてもよい。転写されたRNAは標的遺伝子の転写産物に対して好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相補性を有する。アンチセンス核酸を用いて標的遺伝子の発現を効果的に阻害するには、アンチセンス核

40

50

酸の長さは少なくとも15塩基以上25塩基未満であることが好ましいが、本発明のアンチセンス核酸は必ずしもこの長さに限定されず、例えば100塩基以上、または500塩基以上であってもよい。

【0036】

本発明のアンチセンス核酸は特に制限されないが、例えばC4ST-1 (GenBankのアクセッション番号NM\_021439、配列番号：6)、C4ST-2 (GenBankのアクセッション番号NM\_021528、配列番号：8)、C4ST-3 (GenBankのアクセッション番号XM\_355798、配列番号：10)等をもとに作成することができる。

【0037】

上述の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子の発現の阻害は、リボザイム、またはリボザイムをコードするDNAを利用して行うことも可能である。リボザイムとは触媒活性を有するRNA分子を指す。リボザイムには種々の活性を有するものが存在するが、中でもRNAを切断する酵素としてのリボザイムに焦点を当てた研究により、RNAを部位特異的に切断するリボザイムの設計が可能となった。リボザイムには、グループIイントロン型やRNase Pに含まれるM1 RNAのように400ヌクレオチド以上の大きさのものもあるが、ハンマーヘッド型やヘアピン型と呼ばれる40ヌクレオチド程度の活性ドメインを有するものもある (小泉誠および大塚栄子, タンパク質核酸酵素, 1990, 35, 2191.)。

【0038】

例えば、ハンマーヘッド型リボザイムの自己切断ドメインは、G13U14C15という配列のC15の3'側を切断するが、その活性にはU14とA9との塩基対形成が重要とされ、C15の代わりにA15またはU15でも切断され得ることが示されている (Koizumi, M. et al., FEBS Lett, 1988, 228, 228.)。基質結合部位が標的部位近傍のRNA配列と相補的なリボザイムを設計すれば、標的RNA中のUC、UUまたはUAという配列を認識する制限酵素的なRNA切断リボザイムを作出することができる (Koizumi, M. et al., FEBS Lett, 1988, 239, 285.; 小泉誠および大塚栄子, タンパク質核酸酵素, 1990, 35, 2191.; Koizumi, M. et al., Nucl Acids Res, 1989, 17, 7059.)。

【0039】

また、ヘアピン型リボザイムも本発明の目的に有用である。このリボザイムは、例えばタバコリングスポットウイルスのサテライトRNAのマイナス鎖に見出される (Buzayan, JM., Nature, 1986, 323, 349.)。ヘアピン型リボザイムからも、標的特異的なRNA切断リボザイムを作出することが示されている (Kikuchi, Y. and Sasaki, N., Nucl Acids Res, 1991, 19, 6751.; 菊池洋, 化学と生物, 1992, 30, 112.)。このように、リボザイムを用いて上述の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子の転写産物を特異的に切断することで、該遺伝子の発現を阻害することができる。

【0040】

内在性遺伝子の発現の抑制は、さらに、標的遺伝子配列と同一もしくは類似した配列を有する二本鎖RNAを用いたRNA干渉 (RNA interference、以下「RNAi」と略称する) によっても行うことができる。

【0041】

近年のゲノムプロジェクトの完了によってヒトの全塩基配列が解読され数多くの疾患関連遺伝子が盛んに同定されている現在、特定の遺伝子を標的とした治療法、創薬開発が盛んに実施されている。中でも特異的転写後抑制効果を発揮するsmall interfering RNA (siRNA) の遺伝子治療への応用が注目されている。

RNAiは1998年にFireらによって発見された現象 (Fire A, Nature (1998) 391, :806-811) で、二本鎖RNA (double strand RNA) が相同な標的遺伝子の発現を強力に抑制するというものである。従来のベクター等を用いる遺伝子導入法に比べ簡便であり、標的に対する特異性が高く、遺伝子治療への応用が可能であるということで最近注目されている。また哺乳類細胞においては、短鎖dsRNA (siRNA) を用いることにより、RNAiを誘導する事が可能で、RNAiは、ノックアウトマウスと比較して、効果が安定、実験が容易、費用が安価であるなど、多くの利点を有している。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 2 】

RNAi効果による阻害作用を有する核酸は、一般的にsiRNAもしくはshRNAとも呼ばれる。RNAiは、標的遺伝子のmRNAと相同な配列からなるセンスRNAとこれと相補的な配列からなるアンチセンスRNAとからなる短鎖二本鎖RNA（以下、「dsRNA」と略称する）を細胞等に導入することにより、標的遺伝子mRNAに特異的かつ選択的に結合して破壊を誘導し、当該標的遺伝子を切断することにより標的遺伝子の発現を効率よく阻害する（抑制する）現象である。例えば、dsRNAを細胞内に導入すると、そのRNAと相同配列の遺伝子の発現が抑制（ノックダウン）される。このようにRNAiは、標的遺伝子の発現を抑制し得ることから、従来の煩雑で効率の低い相同組換えによる遺伝子破壊方法に代わる簡易な遺伝子ノックアウト方法として、または、遺伝子治療への応用可能な方法として注目されている。

10

## 【 0 0 4 3 】

本発明において、RNAiに用いるRNAは、上述の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子もしくは該遺伝子の部分領域と必ずしも完全に同一である必要はないが、完全な相同性を有することが好ましい。また、末端部は2塩基程度のオーバーハングを有していてもよい。

## 【 0 0 4 4 】

siRNAの設計にあたっては、ターゲットとしては上述の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子であれば特に限定されるものではなく、任意の領域を全てターゲット候補とすることが可能である。

## 【 0 0 4 5 】

例えば、C4ST-1遺伝子の塩基配列（配列番号：6）、C4ST-2遺伝子の塩基配列（配列番号：8）、C4ST-3遺伝子の塩基配列（配列番号：10）等をもとに作成することができる。より具体的には、その配列の一部の領域をターゲット候補とすることが可能であり、例えば、C4ST-1遺伝子の塩基配列の一部領域（配列番号：20）、C4ST-2遺伝子の塩基配列の一部領域（配列番号：21）、C4ST-3遺伝子の塩基配列の一部領域（配列番号：22）、C6ST-1遺伝子の塩基配列の一部領域（配列番号：23）、C6ST-2遺伝子の塩基配列の一部領域（配列番号：24）、等をもとに作成することができる。さらに具体的には、本明細書によって具体的に示されたDNA配列（配列番号：25、26、35～50、55～65、82～88）を標的とするsiRNAが例示できる。

20

## 【 0 0 4 6 】

siRNAを細胞に導入するには、in vitroで合成したsiRNAをプラスミドDNAに連結してこれを細胞に導入する方法、2本のRNAをアニールする方法などを採用することができる。

30

## 【 0 0 4 7 】

また上記2本のRNA分子は、ここで一方の端が閉じた構造の分子、例えば、ヘアピン構造を有するsiRNA（shRNA）であってもよい。shRNAとは、ショートヘアピンRNA（short hairpin RNA）と呼ばれ、一本鎖の一部の領域が他の領域と相補鎖を形成するためにステムループ構造を有するRNA分子である。即ち、分子内において二本鎖RNA構造を形成し得る分子もまた本発明のsiRNAに含まれる。

## 【 0 0 4 8 】

また本発明の好ましい態様としては、C4ST-1、C4ST-2、C4ST-3等の発現をRNAi効果により抑制し得るRNA（siRNA）であって、本明細書によって具体的に示されたDNA配列（配列番号：25、26、35～50、55～65、82～88）を標的とするsiRNAにおいて、例えば、1もしくは少数のRNAが付加もしくは欠失された構造の二本鎖RNAであっても、上述の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子の発現を抑制する機能を有するものであれば、本発明のsiRNAに含まれる。

40

## 【 0 0 4 9 】

RNAi（siRNA）のために使用されるRNAは、上記タンパク質をコードする遺伝子もしくは該遺伝子の部分領域と完全に同一（相同）である必要はないが、完全な同一（相同）性を有することが好ましい。

## 【 0 0 5 0 】

RNAi機構の詳細については未だに不明な部分もあるが、DICERといわれる酵素（RNase I

50

II核酸分解酵素ファミリーの一種)が二本鎖RNAと接触し、二本鎖RNAがsmall interfering RNAまたはsiRNAと呼ばれる小さな断片に分解されるものと考えられている。本発明におけるRNAi効果を有する二本鎖RNAには、このようにDICERによって分解される前の二本鎖RNAも含まれる。即ち、そのままの長さではRNAi効果を有さないような長鎖のRNAであっても、細胞においてRNAi効果を有するsiRNAへ分解されることが期待されるため、本発明における二本鎖RNAの長さは、特に制限されない。

【0051】

例えば、上述の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子のmRNAの全長もしくはほぼ全長の領域に対応する長鎖二本鎖RNAを、例えば、予めDICERで分解させ、その分解産物を本発明の薬剤として利用することが可能である。この分解産物には、RNAi効果を有する二本鎖RNA分子(siRNA)が含まれることが期待される。この方法によれば、RNAi効果を有することが期待されるmRNA上の領域を、特に選択しなくともよい。即ち、RNAi効果を有する本発明の上述の遺伝子のmRNA上の領域は、必ずしも正確に規定される必要はない。

【0052】

本発明の上記「RNAi効果により抑制し得る二本鎖RNA」は、当業者においては、該二本鎖RNAの標的となる上述の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子の塩基配列を基に、適宜作製することができる。一例を示せば、配列番号：25に記載の塩基配列をもとに、本発明の二本鎖RNAを作製することができる。即ち、配列番号：25に記載の塩基配列をもとに、該配列の転写産物であるmRNAの任意の連続するRNA領域を選択し、この領域に対応する二本鎖RNAを作製することは、当業者においては、通常の試行の範囲内において適宜行い得ることである。また、該配列の転写産物であるmRNA配列から、より強いRNAi効果を有するsiRNA配列を選択することも、当業者においては、公知の方法によって適宜実施することが可能である。また、一方の鎖が判明していれば、当業者においては容易に他方の鎖(相補鎖)の塩基配列を知ることができる。siRNAは、当業者においては市販の核酸合成機を用いて適宜作製することが可能である。また、所望のRNAの合成については、一般の合成受託サービスを利用することができる。

【0053】

また、本発明におけるsiRNAは、必ずしも標的配列に対する一組の2本鎖RNAである必要はなく、標的配列を含んだ領域に対する複数組の2本鎖RNAの混合物であってもよい。ここで標的配列に対応した核酸混合物としてのsiRNAは、当業者においては市販の核酸合成機およびDICER酵素を用いて適宜作成することが可能であり、また、所望のRNAの合成については、一般の合成受託サービスを利用することができる。なお、本発明のsiRNAには、所謂「カクテルsiRNA」が含まれる。

【0054】

また、本発明におけるsiRNAは、必ずしも全てのヌクレオチドがリボヌクレオチド(RNA)でなくともよい。即ち、本発明において、siRNAを構成する1もしくは複数のリボヌクレオチドは、対応するデオキシリボヌクレオチドであってもよい。この「対応する」とは、糖部分の構造は異なるものの、同一の塩基種(アデニン、グアニン、シトシン、チミン(ウラシル))であることを指す。例えば、アデニンを有するリボヌクレオチドに対応するデオキシリボヌクレオチドとは、アデニンを有するデオキシリボヌクレオチドのことを言う。また、前記「複数」とは特に制限されないが、好ましくは2~5個程度の少数を指す。

【0055】

さらに、本発明の上記RNAを発現し得るDNA(ベクター)もまた、本発明の上述のタンパク質をコードする遺伝子の発現を抑制し得る化合物の好ましい態様に含まれる。例えば、本発明の上記二本鎖RNAを発現し得るDNA(ベクター)は、該二本鎖RNAの一方の鎖をコードするDNA、および該二本鎖RNAの他方の鎖をコードするDNAが、それぞれ発現し得るようにプロモーターと連結した構造を有するDNAである。本発明の上記DNAは、当業者においては、一般的な遺伝子工学技術により、適宜作製することができる。より具体的には、本発明のRNAをコードするDNAを公知の種々の発現ベクターへ適宜挿入することによって、本発

明の発現ベクターを作製することが可能である。

【0056】

また、本発明の発現阻害物質には、上述の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子の発現調節領域（例えば、プロモーター領域）と結合することにより、上述の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子の発現を阻害する化合物が含まれる。該化合物は、例えば上述の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子のプロモーターDNA断片を用いて、該DNA断片との結合活性を指標とするスクリーニング方法により、取得することが可能である。また当業者においては、所望の化合物について、上述の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子の発現を阻害するかどうかの判定を公知の方法、例えばレポーターアッセイ法等により適宜実施することができる。

10

【0057】

さらに、本発明の上記RNAを発現し得るDNA（ベクター）もまた、本発明の上述の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子の発現を阻害し得る化合物の好ましい態様に含まれる。例えば本発明の上記二本鎖RNAを発現し得るDNA（ベクター）は、該二本鎖RNAの一方の鎖をコードするDNA、および該二本鎖RNAの他方の鎖をコードするDNAが、それぞれ発現し得るようにプロモーターと連結した構造を有するDNAである。本発明の上記DNAは、当業者においては、一般的な遺伝子工学技術により、適宜作製することができる。より具体的には、本発明のRNAをコードするDNAを公知の種々の発現ベクターへ適宜挿入することによって、本発明の発現ベクターを作製することが可能である。

【0058】

本発明の上記ベクターの好ましい態様としては、C4ST-1、C4ST-2、C4ST-3等の発現をRNAi効果により抑制し得るRNA（siRNA）を発現するベクターを挙げることができる。

20

【0059】

上述の硫酸基転移酵素に結合する抗体は、当業者に公知の方法により調製することが可能である。ポリクローナル抗体であれば、例えば、次のようにして得ることができる。天然の上述のタンパク質、あるいはGSTとの融合タンパク質として微生物において発現させたりコンビナント（組み換え）タンパク質、またはその部分ペプチドをウサギ等の小動物に免疫し血清を得る。これを、例えば、硫安沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、上述の硫酸基転移酵素や合成ペプチドをカップリングしたアフィニティークラム等により精製することにより調製する。また、モノクローナル抗体であれば、例えば上述の硫酸基転移酵素やその部分ペプチドをマウスなどの小動物に免疫を行い、同マウスより脾臓を摘出し、これをすりつぶして細胞を分離し、該細胞とマウスミエローマ細胞とをポリエチレングリコール等の試薬を用いて融合させ、これによりできた融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、上述の硫酸基転移酵素に結合する抗体を産生するクローンを選択する。次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫安沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、上述の硫酸基転移酵素のタンパク質や合成ペプチドをカップリングしたアフィニティークラム等により精製することで、調製することが可能である。

30

【0060】

本発明の抗体は、本発明の上述の硫酸基転移酵素に結合するものであれば特に制限はなく、上記ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のほかにヒト抗体、遺伝子組み換えによるヒト型化抗体、さらにその抗体断片や抗体修飾物であってもよい。

40

【0061】

抗体取得の感作抗原として使用される本発明のタンパク質はその由来となる動物種について制限されないが、哺乳動物、例えばマウスやヒト由来のタンパク質が好ましく、特にヒト由来のタンパク質が好ましい。ヒト由来のタンパク質は、当業者においては本明細書に開示される遺伝子配列またはアミノ酸配列を用いて適宜取得することができる。

【0062】

本発明において、感作抗原として使用されるタンパク質は、完全なタンパク質あるいは

50



タンパク質の部分ペプチドであってもよい。タンパク質の部分ペプチドとしては、例えば、タンパク質のアミノ基(N)末端断片やカルボキシ(C)末端断片が挙げられる。本明細書における「抗体」とはタンパク質の全長または断片に反応する抗体を意味する。

【0063】

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球、例えばEBウイルスに感染したヒトリンパ球をin vitroでタンパク質、タンパク質発現細胞またはその溶解物で感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、タンパク質への結合活性を有する所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる。

【0064】

本発明の上述の硫酸基転移酵素に対する抗体は、該タンパク質と結合することにより、該タンパク質の発現もしくは機能を阻害する効果が期待される。得られた抗体を人体に投与する目的(抗体治療)で使用する場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト抗体やヒト型化抗体が好ましい。

【0065】

さらに本発明は、上述の硫酸基転移酵素の機能を阻害し得る物質として、上述の硫酸基転移酵素に結合する低分子量物質(低分子化合物)も含有する。該低分子量物質は、天然または人工の化合物であってもよい。通常、当業者に公知の方法を用いることによって製造または取得可能な化合物である。また本発明の化合物は、後述のスクリーニング方法によって、取得することも可能である。

【0066】

さらに本発明の上述の硫酸基転移酵素の発現もしくは機能を阻害し得る物質として、上述の硫酸基転移酵素に対してドミナントネガティブの性質を有する変異体(ドミナントネガティブタンパク質)を挙げることができる。N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素に対してドミナントネガティブの性質を有する該タンパク質変異体とは、N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子を発現させることによって、内在性の野生型タンパク質の活性を消失もしくは低下させる機能を有するタンパク質を指す。

【0067】

本発明の薬剤である、N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸化インヒビターは、線維形成性疾患の治療または予防効果を有する。従って、本発明の薬剤の好ましい態様としては、線維形成性疾患の治療用または予防用である。

ここで「治療または予防」とは、組織線維形成を呈する臓器、組織に対して、必ずしも完全な治療効果または予防効果を有する必要はなく、部分的な効果を有する場合であってもよい。

【0068】

本発明の組織線維形成抑制剤は、線維形成の原因であるN-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸化を阻害することにより線維形成を抑制する作用を有する。従って、本発明の好ましい態様としては、例えば、本発明の組織線維形成抑制剤を有効成分とする、組織線維形成性疾患治療剤または予防剤を提供する。

また本発明の「組織線維形成性疾患治療剤」は、「組織線維形成性疾患改善剤」、「抗組織線維形成剤」等と表現することも可能である。また、本発明における薬剤は、「医薬品」、「医薬組成物」、「治療用医薬」等と表現することもできる。

なお、本発明における「治療」には、線維形成の発生を予め抑制し得る予防的な効果も含まれる。また、線維形成性の臓器(組織)に対して、必ずしも、完全な治療効果を有する場合に限定されず、部分的な効果を有する場合であってもよい。

【0069】

本発明の薬剤は、生理学的に許容される担体、賦形剤、あるいは希釈剤等と混合し、医薬組成物として経口、あるいは非経口的に投与することができる。経口剤としては、顆粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、溶剤、乳剤、あるいは懸濁剤等の剤型とすることができる

10

20

30

40

50

。非経口剤としては、注射剤、点滴剤、外用薬剤、吸入剤（ネブライザー）あるいは座剤等の剤型を選択することができる。注射剤には、皮下注射剤、筋肉注射剤、腹腔内注射剤、頭蓋内投与注射剤、あるいは鼻腔内投与注射剤等を示すことができる。外用薬剤には、経鼻投与剤、あるいは軟膏剤等を示すことができる。主成分である本発明の薬剤を含むように、上記の剤型とする製剤技術は公知である。

#### 【0070】

例えば、経口投与用の錠剤は、本発明の薬剤に賦形剤、崩壊剤、結合剤、および滑沢剤等を加えて混合し、圧縮整形することにより製造することができる。賦形剤には、乳糖、デンプン、あるいはマンニトール等が一般に用いられる。崩壊剤としては、炭酸カルシウムやカルボキシメチルセルロースカルシウム等が一般に用いられる。結合剤には、アラビアゴム、カルボキシメチルセルロース、あるいはポリビニルピロリドンが用いられる。滑沢剤としては、タルクやステアリン酸マグネシウム等が公知である。

本発明の薬剤を含む錠剤は、マスキングや、腸溶性製剤とするために、公知のコーティングを施すことができる。コーティング剤には、エチルセルロースやポリオキシエチレングリコール等を用いることができる。

#### 【0071】

また注射剤は、主成分である本発明の薬剤を適当な分散剤とともに溶解、分散媒に溶解、あるいは分散させることにより得ることができる。分散媒の選択により、水性溶剤と油性溶剤のいずれの剤型とすることもできる。水性溶剤とするには、蒸留水、生理食塩水、あるいはリンゲル液等を分散媒とする。油性溶剤では、各種植物油やプロピレングリコール等を分散媒に利用する。このとき、必要に応じてパラベン等の保存剤を添加することもできる。また注射剤中には、塩化ナトリウムやブドウ糖等の公知の等張化剤を加えることができる。更に、塩化ベンザルコニウムや塩酸プロカインのような無痛化剤を添加することができる。

#### 【0072】

また、本発明の薬剤を固形、液状、あるいは半固形状の組成物とすることにより外用剤とすることができる。固形、あるいは液状の組成物については、先に述べたものと同様の組成物とすることで外用剤とすることができる。半固形状の組成物は、適当な溶剤に必要な応じて増粘剤を加えて調製することができる。溶剤には、水、エチルアルコール、あるいはポリエチレングリコール等を用いることができる。増粘剤には、一般にベントナイト、ポリビニルアルコール、アクリル酸、メタクリル酸、あるいはポリビニルピロリドン等が用いられる。この組成物には、塩化ベンザルコニウム等の保存剤を加えることができる。また、担体としてカカオ脂のような油性基材、あるいはセルロース誘導体のような水性ゲル基材を組み合わせることにより、座剤とすることもできる。

#### 【0073】

本発明の薬剤を遺伝子治療剤として使用する場合は、本発明の薬剤を注射により直接投与する方法のほか、核酸が組込まれたベクターを投与する方法が挙げられる。上記ベクターとしては、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター等が挙げられ、これらのウイルスベクターを用いることにより効率よく投与することができる。

#### 【0074】

また、本発明の薬剤をリボソームなどのリン脂質小胞体に導入し、その小胞体を投与することも可能である。siRNAやshRNAを保持させた小胞体をリポフェクション法により所定の細胞に導入する。そして、得られる細胞を例えば静脈内、動脈内等に全身投与する。線維形成組織等に局所的に投与することもできる。siRNAはin vitroにおいては非常に優れた特異的転写後抑制効果を示すが、in vivoにおいては血清中のヌクレアーゼ活性により速やかに分解されてしまうため持続時間が限られるためより最適で効果的なデリバリーシステム開発が求められてきた。一つの例としては、Ochiya, TらのNature Med., 5:707-710, 1999, Curr. Gene Ther., 1:31-52, 2001より生体親和性材料であるアテロコラーゲンが

10

20

30

40

50

核酸と混合し複合体を形成させると、生体中の分解酵素から核酸を保護する作用があり siRNA のキャリアーとして非常に適しているキャリアーであると報告されているが、本発明の薬剤の導入の方法はこれには限られない。

#### 【0075】

本発明の薬剤は、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て、必要量（有効量）が投与される。本発明の薬剤の投与量は、剤型の種類、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。一例を示せば、年齢、性別、症状、投与経路、投与回数、剤型によって異なるが、例えばアデノウイルスの場合の投与量は1日1回あたり  $10^6 \sim 10^{13}$  個程度であり、1週～8週間隔で投与される。

また、siRNA または shRNA を目的の組織または器官に導入するために、市販の遺伝子導入キット（例えばアデノエクスプレス：クローンテック社）を用いることもできる。

#### 【0076】

本発明の薬剤の治療もしくは予防の対象となる疾患は、組織の線維形成に起因する疾患であれば特に制限されないが、好ましくは、心疾患、消化管疾患、肝疾患、肺疾患、腎疾患、脳神経疾患、眼疾患、脾臓疾患等を挙げることができる。

#### 【0077】

本発明の「線維形成に起因する疾患」の具体例としては、特に限定されないが、皮膚をはじめとする外皮および上皮組織における弾性線維症、強皮症、慢性腹膜炎、後腹膜腔線維化症など、結合組織などの支持組織、筋肉における多発性筋炎、皮膚筋炎、結節性多発動脈炎、軟組織線維症、慢性関節リウマチ、手掌線維腫、腱炎、腱鞘炎、アキレス腱炎、足菌腫など、骨髄、心臓などの血液組織、脈管系における骨髄線維症、脾機能亢進症、脈管炎、徐脈性不整脈、動脈硬化、閉塞性血栓性血管炎、結節性線維症、狭心症、拡張型うっ血性心筋症、心不全、拘束型心筋症、びまん性非閉塞性心筋症、閉塞性心筋症、肺性心、僧帽弁狭窄、大動脈弁狭窄、慢性心膜炎、心内膜線維症、心内膜心筋線維症など、肝臓などの消化器系では慢性肝炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、アルコール性肝炎、慢性B型肝炎、慢性C型肝炎、ウィルソン病、肝硬変、ウイルス性肝炎、ゴーシェ病、糖原病、抗トリプシン欠損、ヘモクロマトーシス、チロシン血症、果糖血症、ガラクトース血症、ゼルウェーガー症候群、先天性肝線維症、門脈圧亢進症、肝肉芽腫症、バッド-キアリ症候群、原発性硬化性胆管炎、脂肪肝、非アルコール性肝炎、肝線維症、先天性肝線維症、アルコール性肝硬変、ウイルス性肝硬変、寄生虫性肝硬変、中毒性肝硬変、栄養障害性肝硬変、うっ血性肝硬変、肝硬化症、シャルコー肝硬変、トッド肝硬変、続発性胆汁性肝硬変、単葉性肝硬変、慢性非化膿性破壊性胆炎から移行した肝硬変、閉塞性肝硬変、胆細管性肝硬変、胆汁性肝硬変、萎縮性肝硬変、壊死後性肝硬変、肝炎後肝硬変、結節性肝硬変、混合型肝硬変、小結節性肝硬変、代償性肝硬変、非代償性肝硬変、大結節性肝硬変、中隔性肝硬変、突発性肝硬変、門脈周囲性肝硬変、門脈性肝硬変、原発性胆汁性肝硬変など、肺などの呼吸系におけるコクシジオイデス症、プラストミセス症、アレルギー性気管支肺炎、アスペルギルス症、グッドパスチャー症候群、成人呼吸促迫症候群における肺線維症、慢性閉塞性肺疾患、無気肺、肺炎、珪肺症、石綿肺症、過敏性肺炎、特発性肺線維症、リンパ球性間質性肺炎、ランゲルハンス細胞肉芽腫症、嚢胞性線維症、膿胞性線維症、肺線維症、特発性肺線維症、線維化性肺胞隔炎、間質性線維症、びまん性肺線維症、慢性間質性肺炎、気管支拡張症、細気管支炎線維症、気管支周囲線維症、胸膜線維症など、腎臓などの泌尿器、生殖器系における男性性腺機能低下症、筋強直性ジストロフィー、ペイロニー病などによる線維症、慢性尿細管間質性腎炎、常染色体劣性嚢胞腎、骨髄腫腎、水腎症、急速進行性糸球体腎炎、腎毒性疾患、黄色肉芽腫性腎盂腎炎、鎌状赤血球腎症、腎性尿崩症、常染色体優性多発性嚢胞腎疾患、慢性糸球体腎炎、IgA腎症、腎硬化症、巣状糸球体硬化症、膜性腎炎、膜増殖性糸球体腎炎、慢性腎盂腎炎、腎アミロイドーシス、多発性嚢胞腎、後腹膜線維症、ループス腎炎など膠原病に伴う腎病変、糖尿病性腎症、慢性前立腺炎、住血吸虫症による膀胱炎、乳腺線維症、乳腺線維腺腫など、脊椎などの神経系における先天性斜頸、強直性脊椎炎、神経線維腫や脊髄損傷後の神経機能欠損等の脊髄疾患、パ

10

20

30

40

50

ーキンソン病やアルツハイマー病等の脳神経疾患、眼球における後部水晶体線維化症、増殖性網膜症など、また、全身に病変の生じるサルコイドーシス、全身性エリテマトーデスによる線維症や全身性強皮症、多発性筋炎、皮膚筋炎などがあげられるが、本発明における「線維形成に起因する疾患」はこれらに限定されるものではなく、皮膚や臓器など各生体組織における線維形成によって生じる疾患を含む。

【0078】

また本発明は、N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸化の程度を指標とすることによる、組織線維形成抑制剤のスクリーニング方法（本明細書において「本発明の方法」と記載する場合あり）に関する。

本発明の方法の好ましい態様としては、糖鎖を構成するN-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸化を阻害する化合物を選択する工程を含む方法である。

本発明のスクリーニング方法によって、組織線維形成抑制剤もしくは線維形成性疾患治療もしくは予防剤のための候補化合物を効率的に取得することができる。

【0079】

本発明のスクリーニング方法の好ましい態様は、以下の（a）～（c）を含む、組織線維形成抑制剤のスクリーニング方法である。

（a）N-アセチルガラクトサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含有する糖鎖と、被検化合物を接触させる工程

（b）N-アセチルガラクトサミンの4位または6位について硫酸化の程度を測定する工程

（c）被検化合物を接触させない場合と比較して、硫酸化の程度を低下させる化合物を選択する工程

【0080】

以下、本発明のスクリーニング方法の態様を例示する。なお、以下に記載の態様においては、用いられるN-アセチルガラクトサミン、硫酸基転移酵素、脱硫酸化酵素等の由来としては、ヒト、マウス、ラット等に由来するものが挙げられるが、これらに特に制限されない。

【0081】

また以下に記載の態様に用いる被検化合物としては、特に制限されないが、例えば、天然化合物、有機化合物、無機化合物、タンパク質、ペプチドなどの単一化合物、並びに、化合物ライブラリー、遺伝子ライブラリーの発現産物、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産物、海洋生物抽出物、植物抽出物等が挙げられる。

【0082】

また本発明の方法において被検化合物への「接触」は、通常、N-アセチルガラクトサミン、硫酸基転移酵素、または脱硫酸化酵素を被検化合物と混合することによって行うが、この方法に限定されない。例えば、これらのタンパク質またはその一部を発現する細胞を被検化合物と接触させることにより、上記「接触」を行うことができる。

【0083】

また以下に記載の態様における「細胞」の由来としては、ヒト、マウス、ラット等に由来する細胞が挙げられるが、これらに由来する細胞に特に制限されず、それぞれの態様において用いられるタンパク質を発現するように形質転換された大腸菌、酵母等の微生物細胞を利用することも可能である。例えば、「N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子を発現する細胞」としては、内在性のN-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子を発現している細胞、または外来性のN-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子が導入され、該遺伝子が発現している細胞を利用することができる。外来性のN-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子が発現した細胞は、通常N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子が挿入された発現ベクターを宿主細胞へ導入することにより作製することができる。該発現ベクターは、一般的な遺伝子工学技術によって作製することができる。

【0084】

また、本発明の方法における硫酸化の程度の測定は、当業者に公知の方法によって行うことができる。例えば、N-アセチルガラクトサミンの4位または6位、またはその一部の硫酸化構造に結合する標識された化合物、または抗体等を用い、標識量を測定することにより検出することができる。また、クロマトグラフィー法や質量分析法などを用いて検出することもできる。

【0085】

当業者であれば、N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸化の程度を、例えば、以下の公知の方法によって適宜評価することができる。

(1) 標識色素(1-9-ジメチルメチレンブルー)を用いた定量的色素結合による方法(Nature. 1998 Feb 26;391(6670):908-11)

10

(2) ( $^{32}\text{P}$ ) 3',5'-ABPによる光親和性標識による方法 (Mandon, E.C., Milla, M.E., Kempner, E., and Hirschberg, C.B. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 10707-10711)

(3) 3'-( $^{32}\text{P}$ )-methyleneb PAPSによる光親和性標識による方法 (Ozeran, J.D., Wesley, J., and Schwarz, N.B. (1996) Biochemistry, 35, 3695-3703)

(4) 陰イオン交換樹脂(硫酸化糖蛋白質の分離法)による方法 (Vol.16, No.2(19860430) pp. 69-72、北里大学 ISSN:03855449)

(5) Alcian blue によるsGAG比色染色 (Anal Biochem. 1998 Feb 15; 256(2): 229-37)

【0086】

また、任意の物質が本発明のN-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸化インヒビターであるか否かについては、当業者であれば上記方法等により容易に評価することができる。

20

【0087】

本発明のスクリーニング方法の他の態様としては、N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移活性を低下させる物質(化合物)を選択する工程を含む方法を挙げることができる。

本発明の上記方法は、例えば以下の工程からなる。

(a) N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素と、被検化合物を接触させる工程

(b) 前記酵素の硫酸基転移活性を測定する工程

30

(c) 被検化合物を接触させない場合と比較して、前記活性を低下させる化合物を選択する工程

【0088】

上記方法においてはまず、N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素に被検化合物を接触させる。

【0089】

本方法においては次いで、前記酵素の硫酸基転移活性を測定する。次いで、被検化合物を接触させない場合(対照)と比較して、前記活性を低下させる化合物を選択する。低下させる化合物は線維形成抑制剤もしくは線維形成性疾患治療のための薬剤となる。

被検化合物が上記硫酸基転移活性を有しているか否かについて評価(測定)可能な方法としては、例えば、以下の方法が挙げられる。

40

【0090】

N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸化を促進する細胞、細胞株を一定時間培養する過程において各種被検化合物を混合し、培養前後の硫酸化の程度を、例えば、4位硫酸化を検出する抗体(クローン; LY111, 2H6)や6位硫酸化を検出する抗体(クローン; MC21C, M0225, CS-56、いずれも生化学工業社製)で簡便に確認できる。蛍光標識抗体を用いて、培養前後の蛍光数値を比較しても良いし、培養前後で2-B-6や3-B-3抗体を使用した検出法を行っても良い。細胞培養後の硫酸化の増加(LY111やMC21Cの蛍光数値増加)を抑制する化合物、もしくは細胞培養後の脱硫酸化の進行(2-B-6や3-B-3の蛍光数値増加)を促進する化合物が、本発明の方法において目的の候補化合物として選択される。

50

## 【 0 0 9 1 】

さらに、より選択的には、例えばC4ST-1やC6ST-1などの硫酸基転移酵素の遺伝子をCHO細胞やL細胞などへ周知の方法で導入、恒常的に発現させた細胞株を作成する事ができる。このような恒常的に硫酸基を付加する細胞株を使用する事により、よりクリアーに治療候補化合物を判定する事ができる。

## 【 0 0 9 2 】

本発明の他の好ましい態様は、本発明のN-アセチルガラクトサミンの硫酸基転移酵素の遺伝子の発現量を低下させる化合物を選択する、以下の工程 ( a ) ~ ( c ) を含む組織線維形成抑制剤のスクリーニング方法である。

( a ) N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子を発現する細胞に、被検化合物を接触させる工程

( b ) 前記細胞における遺伝子の発現量を測定する工程

( c ) 被検化合物を接触させない場合と比較して、前記遺伝子の発現量を低下させる化合物を選択する工程

## 【 0 0 9 3 】

上記方法においてはまず、N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子を発現する細胞に、被検化合物を接触させる。

## 【 0 0 9 4 】

本方法においては次いで、N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子の発現量を測定する。ここで「遺伝子の発現」には、転写および翻訳の双方が含まれる。遺伝子の発現量の測定は、当業者に公知の方法によって行うことができる。

## 【 0 0 9 5 】

例えば、上記いずれかのタンパク質を発現する細胞からmRNAを定法に従って抽出し、このmRNAを鋳型としたノーザンハイブリダイゼーション法、RT-PCR法、DNAアレイ法等を実施することによって該遺伝子の転写量の測定を行うことができる。また、上記いずれかのタンパク質をコードする遺伝子を発現する細胞からタンパク質画分を回収し、上記いずれかのタンパク質の発現をSDS-PAGE等の電気泳動法で検出することにより、遺伝子の翻訳量の測定を行うこともできる。さらに、上記いずれかのタンパク質に対する抗体を用いて、ウェスタンブロッティング法を実施することにより該タンパク質の発現を検出することにより、遺伝子の翻訳量の測定を行うことも可能である。該タンパク質の検出に用いる抗体としては、検出可能な抗体であれば特に制限はないが、例えばモノクローナル抗体、またはポリクローナル抗体の両方を利用することができる。

## 【 0 0 9 6 】

本方法においては、次いで、被検化合物を接触させない場合 ( 対照 ) と該遺伝子の発現量を比較する。

## 【 0 0 9 7 】

本方法においては、次いで、被検化合物を接触させない場合と比較して、前記遺伝子の発現量を低下 ( 抑制 ) させる化合物を選択する。低下 ( 抑制 ) させる化合物は、組織線維形成抑制剤もしくは線維形成性疾患治療のための候補化合物となる。

## 【 0 0 9 8 】

また、本発明のスクリーニング方法の一態様としては、本発明のN-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子の発現量 ( レベル ) を低下させる化合物を、レポーター遺伝子の発現量 ( レベル ) を指標として選択する方法である。本発明の上記方法は例えば以下の工程 ( a ) ~ ( c ) を含む。

( a ) N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子の転写調節領域とレポーター遺伝子とが機能的に結合した構造を有するDNAを含む細胞または細胞抽出液と、被検化合物を接触させる工程

( b ) 前記レポーター遺伝子の発現量 ( レベル ) を測定する工程

( c ) 被検化合物を接触させない場合と比較して、前記レポーター遺伝子の発現量 ( レベ

10

20

30

40

50

ル)を低下させる化合物を選択する工程

【0099】

本方法においてはまず、N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子の転写調節領域とレポーター遺伝子とが機能的に結合した構造を有するDNAを含む細胞または細胞抽出液と、被検化合物を接触させる。

【0100】

ここで「機能的に結合した」とは、N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子の転写調節領域に転写因子が結合することにより、レポーター遺伝子の発現が誘導されるように、N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子の転写調節領域とレポーター遺伝子とが結合していることをいう。従って、レポーター遺伝子が他の遺伝子と結合しており、他の遺伝子産物との融合タンパク質を形成する場合であっても、N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子の転写調節領域に転写因子が結合することによって、該融合タンパク質の発現が誘導されるものであれば、上記「機能的に結合した」の意に含まれる。N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子のcDNA塩基配列に基づいて、当業者においては、ゲノム中に存在するN-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子の転写調節領域を周知の方法により取得することが可能である。

10

【0101】

本方法に用いるレポーター遺伝子としては、その発現が検出可能であれば特に制限はなく、例えば、CAT遺伝子、lacZ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、およびGFP遺伝子等が挙げられる。「N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子の転写調節領域とレポーター遺伝子とが機能的に結合した構造を有するDNAを含む細胞」として、例えば、このような構造が挿入されたベクターを導入した細胞が挙げられる。このようなベクターは、当業者に周知の方法により作製することができる。ベクターの細胞への導入は、一般的な方法、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法等によって実施することができる。「N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子の転写調節領域とレポーター遺伝子とが機能的に結合した構造を有するDNAを含む細胞」には、染色体に該構造が挿入された細胞も含まれる。染色体へのDNA構造の挿入は、当業者に一般的に用いられる方法、例えば、相同組み換えを利用した遺伝子導入法により行うことができる。

20

30

【0102】

「N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子の転写調節領域とレポーター遺伝子とが機能的に結合した構造を有するDNAを含む細胞抽出液」とは、例えば、市販の試験管内転写翻訳キットに含まれる細胞抽出液に、N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子の転写調節領域とレポーター遺伝子とが機能的に結合した構造を有するDNAを添加したものを挙げることができる。

【0103】

ここで「接触」は、「N-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子の転写調節領域とレポーター遺伝子とが機能的に結合した構造を有するDNAを含む細胞」の培養液に被検化合物を添加する、または該DNAを含む上記の市販された細胞抽出液に被検化合物を添加することにより行うことができる。被検化合物がタンパク質の場合には、例えば、該タンパク質を発現するDNAベクターを、該細胞へ導入することにより行うことも可能である。

40

【0104】

本方法においては、次いで、該レポーター遺伝子の発現レベルを測定する。レポーター遺伝子の発現レベルは、該レポーター遺伝子の種類に応じて、当業者に公知の方法により測定することができる。例えば、レポーター遺伝子がCAT遺伝子である場合には、該遺伝

50

子産物によるクロラムフェニコールのアセチル化を検出することによって、レポーター遺伝子の発現量を測定することができる。レポーター遺伝子がlacZ遺伝子である場合には、該遺伝子発現産物の触媒作用による色素化合物の発色を検出することにより、また、ルシフェラーゼ遺伝子である場合には、該遺伝子発現産物の触媒作用による蛍光化合物の蛍光を検出することにより、さらに、GFP遺伝子である場合には、GFPタンパク質による蛍光を検出することにより、レポーター遺伝子の発現量を測定することができる。

#### 【0105】

本方法においては、次いで、測定したレポーター遺伝子の発現量（レベル）を被検化合物の非存在下において測定した場合（対照）と比較する。前記レポーター遺伝子がN-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素をコードする遺伝子と機能的に結合している場合には、前記レポーター遺伝子の発現レベルが対照と比較して低下（抑制）させている化合物を選択する。低下（抑制）させる化合物は、組織線維形成抑制のための薬剤もしくは線維形成性疾患治療のための候補化合物となる。

#### 【0106】

本発明のスクリーニング方法において見出される組織線維形成抑制剤は、好ましくは、線維形成性疾患の治療用または予防用に用いられる。

#### 【0107】

また本発明は、線維形成性疾患の治療または予防のための医薬組成物の製造方法を提供する。本発明の上記製造方法は、例えば以下の工程（a）および（b）を含む。

（a）被検試料から、上記組織線維形成抑制剤のスクリーニング方法により、組織線維形成抑制剤を選択する工程

（b）前記薬剤と医薬的に許容される担体とを混合する工程

#### 【0108】

本方法においては、まず被検試料から上記組織線維形成抑制剤のスクリーニング方法により、組織線維形成抑制剤を選択する。

本方法においては次いで、上記選択された薬剤と、医薬的に許容される担体とを混合する。医薬的に許容される担体としては、例えば上述の担体を用いることができる。

#### 【0109】

また本発明は、本発明のスクリーニング方法を実施するために用いられる、各種薬剤・試薬等を含むキットを提供する。

本発明のキットは、例えば本発明の上述の各種試薬の中から、実施するスクリーニング方法にあわせて適宜選択することができる。例えば本発明のキットは、本発明のN-アセチルガラクトサミンの4位または6位の硫酸基転移酵素を構成要素とすることができる。本発明のキットには、さらに、本発明の方法において使用される各種試薬、容器等を含めることができる。例えば、抗体、プローブ、各種反応試薬、細胞、培養液、対照サンプル、緩衝液、使用方法を記載した指示書等を適宜含めることができる。

#### 【0110】

また本発明は、本発明の薬剤を個体（例えば、患者等）へ投与する工程を含む、線維形成性疾患の治療もしくは予防方法を提供する。

本発明の予防もしくは治療方法の対象となる個体は、線維形成性疾患を発症し得る生物であれば特に制限されないが、好ましくはヒトである。

個体への投与は、一般的には、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射など当業者に公知の方法により行うことができる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者（医師、獣医師、薬剤師等）であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。

#### 【0111】

さらに本発明は、本発明の薬剤の、組織線維形成抑制剤の製造における使用に関する。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

#### 【実施例】



## 【 0 1 1 2 】

以下、実施例を用いて本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明の技術的範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

なお、本明細書においてsiRNAの構造（配列）を、ターゲットとなる遺伝子のDNA領域を記載することによって表現する場合がある。当業者であれば、ターゲット配列として記載されたDNA配列の情報に基づいて、当該DNA配列に対応する二本鎖RNAからなるsiRNAの構造を認識することは容易である。

## 【 0 1 1 3 】

〔 心臓組織 〕

実施例 1：マウス心筋症モデルにおける標的糖鎖遺伝子のsiRNAノックダウン効果の検討と、遺伝子レベルにおける抗線維形成効果の検討

10

この実施例及び以下の実施例では、マウス心筋症モデルとして標準化されている、塩酸ドキシルピシン（DOX:協和発酵社製）腹腔内投与モデルを使用した。このマウスモデルは古典的であるが再現性にすぐれ、簡便であることより心筋症モデルとして病態解明や、新規治療実験などに幅広く使用されている（Longhu Li, Circulation. 2006;113:535-543、Xiaoming Yi, Am J Physiol Heart Circ Physiol 290: H1098-H1102, 2006、Kang YJ, J Biol Chem. 2000 May 5; 275(18):13690-8、Nozaki N, Circulation. 2004;110:2869-2874、Fisher PW, Circulation. 2005;111:1601-1610）。

## 【 0 1 1 4 】

組織学的には心筋間質の線維形成を呈することから、拡張型心筋症、拘束型心筋症、肥大型心筋症、不整脈原生右室心筋症（ARVC）に加え、急性心筋梗塞・安定狭心症・不安定狭心症・心筋炎・心臓弁膜症・不整脈・高血圧症に続発する左室リモデリングに共通する所見であり、前述の疾患に基づく慢性心不全の心筋機能障害の責任となる病理所見である（Jugdutt BI, Circulation. 108:1395-1403, 2003）。

20

## 【 0 1 1 5 】

最初に、マウスモデルの作製についてであるが、C57BL6/Jマウス（オス、8週齢、日本クレア社製）に、DOX（15 mg/kg；協和発酵社製）を腹腔内投与する。投与後1週間飼育し、心臓組織を採取した。対照群は、同様のマウスでDOXを投与せず、同時期に購入・飼育したものをを用いた。

## 【 0 1 1 6 】

GalNac 4S-6ST siRNA薬は、DOX投与の24時間前に、マウス1匹あたり、GalNac 4S-6ST siRNA 1μg（北海道システムサイエンス社製）と、媒体である1%アテノコラーゲン（高研社製）200μLを混合したもの腹腔内投与した。本実施例に用いたGalNac 4S-6ST siRNA薬の塩基配列について以下に示す。配列は必ずしも本例のみに限定されない。

[ human GalNac4-6STsiRNA ] (Gene Bank accession number NM\_015892)

（北海道システムサイエンス社製）

5' -ggagcagagcaagaugaaucaaac-3'（配列番号：25）

3' -ua-ccucgucucguucuacuuauuuag-5'（配列番号：26）

30

## 【 0 1 1 7 】

心筋症モデルマウスより摘出した臓器（心臓）50 mg当たりに対し、RNA iso（タカラバイオ社製）1 mLを加え、電動ホモジナイザー（DIGITAL HOMOGENIZER、AS ONE社製）にて粉碎させた後、chloroform 200μL（Sigma Aldrich Japan社製）を加え穏やかに混合後、約5分氷冷し、12,000 rpm、4分、15分間遠心分離機（Centrifuge 5417R、Eppendorf社製）を用い遠心分離を行った。遠心分離後の上澄み液500μLを別のエッペンドルフチューブに移し、上澄み液と同等量のisopropanol 500μL（Sigma Aldrich Japan社製）を加え混合後、1μLのglycogen（Invitrogen社製）を加え、15分間氷冷した。氷冷15分後、12,000 rpm、4分、15分間遠心し、その後、75% Ethanol 1000μL（Sigma Aldrich Japan社製）で3回洗浄して得られたRNA沈殿物を30分間～1時間、自然乾燥させた後、大塚蒸留水50μL（大塚製薬社製）に溶解させ、さらに大塚蒸留水（大塚製薬社製）にて100倍希釈し、UVプレート（コーニングコースター社製）上でプレートリーダー（POWER Wave XS、BIO-TEK社製）によ

40

50

り抽出したサンプル中のRNA濃度を算出した。

#### 【0118】

次に、逆転写反応 (cDNA合成)を行うため以下の手技を行った。算出して得られたRNAサンプルを500 ng/20  $\mu$ Lの濃度に調整し、68、3分間、BLOCK INCUBATOR(ASTEC製)にて加温し、10分間、氷冷した。氷冷後、予め調製していたRT Pre Mix 液 (組成: 25 mM  $MgCl_2$  18.64  $\mu$ L (Invitrogen社製)、5 $\times$ Buffer 20  $\mu$ L (Invitrogen社製)、0.1 M DTT 6.6  $\mu$ L (Invitrogen社製)、10 mM dNTP mix 10  $\mu$ L (Invitrogen社製)、RNase Inhibitor 2  $\mu$ L (Invitrogen社製)、MLV Reverse transcriptase 1.2  $\mu$ L (Invitrogen社製)、Random primer 2  $\mu$ L (Invitrogen社製)、滅菌蒸留水19.56  $\mu$ L (大塚蒸留水: 大塚製薬社製)を80  $\mu$ L加えBLOCK INCUBATOR(ASTEC社製)にて42、1時間、加温反応させ、1時間後、BLOCK INCUBATOR(ASTEC社製)にて99、5分間、加熱した後、氷冷し求めるcDNA 100  $\mu$ Lを作製し、合成して得られたcDNAを用いて、以下の組成で定量PCR反応を行った。定量PCRについては、SYBR premix kit (タカラバイオ社製)とReal-time PCR thermal cycler DICE (タカラバイオ社製)を用いて行った。PCR反応の条件は、95を10秒、95を5秒と60を30秒の40サイクルとし、最後に融解曲線分析を行った。定量PCRに用いたprimerの塩基配列については以下に示す。

#### [定量PCR Primer配列]

\*mouse GalNac4S-6ST(タカラバイオ社製)

forward : 5' -GTGAGTTCTGCTGCGGTCCA-3' (配列番号: 27)

reverse : 5' -AGTCCATGCTGATGCCAGAG-3' (配列番号: 28)

\*mouse procollagen Type 1 alpha 2(タカラバイオ社製)

forward : 5' -ACCCGATGGCAACAATGGA-3' (配列番号: 29)

reverse : 5' -ACCAGCAGGGCCTTGTTTAC-3' (配列番号: 30)

\*mouse -SMA(タカラバイオ社製)

forward : 5' -CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC-3' (配列番号: 31)

reverse : 5' -ATGGAGCCACCGATCCACA-3' (配列番号: 32)

\*mouse  $\alpha$ 1(I)2(タカラバイオ社製)

forward : 5' -TTCTGGCCAACGGTCTAGACAAC-3' (配列番号: 33)

reverse : 5' -CCAGTGGTCTTGGTGTGCTGA-3' (配列番号: 34)

#### 【0119】

図2に示すように、GalNac4S-6ST、Type1 collagen、-SMAの遺伝子発現について検討した結果、GalNac 4S-6ST siRNA治療群では、未治療群に比べて有意 ( $P<0.001$ , vs未治療群)にGalNac4S-6STの発現の抑制が見られた。また、心筋症の病態として重要な線維形成の指標として -SMA、Type1 collagenの遺伝子発現をそれぞれ検討した結果、GalNac 4S-6ST siRNA治療群では、未治療群に比べ有意な発現の低下 ( $P<0.001$  vs未治療群)が確認された。これらの結果を考察すると、GalNac 4S-6ST siRNAのターゲットノックダウン効果に伴い、心筋の線維形成の進行が、遺伝子発現レベルにおいて抑制されることが明らかになった。

本発明の薬剤は、例えば、心筋線維形成抑制剤として有用である。

#### 【0120】

実施例2: マウス心筋症モデルにおけるGalNac4S-6ST siRNAの心肥大の抑制効果

この実施例では心筋症モデルマウスの心重量(mg)と体重(g)を測定し、心肥大の指標となる心重量・体重比を算出し、GalNac4S-6ST (GalNac) siRNA心肥大抑制効果について比較検討を行った。心肥大は組織の線維性変化を示す指標でもある。

図1は、siRNA治療群 ( $n=4$ ) 及び未治療群 ( $n=4$ ) の心重量(mg)・体重(g)比について算出した結果について示している。この結果、未治療群での比の値は、 $6.376 \pm 0.484$ で、siRNA治療群の値は $5.442 \pm 0.203$ であった。この結果、未治療群に比べてsiRNA治療群では、有意に値の減少が見られた ( $p<0.05$ : t検定)。これは、GalNac 4S-6ST siRNAが病的な心肥大を抑制する効果を持つこと示した結果である。

本発明の薬剤は、例えば、心肥大抑制剤 (心肥大治療剤) として有用である。

## 【 0 1 2 1 】

実施例 3：マウス心筋症モデルにおけるGalNAc 4S-6ST siRNAのI型コラーゲン沈着抑制効果の検討

この実施例では、心筋症モデルマウスの心臓サンプルを使用してGalNAc 4S-6ST siRNAのI型コラーゲン沈着（線維形成の指標）の抑制効果について比較検討を行った。実施例1と同じマウスより採取された心臓の組織サンプルを、凍結用包埋剤OCTコンパウンド(Miles社製)に包埋し、クライオスタット(カールツァイス社製)により薄切し、得られた切片をアセトン(シグマアルドリッチジャパン社製)で10分間固定後、リン酸緩衝液で洗浄し、さらに一次抗体として抗I型コラーゲンウサギ抗血清(ウサギポリクローナル抗体、1:2000希釈; LSL社製)を添加し、室温で一時間反応させた。続いて、二次抗体であるペルオキシダーゼ標識ヤギ由来抗ウサギIgG(1:200希釈; cappel社製)を添加し、室温で30分反応させた。反応後のサンプルにDAB基質(ニチレイ社製)を添加した。この標本を光学顕微鏡(ライカ社製)用いて観察した。

10

組織所見を図3に示した。未治療群においては、心筋線維間に非常に強いI型コラーゲンの陽性シグナルが確認出来た。これに対して、siRNA治療群では、I型コラーゲンの陽性シグナルは未治療群に比べて遥かに弱かった。以上のI型コラーゲンの免疫染色の結果を考察すると、GalNAc 4S-6ST siRNAが、心筋組織におけるI型コラーゲンの過剰沈着に対して抑制効果をもつことが明らかとなった。この結果は、実施例1に示した定量PCRの結果と相関するものであった。

本発明の薬剤は、例えば、心筋組織におけるI型コラーゲン沈着抑制剤として有用である。

20

## 【 0 1 2 2 】

実施例 4：マウス心筋症モデルにおけるGalNAc 4S-6ST siRNAのIII型コラーゲン沈着抑制効果の検討

この実施例では、心筋症モデルマウスの心臓サンプルを使用してGalNAc 4S-6ST siRNAのIII型コラーゲン沈着（線維形成の活動性の指標）の抑制効果について比較検討を行った。実施例3と同様の方法で得られた組織切片を、アセトン(シグマアルドリッチジャパン社製)で10分間固定後、リン酸緩衝液で洗浄し、さらに一次抗体として抗III型コラーゲンウサギ抗血清(ウサギポリクローナル抗体、1:2000希釈; LSL社製)を添加し、室温で一時間反応させた。続いて、二次抗体であるペルオキシダーゼ標識ヤギ由来抗ウサギIgG(1:200希釈; cappel社製)を添加し、室温で30分反応させた。反応後のサンプルにDAB基質(ニチレイ社製)を添加した。この標本を光学顕微鏡(ライカ社製)用いて観察した。

30

組織所見を図4に示した。未治療群においては、心筋線維間にやや強めのIII型コラーゲンの陽性シグナルが確認出来た。これに対して、siRNA治療群では、III型コラーゲンの陽性シグナルは対照群と同程度であった。以上のIII型コラーゲンの免疫染色の結果を考察すると、GalNAc 4S-6ST siRNAが、心筋組織におけるIII型コラーゲンの沈着を抑制する効果、つまり活動的なコラーゲンの沈着に対しても有効的な抑制効果もつことが明らかとなった。

本発明の薬剤は、例えば、心筋組織におけるIII型コラーゲン沈着抑制剤として有用である。

40

## 【 0 1 2 3 】

実施例 5：マウス心筋症モデルにおけるGalNAc 4S-6ST siRNAの線維芽細胞の浸潤抑制効果についての検討

この実施例では、DOX投与により、心筋症モデルマウスの心筋組織内に浸潤してくる線維芽細胞の動態に対するGalNAc 4S-6ST siRNAの薬理効果について検討した。実施例3と同様の方法で得られた組織切片を、アセトン(シグマアルドリッチジャパン社製)で10分間固定後、リン酸緩衝液で洗浄し、さらに一次抗体として抗マウス線維芽細胞抗体(ER-T R7:ラットモノクローナル抗体、1:400希釈; BMAバイオメディカルズ社製)を添加し、室温で一時間反応させた。続いて、二次抗体であるペルオキシダーゼ標識ヤギ由来抗ラッ

50

ト免疫グロブリン抗体（1:200希釈；バイオソース社製）を添加し、室温で30分反応させた。反応後のサンプルにDAB基質（ニチレイ社製）を添加した。この標本を光学顕微鏡（ライカ社製）用いて観察した。

組織所見を図5に示した。写真は心室隔壁部分フォーカスしたものである。未治療群においては、対照群に比べて多数の線維芽細胞の浸潤を認めた。これに対して、siRNA治療群では、未治療群に比べて、線維芽細胞の浸潤の程度を少なかった。この結果は、GalNac 4S-6ST siRNAが心筋組織における線維芽細胞の浸潤を抑制する薬理効果をもち、この効果が抗線維形成作用の一端である事を示すものであった。

本発明の薬剤は、例えば、心筋組織における線維芽細胞浸潤抑制剤として有用である。

【0124】

〔消化管組織〕

#### 実施例6：マウス腸管線維形成モデルにおけるGalNac4S-6STの臨床的線維形成抑制効果

C57BL/6Jマウス（、6週齢、日本クレア社製）にデキストラン硫酸ナトリウム（DSS；和光社製）を3%含有する高塩素水を8日間自由飲水させることにより大腸炎モデルを作成した。本DSS誘導性大腸炎モデルは再現性に優れており、マウス潰瘍性大腸炎やクローン病という炎症性腸疾患の標準的実験モデルとして広く用いられている他、腸管狭窄の組織学的特徴である全層性の炎症・線維性変化ならびに筋層の肥厚を呈するモデルでもある（Sasaki N, J Inflamm. 2005 2: 13、総説：Pucilowska JB et al. Am J Physiol Gastroenterol Liver Physiol. 279:G653-G659, 2000）。したがって、炎症性腸疾患に加え、組織上の腸管狭窄を呈する病態、すなわち、腸管ペーチェット（単純性潰瘍）、過敏性腸症候群、虚血性腸炎、薬剤性腸炎、放射線性腸炎、食道アカラシア、強皮症に伴う食道狭窄、SLE（全身性エリテマトーデス：systemic lupus erythematosus）に伴う腸管狭窄、ヒルス・シュプリング病、腸管摘出後の狭窄（術後狭窄）、消化管系の癌（舌癌、上咽頭癌、喉頭癌、食道癌、胃癌、小腸癌、大腸癌、直腸癌）に対する内視鏡的粘膜切除術後の腸管狭窄、腸閉塞、という疾病に幅広く共通する組織学的所見である。

【0125】

3% DSS水を給水すると同時に、マウスには実施例1と同一のGalNac4S-6ST siRNA（1μg/匹）を、あらかじめPBSにて10倍希釈したアテロコラーゲン（コーケン社製）に混合し200μlを腹腔内に注射した。この処置を行ったマウス群をGalNac4S-6ST siRNA群、GalNac4S-6ST siRNAを混合せずアテロコラーゲンのみの処置を行なった群を対照群と名付け、3%DSS水を飲水させながら7日間体重と疾患の活動性インデックス（DAI）スコアを記録した（Kihara M, Gut. 2003 52: 713-9）。DAIの評価基準は以下の通りである。

【0126】

【表1】

Index	Weight loss	Stool consistency	Fecal blood
0	None	Normal	Normal
1	1-5%		Hem occult (+)
2	5-10%	Loose stools	Hem occult (++)
3	10-20%		Hem occult (+++)
4	>20%	Diarrhea	Gross bleeding

【0127】

DSS水給水初日（day 0）を1とし、個々のマウスのDAIを記録した結果を図6に示す。3日目には対照群に比較してGalNac4S-6ST siRNA投与群の方が有意に低値を示した（ $p<0.001$ 、t検定）。この結果より、GalNac4S-6ST遺伝子の発現抑制は比較的早期から炎症の活動性を抑制する効果をもたらすことが示された。

さらに、5日目にマウス屠殺後に大腸長を測定したところ、GalNAc4S-6ST siRNA投与群で有意 ( $p < 0.005$ ,  $t$ 検定) に大腸の短縮が抑制されていた (図6)。大腸長は、腸管線維形成あるいは狭窄を反映する決定的な指標である。したがって、GalNAc4S-6ST siRNA投与群では、臨床的にも腸管線維性変化を強く抑制することが明らかになった。

本発明の薬剤は、例えば、腸管線維性変化抑制剤として有用である。

#### 【0128】

#### 実施例7：マウス腸管線維形成モデルにおけるGalNAc4S-6ST siRNAによる腸管線維形成抑制効果

この実施例では、GalNAc4S-6ST siRNA投与による大腸局所の線維形成関連遺伝子発現をリアルタイム定量PCR法により検討した。

実施例6と同様の方法で腸管線維形成モデルを作成し、7日目にマウスを屠殺した。採取した大腸の一部を1.5 mlチューブにとりわけ、液体窒素で凍結した。実施例1と同様の方法でcDNA合成を行ない、定量的PCRを行なった。プライマーの配列、PCRサイクルも同様である。

結果を図7に示す。本モデルではGalNAc4S-6ST遺伝子の発現が増強してくるが、GalNAc4S-6ST siRNA治療によって有意 ( $p < 0.001$ ,  $t$ 検定) にノックダウンされていることが確認できた。また、線維形成の指標であるtype I collagenならびに  $\alpha$ -SMAの発現増強も、GalNAc4S-6ST siRNAにより有意 (ともに $p < 0.001$ ,  $t$ 検定) に抑制した。本結果は、GalNAc4S-6ST の発現を抑制することにより、大腸の線維性変化の増強を効果的に抑制できることを示している。

本発明の薬剤は、例えば、大腸における線維性変化抑制剤として有用である。

#### 【0129】

#### 実施例8：マウス腸管線維形成モデルにおけるGalNAc4S-6ST siRNAの組織的線維形成抑制効果

実施例6と同様の方法で腸管線維形成モデルを作成し、7日目にマウスを屠殺した。採取した大腸を実施例3と同様の方法で凍結ブロックならびに、組織切片を作成した。大腸組織切片のマッソン染色像を図8に示す。マッソン染色はコラーゲン繊維を視覚化する、組織の線維性変化を評価するための指標である。GalNAc4S-6ST siRNA投与群においては、対照群に比較し、全層性 (粘膜固有層、粘膜下層、筋層) のコラーゲン繊維の沈着が明確に抑制されていた。

本発明の薬剤は、例えば、全層性 (粘膜固有層、粘膜下層、筋層) のコラーゲン繊維沈着抑制剤として有用である。

#### 【0130】

#### 実施例9：マウス腸管線維形成モデルにおけるGalNAc4S-6ST siRNAの組織学的線維芽細胞浸潤抑制効果

実施例6と同様の方法で腸管線維形成モデルを作成し、7日目にマウスを屠殺した。採取した大腸を実施例3と同様の方法で凍結ブロックならびに、組織切片を作成した。得られた切片をアセトン (和光社製) で10分間固定後、リン酸緩衝液で洗浄し、一次抗体として抗ER-TR7抗体 (ラットモノクローナル抗体、 $1 \mu\text{g/ml}$ 、BMA社製) を添加し、室温で1時間反応させた。続いて、ペルオキシダーゼ標識抗ラットIgG (1:200希釈) を用いて二次抗体反応を行った後、DAB基質 (ニチレイバイオサイエンス社製) を添加し発色させた。その後リリー・マイヤーヘマトキシリン (武藤化学社製) により核染色を行い、光学顕微鏡 (ライカ社製) 下で試料を観察し、茶色のシグナルで可視化された抗体結合を観察した。

その結果、GalNAc4S-6ST siRNA治療群では対照群に比し、線維芽細胞の全層性の浸潤が明確に抑制されていた (図9)。したがって、GalNAc4S-6ST遺伝子発現抑制により、組織病変局所の線維芽細胞の浸潤及び定着を抑制することで、線維性変化の増強を軽減していることが判明した。

本発明の薬剤は、例えば、線維芽細胞浸潤抑制剤もしくは線維芽細胞定着抑制剤として有用である。

## 【 0 1 3 1 】

実施例 10 : マウス腸管線維形成モデルにおけるGalNAc4S-6ST siRNAの組織学的マクロファージ浸潤抑制効果

実施例 6 と同様の方法で腸管線維形成モデルを作成し、7日目にマウスを屠殺した。採取した大腸を実施例 3 と同様の方法で凍結ブロックならびに、組織切片を作成した。得られた切片をアセトン（和光社製）で10分間固定後、リン酸緩衝液で洗浄し、一次抗体として抗F4/80抗体（クローンA3-1、ラットモノクローナル抗体、2  $\mu$ g/ml : CALTAG LABORATORIES社製）を添加し、室温で1時間反応させた。続いて、ペルオキシダーゼ標識抗ラットIgG（1 : 200希釈）を用いて二次抗体反応を行った後、DAB基質（ニチレイバイオサイエンス社製）を添加し発色させた。その後リリー・マイヤーヘマトキシリン（武藤化学社製）により核染色を行い、光学顕微鏡（ライカ社製）下で試料を観察し、茶色のシグナルで可視化された抗体結合を観察した。

10

その結果、GalNAc4S-6ST siRNA治療群では対照群に比し、マクロファージの全層性の浸潤が明確に抑制されていた（図 10）。したがって、GalNAc4S-6ST遺伝子発現抑制によって、マクロファージと線維芽細胞という線維性変化を持続・増強させる責任細胞群の浸潤を抑制し、総合的に組織の線維性変化を抑制していることが判明した。

本発明の薬剤は、例えば、マクロファージもしくは線維芽細胞の浸潤抑制剤として有用である。

## 【 0 1 3 2 】

実施例 11 : マウス腸管線維形成モデルにおけるGalNAcST siRNAの組織学的マクロファージ浸潤抑制効果

20

GalNAc4S-6STは4位が硫酸化されたNアセチルガラクトサミンの6位に硫酸基を転移する酵素である。本実施例では、4位硫酸転移酵素であるGalNAc-4ST1、GalNAc-4ST2というファミリーの役割に検討を加えた。実施例 6 と同様の方法で腸管線維形成モデルを作成した。7日目にマウスを屠殺した。本実施例では、GalNAc 4S-6ST siRNAのみならず、GalNAc 4ST-1とGalNAc 4ST-2（Gene World社製）を混合してマウス1匹あたり1  $\mu$ gを、媒体である1%アテノコラーゲン（高研社製）200  $\mu$ Lを混合したものを腹腔内投与した。本siRNA投与群をGalNAc ST siRNA投与群と表現する。対照群は実施例 6 と同様である。本実施例に用いたGalNAc 4S-6ST siRNA、GalNAc 4ST-1、GalNAc 4ST-2の塩基配列について以下に示す。配列は必ずしも本例のみに限定されない。

30

[GalNAc4ST-1 siRNAカクテル配列]（GenBank accession number NM\_175140）

（Gene world社製）

5' -ACCCCAACTCGGAACGATGCGGCT-3'（配列番号：35）

5' -TGCATGTTCTCGTCCATCCTGCTG-3'（配列番号：36）

5' -CGCCACCGTGTACTGTACTGTGAAGT-3'（配列番号：37）

5' -AGGCT GCTCCAAGT GAAGAGGGTG-3'（配列番号：38）

[GalNAc4ST-2 siRNAカクテル配列]（GenBank accession number NM\_199055）

（Gene world社製）

5' -ATATAGTATCTAGGATATATGTAG-3'（配列番号：39）

5' -GAAGTACCAAAAGCTGGCTGCTCTA-3'（配列番号：40）

5' -TTCTATCACTTGGACTATTTGATGTT-3'（配列番号：41）

5' -TACACAACTCCACATTTGTAATTTG-3'（配列番号：42）

40

[GALNAc4S-6ST siRNAカクテル配列]（GenBank accession number NM\_029935）

（Gene world社製）

5' -CCAGAAGCCAAGCTCATTGTTATG-3'（配列番号：43）

5' -CTGTGGAGAGGTTGTACTCAGACTA-3'（配列番号：44）

5' -ATTTCCTGGAAGACAACGTGAGAGC-3'（配列番号：45）

5' -GTCCCTTCTGCAGAAGCTGGGCCCACT-3'（配列番号：46）

マウス腸管線維形成モデルにおいては実施例 6 から 10 で詳細に検討した如く、組織の線維性変化が大腸長に集約されるため、本実施例においては7日目における大腸長を決定

50

的な評価ポイントとして示す。GalNAc ST siRNA投与群においては、対照群に比較し有意 ( $p<0.01$ 、 $t$ 検定) に大腸の短縮を抑制した (図 11)。したがって、GalNAc 4ST-1、GalNAc 4ST-2遺伝子の発現を抑制することで、腸管線維形成が抑制されることが判明した。

本発明の薬剤は、例えば、腸管線維形成抑制剤として有用である。

#### 【0133】

〔肺組織〕

#### 実施例 12：マウス肺気腫モデルにおけるC6ST-1 siRNAの肺胞間質における効果

この実施例では、基本的な肺気腫マウスモデルであるブタ膀胱由来エラストーゼ (PPE) 気管内投与モデルを使用した。このマウスモデルは古典的ではあるが再現性にすぐれ、簡便であることより肺気腫モデルとして広く使用されている。組織学的には肺胞間質への炎症細胞浸潤が認められるため、肺気腫や慢性気管支炎等の慢性閉塞肺疾患 (COPD: chronic obstructive pulmonary disease) に加えて、特発性間質性肺炎 (IIPs: idiopathic interstitial pneumonias)、塵肺、肺結核後遺症など、慢性呼吸不全に至る疾患の組織所見に共通する (Karlinsky JB et al Am Rev Respir Dis 1978;117:1109-1133.、Otto-Verberne CJ et al Protective effect of pulmonary surfactant on elastase-induced emphysema in mice. Eur Respir J 1992;5:1223-1230.、Janoff A et al Prevention of elastase-induced experimental emphysema by oral administration of a synthetic elastase inhibitor. Am Rev Respir Dis 1980;121:1025-1029.、Christensen TG, et al. Irreversible bronchial goblet cell metaplasia in hamsters with elastase-induced pancreatic emphysema. J Clin Invest 1977;59:397-404.、Lucey EC, et al. Remodeling of alveolar walls after elastase treatment of hamsters: results of elastin and collagen mRNA in situ hybridization. Am J Respir Crit Care Med 1998;158:555-564.、Snider GL, Lucey EC, Stone PJ. Animal models of emphysema. Am Rev Respir Dis 1986;133:149-169.)。

#### 【0134】

この実施例では肺気腫モデルマウスの肺組織サンプルを使用してヘマトキシリン・エオジン染色 (HE染色) を行い、C6ST-1 siRNAの気腫性病変抑制効果について比較検討を行った。

最初にマウスモデルの作製についてであるが、C57BL6/J マウス (メス、5~6週齢、日本クレア社製) に、PPE (4単位; Calbiochem-Novabiochem社製) を気管内投与する。投与後3週間飼育し肺組織を採取した。対照群は同様のマウスでPPE未投与のものをを用いた。

C6ST-1 siRNAの投与については実施例 1 と同様に行なった。PPE投与後より1週間ごとに C6ST-1 siRNA 1  $\mu$ g (ambion社製) と siRNAの媒体である1%アテノコラーゲン (高研社製) を混合したものの腹腔内投与した。投与量は200  $\mu$ L/ mouseで行った。

\*[C6ST-1 siRNAカクテル配列]

(GenBank accession number NM\_016803)

5' -gcgccccctctcccatggagaaag-3' (配列番号: 47)

5' -gctttgcctcaggatttccgggacc-3' (配列番号: 48)

5' -ggttcagccttggtctaccgtgatgtc-3' (配列番号: 49)

5' -gcagttgttgctatgcgacctgtat-3' (配列番号: 50)

採取した右肺組織を凍結用包埋剤OCTコンパウンド (Miles社製) に包埋し、液体窒素を用いて凍結ブロックを作製した。その凍結ブロックからクライオスタット (Microm社製) を用いて厚さ6  $\mu$ mの切片を作製した。

得られた切片を1%グルタルアルデヒド (ナカライテスク社製) で10分間固定後、さらにホルモールカルシウム液で10分間固定した。リン酸緩衝液で洗浄後、リリマイヤーヘマトキシリン液 (シグマアルドリッチジャパン社製) で室温、5分間染色し脱色液 (0.5% HCL含有70%エタノール、いずれもナカライテスク社製試薬を用いて作製) にて軽く洗浄した。その後10分間水洗いを行った。エオジンアルコールで室温、5分間染色し10分間水洗いを行った。100%エタノールで軽く洗浄後、3分間静置した。さらにキシレン (ナカラ

イテスク社製)軽く洗浄後、10分間静置した。この標本を光学顕微鏡(ライカ社製)を用いて観察し組織の様子を確認した。

得られた組織図を図12に示した。対照群(PPE未投与マウス)の所見では蜂の巣様の肺胞隔壁が特徴的な正常な肺実質の組織所見が確認出来る。しかしながら、中央の写真が示す未治療群(PPE投与、C6ST-1 siRNA未投与)では、肺気腫に特徴的な所見である肺胞隔壁の破壊消失と気腔の拡大に伴う気腫性病変が観察出来る。これに対して酵素治療群(PPE投与、C6ST-1 siRNA投与)では若干の肺胞隔壁の消失と気腫性病変が見られるものの、その程度は大幅に改善されていることが観察出来る所見であった。

【0135】

#### 実施例13：マウス肺気腫モデルにおけるC6ST-1 siRNAによる肺間質線維化抑制効果

10

この実施例では、C6ST-1 siRNA投与による肺胞間質の線維化関連遺伝子発現をリアルタイム定量PCR法により検討した。

実施例12と同様の方法でCOPDモデルを作成した。採取した肺組織の一部を1.5 mlチューブにとりわけ、液体窒素で凍結した。実施例1と同様の方法でcDNA合成を行ない、定量的PCRを行なった。I型コラーゲンと  $\alpha$ -SMAのプライマーの配列、PCRサイクルは同様である。C6ST-1のプライマーの配列を以下に示す。

[定量PCR Primer配列]

\*mouse C6ST-1(タカラバイオ社製)

forward : 5' -TGTTCTGCGATTTGTGGTCATA -3' (配列番号 : 51)

reverse : 5' -CCAACTC GCTCAGGGACAAGA-3' (配列番号 : 52)

20

結果を図13に示す。本モデルではC6ST-1遺伝子の発現が増強してくるが、C6ST-1 siRNA治療によって有意( $p < 0.01$ , t検定)にノックダウンされていることが確認できた。また、線維化の指標であるtype I collagenならびに  $\alpha$ -SMAの発現増強も、C6ST-1 siRNAにより有意(ともに $p < 0.01$ , t検定)に抑制した。本結果は、C6ST-1の発現を抑制することにより、肺間質の線維性変化の増強を効果的に抑制できることを示している。

本発明の薬剤は、例えば、肺間質の線維性変化抑制剤として有用である。

【0136】

#### 実施例14：マウス肺気腫モデルにおけるC6ST-1 siRNAの組織学的線維芽細胞浸潤抑制効果

30

実施例12と同様の方法で腸管線維形成モデルを作成した。採取した肺組織を実施例3と同様の方法で凍結ブロックならびに、組織切片を作成した。得られた切片をアセトン(和光社製)で10分間固定後、リン酸緩衝液で洗浄し、一次抗体として抗ER-TR7抗体(ラットモノクローナル抗体、1  $\mu$ g/ml、BMA社製)を添加し、室温で1時間反応させた。続いて、ペルオキシダーゼ標識抗ラットIgG(1:200希釈)を用いて二次抗体反応を行った後、DAB基質(ニチレイバイオサイエンス社製)を添加し発色させた。その後リリー・マイヤーヘマトキシリン(武藤化学社製)により核染色を行い、光学顕微鏡(ライカ社製)下で試料を観察し、茶色のシグナルで可視化された抗体結合を観察した。

その結果、対照群では肺胞隔壁の破壊した間質に線維芽細胞の強い集積を認めた(図14、対照群の図左)。また、肺胞隔壁が破壊されつつある部位の間質においても多数の集積を認めた(図14、対照群の図右)ことから、COPDのような病態において、線維芽細胞の過剰集積から肺胞壁の破壊過程に至るという予想外の結果を得た。一方、C6ST-1 siRNA治療群では、線維芽細胞の肺胞組織間質への浸潤が明確に抑制されていた(図14)。したがって、C6ST-1 遺伝子発現抑制により、肺胞組織間質の線維芽細胞の浸潤及び定着を抑制することで、線維性変化の増強を軽減していることが判明した。

40

本発明の薬剤は、例えば、肺胞組織間質の線維芽細胞浸潤もしくは定着抑制剤として有用である。

【0137】

#### 実施例15：マウス肺気腫モデルにおけるC6ST-1 siRNAの組織学的マクロファージ浸潤抑制効果

実施例12と同様の方法でCOPDモデルを作成した。採取した肺組織を実施例3と同様の

50



方法で凍結ブロックならびに、組織切片を作成した。得られた切片をアセトン（和光社製）で10分間固定後、リン酸緩衝液で洗浄し、一次抗体として抗F4/80抗体（クローンA3-1、ラットモノクローナル抗体、2  $\mu$ g/ml：CALTAG LABORATORIES社製）を添加し、室温で1時間反応させた。続いて、ペルオキシダーゼ標識抗ラットIgG（1：200希釈）を用いて二次抗体反応を行った後、DAB基質（ニチレイバイオサイエンス社製）を添加し発色させた。その後リリー・マイヤーヘマトキシリン（武藤化学社製）により核染色を行い、光学顕微鏡（ライカ社製）下で試料を観察し、茶色のシグナルで可視化された抗体結合を観察した。

その結果、C6ST-1 siRNA治療群では対照群に比し、マクロファージの肺胞間質への浸潤が明確に抑制されていた（図15）。したがって、C6ST-1遺伝子発現抑制によって、マクロファージと線維芽細胞という線維性変化を持続・増強させる責任細胞群の浸潤を抑制し、総合的に組織の線維性変化を抑制していることが判明した。

本発明の薬剤は、例えば、肺胞間質へのマクロファージ浸潤抑制剤として有用である。

【0138】

#### 実施例16：マウス肺気腫モデルにおけるC6ST-1 siRNAの呼吸機能保存効果

本実施例では、C6ST-1 siRNAの肺気腫モデルマウスにおける臨床効果を検討するために静肺コンプライアンス（statistic compliance: Cst）を指標として呼吸機能に与える影響について評価した。Cstは肺組織の伸びやすさを表しているが、肺泡域の組織破壊を伴う疾患である肺気腫はCstが上昇する。

実施例12で示してきた方法と同様の手順で肺気腫モデルマウスを作製し、C6ST-1 siRNAで治療を行った。それらのマウスの自発呼吸を麻酔薬にて停止させたのちFlexiVent（SCIREQ社製）呼吸機能解析装置のP-V roop modeを用いてCstを測定した。マウスとFlexiVentとの接続はマウスの自発呼吸停止後に正中切開を行い、気管内に専用カニューレを挿入し気管支周囲を結紮する方法にて行った。

本実施例の結果について図16に示した。対照群では $42.62 \pm 2.25 \mu\text{L}/\text{cmH}_2\text{O}$ であったが、未治療群で $51.22 \pm 5.2 \mu\text{L}/\text{cmH}_2\text{O}$ （vs対照群 $P=0.03$  t検定）と統計学的に有意な増加を認めた。また、C6ST-1 siRNA投与群におけるCstは、 $42.92 \pm 1.82 \mu\text{L}/\text{cmH}_2\text{O}$ （vs未治療群 $P=0.03$  t検定）と、未治療群に対して有意に低下していた。

したがって、C6ST-1 siRNA投与群では、PPEの気管内投与により誘導される肺気腫に伴うCstの増加を有意に抑制することが明らかになった。また、本実施例に示された結果は、C6ST-1の遺伝子発現を抑制することにより、肺組織の間質線維性変化に伴う肺胞破壊を抑制するだけでなく実際の臨床症状（呼吸状態）を改善する効果を有することを示唆するものであった。

本発明の薬剤は、例えば、肺胞破壊抑制剤として有用である。

【0139】

#### 実施例17：マウス肺気腫モデルにおけるC6ST-1 siRNAの組織保存効果

肺胞の気腔拡大を特徴的な病理像として示す肺気腫では、気腫性病変の進行に従い肺容量が増加する。本実施例ではC6ST-1 siRNAの治療効果が、細胞レベルでの破壊を抑制するだけでなく臓器の形態維持・保存の効果にまで及ぶものであることを立証することを目的として行われた。

本実施例で使用した肺組織は、実施例12で使用した肺組織の右肺を使用して行っている。マウスより摘出した肺組織をリン酸緩衝液で軽く洗浄後、同じくガラス容器に満たしたリン酸緩衝液につけた。リン酸緩衝液を満たしたガラス容器の重量を予め測定しておき、肺組織を容器に加えた後に増加した重量を液量に換算し肺容量とした。

本実施例の結果について図17に示した。対照群における肺容量は $277.5 \pm 61.85 \mu\text{L}$ であったが、未治療群で $413.33 \pm 77.67 \mu\text{L}$ （vs対照群 $P=0.024$  t検定）と統計学的に有意な肺容量の増加を認めた。また、C6ST-1 siRNA治療群における肺容量は、 $292.5 \pm 51.23 \mu\text{L}$ （vs未治療群 $P=0.027$  t検定）と未治療群に対して有意に肺容量の低下を認めた。

これらの結果をまとめると、C6ST-1の遺伝子発現を抑制することにより、PPEの気管内投与により誘導される肺気腫に伴う肺容量の増加を効果的に抑制することが明らかになっ

10

20

30

40

50

た。したがって、細胞レベルでの破壊を抑制するだけでなく、臓器の形態維持・保存の効果、もしくは破壊された組織の修復効果を持ち合わせていることを示すものであった。

本発明の薬剤は、例えば、肺気腫に伴う肺容量増加抑制剤として有用である。

#### 【0140】

##### 実施例18：マウス肺気腫モデルにおけるGalNAcST siRNAによる肺間質線維化抑制効果

4位および6位硫酸化が重要であることをもう一つの実施例で示す。本実施例では、実施例11と同様の方法で、GalNAcST siRNA投与による肺胞間質の線維化関連遺伝子発現をリアルタイム定量PCR法により検討した。siRNAの配列は実施例11と同様である。

実施例12と同様の方法で肺気腫モデルを作成した。採取した肺組織の一部を1.5 mlチューブにとりわけ、液体窒素で凍結した。実施例1と同様の方法でcDNA合成を行ない、定量的PCRを行なった。プライマーの配列、PCRサイクルは実施例1ならびに13と同様である。TGF- $\alpha$ の配列は以下に示す。

[定量PCR Primer配列]

\*mouse TGF- $\alpha$  (タカラバイオ社製)

forward : 5' -GTGTGGAGCAACATGTGGAAGCTCTA -3' (配列番号 : 53)

reverse : 5' -TTGGTTTCAGCCACTGCCGTA -3' (配列番号 : 54)

結果を図18に示す。本実施例においても、線維化の指標であるtype I collagen、 $\alpha$ -SMA、ならびにTGF- $\alpha$ の発現増強が、GalNAcST siRNAにより有意(ともに $p < 0.01$ , t検定)に抑制した。本結果は、GAINAc4ST-1、GAINAc4ST-2ならびにGAINAc4S-6STの発現を抑制することにより、肺間質の線維性変化の増強を効果的に抑制できることを示している。

本発明の薬剤は、例えば、肺間質の線維性変化抑制剤として有用である。

#### 【0141】

##### 実施例19：マウス肺気腫モデルにおけるGalNAcST siRNAの呼吸機能保存効果

本実施例では、GAINAcST siRNAの肺気腫モデルマウスにおける臨床効果を検討するために静肺コンプライアンス (static compliance: Cst) を指標として呼吸機能に与える影響について評価した。

実施例12で示してきた方法と同様の手順で肺気腫モデルマウスを作製し、GAINAcST siRNAで治療を行った。それらのマウスの自発呼吸を麻酔薬にて停止させたのちFlexiVent (SCIREQ社製) 呼吸機能解析装置のP-V loop modeを用いてCstを測定した。マウスとFlexiVentとの接続はマウスの自発呼吸停止後に正中切開を行い、気管内に専用カニューレを挿管し気管支周囲を結紮する方法にて行った。

本実施例の結果について図18に示した。対照群では $42.62 \pm 2.25 \mu\text{L}/\text{cmH}_2\text{O}$ であったが、未治療群で $51.22 \pm 5.2 \mu\text{L}/\text{cmH}_2\text{O}$  (vs対照群 $P=0.03$  t検定) と統計学的に有意な増加を認めた。また、C6ST-1 siRNA投与群におけるCstは、 $44.15 \pm 2.29 \mu\text{L}/\text{cmH}_2\text{O}$  (vs未治療群 $P=0.0018$  t検定) と、未治療群に対して有意に低下していた。

したがって、GalNAcST siRNA投与群では、PPEの気管内投与により誘導される肺気腫に伴うCstの増加を有意に抑制することが明らかになった。また、本実施例に示された結果は、GAINAc4ST-1、GAINAc4ST-2ならびにGAINAc4S-6STの遺伝子発現を抑制することにより、肺組織の間質線維性変化に伴う肺胞破壊を抑制するだけでなく実際の臨床症状(呼吸状態)を改善する効果を有することを示唆するものであった。

本発明の薬剤は、例えば、肺胞破壊抑制剤もしくは呼吸状態改善剤として有用である。

#### 【0142】

##### 実施例20：マウス肺気腫モデルにおけるGalNAcST siRNAの組織保存効果

本実施例ではGalNAcST siRNAの治療効果が、細胞レベルでの破壊を抑制するだけでなく臓器の形態維持・保存の効果にまで及ぶものであることを立証することを目的として行われた。

本実施例で使用した肺組織は、実施例12で使用した肺組織の右肺を使用して行っている。マウスより摘出した肺組織をリン酸緩衝液で軽く洗浄後、同じくガラス容器に満たしたリン酸緩衝液につけた。リン酸緩衝液を満たしたガラス容器の重量を予め測定しておき、肺組織を容器に加えた後に増加した重量を液量に換算し肺容量とした。

本実施例の結果について図 20 に示した。対照群における肺容量は $277.5 \pm 61.85 \mu\text{L}$ であったが、未治療群で $413.33 \pm 77.67 \mu\text{L}$  (vs対照群 $P=0.024$  t検定)と統計学的に有意な肺容量の増加を認めた。また、GAINAcST siRNA治療群における肺容量は、 $315 \pm 51.96 \mu\text{L}$  (vs未治療群 $P=0.049$  t検定)と未治療群に対して有意に肺容量の低下を認めた。

これらの結果をまとめると、GAINAc4ST-1、GAINAc4ST-2ならびにGAINAc4S-6STの遺伝子発現を抑制することにより、PPEの気管内投与により誘導される肺気腫に伴う肺容量の増加を効果的に抑制することが明らかになった。したがって、細胞レベルでの破壊を抑制するだけでなく、臓器の形態維持・保存の効果、もしくは破壊された組織の修復効果を持ち合わせていることを示すものであった。

本発明の薬剤は、例えば、肺の形態維持剤、もしくは肺の形態保存剤として有用である。

#### 【0143】

##### 〔膵臓組織〕

以下の実施例では生後2日目C57BL/6JcLマウス(雌、日本クレア社製)のStreptozotocin投与により2型糖尿病モデルを作製し、C4ST-1(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 1) siRNA、C4ST-2(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 2) siRNA、C4ST-3(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 3) siRNA処置による体重変動、血糖値変動、遺伝子発現や膵臓組織における線維性変化を検討した。各siRNAの投与方法については、実施例1と同様の方法で行なった。配列を以下に示す。

##### \*[C4ST-1 siRNAカクテル配列]

C4ST1(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 1)

(GenBank accession number NM\_021439)

5' -ACAAAGCCATGAAGCCGGCGCTGCTGGAAGTGATGAGGATGAACAGAATT-3' (配列番号: 55)

5' -CAACCTGAAGACCTTAACCACTACA-3' (配列番号: 56)

5' -GCATCCCAGAGATCAACCACCGCTTG-3' (配列番号: 57)

##### \*[C4ST-2 siRNAカクテル配列]

C4ST2(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 2)

(GenBank accession number NM\_021528)

5' -GCCAGGAGTGGGCCAGCCAGGGC -3' (配列番号: 58)

5' -ATGACCAAGCCGCGGCTCTCCGGCTG -3' (配列番号: 59)

5' -AGAGCCTGCTGGACCGGGGAGCCCTA -3' (配列番号: 60)

5' -GAGACCCCTGGACATCCCCGGGAACA-3' (配列番号: 61)

##### \*[C4ST-3 siRNAカクテル配列]

C4ST3(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 3)

(GenBank accession number XM\_355798)

5' -ATGACTGTGCGCTGCCACGCGTGCCA -3' (配列番号: 62)

5' -CAGCATGGGAAGACGCTCCTGTTGCA -3' (配列番号: 63)

5' -TCCAAGCGCAATCCCTGCGCACGAGGCG -3' (配列番号: 64)

5' -GCCTGGCCTGCTGCCCTCGCTGGCC -3' (配列番号: 65)

まず、サンプル調製するため以下の様に行った。

#### 【0144】

#### 実施例 21: Streptozotocin誘発性 C57BL/6JcL 2 型糖尿病モデルマウスによるC4ST-1 siRNA、C4ST-2 siRNA、C4ST-3 siRNA処置における抗肥満効果の検討

妊娠14日目 C57BL/6JcLマウス(日本クレア社製)を飼育、出産させ、出生後2日令 C57BL/6JcLマウス雌、各々にStreptozotocin 10 mg/mL (SIGMA社製) 20  $\mu\text{L}$ /headに皮下注射し、4週令までCE-2(日本クレア社製)の飼料、滅菌水を与え飼育し、4週令よりHigh Fat Diet食(日本クレア社製)、滅菌水を与え、2週間飼育させた。2週間目にsiRNA C4ST-1(Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 1)、C4ST-2(Chondroitin

D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 2)、C4ST-3 (Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 3) 1 µg (GeneWorld社製) をsiRNA媒体である1% Atelocollagen (高研社製) と混合させたものを1回/1週間 200 µL 腹腔内投与 (1回/1週間) の2回 (2週間) 処置を行った。実験14日目にBrdU 5 mg/mL (ZyMED Laboratory, Inc社製) 100 µLを尾静脈内投与処置し、1時間後、解剖し、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、卵巣、筋肉を摘出し、免疫染色用サンプル、遺伝子発現解析用サンプルを得た。体重変動に関しては、実施例期間中、14日間、経時的に測定を行った。

図2-1に結果を示した。縦軸に体重 (g) を横軸に測定日数 (days) を示した。図2-1よりControl群と比較してC4ST-1 siRNA処置群、C4ST-2 siRNA処置群、C4ST-3 siRNA処置群において処置10日目以降、体重増加が抑えられる傾向を示した。C4ST-2 siRNA処置群、C4ST-3 siRNA処置群においては、処置18日目に有意に (ともに $p<0.05$ ) 体重増加が抑制された。本結果はC4ST-1、C4ST-2、C4ST-3の発現を抑制することにより、2型糖尿病に付随する肥満を抑制できることを示している。

本発明の薬剤は、例えば、体重増加抑制剤、もしくは2型糖尿病に付随する肥満抑制剤として有用である。

#### 【0145】

実施例2-2: Streptozocin誘発性 C57BL/6JcL 2型糖尿病モデルマウスによるC4ST-1 siRNA、C4ST-2 siRNA、C4ST-3 siRNA処置におけるインスリン抵抗性の検討

解剖前日にインスリン抵抗性テスト (Insulin-tolerance test) としてHuman crystalline insulin (0.75 U/kg) を腹腔内投与処置し、0分後、15分後、60分後の血糖値をグルコース血糖値測定器 (ボンビックス薬品社製) を用い測定を行い評価を実施した。siRNA処置後、0分後、15分後、60分後の血糖値の変動を図2-2に示した。縦軸に血糖値 (mg/dL)、横軸にInsulin-tolerance test後、0分後、15分後、60分後を示した。

図2-2よりControl群と比較してC4ST-1 siRNA処置群、C4ST-2 siRNA処置群、C4ST-3 siRNA処置群において処置後、0分後、15分後においては有意な血糖値の減少は認められなかったが、60分後においてC4ST-1 siRNA処置群、C4ST-2 siRNA処置群、C4ST-3 siRNA処置群各々で有意な血糖値の減少が認められた。本結果は、C4ST-1、C4ST-2、C4ST-3の発現抑制により、2型糖尿病の本質的な機能障害であるインスリン抵抗性を効果的に改善できることを示している。

本発明は、例えば、2型糖尿病のインスリン抵抗性改善剤として有用である。

#### 【0146】

実施例2-3: Streptozocin誘発性 C57BL/6JcL 2型糖尿病モデルマウスによるC4ST-1 siRNA、C4ST-2 siRNA、C4ST-3 siRNA処置における脾臓組織遺伝子発現の検討

Streptozocin誘発性C57BL/6JcLマウス、雌より摘出した臓器 (脾臓) 50 mg当たりに対し、実施例1と同様にcDNAを調整し、以下の組成でPCR反応を行った。

PCR Buffer 2 µL [組成: 166 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Sigma Aldrich Japan社製)、670 mM Tris pH8.8 (Invitrogen社製)、67 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Sigma Aldrich Japan製)、100 mM 2-mercaptoethanol] (WAKO社製)、25 mM dNTP mix 0.8 µL (Invitrogen社製)、DMSO 0.6 µL (Sigma Aldrich Japan社製)、Primer Forward 0.2 µL (GeneWorld社製)、Primer Reverse 0.2 µL (GeneWorld社製)、大塚蒸留水 15.7 µL (大塚製薬社製)、Taq polymerase 0.1 µL (Perkin Elmer社製)、上記より得られたcDNA 1 µLを混合させAuthorized Thermal Cycler (Eppendorf社製) により94 45second、56 45second、72 60second 35 cycle反応させた。反応終了後、得られたPCR産物に2 µL Loading Dye (Invitrogen社製) を加え、1.5% UltraPure Agarose (Invitrogen社製) ゲルを作製し、Mupid-2 plus (ADVANCE社製) により100 V、20分間 電気泳動を行った。泳動後、1×LoTE [組成: 3 mM Tris-HCl (pH7.5) (Invitrogen社製)、0.2 mM EDTA (pH7.5) (Sigma Aldrich Japan社製)] にて10000倍希釈Ethydium Bromide (Invitrogen社製) 染色液中で20分間~30分間振とうさせた後、I-Scope WD (ADVANCE製) に設置したEXILIM (CASIO社製) にてゲル撮影し遺伝子発現の確認を行った。

今回、用いたPrimer (Forward、Reverse) (GeneWorld社製) を以下に列記する。

## [Primer配列]

## \*GAPDH

Forward : 5' -CTGCCAAGTATGACATCA -3' (配列番号 : 66)

Reverse : 5' -TACTCCTTGGAGGCCATGTAG -3' (配列番号 : 67)

## \*C4ST1 (Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 1)

Forward : 5' -gtggatgaggaccacgaact-3' (配列番号 : 68)

Reverse : 5' -cttttcaagcgggtggtgat-3' (配列番号 : 69)

## \*C4ST2 (Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 2)

Forward : 5' -acctcctagaccacacacg-3' (配列番号 : 70)

Reverse : 5' -ggatgttggcaaaccagtct-3' (配列番号 : 71)

## \*C4ST3 (Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 3)

Forward : 5' -atgagcccttcaacgaacac-3' (配列番号 : 72)

Reverse : 5' -tggtagaaggggctgatgtc-3' (配列番号 : 73)

## 【0147】

結果を図23に示した。RT-PCRによりPositive controlであるGAPDHの発現がControl群、C4ST1 (Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 1)、C4ST2 (Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 2)、C4ST3 (Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 3)、において各々認められ、Control群と比較しC4ST1 (Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 1) siRNA、C4ST2 (Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 2) siRNA、C4ST3 (Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 3) siRNA処置群では発現減少が認められ、Atellocollagen媒体C4ST1 (Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 1) siRNA、C4ST2 (Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 2) siRNA、C4ST3 (Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 3) siRNA投与によりC4ST1 (Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 1)、C4ST2 (Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 2)、C4ST3 (Chondroitin D-N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 3) 遺伝子のノックダウンが確認された。

## 【0148】

実施例24 : Streptozocin誘発性 C57BL/6JcL 2型糖尿病モデルマウスによるC4ST-1 siRNA、C4ST-2 siRNA、C4ST-3 siRNA処置における膵臓アミロイド前駆タンパク質蓄積の検討

本実施例では、2型糖尿病モデルマウスの膵臓組織サンプルを使用して、C4ST-1 siRNA、C4ST-2 siRNA、C4ST-3 siRNAのアミロイド前駆タンパク質 (APP : Amyloid precursor protein) 沈着抑制効果について比較検討を行った。細胞の存在するisletにおけるAPP、アミロイド線維の沈着は、2型糖尿病の重要な病理組織所見であることは古くから知られているが、近年ではアルツハイマー病との関わりも判明している (Johnson KH et al. N Eng J Med 321:513, 1989.、Rhodes CJ. Science 307:380, 2005.、Haan MN. Nat Clin Pract Neurol 3:159, 2006.、Prentki M et al. J Clin Invest 116:1802, 2006.)。

得られた組織サンプル切片を、実施例3と同様の方法で抗アミロイド前駆体タンパク質抗体 (calbiochem社) を用いて染色を行い、組織レベルの発現を評価、検討した。図24に正常マウス (Normal) 群、Control群、C4ST-2 siRNA処置群の組織画像を示した。2型糖尿病モデルマウスのisletにおいてはAPPの沈着が増強してくるが、Control群と比較してC4ST-2 siRNA処置群では明確に抑えられていることが確認された。

本発明の薬剤は、例えば、アミロイド線維沈着抑制剤として有用である。

## 【0149】

実施例25 : Streptozocin誘発性 C57BL/6JcL 2型糖尿病モデルマウスによるC4ST-1 siRNA、C4ST-2 siRNA、C4ST-3 siRNA処置における組織学的線維芽細胞浸潤抑制効果

採取した膵臓組織を実施例3と同様の方法で凍結ブロックならびに、組織切片を作成した。得られた切片をアセトン (和光社製) で10分間固定後、リン酸緩衝液で洗浄し、一次抗体として抗ER-TR7抗体 (ラットモノクローナル抗体、1 µg/ml : BMA社製) を添加し、室

温で1時間反応させた。続いて、ペルオキシダーゼ標識抗ラットIgG(1:200希釈)を用いて二次抗体反応を行った後、DAB基質(ニチレイバイオサイエンス社製)を添加し発色させた。その後リリー・マイヤーヘマトキシリン(武藤化学社製)により核染色を行い、光学顕微鏡(ライカ社製)下で試料を観察し、茶色のシグナルで可視化された抗体結合を観察した。

その結果、C4ST-1 siRNA、C4ST-2 siRNA、C4ST-3 siRNA各治療群では対照群に比し、線維芽細胞の膵臓isletへの浸潤が明確に抑制されていた(図25)。したがって、C4ST-1、C4ST-2、C4ST-3遺伝子発現抑制によって、細胞の局在するisletへの線維芽細胞浸潤と定着を抑制することで、組織の線維性変化の増強を軽減していることが判明した。

本発明の薬剤は、例えば、isletへの線維芽細胞浸潤抑制剤として有用である。

10

#### 【0150】

実施例26: Streptozocin誘発性 C57BL/6JcL 2型糖尿病モデルマウスによるC4ST-1 siRNA、C4ST-2 siRNA、C4ST-3 siRNA処置における組織学的マクロファージ浸潤抑制効果

採取した膵臓組織を実施例3と同様の方法で凍結ブロックならびに、組織切片を作成した。得られた切片をアセトン(和光社製)で10分間固定後、リン酸緩衝液で洗浄し、一次抗体として抗F4/80抗体(クローンA3-1、ラットモノクローナル抗体、2µg/ml: CALTAG LABORATORIES社製)を添加し、室温で1時間反応させた。続いて、ペルオキシダーゼ標識抗ラットIgG(1:200希釈)を用いて二次抗体反応を行った後、DAB基質(ニチレイバイオサイエンス社製)を添加し発色させた。その後リリー・マイヤーヘマトキシリン(武藤化学社製)により核染色を行い、光学顕微鏡(ライカ社製)下で試料を観察し、茶色のシグナルで可視化された抗体結合を観察した。

20

その結果、C4ST-1 siRNA、C4ST-2 siRNA、C4ST-3 siRNA各治療群では対照群に比し、マクロファージの肺胞間質への浸潤が明確に抑制されていた(図26)。したがって、C6ST-1遺伝子発現抑制によって、マクロファージと線維芽細胞という線維性変化を持続・増強させる責任細胞群の浸潤を抑制し、総合的に組織の線維性変化を抑制していることが判明した。

本発明の薬剤は、例えば、肺胞間質へのマクロファージ浸潤抑制剤として有用である。

#### 【0151】

実施例27: Streptozocin誘発性 C57BL/6JcL 2型糖尿病モデルマウスによるGalNAcST siRNA処置におけるインスリン抵抗性の検討

30

4位および6位硫酸化が重要であることを示すためのもう一つの実施例を示す。本実施例では、実施例11、実施例18と同様の方法でGalNAcST siRNA投与によるインスリン抵抗性の改善を検討した。実施例21と同様の方法で2型糖尿病モデルを作成し、実施例22と同様の方法でインスリン抵抗性を検査した。結果を図27に示す。

GalNAcST siRNA投与によりインスリン負荷後の良好な血糖降下作用が認められた。本結果は、GalNAc4ST-1、GalNAc4ST-2、GalNAc4S-6STの発現を抑制することにより、膵臓組織isletの線維性変化に伴うインスリン抵抗性を効果的に改善できることを示している。

本発明の薬剤は、例えば、血糖降下剤、もしくは膵臓組織のインスリン抵抗性改善剤として有用である。

#### 【0152】

40

#### 〔腎臓組織〕

腎臓組織の線維性変化は、あらゆる腎疾患のエンドポイントと考えられている。古典的には1)間質性腎疾患(tubulointerstitial disease)が腎線維形成の代表的疾患とされてきた。これには薬剤性、感染性、放射線性、重金属性間質性腎障害の他に、シェーグレン症候群や移植拒絶反応(chronic allograft nephropathyなど)、移植片対宿主反応(graft-versus-host diseaseなど)なども含まれる。次に、2)血管性腎疾患が挙げられる。いわゆる高血圧に伴う腎硬化症の他、近年では動脈硬化症、メタボリック症候群に伴う線維形成も含まれる。さらには、糸球体原発疾患でも、蛋白尿などの結果、間質の線維形成を来し慢性腎不全につながることから、3)原発性糸球体疾患、ならびに4)続発性糸球体疾患における腎線維性変化がある。3)にはIgA腎症、微小変化型ネフローゼ症候

50

群、膜性腎症、膜性増殖性腎炎、巣状糸球体硬化症（FGFS：focal segmental glomerulosclerosis）が、4）には糖尿病性腎症、SLE（systemic lupus erythematosus）に伴うループス腎炎、慢性関節リウマチに伴う腎症、アミロイド腎症、B型肝炎やC型肝炎に伴う腎症などが含まれる。最後に、5）尿路閉塞に伴う間質性腎疾患が挙げられ、尿路結石、腫瘍、神経因性膀胱などが含まれる。

近年、腎機能の程度により分類・診断される臨床的な疾患概念として、これらの疾患群を慢性腎疾患（CKD：chronic kidney disease）と総称するようになった。CKDは間質の線維性変化により徐々に進行し、慢性腎不全、ESRD（end-stage renal disease）に至る。従来、ESRDに対しては人工透析しか決定的な治療法がなかった。アンギオテンシン系の降圧剤の使用によりESRDへの進行を遅らせる可能性も示唆されているが、腎線維形成そのものを標的とした治療法は確立されていない。CKDに対する新規治療が切に望まれるが、その病態進行プロセスから、線維性変化を治療標的とすることが、原発疾患の種類に関わらず共通した治療戦略として決定的な意義を持つ。CKDは全世界で5億人の患者が存在すると報告されていること、生活習慣の変化に伴い今後も一層患者数の増加が予測されること、更には、人工透析に至るまでに心血管障害で死亡するリスクが極めて高いことが大規模試験で明らかになったこと、から、CKDを21世紀型疾患として捉え、積極的な治療を行なうことが医療界の重大な課題となっている（Sergio A et al. Hypertension 38:635, 2001.、Weiner DE et al. JASN 15:1307, 2004.、Anavekar NS et al. N Eng J Med 351:1285, 2004.、Remuzzi G et al. J Clin Invest 116:288, 2006.、Tonelli M et al. BMJ 332:1426, 2006.、Khawaja A et al. Kidney International doi:10.1038/sj.ki.5002489）。

本実施例では、腎間質の組織学的な線維性変化に対する、4位及び6位硫酸基を修飾する糖鎖遺伝子阻害による変化を検討した。

#### 【0153】

##### 実施例28：マウス糖尿病性腎症モデルにおけるC4ST-1 siRNAの抗線維形成効果の検討

実施例28と同様の方法で2型糖尿病モデルを作成した。妊娠14日目 C57BL/6JcLマウス（日本クレア社製）を飼育、出産させ、出生後2日齢C57BL/6JcLマウスにstreptozotocin（STZ：シグマ社製）を投与し、STZ誘発糖尿病モデルを作成した。マウスにSTZ（10 mg/ml）20 µlを皮下に注射し、これを2日間で計3回行い、合計60 µl投与した。これを4週齢まで親マウスと共に通常餌で飼育し、満4週齢で離乳させた後よりhigh fat diet（日本クレア社製）を給餌し、2週間飼育させた。2週間目にC4ST-1（Chondroitin D-N-acetylglucosamine-4-O-sulfotransferase 1）siRNA 1 µg（GeneWorld社製）をsiRNA媒体である0.1% Atelocollagen（高研社製）と混合させたものを1回/1週間200 µL腹腔内投与（1shot/1週間）の2回（2週間）処置を行った。実験14日目に解剖し、腎臓を摘出し、免疫染色用サンプルを得た。遺伝子発現や体重、インスリン抵抗性に関する効果は、実施例21、22、23に記載の通りである。

得られた腎臓組織サンプル切片をアセトン（和光社製）で10分間固定後、リン酸緩衝液で洗浄し、一次抗体として抗ER-TR7抗体（ラットモノクローナル抗体、1 µg/ml、BMA社製）を添加し、室温で1時間反応させた。続いて、ペルオキシダーゼ標識抗ラットIgG（1：200希釈）を用いて二次抗体反応を行った後、DAB基質（ニチレイバイオサイエンス社製）を添加し発色させた。その後リリー・マイヤーヘマトキシリン（武藤化学社製）により核染色を行い、光学顕微鏡（ライカ社製）下で試料を観察し、茶色のシグナルで可視化された抗体結合を観察した。

その結果、C4ST-1 siRNA治療群では対照群に比べて腎皮質及び髄質における線維芽細胞（ER-TR7陽性細胞）の浸潤が少なかった（図28、原図はカラー）。また炎症性細胞の線維形成を定量化するため、ER-TR7陽性細胞をカウントした。それぞれの標本を顕微鏡下で400倍にて10視野観察し、陽性細胞数をカウントし対照群とC4ST-1 siRNA投与群とを比較した。その結果、対照群と比較しC4ST-1 siRNA治療群ではER-TR7の陽性率が有意に低下した（ $p<0.001$ ）。

#### 【0154】

### 実施例 29 : マウス糖尿病性腎症モデルにおけるC4ST-1 siRNAのマクロファージ浸潤効果の検討

得られた腎臓組織サンプル切片をアセトン（和光社製）で10分間固定後、リン酸緩衝液で洗浄し、一次抗体として抗ER-TR7抗体（ラットモノクローナル抗体、1 µg/ml、BMA社製）を添加し、室温で1時間反応させた。続いて、ペルオキシダーゼ標識抗ラットIgG（1：200希釈）を用いて二次抗体反応を行った後、DAB基質（ニチレイバイオサイエンス社製）を添加し発色させた。その後リリー・マイヤーヘマトキシリン（武藤化学社製）により核染色を行い、光学顕微鏡（ライカ社製）下で試料を観察し、茶色のシグナルで可視化された抗体結合を観察した。

その結果、C4ST-1 siRNA治療群では対照群に比べて腎皮質及び髄質におけるマクロファージ（F4/80陽性細胞）の浸潤が少なかった（図29、原図はカラー）。また、実施例29と同様に組織病変を定量化すると、対照群と比較し、C4ST-1 siRNA治療群ではマクロファージの陽性率が有意に低下していた（ $p < 0.001$ ）。

【0155】

### 実施例 30 : マウス糖尿病性腎症モデルにおけるC4ST-1 siRNAの、組織における線維芽細胞活性化の検討

腎臓組織サンプル切片をアセトン（和光社製）で10分間固定後、リン酸緩衝液で洗浄し、一次抗体として抗ヒト平滑筋線維アクチン抗体（SMA：マウスモノクローナル抗体、1：100、DACO社製）を添加し、室温で1時間反応させた。続いて、ヒストファインマウスステインキット（ニチレイバイオサイエンス社製）を用いて二次抗体反応を行った後、DAB基質（ニチレイバイオサイエンス社製）を添加し発色させた。その後リリー・マイヤーヘマトキシリン（武藤化学社製）により核染色を行い、光学顕微鏡（ライカ社製）下で試料を観察し、茶色のシグナルで可視化された抗体結合を観察した。

その結果、C4ST-1 siRNA治療群では対照群に比べて傍系球体及び間質におけるSMA陽性細胞の定着が明確に減少していた（図30、原図はカラー）。SMAは線維芽細胞活性化の機能的なマーカーであり、本結果は、C4ST-1の遺伝子発現を抑制することで組織に浸潤している線維芽細胞の活性化が抑制していることを示している。

本発明の薬剤は、例えば、線維芽細胞活性化抑制剤として有用である。

【0156】

### 実施例 31 : マウス糖尿病性腎症モデルにおけるGalNAc4S-6ST siRNAの、組織における線維性変化の検討

実施例28と同様の方法で糖尿病性腎症モデルを作成し、GalNAc4S-6ST siRNAの効果を検討した。本実施例では経過をより長期に渡って観察した。GalNAc4S-6ST siRNAの配列は実施例1と同様であり、8週齢ならびに9週齢の時点で各1回腹腔内投与を施した。さらに、比較対象としてアンギオテンシンII受容体阻害剤（ARB）であるValsartanを30 mg/kgの容量で経口投与を、同スケジュールで行なった。10週齢で免疫組織学的検査と遺伝子発現検査のための腎臓組織を採取した。実施例1と同様の方法で腎臓組織の定量的PCRを行い、遺伝子発現を検討した。本実施例では内部コントロールとして36B4を使用しており、その配列を以下に示す。

[定量PCR Primer配列]

\*mouse 36B4(タカラバイオ社製)

forward : 5' -TTCCAGGCTTTGGGCATCA -3' (配列番号：74)

reverse : 5' -ATGTTTCAGCATGTTTCAGCAGTGTG -3' (配列番号：75)

結果を図31に示す（なお、GalNAc4S-6STは図中ではG#1と表記する）。糖尿病性腎症モデルにおいては、腎臓組織のGalNAc4S-6STの発現が増強するが、GalNAc4S-6ST siRNAの投与により、腎臓組織でのGalNAc4S-6ST遺伝子発現が有意に抑制されていた。さらに、線維化のマーカーであるSMAとTGF $\beta$ の発現増強が有意に抑制されていた。ARBと治療効果を比較検討すると、TGF $\beta$ に関しては両群とも抑制効果を示し、有意差は出なかったが、

SMAに関してはGalNAc4S-6ST siRNA投与群がARB投与群に比較し有意な抑制効果を示した。本結果は、GalNAc4S-6STの遺伝子発現を抑制することにより、腎臓組織における線維性

10

20

30

40

50



変化を示すマーカーが抑制できたことを示している。更には、線維芽細胞の活性化（SM Aの増強）に関しては、GalNAc4S-6ST siRNAの効果が際立って優れていることも示された。

#### 【0157】

#### 実施例32：マウス糖尿病性腎症モデルにおけるGalNAc4S-6ST siRNAの線維芽細胞浸潤における検討

線維芽細胞の腎組織内浸潤の程度は、実施例28と同様の方法で免疫組織学的検討を加え、定量的評価を行った。結果を図32に示す。GalNAc4S-6ST siRNA投与により、線維芽細胞の腎間質内浸潤は有意に抑制された。間質全体的な定量的検索ではARBとの有意差を認めなかったが、傍糸球体領域に浸潤する線維芽細胞に限定した検討では、GalNAc4S-6ST siRNA投与群が図の如く明確な抑制効果を示した。

10

本発明の薬剤は、例えば、線維芽細胞の腎間質内浸潤抑制剤として有用である。

#### 【0158】

#### 実施例33：マウス糖尿病性腎症モデルにおけるGalNAc4S-6ST siRNAのマクロファージにおける検討

線維芽細胞の腎組織内浸潤の程度は、実施例29と同様の方法で免疫組織学的検討を加え、定量的評価を行った。結果を図33に示す。GalNAc4S-6ST siRNA投与により、マクロファージの腎間質内浸潤は有意に抑制された。間質全体的な定量的検索ではARBとの有意差を認めなかったが、傍糸球体領域に浸潤するマクロファージに限定した検討では、GalNAc4S-6ST siRNA投与群が図の如く明確な抑制効果を示した。

20

本発明の薬剤は、例えば、マクロファージの腎間質内浸潤抑制剤として有用である。

#### 【0159】

#### 実施例34：マウス糖尿病性腎症モデルにおけるGalNAc4S-6ST siRNAの糸球体基底膜肥厚における検討

実施例32、33と同様の方法で、タイプIVコラーゲンの免疫染色を行った。一次抗体として抗マウスIV型コラーゲンウサギ抗血清（エル・エス・エル社製）を添加し、室温で1時間反応させた。続いて、ペルオキシダーゼ標識抗ラビットIgG（1：200希釈）を用いて二次抗体反応を行った後、DAB基質（ニチレイバイオサイエンス社製）を添加し発色させた。その後リリー・マイヤーヘマトキシリン（武藤化学社製）により核染色を行い、光学顕微鏡（ライカ社製）下で試料を観察し、茶色のシグナルで可視化された抗体結合を観察した。

30

IVコラーゲンの蓄積を定量化するため、糸球体周囲に茶色のシグナルで可視化されたコラーゲンの厚みを測定した。それぞれの標本を糸球体15～20個において糸球体周囲で最も肥厚している部分の厚みをモニター上でノギスを用いて計測した。その結果、コントロール群に比較し、GalNAc4S-6ST siRNA投与群で有意に糸球体基底膜（GBM）の肥厚が抑制されていた（図34）。ARBと比較した場合、GalNAc4S-6ST siRNA投与群で肥厚をより優勢に抑制する傾向を示した。

本発明の薬剤は、例えば、糸球体基底膜肥厚抑制剤として有用である。

#### 【0160】

#### 実施例35：マウス糖尿病性腎症モデルにおけるGalNAc4S-6ST siRNAのアンギオテンシン経路における検討

40

糖尿病性腎症の線維形成においてはアンギオテンシンIIの関与が報告されている。本実施例では腎臓組織の定量的PCRでアンギオテンシン経路の検討を行った。本モデルにおいてはアンギオテンシノーゲン及びアンギオテンシン変換酵素（ACE）の発現に増強が認められ（図35）、これが腎局所のアンギオテンシンIIを増強させる要因と考えられた。GalNAc4S-6ST siRNA投与群においてはアンギオテンシノーゲンとACEの抑制効果を認めた（図35）。本結果により、GalNAc4S-6STの遺伝子抑制によって線維芽細胞の浸潤・活性を抑制することにより、アンギオテンシン経路においても改善効果を示すことが判明した。

本発明の薬剤は、例えば、アンギオテンシノーゲン発現抑制剤、もしくはアンギオテンシン変換酵素抑制剤として有用である。

50

## 【0161】

実施例36：マウス糖尿病性腎症モデルにおけるGalNAc4S-6ST siRNAの血清クレアチニン濃度における検討

糖尿病性腎症からESRDに至る過程で、腎機能の低下に伴い血清クレアチニン濃度が上昇するため、臨床的に最も汎用される腎機能マーカーである。しかしながら、血清クレアチニンが上昇した時点では既に機能的ネフロン50%の機能低下を来している事が明らかになっており、如何にクレアチニン上昇前に腎機能を保護するかが臨床的には大きい課題である。

本モデルにおいても既に組織学的線維形成が進行した18週齢においてようやく血清クレアチニン濃度の上昇を認めた(図36)。コントロール群に比較して、GalNAc4S-6ST siRNA投与群においては、血清クレアチニンの上昇を抑制した(図36)。本結果は、GalNAc4S-6STの遺伝子抑制により、腎組織の線維性変化を抑制する事で、血清クレアチニンの上昇すなわち腎機能の低下を抑制するという、極めて有効な腎保護作用を呈する事を示している。

本発明の薬剤は、例えば、腎機能低下抑制剤、もしくは腎保護剤として有用である。

## 【0162】

実施例37：マウス糖尿病性腎症モデルにおけるGalNAcST siRNAの抗線維化効果の検討

4位及び6位硫酸化が重要である事をもう一つの実施例で示す。実施例11と同様の方法で、GalNAcST siRNA投与による腎間質の線維性変化を検討した。GalNAcST siRNAの投与スケジュールは実施例28と同様である。実施例31と同様の方法で、腎臓組織を用いた定量的PCRを行った。本実施例では内部コントロールにアクチンを使用しており、その配列を以下に示す。

[定量PCR Primer配列]

\*mouse アクチン(タカラバイオ社製)

forward : 5' -CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC -3' (配列番号: 76)

reverse : 5' -ATGGAGCCACCGATCCACA -3' (配列番号: 77)

図37に示す通り、糖尿病性腎症モデルの腎組織においては、GalNAc4ST-1、GalNAc4ST-2、GalNAc4S-6STの発現増強を認めたが、GalNAcST siRNA投与により、全ての遺伝子発現が有意に抑制された。

## 【0163】

実施例38：マウス糖尿病性腎症モデルにおけるGalNAcST siRNAの抗線維形成ならびに腎保護作用の検討

GalNAcST siRNA投与群においては、対照群と比較して、腎組織における線維形成のマーカーであるSMA、TGF- $\beta$ 1、CTGFの発現増強も有意に抑制された(図38)。更には、ACEの発現増強も有意に抑制された。本結果は、GalNAc4ST-1、GalNAc4ST-2、GalNAc4S-6STの発現を抑制する事によって、腎組織の線維形成を抑制し、腎保護に働く事を示している。実施例35の結果と併せると、いずれの遺伝子を抑制してもACEの低下が顕著である事から、血圧低下作用を有する事もまた明らかである。

本発明の薬剤は、例えば、降圧剤として有用である。

## 【0164】

実施例39：マウス薬剤性間質性腎炎モデルにおけるGalNAc4S-6ST siRNAの遺伝子発現における検討

本実施例では、典型的な薬剤性間質性腎炎におけるGalNAc4S-6ST siRNAの効果を検討した。最初に、マウスモデルの作製についてであるが、C57BL6/Jマウス(オス、8週齢、日本クレア社製)に、アドリアマイシン(15 mg/kg; 協和発酵社製)を腹腔内投与する。投与後1週間飼育し、腎臓組織を採取した。対照群は、同様のマウスでアドリアマイシンを投与せず、同時期に購入・飼育したものをを用いた。

GalNAc 4S-6ST siRNAは、実施例1と同様の方法で、アドリアマイシン投与の24時間前に、マウス1匹あたり、GalNAc 4S-6ST siRNA 1  $\mu$ g(北海道システムサイエンス社製)と、媒体である1%アテノコラーゲン(高研社製)200  $\mu$ Lを混合したものを腹腔内投与した。

本実施例における典型的な薬剤性間質性腎炎のモデルにおいても、腎臓組織におけるGalNac 4S-6STの発現増強を認め（図39）、GalNac 4S-6ST siRNA投与によりその発現は有意に抑制された。

【0165】

実施例40：マウス薬剤性間質性腎炎モデルにおけるGalNAc4S-6ST siRNAの遺伝子発現における検討

本実施例では、実施例34と同様の方法でタイプIコラーゲンの免疫染色を行った。一次抗体として抗ラットI型コラーゲンウサギ抗血清（エル・エス・エル社製）を添加し、室温で1時間反応させた。続いて、ペルオキシダーゼ標識抗ラビットIgG（1：200希釈）を用いて二次抗体反応を行った後、DAB基質（ニチレイバイオサイエンス社製）を添加し発色させた。その後リリー・マイヤーヘマトキシリン（武藤化学社製）により核染色を行い、光学顕微鏡（ライカ社製）下で試料を観察し、茶色のシグナルで可視化された抗体結合を観察した。

10

結果を図40に示す。コントロール群では傍系球体から間質にかけて広くタイプIコラーゲンの沈着を認めるのに対し、GalNac 4S-6ST投与群では顕著に沈着が抑制されていた。本結果は、薬剤性間質性腎炎においても、GalNac 4S-6STの発現を抑制する事で、腎組織の線維性変化を抑制できる事を示している。

本発明の薬剤は、例えば、腎組織の線維性変化抑制剤として有用である。

【0166】

実施例41：片側尿管結紮術（UUO）による腎線維化モデルマウスにおけるC6ST siRNAの抗線維化効果の検討

20

まず、マウス腎線維化モデルの作成に関してであるが、C57BL/6JcLマウス（、8週齢、日本クレア社製）に片側尿管結紮術（UUO）を行い、腎線維化モデルを作成した。この腎線維症モデルマウスは再現性に優れており、マウスの腎線維症の実験系で広く用いられている（American journal of pathology 2003 163;4 1261-1273）。マウスをケタラル/キシラジン麻酔下で開腹し、尿管を露出させ、右尿管を4-0号手術用糸で2カ所結紮し、1-0号手術用糸にて腹膜、皮膚を縫合した。

腎線維化モデルマウスの典型例として片側尿管結紮術（UUO）による腎線維化モデルマウスを用いてC6ST siRNA投与によるC6ST発現の抑制効果をPCR法により確認した。C57BL/6JcLマウス（、8週齢、日本クレア社製）にUUOを施術し腎線維化モデルを作成した。また、UUOを施術する直前に、マウスにはC6ST-1 siRNA、C6ST-2 siRNA混合物（1μg/匹、ジーンワールド社製）、またはPBSをsiRNA媒体である0.1% Atelocollagen（高研社製）に混合し200μlを腹腔内に注射した。この処置を行ったマウス群をC6ST siRNA群、対照群と名付けた。実験8日目に解剖し、UUO施術腎を摘出し、免疫染色用サンプル、遺伝子発現解析用サンプルを得た。実施例1と同様の方法で定量的PCRを行なった。

30

今回、用いたC6ST-1 siRNA、C6ST-2 Primer（Forward、Reverse）（GeneWorld社製）を以下に示す。

【0167】

[Primer配列]

\*C6ST1（Chondroitin 6-sulfotransferase-1）

40

Forward：5'-tgtgtggacacacctcccta-3'（配列番号：78）

Reverse：5'-cttcaaagggtcccttcctc-3'（配列番号：79）

\*C6ST2（Chondroitin 6-sulfotransferase-2）

Forward：5'-cagcttgagccatttcaaca-3'（配列番号：80）

Reverse：5'-gggtgaggcctttaggaac-3'（配列番号：81）

[C6ST-1カクテル配列]（Gene Bank accession number NM\_016803）

（Gene world社製）

5'-gcgccccctctccccatggagaaag-3'（配列番号：82）

5'-gctttgcctcaggatttccgggacc-3'（配列番号：83）

5'-ggttcagccttggtctaccgtgatgtc-3'（配列番号：84）

50

5' -gcagttgttgctatgacgacctgtat-3' (配列番号: 85)

[ C6ST-2カクテル配列 ] (Gene Bank accession number NM\_021715)

(Gene world社製)

5' -tggggagagtgaggattcggtgaa-3' (配列番号: 86)

5' -cggacgtgggactcgctcaggacaaag-3' (配列番号: 87)

5' -cgaaagtacctgcccgccttctgc-3' (配列番号: 88)

その結果、腎臓におけるC6ST-2 (G#10) の発現増強が認められた (図4-1、C6ST-2をG#10と表記した)。C6ST siRNA治療群では発現減少が認められ、Atellocollagen媒体C6ST siRNA投与によりC6ST-2遺伝子のノックダウンが確認された (図4-1)。また、TGF- $\beta$ 1、SMA、タイプIコラーゲン、CTGFといった線維形成マーカーの発現増強も、C6ST siRNA投与により有意に抑制された。

10

【0168】

実施例4-2: 片側尿管結紮術 (UUO) による腎線維形成モデルマウスにおけるC6ST siRNAの線維芽細胞浸潤における検討

摘出した組織を凍結用包埋剤OCTコンパウンド (サクラ社製) にて包埋し、液体窒素で凍結ブロックを作成し、クリオスタット (マイクロエッジ社製) を用いて厚さ6 $\mu$ mの切片を作成した。得られた切片を、実施例2-8と同様の方法で抗ER-TR7抗体を用いて免疫染色を行なった。光学顕微鏡 (ライカ社製) 下で試料を観察し、茶色のシグナルで可視化された抗体結合を観察し、定量化を行った。

その結果、UUO手術腎において、C6ST siRNA治療群では対照群に比べて腎間質における線維芽細胞の集積が有意に抑制されていた (図4-2)。

20

本発明の薬剤は、例えば、腎間質における線維芽細胞集積抑制剤として有用である。

【0169】

実施例4-3: 片側尿管結紮術 (UUO) による腎線維形成モデルマウスにおけるC6ST siRNAのマクロファージ浸潤における検討

実施例4-2と同様に、抗F4/80抗体で免疫染色、定量化を行った。その結果、UUO手術腎において、C6ST siRNA治療群では対照群に比べて腎間質におけるマクロファージの集積が有意に抑制されていた (図4-3)。

本発明の薬剤は、例えば、腎間質におけるマクロファージ集積抑制剤として有用である。

30

【0170】

実施例4-4: 片側尿管結紮術 (UUO) による腎線維形成モデルマウスにおけるC6ST siRNAのコラーゲン蓄積における検討

実施例4-2と同様に、抗タイプIVコラーゲン抗体で免疫染色を行い、実施例3-4と同様に定量化を行った。その結果、UUO手術腎において、C6ST siRNA治療群では対照群に比べて糸球体基底膜の線維性肥厚が有意に抑制されていた (図4-4)。このことから、C6ST-2の遺伝子発現を抑制する事により、炎症性細胞の浸潤、線維形成を抑制しうる事が認められた。

本発明の薬剤は、例えば、炎症性細胞浸潤抑制剤として有用である。

【0171】

40

実施例4-5: 片側尿管結紮術 (UUO) による腎線維形成モデルマウスにおけるC6ST siRNAの線維芽細胞活性化における検討

実施例3-0と同様に抗SMA抗体で免疫染色を行った。その結果、UUO手術腎において、C6ST siRNA治療群では対照群に比べて、間質とりわけ傍糸球体領域におけるSMA陽性細胞の明らかな減少を認めた (図4-5)。本結果は、C6ST-1ならびにC6ST-2の遺伝子発現を抑制する事により、腎間質に集積している線維芽細胞の活性化が抑制される事を示している。

本発明の薬剤は、例えば、腎間質における線維芽細胞活性化抑制剤として有用である。

【0172】

実施例4-6: 片側尿管結紮術 (UUO) による腎線維化モデルマウスにおけるC6ST siRNAのA

50

### CE発現における検討

同様に、抗ヒトACEウサギ抗体（サンタクルーズ社製）を用いて免疫染色を行なった。その結果、UUO施術腎において、C6ST siRNA治療群では対照群に比べて、間質とりわけ傍系球体領域におけるACE陽性細胞の明らかな減少を認めた（図46）。本結果は、C6ST-2の遺伝子発現を抑制する事により、腎間質に集積している線維芽細胞の活性化が抑制され、それに伴ってACEの発現も抑制される事を示している。ACE抑制は血圧低下作用を有するため、本結果においても血圧降下あるいは動脈硬化抑制作用を有するものと強く考えられた。

本発明の薬剤は、例えば、動脈硬化抑制剤として有用である。

〔眼組織〕

眼組織においても他臓器と同様に、種々の原因による侵襲に対し、線維性変化が生じ、視力の低下・損失を招く。主要な疾患として、糖尿病網膜症、網膜静脈閉塞症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症、網膜色素変性症などが挙げられるが、角膜の炎症に伴って生じる線維形成、緑内障に伴う線維形成、白内障に伴う線維形成も含まれる（総説：Fiedlander M. J Clin Invest 117:576-586, 2007、Harada T et al. Genes and Dev. 21:367-378, 2007）。病理組織学的には線維形成に伴う視細胞の損傷・減少が視力低下の大きな要因となるため、眼組織の線維形成を抑制する事は、あらゆる眼疾患の視力低下を防ぐための新たな治療戦略として期待されている。

本実施例では糖尿病性網膜症のモデルにおける、網膜の線維形成とそれに伴う視細胞の損失を中心に検討を加えた。

【0173】

### 実施例47：マウス糖尿病性網膜症モデルにおけるGalNac4S-6ST (G#1) siRNAのコラーゲン集積における検討：

妊娠14日目 C57BL6J/JcLマウス（日本クレア社製）を飼育、出産させ、出生後2日令 C57BL6J/JcLマウス雌（日本クレア社製）、各々にStreptozocin 10 mg/mL（SIGMA社製）20 µL/head に皮下注射し、4週令までCE-2（日本クレア社製）の飼料、滅菌水を与え飼育し、4週令よりHigh Fat Diet食（日本クレア社製）、滅菌水を与え、2週間飼育させた。8週間目と9週間目に実施例11と同様の方法で、GalNac4S-6ST (G#1) siRNA（北海道システムサイエンス社製）をマウス1匹あたり1 µgを、媒体である1%アテノコラーゲン（高研社製）200 µLを混合したものの腹腔内投与した。18週間目にGalNac4S-6ST (G#1) siRNAの効果を検討するため、両群マウスの眼球を摘出し、免疫組織学的検討を加えた。

摘出眼で凍結ブロック・切片を作成した。切片をアセトン（シグマアルドリッチジャパン社製）で10分間固定後、リン酸緩衝液で洗浄し、さらに一次抗体としてウサギ由来抗IV型コラーゲン抗血清（1:2000希釈；LSL社製）を添加し、室温で一時間反応させた。続いて、二次抗体であるペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG（1:25希釈；Cappel社製）を添加し、室温で30分反応させた後、DAB基質を（ニチレイ社製）添加し酵素色素反応を行った。この標本を光学顕微鏡（ライカ社製）用いて観察した。

得られた網膜の組織像を図47に示した。対照群では視力に重要な視神経節細胞層（GCL：ganglion cell layer）から内顆粒層（INL：inner nuclear layer）にかけてタイプIVコラーゲンの沈着が増加していたのに比較し、GalNac4S-6ST (G#1) siRNA投与群では、とりわけGCLにおけるコラーゲン増生が顕著に抑制されていた。

本発明の薬剤は、例えば、視神経節細胞層におけるコラーゲン増生抑制剤として有用である。

【0174】

### 実施例48：マウス糖尿病性網膜症モデルにおけるGalNac4S-6ST (G#1) siRNAのコンドロイチン硫酸ナトリウムプロテオグリカン集積における検討：

実施例47と同様の方法で網膜の免疫組織学的検討を行った。一次抗体として抗コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG）抗体（クローンCS56、マウスモノクローナル抗体、1:100；生化学工業社製）を添加し、室温で一時間反応させた。続いて、ヒストファイ

10

20

30

40

50

ンマウスステインキット（ニチレイ社製；マウスモノクローナル抗体に対して使用）を用いて二次抗体反応を行った。

図48に示すように、対照群においては、網膜のGCLならびに外顆粒層（ONL: outer nuclear layer）から網膜色素上皮細胞層にかけてのセグメントにCS56陽性所見の著しい増強を認めた。これに対して、GalNac4S-6ST (G#1)siRNA投与群ではCS56強度が顕著に減弱していた。それに伴って、GCL層における神経節細胞ならびに網膜色素上皮細胞の形態が極めて良好に維持されていた。

以上より、本モデルマウスにおいて誘導される網膜組織におけるCSPGの沈着は、GalNac4S-6ST (G#1)siRNAの生体内投与により顕著に抑制されることが明らかになった。CSPGはコラーゲンとともに線維形成病変形成に重要であると考えられる他、神経節細胞が軸索を伸張する過程を阻害すると報告されている（Brittis PA et al. Science 255:733, 1992）。既報ではin vitroの実験結果ならびに発生過程の報告しかなく、生体内病変での役割は全く未知であったが、本結果により初めて病変組織における役割が示唆された。

【0175】

実施例49：マウス糖尿病性網膜症モデルにおけるGalNac4S-6ST (G#1)siRNAのグリア細胞集積における検討：

網膜損傷時における生体防御機構の一環として、視神経の再生が報告されてきたが、そのような傷害後再生に関わる視神経前駆細胞はグリア細胞である事が報告されている（Fischer AJ et al. Nature neuroscience 4:247, 2001、Ooto S et al. PNAS 101:13645, 2004）。本実施例ではグリア細胞のマーカーとして抗GFAPヤギ抗体（サンタクルーズ社製）を用い、実施例47と同様の方法で免疫染色を行なった。

結果を図49に示す。正常群、対照群ではGFAP陽性グリア細胞数に変化はなかったが、GalNac4S-6ST (G#1)siRNA投与群では、INLからGCLにかけて顕著な細胞数の増加を認めた。視神経の再生はINLからGCLに向かって起こると報告されていることから、本結果は、GalNac4S-6ST (G#1)siRNAにより、視神経の再生が活発に行なわれている過程を示すと考えられる。

本発明の薬剤は、例えば、視神経再生剤として有用である。

【0176】

実施例50：マウス糖尿病性網膜症モデルにおけるGalNac4S-6ST (G#1)siRNAの神経節細胞における検討：

実施例47に作製したサンプルを用いて、神経節細胞の数を定量化した。その結果、糖尿病性網膜症モデルにおいてもGCLにおける神経節細胞の減少が認められたが、GalNac4S-6ST (G#1)siRNA投与によりこのような損失が有意に回復する事が明らかになった（図50）。

【0177】

実施例51：マウス糖尿病性網膜症モデルにおけるGalNac4S-6ST (G#1)siRNAの遺伝子発現における検討：

実施例1と同様の方法で眼組織のRNAを抽出し、定量的PCRを行なった。ミューラー細胞のマーカーであるglutamate synthetase (GS) の発現の変化を解析する事により、視神経再生能力に検討を加えた。PCRプライマー配列を以下に記す。

[定量PCR Primer配列]

\*mouse GS(タカラバイオ社製)

forward : 5' -CTGTGAGCCCAAGTGTGTGGA -3' (配列番号：89)

reverse : 5' -GTCTCGAAACATGGCAACAGGA -3' (配列番号：90)

結果を図51に示す。GalNac4S-6ST (G#1)siRNA投与により、眼組織のGalNac4S-6STの発現増強が有意に抑制できた。これに伴い、GalNac4S-6ST (G#1)siRNA投与群では、眼組織におけるGSの発現が有意に上昇していた。本結果は、GalNac4S-6ST (G#1)siRNA投与によりミューラー細胞の再生すなわち視神経の回復を導く事を示している。

本実施例により、GalNac4S-6STの遺伝子発現を抑制する事で、網膜組織の線維性変化を抑制でき、結果として神経節細胞の再生に基づく視細胞損失の回避につながる事が判明し

10

20

30

40

50

た。このような組織学的所見は緑内障や糖尿病性網膜症を始め、幅広い眼線維化病変に共通する所見である。

本発明の薬剤は、例えば、ミューラー細胞再生剤、もしくは、神経節細胞再生剤として有用である。

【0178】

〔肝臓組織〕

肝臓における組織の線維性変化はあらゆる肝疾患の進行像あるいは終末像である。ウイルス性肝炎（A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、D型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、G型肝炎ウイルス）由来の肝線維形成のみならず、アルコール性肝障害、非アルコール性脂肪性肝障害（NAFLD及びNASH）、代謝性肝障害、薬剤性肝障害、特発性門脈圧亢進症、バッド・キアリ症候群、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、胆道系疾患（胆道閉鎖症や胆道拡張症を含む）、腫瘍等の肝疾患による胆道閉鎖、移植片対宿主反応、慢性拒絶反応など、多岐にわたる（Battaller R et al. J Clin Invest 115:209, 2005. Iredale JP. J Clin Invest 117:539, 2007）。本実施例では、肝臓組織レベルの線維性変化の検討を行った。

【0179】

実施例 5 2：マウス脂肪性肝障害モデルにおけるGalNAcST siRNAの遺伝子発現における効果の検討

妊娠14日目 C57BL/6JcLマウス（日本クレア社製）を飼育、出産させ、出生後2日齢C57BL/6JcLマウスにstreptozotocin（STZ：シグマ社製）を投与した。マウスにSTZ（10 mg/ml）20 µlを皮下に注射し、これを2日間で計3回行い、合計60 µl投与した。これを4週齢まで親マウスと共に通常餌で飼育し、満4週齢で離乳させた後よりhigh fat diet（日本クレア社製）を給餌し、2週間飼育させた。2週間目に、実施例 1 1に記載のGalNAcST siRNAを1回/1週間200 µL腹腔内投与（1 shot/1週間）の2回（2週間）処置を行った。実験14日目に解剖し、肝臓を摘出し、遺伝子発現解析ならびに免疫染色用サンプルを得た。

本実施例では、実施例 1と同様の方法で、肝臓組織の定量的PCRを行なった。結果を図 5 2に示す。本モデルの肝臓組織ではGalNAc4S-6STの発現が増強するが、GalNAcST siRNA投与により有意に抑制された。

【0180】

実施例 5 3：マウス脂肪性肝障害モデルにおけるGalNAcST siRNAの抗線維形成効果の検討

実施例 5 2と同様の方法で、肝臓組織の線維形成マーカーの発現を検討した。本モデルにおいては、タイプIコラーゲンならびに SMAの発現が有意に上昇した（図 5 3）。したがって、肝臓組織における線維性変化が増強している事が示された。これに対し、GalNAcST siRNA投与により、これらの線維形成マーカーの増強が有意に抑制された。

【0181】

実施例 5 4：マウス脂肪性肝障害モデルにおけるGalNAcST siRNAの線維芽細胞浸潤における検討

次に、実施例 3と同様の方法で肝臓組織の免疫染色を行なった。一次抗体としてラット抗マウス線維芽細胞抗体（クローンER-TR7；1：500希釈；BMA社製）を添加し、室温で1時間反応させた。続いて、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ラットIgG（1：200希釈；バイオソース社製）を添加して、室温で30分更に反応させた後、DAB基質（ニチレイ社製）を添加した。光学顕微鏡（ライカ社製）下で試料を観察し、茶色のシグナルで可視化された抗体結合を確認した。

得られた肝組織の免疫染色像の例を図 5 3に示す。対照群では線維芽細胞の集積が明確であり、ブリッジングを形成している組織像を認めた。これに比較し、GalNAcST siRNA投与群では線維芽細胞の集積をほとんど認めなかった。

【0182】

実施例 5 5：マウス脂肪性肝障害モデルにおけるGalNAcST siRNAの線維形成スコアの検討

実施例 5 4で行った免疫組織学的染色に基づき、各試料の肝線維形成の程度を既報（Dai K, et al. World J Gastroenterol. 31:4822-4826, 2005、Hillebrandt S, et al. Nat

10

20

30

40

50

ure Genetics 37:835-843, 2005) に従って、線維形成度数で評価した。線維形成度数の評価基準は以下の通りである。0度：正常、1度：中心静脈からの少量のコラーゲン伸長が認められる、2度：中心静脈からの明白なコラーゲン伸長が認められるが、肝臓全体を取り囲まない程度である、3度：中心静脈からの明白なコラーゲン伸長が認められ、肝臓全体を取り囲む程度である、4度：肝臓全体の瀰漫性コラーゲン伸長が認められ、偽小葉を形成している。

結果を図55にグラフで示す。各バーは、各群における線維形成度数の平均値±標準偏差を示している。対照群と比較すると、GalNAcST siRNA投与群 ( $p<0.01$ , t検定) で統計学的に有意に線維形成が軽減されていた。以上より、GalNAcST siRNAの投与は、臨床的にも優れた肝線維形成抑制効果を発揮することが示された。

10

#### 【0183】

#### 実施例56：マウス脂肪性肝障害モデルにおけるGalNAcST siRNAのマクロファージ浸潤における検討

次に、実施例54と同様の方法で肝臓組織の免疫染色を行なった。一次抗体としてラット抗マウスF4/80抗体 (クローンA3-1; 2  $\mu$ g/ml; CALTAG LABORATORIES社製) を添加し、室温で1時間反応させた。続いて、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ラットIgG (1:200希釈; バイオソース社製) を添加して、室温で30分更に反応させた後、DAB基質 (ニチレイ社製) を添加した。光学顕微鏡 (ライカ社製) 下で試料を観察し、茶色のシグナルで可視化された抗体結合を確認した。

得られた肝組織の免疫染色像の例を図56に示す。対照群ではマクロファージの集積が明確であり、炎症集簇層を形成している組織像を認めた。これに比較し、GalNAcST siRNA投与群ではマクロファージの過剰集積を認めなかった。

20

#### 【0184】

#### 実施例57：マウス脂肪性肝障害モデルにおけるGalNAcST siRNAの肝脂質代謝における検討

実施例52と同様の方法で肝臓の脂質代謝関連遺伝子の発現を検討した。ChREBP (carbohydrate response element-binding protein) ならびにACC2 (Acetyl-CoA carboxylase-2) の発現が増強していたが、GalNAcST siRNA投与群で有意に抑制された (図57)。本結果は、GalNAc4ST-1、GalNAc4ST-2ならびにGalNAc4S-6STの遺伝子発現を抑制する事によって、肝臓組織の線維性変化が抑制でき、結果として糖脂質代謝が改善出来る事を示している。

30

本発明の薬剤は、例えば、糖脂質代謝改善剤として有用である。

#### 【0185】

#### 実施例58：マウス脂肪性肝障害モデルにおけるC4ST-1 siRNA、C4ST-2 siRNA、C4ST-3 siRNAの線維芽細胞集積における検討

実施例52と同様の方法で脂肪性肝障害モデルを作成し、同様の投与プロトコールで、実施例21に記載のC4ST-1 siRNA、C4ST-2 siRNA、C4ST-3 siRNAを投与し、肝臓組織を採取した。

次に、実施例3と同様の方法で肝臓組織の免疫染色を行なった。一次抗体としてラット抗マウス線維芽細胞抗体 (クローンER-TR7; 1:500希釈; BMA社製) を添加し、室温で1時間反応させた。続いて、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ラットIgG (1:200希釈; バイオソース社製) を添加して、室温で30分更に反応させた後、DAB基質 (ニチレイ社製) を添加した。光学顕微鏡 (ライカ社製) 下で試料を観察し、茶色のシグナルで可視化された抗体結合を確認した。

40

得られた肝組織の免疫染色像の例を図58に示す。対照群では線維芽細胞の集積が明確であり、ブリッジングを形成している組織像を認めた。これに比較し、C4ST-1 siRNA、C4ST-2 siRNA、C4ST-3 siRNA投与群では全ての群において線維芽細胞の集積を認めなかった。

#### 【0186】

#### 実施例59：マウス脂肪性肝障害モデルにおけるC4ST-1 siRNA、C4ST-2 siRNA、C4ST-3 s

50



#### siRNAの線維形成スコアにおける検討

実施例 58 で行った免疫組織学的染色に基づき、各試料の肝線維形成の程度を線維形成度数で評価した。結果を図 59 に示す。各バーは、各群における線維形成度数の平均値 ± 標準偏差を示している。対照群と比較すると、C4ST-1 siRNA、C4ST-2 siRNA、C4ST-3 siRNA 投与群 ( $p < 0.001$ , t 検定) で全てに統計学的に有意に線維形成が軽減されていた。以上より、C4ST-1 siRNA、C4ST-2 siRNA、C4ST-3 siRNA の投与は、臨床的にも優れた肝線維形成抑制効果を発揮することが示された。

【0187】

#### 実施例 60：マウス脂肪性肝障害モデルにおけるC4ST-1 siRNA、C4ST-2 siRNA、C4ST-3 siRNAの肝細胞障害における検討

実施例 58 のプロトコルでマウス屠殺時に採血を施し、血清中ALT (アラニントランスフェラーゼ) 値をSRL社に委託し、測定した。結果を図 60 に示す。血清ALT値は肝細胞の破壊を示す臨床的に最も汎用される指標である。対照群では血清ALT値の上昇を認めたのに比較し、C4ST-1 siRNA、C4ST-2 siRNA、C4ST-3 siRNA 投与群では平均値で 50% 以下の低下を認めた (図 60)。本結果は、C4ST-1、C4ST-2、C4ST-3 の遺伝子発現を抑制する事により、肝臓組織の線維性変化を抑制でき、結果として肝細胞障害を軽減し得る事を示している。

本発明の薬剤は、例えば、肝細胞障害軽減剤として有用である。

【0188】

#### 実施例 61：マウス肝線維症モデルにおけるC6ST siRNAの抗線維形成効果の検討

本実施例では、実験的に最も汎用されるマウス四塩化炭素誘導肝硬変モデルを用いて実験を行なった。まずマウスモデルの作成であるが、C57BL6/Jマウス (雌、5~6週齢、日本クレア社製) に、四塩化炭素 (25  $\mu$ L/100 g 体重; Sigma-Aldrich 社製) を、週2回ずつ4週間にわたり (8回)、腹腔内に注射し、肝線維症を惹起した。さらに四塩化炭素を週2回ずつ2週間にわたって追加投与し (総計12回)、肝硬変を誘導した。肝硬変が誘導されたマウスを屠殺し、その肝臓を採取した (硬変肝)。一方、対照実験では、四塩化炭素の投与を行っていない同週齢のC57BL6/Jマウス (雌、日本クレア社製) から肝臓を採取した (正常肝)。

四塩化炭素の追加投与 (9回目から12回目までの合計4回) と同様に、合計4回、実施例 41 と同一のC6ST siRNA とそのコントロールを腹腔内投与した。追加投与終了後、両群のマウスを屠殺し、肝臓組織切片を作成、免疫組織学的検討を行った。一次抗体としてラット抗マウス線維芽細胞抗体 (クローンER-TR7; 1:500希釈; BMA 社製) を添加し、室温で1時間反応させた。続いて、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ラットIgG (1:200希釈; バイオソース社製) を添加して、室温で30分更に反応させた後、DAB基質 (ニチレイ社製) を添加した。光学顕微鏡 (ライカ社製) 下で試料を観察し、茶色のシグナルで可視化された抗体結合を確認した。

得られた肝組織の免疫染色像の例を図 61 に示す。対照群では線維芽細胞の集積が明確であり、ブリッジングを形成している組織像を認めた。これに比較し、C6ST siRNA 投与群では全ての群において線維芽細胞の集積を認めなかった。

【0189】

#### 実施例 62：マウス肝線維症モデルにおけるC6ST siRNAの線維形成スコアの検討

実施例 61 で行った免疫組織学的染色に基づき、各試料の肝線維形成の程度を線維形成度数で評価した。結果を図 62 に示す。各バーは、各群における線維形成度数の平均値 ± 標準偏差を示している。対照群と比較すると、C6ST siRNA 投与群 ( $p < 0.05$ , t 検定) で全てに統計学的に有意に線維形成が軽減されていた。以上より、C4ST-1 siRNA、C4ST-2 siRNA、C4ST-3 siRNA の投与は、臨床的にも優れた肝線維形成抑制効果を発揮することが示された。

【0190】

#### 実施例 63：マウス肝線維症モデルにおけるC6ST siRNAの抗線維形成効果の検討

実施例 1 と同様の方法で肝臓組織よりRNAを抽出し、定量的PCRを行なった。結果を図 6

10

20

30

40

50

3に示す。対照群では線維形成マーカーである SMA、タイプIコラーゲン、CTGF、TGFの発現増強を認めたが、C6ST siRNA投与群においては、有意に抑制されていた。本結果は、C6ST-1、C6ST-2の遺伝子発現抑制により、肝臓組織の線維性変化が抑制できる事を示している。

#### 〔脳神経組織〕

本実施例ではパーキンソン病マウスモデルとして基本的な、MPTP誘導パーキンソン病モデルを使用した。このモデルは古典的であるが再現性にすぐれ、簡便であることよりパーキンソン病モデルとして汎用されている。組織学的には脳実質組織内への炎症細胞の浸潤と、ドーパミン産生ニューロンの減少を特徴とする。このような病変におけるニューロンの減少の原因として、古典的には神経原線維性変化が考えられている。

したがって、神経が障害される病態、すなわち、パーキンソン病、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、アルツハイマー病、ポリグルタミン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、脊髄性進行性筋萎縮症、球脊髄性筋萎縮症、ハンチントン病、多発性硬化症などの代表的な神経変性疾患のみならず、多系統萎縮症（線条体黒質変性症、オリブ橋小脳萎縮症、シャイ・ドレーガー症候群）、副腎白質ジストロフィー、ギラン・バレー症候群、重症筋無力症、フィッシャー症候群、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、ルイス・サムナー症候群、クロウ・フカセ症候群、正常圧水頭症、脊髄空洞症、プリオン病（クロイツフェルト・ヤコブ病、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、致死性家族性不眠症）、亜急性硬化性全脳炎（SSPE）、進行性多巣性白質脳症（PML）、脊髄小脳変性症などを含む。更には、脳外傷後遺症、脳血管障害（脳梗塞、脳出血）後遺症、ウイルス性脳炎後遺症、細菌性髄膜炎後遺症、脊髄損傷後遺症や、脊髄神経、末梢神経、聴神経、視神経などにおける神経原線維性変化も含まれる。とりわけ上記の後遺症は抑うつ状態などの精神疾患の基盤となるものとの考えが古くからあるため、神経原線維性変化は精神症状の原因としても重要である。

#### 【0191】

#### 実施例64：MPTP誘発性 C57BL/6JcLパーキンソン病モデルマウスによるGalNAc4S-6ST siRNA処置における抗線維形成効果の検討

本実施例では1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine（MPTP）によりドーパミンニューロンを選択的に変性させたパーキンソン病のマウスモデルを作成（Amende et al. (2005) Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation 2(20) 1-13）してGalNAc4S-6ST siRNAを投与し、治療後における遺伝子発現と組織の様子を比較検討した。

妊娠14日目 C57BL/6JcLマウス（日本クレア社製）を飼育、出産させ、8週令 C57BL/6JcLマウス雌（日本クレア社製）、各々に実施例1と同一のGalNAc4S-6ST siRNA 1μg（Gene World社製）をsiRNA媒体である1% Atelocollagen（高研社製）と混合させたもの200μL腹腔内投与した。その後、二日、三日そして四日後の三度にわたりドーパミンニューロンのみを選択的に破壊するMPTP（Sigma Aldrich Japan社製）を30 mg/kgで体内へ投与したものを飼育した。実験8日目にBrdU 5 mg/mL（ZyMED Laboratory, Inc社製）100μlを尾静脈内投与処置し、1時間後、解剖し、脳を摘出し、免疫染色用サンプル、遺伝子発現解析用サンプルを得た。

遺伝子発現は実施例1と同様の方法で、定量的に検討を行った。結果を図64に示す。本パーキンソン病モデルにおいては、脳組織のGalNAc4S-6STならびに線維形成マーカーであるTGF、タイプIコラーゲン、SMAの発現が増強するが、GalNAc4S-6ST siRNA投与により、これらの発現が有意に抑制された。したがって、GalNAc4S-6STの発現を抑制する事により、脳組織における線維性変化を抑制できる事が明らかになった。

本発明の薬剤は、例えば、脳組織における線維性変化抑制剤として有用である。

#### 【0192】

#### 実施例65：MPTP誘発性 C57BL/6JcLパーキンソン病モデルマウスによるGalNAc4S-6ST siRNA処置における線維芽細胞集積の検討

実施例3と同様に脳組織のサンプルを用いて、脳内の神経細胞における線維形成に対してGalNAc4S-6ST生体内投与により得られる組織所見を比較した。得られた切片を4%PFAリ

ン酸緩衝液（ナカライテスク社製）で10分間固定後、脱イオン水で洗浄し、一次抗体として線維芽細胞抗体（ER-TR7；1:100希釈；BMA社製）を添加し、4℃で一晩反応させた。次に二次抗体であるAlexa488標識抗ラットIgGヤギ抗体（1:200希釈；Invitrogen社）を添加し、室温で30分反応させた。

以上の手法にて得られた組織像を図65に示した。未治療群での強い陽性シグナルは脳梁膨大後部顆粒皮質付近にて対照群より脳内における線維芽細胞の浸潤を示している結果であった。さらに、GalNAc4S-6ST siRNA治療群においては、線維芽細胞の陽性所見は激減していた。以上の結果より、パーキンソン病マウスモデルの誘導される脳組織におけるER-TR7の陽性シグナルの所見は、GalNAc4S-6ST siRNA生体内投与により顕著に抑制されることが明らかになった。

10

#### 【0193】

#### 実施例66：MPTP誘発性C57BL/6JcLパーキンソン病モデルマウスによるGalNAc4S-6ST siRNA処置における神経保護効果の検討

次に、上記の線維形成が神経細胞の減少に伴っているかを調べるために、実施例64と同様の方法で、神経再生関連遺伝子の脳組織における発現を定量化した。ドーパミン神経の生存と分化を制御し、再生を促進する因子GDNF、ならびにドーパミン神経を形成する因子であるNurr1の発現が、GalNAc4S-6ST siRNA投与により増強していた（図66）。本結果は、GalNAc4S-6STの発現を抑制する事により、脳組織におけるドーパミン神経の再生を促進できる事を示している。

本発明の薬剤は、例えば、脳組織におけるドーパミン神経再生促進剤として有用である。

20

#### 【0194】

#### 実施例67：MPTP誘発性C57BL/6JcLパーキンソン病モデルマウスによるGalNAc4S-6ST siRNA処置における神経保護効果の検討

以上の実施例で示された結果を最終的に明らかにするために得られた組織サンプル切片をドーパミンニューロンのマーカーとする抗チロシンハイドロキシラーゼ抗体にてドーパミンニューロンを染色、組織所見を比較検討した。このチロシンハイドロキシラーゼ（TH：tyrosine hydroxylase）はドーパミン前駆体をドーパミンへ転換する酵素である。実施例64と同様の方法で得られた切片を4%PFAリン酸緩衝液（ナカライテスク社製）で10分間固定後、脱イオン水で洗浄し、一次抗体としてラビットポリクローナル抗チロシンハイドロキシラーゼ抗体（1:50希釈；Calbiochem社）を添加し、室温で1時間反応させた。次に二次抗体であるAlexa488標識抗ラビット-ロバ抗体（1:200希釈；Invitrogen社）を添加し、室温で30分反応させた。

30

図67に対照群、未治療群、GalNAc4S-6ST siRNA、処置群各々の組織画像を示した（原図はカラーである）。中脳上丘付近において、対照群では正常にチロシンハイドロキシラーゼが発現していることが確認できるが未治療群においては陰性のシグナルとして現れた。これは、MPTPにより選択的にドーパミンニューロンが破壊されたことが示唆される所見である。一方、GalNAc4S-6ST siRNA処置を行った群におけるシグナルは未治療群に比べて強く現れていることが確認できた。つまり、GalNAc4S-6ST siRNAの生体内投与によって線維性変化の抑制に伴い、ドーパミンニューロンの機能回復が期待できる結論が得られた。

40

本発明の薬剤は、例えば、ドーパミンニューロン機能回復剤として有用である。

#### 【0195】

#### 実施例68：MPTP誘発性C57BL/6JcLパーキンソン病モデルマウスによるGalNAc4S-6ST siRNA処置における神経保護効果の検討

実施例64と同様に、妊娠14日目C57BL/6JcLマウス（日本クレア社製）を飼育、出産させ、8週令C57BL/6JcLマウス雌（日本クレア社製）、各々にGalNAc4S-6ST（GalNAc4S-1、GalNAc4S-2とGALNAc4S-6STのカクテル配列を混合したもの）siRNA 1μg（GeneWorld社製）をsiRNA媒体である1% Atelocollagen（高研社製）と混合させたもの200μL腹腔内投与した。その後、二日、三日そして四日後の三度にわたりドーパミンニューロンのみを選択的に破壊するMPTP（Sigma Aldrich Japan社製）を30 mg/kgで体内へ投与したものを飼育した

50

。実験8日目にBrdU 5 mg/mL (ZyMED Laboratory, Inc社製) 100 µlを尾静脈内投与処置し、1時間後、解剖し、脳を摘出し、免疫染色用サンプル、遺伝子発現解析用サンプルを得た。

実施例67と同様に、得られた切片を抗TH抗体で免疫染色を行なった。結果を図68に示す。GalNAcST siRNA処置を行った群においては、TH陽性ドーパミン神経細胞の減少が抑制されていることが確認できた。つまり、GalNAc4ST-1、GalNAc4ST-2、GalNAc4S-6STの発現抑制によって、実施例67と同様に、神経原線維性変化を抑制し、ドーパミンニューロンの機能回復が期待できる結論が得られた。

本発明の薬剤は、例えば、神経原線維性変化抑制剤として有用である。

【0196】

#### 実施例69：Streptozotocin誘発性2型糖尿病性網膜症モデルマウスにおけるC4-サルファターゼの効果：硫酸化CSPGの減弱

妊娠14日目 C57BL/6JcLマウス(日本クレア社製)を飼育、出産させ、出生後2日令 C57BL/6JcLマウス 雌(日本クレア社製)、各々にStreptozotocin 10mg/mL (SIGMA社製) 20 µL/head に皮下注射し、4週令までCE-2(日本クレア社製)の飼料、滅菌水を与え飼育し、4週令よりHigh Fat Diet食(日本クレア社製)、滅菌水を与え、2週間飼育させた。2週間目にコンドロ - 4 - 脱硫酸化酵素(C4-サルファターゼ)(20単位/ml; 生化学工業社製)を4単位/ a headで、ならびに溶媒(リン酸緩衝液)を2回/1週間、腹腔内投与(1shot/1週間)の4回(2週間)処置を行った。14日目にC4-サルファターゼの効果を検討するため、両群マウスの眼球を摘出し、免疫組織学的検討を加えた。

摘出眼で凍結ブロック・切片を作成した。切片をアセトン(シグマアルドリッチジャパン社製)で10分間固定後、リン酸緩衝液で洗浄し、さらに一次抗体として抗コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)抗体(クローンCS56、マウスモノクローナル抗体、10 µg/mL; 生化学工業社製)を添加し、室温で一時間反応させた。続いて、ヒストファインマウスステインキット(ニチレイ社製; マウスモノクローナル抗体に対して使用)を用いて二次抗体反応を行った後、DAB基質を(ニチレイ社製)添加し酵素色素反応を行った。この標本を光学顕微鏡(ライカ社製)用いて観察した。

得られた組織像を図69に示した(原図はカラーである)。未治療群では網膜の硝子体側に新規にCS56陽性所見を認めてくる。これに対して酵素治療群ではCS56強度が減弱している。CS56は、硫酸基を認識する抗体であり、この減弱は4位硫酸基の減弱を反映しているものと示唆される。以上より、本モデルマウスにおいて誘導される網膜組織におけるCSPGの沈着は、C4-サルファターゼの生体内投与により修飾を受け抑制されることが明らかになった。

C4-サルファターゼは、GalNAcの4位の硫酸基を脱硫酸化する酵素である。従って、GalNAcの4位の硫酸化を阻害することによって、生体レベルにおいて組織の線維形成を抑制できることが示された。即ち、GalNAcの4位の硫酸基の脱硫酸化酵素は、組織線維形成抑制剤として有用である。

【0197】

#### 実施例70：Streptozotocin誘発性2型糖尿病性網膜症モデルマウスにおけるC4-サルファターゼの効果：血管内皮細胞増生の抑制

実施例69と同様の方法で得られた切片をアセトン(シグマアルドリッチジャパン社製)で10分間固定後、リン酸緩衝液で洗浄し、一次抗体としてラット由来抗血管内皮細胞抗体(CD31; 1:200希釈; ファーミンジェン社製)を添加し、室温で1時間反応させた。次に二次抗体であるペルオキシダーゼ標識ロバ由来抗ラットIgG(1:200希釈; バイオソース社製)を添加し、室温で30分反応させた。反応後のサンプルにDAB基質(ニチレイ社製)を添加した。この標本を光学顕微鏡(ライカ社製)用いて観察した。得られた組織像を図70に示した(原図はカラーである)。未治療群では網膜硝子体側におけるCD31陽性細胞の数が増加しており、一部硝子体に突出している像も認めた。これは、本モデルが糖尿病性網膜症の前増殖網膜症の段階を反映していると考えられ、モデルの有効性を示すものである。これに対して酵素治療群では、同部位のCD31陽性細胞の数が明らかに減少してい

た。以上の結果から、2型糖尿病モデルにおいては網膜硝子体側の血管内皮細胞数が増加してくるが、C4-サルファターゼ投与により、そのような血管増生が抑制させることが示唆された。

即ち、GalNAcの4位の硫酸基の脱硫酸化酵素は、血管増生抑制剤として有用である。

【0198】

実施例71：Streptozotocin誘発性2型糖尿病性網膜症モデルマウスにおけるC4-サルファターゼの効果：コラーゲン増加性変化の抑制：

実施例69と同様の方法で得られた切片をアセトン（シグマアルドリッチジャパン社製）で10分間固定後、リン酸緩衝液で洗浄し、一次抗体としてウサギ由来抗IV型コラーゲン抗体（1：250希釈；Sigma社製）を添加し、室温で1時間反応させた。次に二次抗体であるペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG（1：200希釈；Jackson ImmunoResearch社製）を添加し、室温で30分反応させた。反応後のサンプルにDAB基質（ニチレイ社製）を添加した。この標本を光学顕微鏡（ライカ社製）用いて観察した。

得られた組織像を図71に示した（原図はカラーである）。未治療群では網膜硝子体側におけるIV型コラーゲン陽性所見の増加とともに、網膜内境界膜に平行して連なる所見を認めた。これは、静脈形態の異常と共に、コラーゲンの増生、すなわち線維化変化を示唆するものである。これに対して酵素治療群では、同部位のIV型コラーゲンの増生が顕著に抑制されていた。以上の結果から、2型糖尿病モデルにおいては網膜コラーゲン増生を認めるが、C4-サルファターゼ投与により抑制させることが明らかになった。

即ち、GalNAcの4位の硫酸基の脱硫酸化酵素は、2型糖尿病性網膜症の治療剤として有用である。

【0199】

実施例72 2型糖尿病モデルマウスの肝臓における線維芽細胞の局在

実施例72～74では、前述の（実施例69～71）2型糖尿病モデルマウスより採取した肝臓を用いて、C4-サルファターゼの肝臓における、抗線維化効果（線維芽細胞の組織浸潤を指標）について比較・検討した。凍結ブロックの作製、免疫染色の手法などは、全て前述の方法で行った。図72に示すように、未治療群においては、多数の線維芽細胞の浸潤を認めた。これに対して、C4-サルファターゼ治療群では、未治療群に比べて、線維芽細胞の浸潤の程度は少なかった。この結果は、C4-サルファターゼが線維芽細胞の浸潤を抑制する薬理作用をもち、この効果が抗線維化作用の一端である事を示すものであった。

即ち、GalNAcの4位の硫酸基の脱硫酸化酵素は、線維芽細胞浸潤抑制剤として有用である。

【0200】

実施例73 2型糖尿病モデルマウスの肝臓におけるマクロファージの局在

実施例73では、前述の（実施例69～71）2型糖尿病モデルマウスより採取した肝臓を用いてC4-サルファターゼの肝臓における、抗炎症効果（マクロファージの組織浸潤を指標）について比較・検討した。凍結ブロックの作製、免疫染色の手法などは、全て前述の方法で行った。図73に示すように、未治療群においては、スポットの形成を伴う、多数のマクロファージの浸潤を認めた。これに対して、C4-サルファターゼ治療群では、未治療群に比べて、マクロファージの浸潤の程度は少なかった。この結果は、C4-サルファターゼがマクロファージの浸潤を抑制する薬理作用をもち、この効果が抗炎症作用の一端である事を示すものであった。

即ち、GalNAcの4位の硫酸基の脱硫酸化酵素は、マクロファージ浸潤抑制剤、あるいは抗炎症剤として有用である。

【0201】

実施例74 2型糖尿病モデルマウスの血清生化学検査所見

実施例74は、実施例72と実施例73の結果を補足する目的で解析を行った。本実施例では、前述の（実施例69～71）2型糖尿病モデルマウスより採取した血清を用いて、肝機能の指標であるアスパラギン酸アミノ基転移酵素（AST）、アラニンアミノ基転移

酵素 (ALT)、脂質代謝の指標であるトリアシルグリセロール (TG) を測定した。図 7 4 には、その結果を示している。生化学検査は、検査受託業者に測定を依頼した。未治療群 (unt) では、対照群 (nor) に比べて、AST、ALT、TGのいずれの値も上昇傾向であった。一方、C4-サルファターゼ治療群 (C4sul) では、AST、ALT、TGの検査値の上昇は、未治療群 (unt) に比べて抑制される傾向にあった。これらの結果は、実施例 7 2 と実施例 7 3 の結果を支持するものであり、C4-サルファターゼの抗線維化効果と、抗炎症効果によって肝機能が保たれていることを示している。

即ち、GalNAcの4位の硫酸基の脱硫酸化酵素は、肝機能疾患に対する治療剤として有用である。

【 0 2 0 2 】

10

#### 実施例 7 5 MPDP誘発性パーキンソンモデルマウスの脳組織におけるCSPGの発現の比較

本実施例では1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine (MPTP) の代謝産物であるMPDPを用いてモデルを作成した、本実験を遂行した。

8週令 C57BL/6JcLマウス雌 (日本クレア社製)、各々にC4-サルファターゼ (生化学工業社製) 4 U/ml 100  $\mu$ l a headで、day 0、day 2にて腹腔内投与し、siRNA については、GALNAC4S-6ST siRNA (北海道システムサイエンス社製) 1  $\mu$ g/ 1% Atelocollagen/ 200  $\mu$ lをday 0で前投与した。day 2、day 3、day 4にて、MPDP (Sigma Aldrich Japan社製) を (30mg/ kg) で連日投与を行った。

本実施例に用いたmouse GalNAc 4S-6ST siRNA薬の塩基配列について以下に示す。配列は必ずしも本例のみに限定されない。

20

[ mouse GalNAc4-6STsiRNA ] (Gene Bank accession number NM\_029935)

( 北海道システムサイエンス社製 )

5' - gcagcccagcaagaugaauaagauc-ag -3' ( 配列番号 : 9 1 )

3' -ua-cgucgggucguucuacuuauucuaag -5' ( 配列番号 : 9 2 )

【 0 2 0 3 】

Day 8において、BrdU 5 mg/mL (ZyMED Laboratory, Inc社製) 100  $\mu$ lを尾静脈内投与処置し、1時間後、解剖し、脳を摘出し、免疫染色用サンプル、遺伝子発現解析用サンプルを得た。以上より摘出した臓器 (脳) 50 mg当たりに対し、RNA-Bee (TEL-TEST社製) 1 mLを加え、電動ホモジナイザー (DIGITAL HOMOGENIZER、ASONE社製) にて粉碎させた後、chloroform 200  $\mu$ l (Sigma Aldrich Japan社製) を加え穏やかに混合後、約5分氷冷し、12,000 rpm、4、15分間 遠心分離機 (Centrifuge 5417R、eppendorf社製) を用い遠心分離を行った。遠心分離後の上澄み液500  $\mu$ Lを別のエッペンドルフチューブに移し、上澄み液と同等量のisopropanol 500  $\mu$ L (Sigma Aldrich Japan社製) を加え混合後、1  $\mu$ Lのglycogen (Invitrogen社製) を加え、15分間氷冷した。氷冷15分後、12,000 rpm、4、15分間遠心し、その後、75% Ethanol 1000  $\mu$ l (Sigma Aldrich Japan社製) で3回洗浄して得られたRNA沈殿物を30分間~1時間、自然乾燥させた後、大塚蒸留水50  $\mu$ l (大塚製薬社製) に溶解させ、さらに大塚蒸留水 (大塚製薬社製) にて100倍希釈し、UVプレート (Corning Costar社製) 上でプレートリーダー (POWER Wave XS、BIO-TEK社製) により抽出したサンプル中のRNA濃度を算出した。

30

次に、RT reaction (cDNA合成) を行うため以下の手技を行った。算出して得られたRNAサンプルを500 ng/20  $\mu$ lの濃度に調整し、68、3分間、BLOCK INCUBATOR (ASTEC製) にて加温し、10分間、氷冷した。氷冷後、予め調製していたRT Pre Mix 液 (組成: 25 mM MgCl<sub>2</sub> 18.64  $\mu$ l (Invitrogen社製)、5 $\times$ Buffer 20  $\mu$ l (Invitrogen社製)、0.1 M DTT 6.6  $\mu$ l (Invitrogen社製)、10 mM dNTP mix 10  $\mu$ l (Invitrogen社製)、RNase Inhibitor 2  $\mu$ l (Invitrogen社製)、MMLV Reverse transcriptase 1.2  $\mu$ l (Invitrogen社製)、Random primer 2  $\mu$ l (Invitrogen社製)、滅菌蒸留水19.56  $\mu$ l (大塚蒸留水: 大塚製薬社製) を80  $\mu$ l加えBLOCK INCUBATOR (ASTEC社製) にて42、1時間、加温反応させ、1時間後、BLOCK INCUBATOR (ASTEC社製) にて99、5分間、加熱した後、氷冷し求めるcDNA 100  $\mu$ lを作製し、合成して得られたcDNAを用いて、以下の組成でPCR反応を行った。

40

【 0 2 0 4 】

50

PCR Buffer 2  $\mu$ l [組成: 166 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Sigma Aldrich Japan社製)、670mM Tris-HCl pH8.8 (Invitrogen社製)、67 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Sigma Aldrich Japan社製)、100 mM 2-mercaptoethanol] (WAKO社製)、25 mM dNTP mix 0.8  $\mu$ l (Invitrogen社製)、DMSO 0.6  $\mu$ l (Sigma Aldrich Japan社製)、Primer Forward 0.2  $\mu$ l (GeneWorld社製)、Primer Reverse 0.2  $\mu$ l (GeneWorld社製)、大塚蒸留水 15.7  $\mu$ l (大塚製薬社製)、Taq polymerase 0.1  $\mu$ l (Perkin Elmer社製)、上述のようにして得られたcDNA 1  $\mu$ lを混合させAuthorized Thermal Cycler (eppendorf社製)により94 45second、55 45 sec、72 60second 30cycle 反応させた。反応終了後、得られたPCR産物に2  $\mu$ l Loading Dye (Invitrogen社製)を加え、1.5% UltraPure Agarose (Invitrogen社製)ゲルを作製し、Mupid-2 plus (ADVANCE社製)により100 V、20分間電気泳動を行った。泳動後、1  $\times$  LoTE [組成: 3 mM Tris-HCl (pH7.5) (Invitrogen社製)、0.2 mM EDTA (pH7.5) (Sigma Aldrich Japan社製)]にて10000倍希釈Ethydium Bromide (Invitrogen社製)染色液中で20分間振とうさせた後、I-Scope WD (ADVANCE社製)に設置したEXILIM (CASIO社製)にてゲル撮影し遺伝子発現の確認を行った。また、凍結ブロックの作製、免疫染色の手法などは、全て前述の方法で行った。

MPDP誘導性パーキンソンモデルにおけるCSPG発現について、CS-56抗体 (抗CSPG抗体: 生化学工業社製 1: 100希釈)を用いた免疫染色にて検討した結果について図75に示す。図75に示したように、未治療群では、CSPG陽性のシグナルが強く発現している。これに対して、C4-サルファターゼ治療群、遺伝子治療群では陽性のシグナルの発現は低下していた。

#### 【0205】

#### 実施例76 MPDP誘発性パーキンソンモデルマウスの脳組織におけるドーパミンニューロンの局在

C4-サルファターゼと、GalNAc4S-6ST siRNAのドーパミン作動性神経に対する薬理効果を明らかにする目的で、MPDP誘導性パーキンソンモデルにおけるドーパミン作動性神経の局在を、抗チロシン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase, TH 1: 20希釈)抗体、二次抗体はAlexa-488標識抗ウサギIgG抗体 (Invitrogen社製1: 200希釈)を用いた蛍光免疫染色を用いて解析を行った。図76に示すように、脳組織にドーパミン作動性神経の局在は、未治療群では他の群に比べて、陽性のシグナルが弱く発現している。これに対して、C4-サルファターゼ治療群、遺伝子治療群では陽性のシグナルの発現は、対照群と大きな差異は見られなかった。C4-サルファターゼ投与、siRNA投与によるドーパミン作動性神経の保護作用、もしくは再生・修復促進作用が示される結果となった。

即ち、GalNAcの4位もしくは6位のインヒビター (GalNAcの4位の硫酸基の脱硫酸化酵素、およびGalNAc4S-6ST siRNA)はドーパミン作動性神経保護剤、もしくは再生・修復促進剤として有用である。

#### 【0206】

#### 実施例77 MPDP誘発性パーキンソンモデルマウスの脳組織における炎症関連遺伝子の発現解析

C4-サルファターゼと、GalNAc siRNAの抗炎症効果を比較する目的で、実施例75、実施例76で使用した組織切片と同様のサンプルから前述の方法で抽出したtotal RNAを用いてTNF- $\alpha$ の発現について定量PCR法で解析した。定量PCRについては、SYBR premix kit (タカラバイオ社製)とReal-time PCR thermal cycler DICE (タカラバイオ社製)を用いて行った。PCR反応の条件は、95  $^{\circ}\text{C}$ を10秒、95  $^{\circ}\text{C}$ を5秒と60  $^{\circ}\text{C}$ を30秒の40サイクルとし、最後に融解曲線分析を行った。用いたプライマーの塩基配列について以下に示す。

mouse アクチン (タカラバイオ社製)

forward: 5' -CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC -3' (配列番号: 93)

reverse: 5' -ATGGAGCCACCGATCCACA -3' (配列番号: 94)

Tumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ ): (タカラバイオ社製)

forward: 5' -CAGGAGGGAGAACAGAACTCCA-3' (配列番号: 95)

reverse: 5' -CCTGGTTGGCTGCTTGCTT-3' (配列番号: 96)

図 77 に示すように、未治療群と比較し、C4-サルファターゼ治療群ではTNF- $\alpha$  の発現が抑制されていた。遺伝子治療群では、発現抑制の傾向を示すに留まった。これらの結果より、C4-サルファターゼが、炎症を抑制する作用を持つ事が示された。

即ち、GalNAcの4位の硫酸基の脱硫酸化酵素は抗炎症剤として有用である。

#### 【0207】

実施例 78 MPDP誘発性パーキンソンモデルマウスの脳組織における炎症関連遺伝子の発現解析

この実施例では、実施例 73 の結果を補足する目的で、ドーパミン作動性神経の発現に  
関与する遺伝子であるNurr1をマーカーとして検討を行った。C4-サルファターゼとGalNAc  
4S-6STが及ぼす影響について、前述の定量PCR法を用いて検討した結果について示す。用  
いたプライマーの塩基配列について以下に示す。

Nuclea receptor subfamily 4 GroupA member2 (Nurr1) : (タカラバイオ社製)

forward : 5' -CTGCCCTGGCTATGGTCACA-3' (配列番号 : 97)

reverse : 5' -AGACAGGTAGTTGGGTCGGTTCA-3' (配列番号 : 98)

図 78 に示すように、C4-サルファターゼ治療群、遺伝子治療群では、未治療群に比べ  
てNurr1の遺伝子発現が有意 ( $P < 0.001$ ) に増加していた。この結果は、実施例 76 の結  
果を支持するものであり、C4-サルファターゼ投与、siRNA投与によるドーパミン作動性神  
経の保護作用、もしくは再生・修復促進作用が示される結果となった。

即ち、GalNAcの4位もしくは6位のインヒビター (GalNAcの4位の硫酸基の脱硫酸化酵素  
、およびGalNAc4S-6ST siRNA) はドーパミン作動性神経保護剤、もしくは再生・修復促進  
剤として有用である。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0208】

本発明は、糖鎖関連遺伝子の機能を阻害することによる、生体組織レベルの線維形成を  
抑制する薬剤を提供する。該薬剤は、組織線維形成性疾患の治療または予防に有用である  
。

慢性の組織線維形成 (線維形成性組織変化) は全身臓器に起こり得るものであり、臓器  
機能不全により個体を死に至らしめる疾患群の総称である (総説 : Wynn TA, J. Clin. In  
vest. 117:524-529, 2007) 。

線維形成性疾患は慢性炎症の終末像と考えられ、全身の臓器に起こり当該臓器の機能不  
全さらには個体を死に至らしめる疾患の総称である。心血管疾患、脳血管疾患など従来死  
亡率の高かった疾患の本質は、組織レベルでの線維形成とそれに伴う機能不全であるとい  
う認識がなされつつあり、欧米死因の45%は線維形成に起因するとの見解がある。この新  
しい見解によれば、個体の病的な死亡は、癌、感染症、線維形成、という3つに集約され  
る事になる。従来の概念である肝硬変、肺線維症、腎硬化症のみに留まらず、癌・感染症  
以外の極めて多彩な、主には慢性疾患が「線維形成性疾患」と定義され得る。とりわけ近  
年の生活習慣の変化 (俗にいう欧米化) に伴い、NASH (非アルコール性脂肪性肝炎) やCK  
D (慢性腎疾患) という生命を脅かす新しい疾患 (疾患概念) が急増しており、これらが  
組織の線維形成に起因するという知見は、「線維形成性疾患」治療剤確立の緊急性を示し  
ている。しかしながら、現在、移植や人工臓器しか対応がなく、根本的な治療方法が無い  
という決定的な課題を抱えていた。

#### 【0209】

本発明は、最近同定されたばかりで機能が未知であった糖鎖遺伝子を標的にするという  
、全く新しい方法で線維形成性疾患 (組織の線維形成性病変ならびにそれに伴う機能不全  
) を抑制する技術を提供する。

臨床的にも難治性機能不全を呈する線維形成性疾患は死亡の決定的要因になるばかりで  
なく、日常のQOL (quality of life) を著しく阻害する疾患でもある。組織線維形成抑制  
剤の確立はそれゆえ極めて重要であるが、現在市場に出ている薬剤はない。実験的にもTG  
F- $\beta$  阻害剤を中心に、アンジオテンシン阻害剤、炎症性サイトカイン阻害剤、TLR阻害剤  
、MMP阻害剤など精力的に研究が進められているが、未だ有効性が確立した方法とは言え

10

20

30

40

50



ない（総説：Wynn TA, J. Clin. Invest. 117:524-529, 2007）。

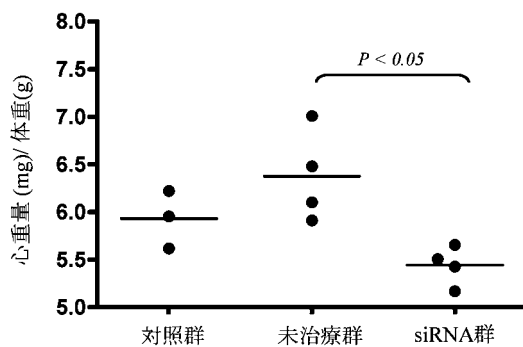
【 0 2 1 0 】

本発明者は、様々な臓器の線維形成性疾患モデル動物において、被験体に標的糖鎖遺伝子阻害剤を投与し、線維形成性病変軽減ならびに臓器機能回復を図った。

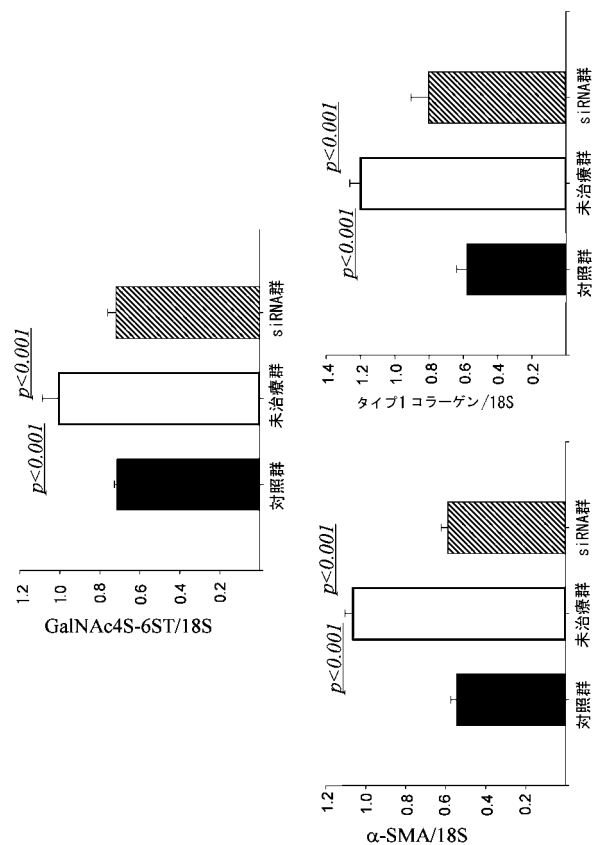
線維形成性疾患の確認は、決定的には病理像（線維芽細胞やコラーゲンの免疫染色、マッソン染色を含む）で行った。治療効果（線維形成阻害効果）は病理像の他、臨床症状、各臓器におけるコラーゲン発現量で決定した。

技術的手法としては、糖鎖遺伝子に対する核酸医薬（siRNA）で直接的な遺伝子ノックダウン法により治療効果を証明した。

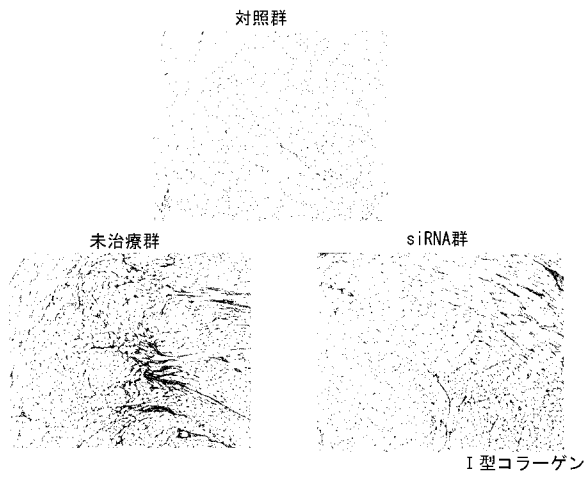
【 図 1 】



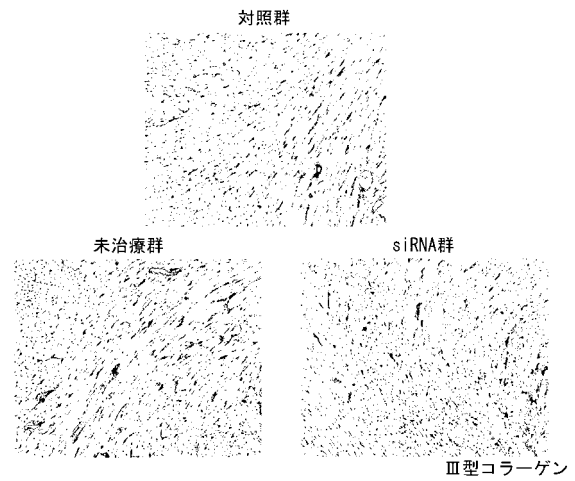
【 図 2 】



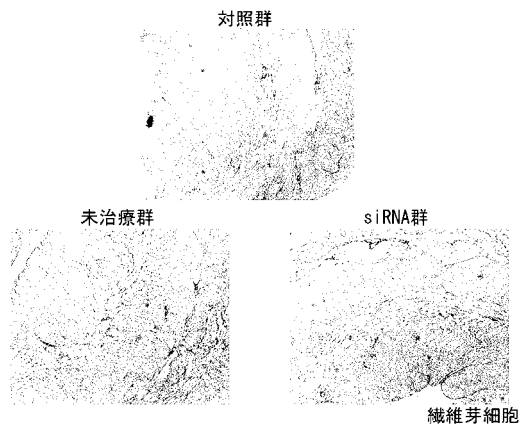
【図 3】



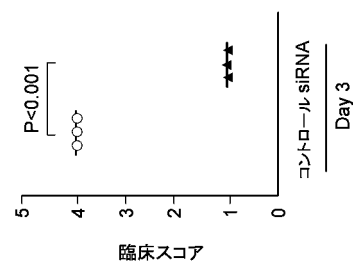
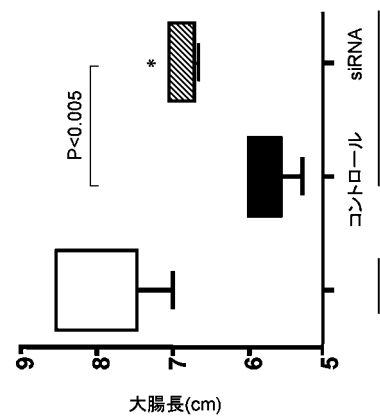
【図 4】



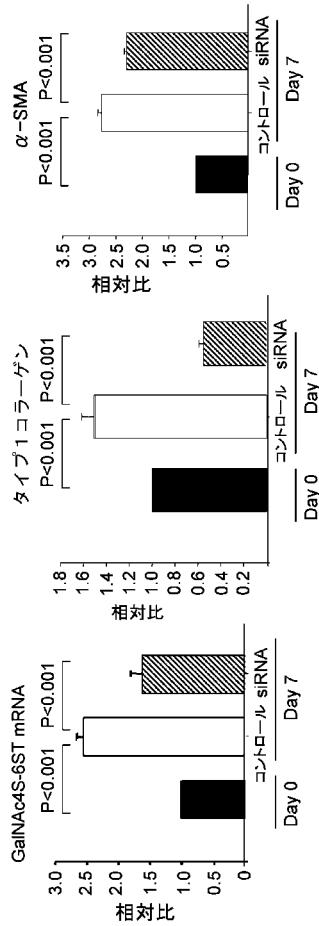
【図 5】



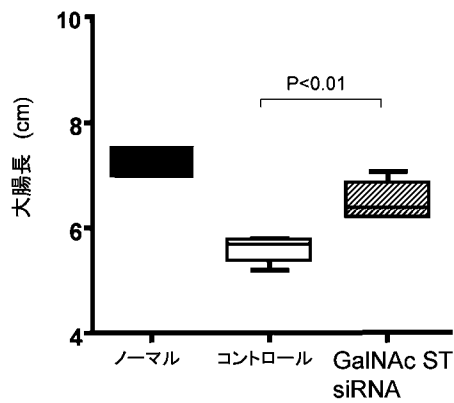
【図 6】



【図 7】



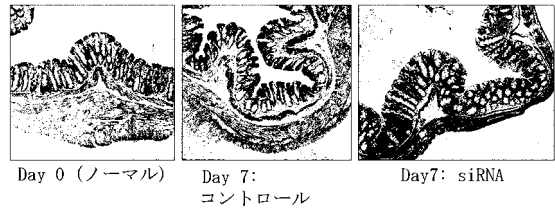
【図 11】



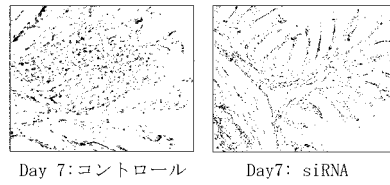
【図 12】



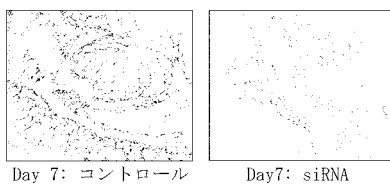
【図 8】



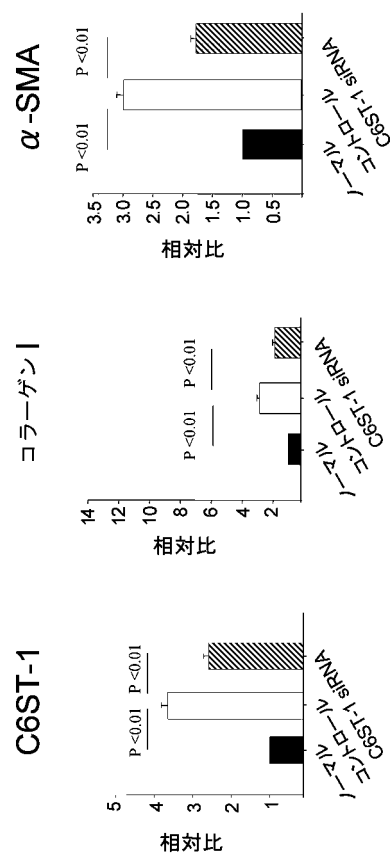
【図 9】



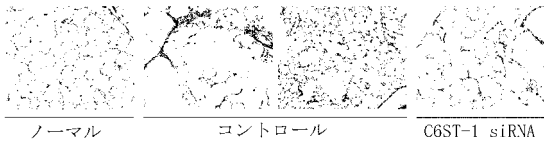
【図 10】



【図 13】



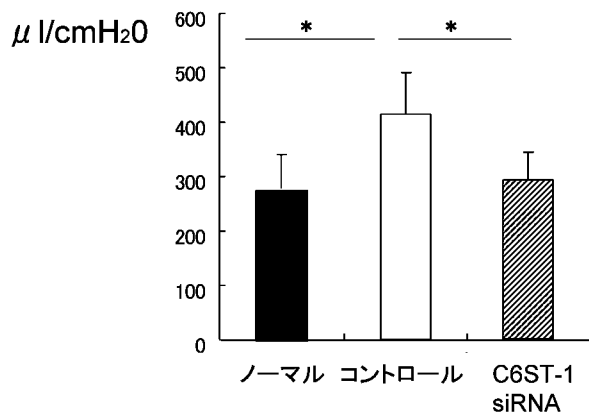
【図 14】



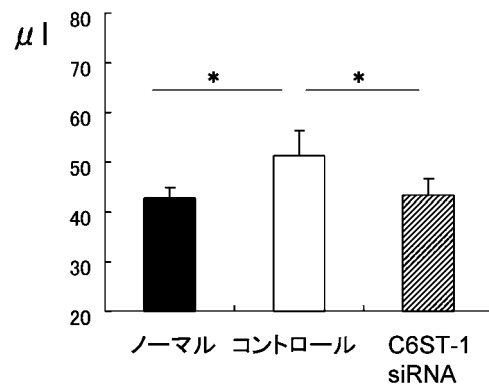
【図 15】



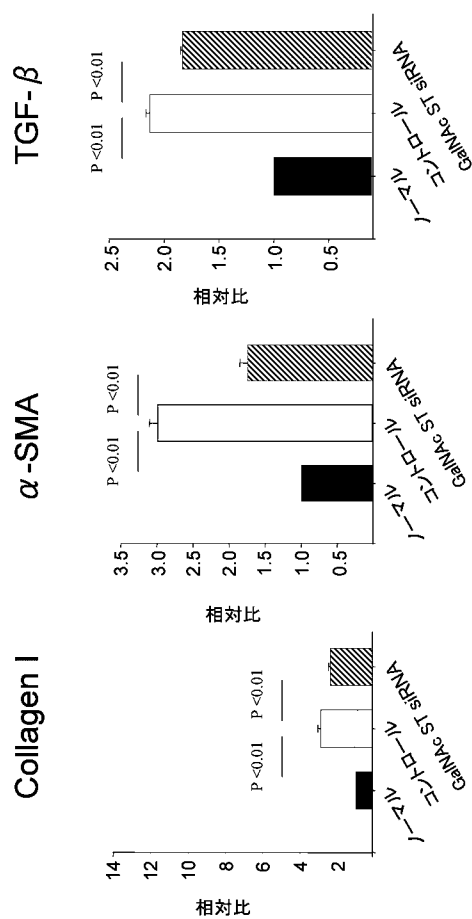
【図 16】



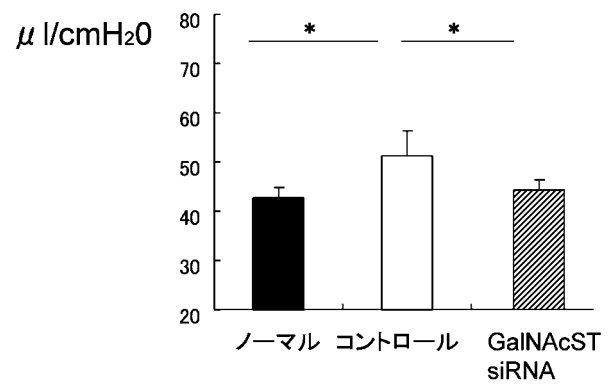
【図 17】



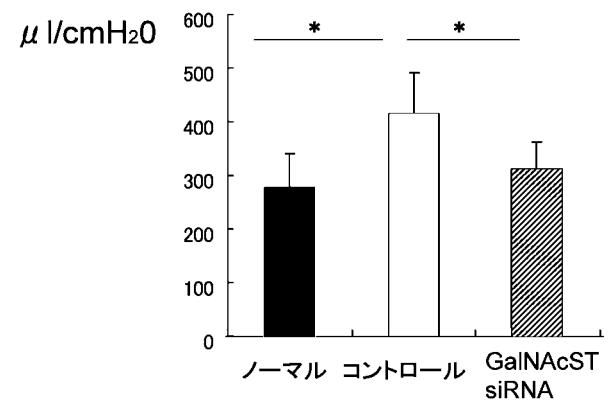
【図 18】



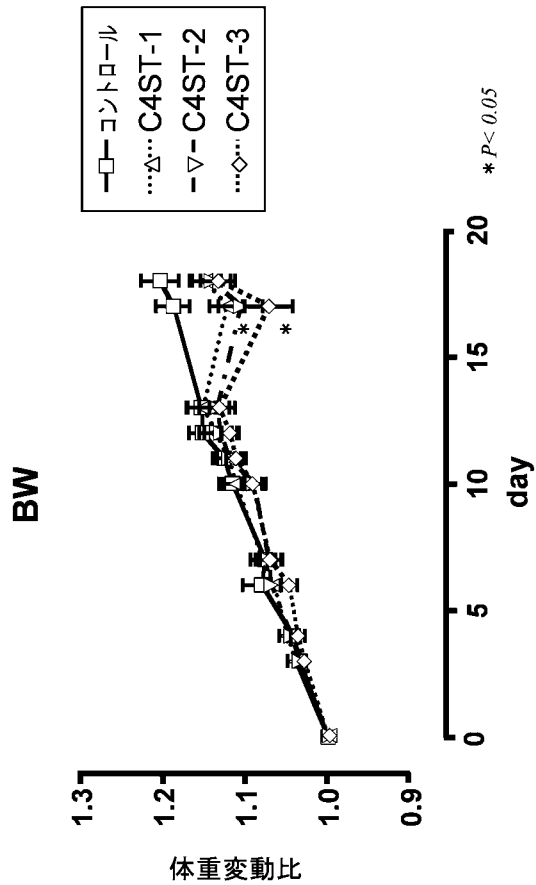
【図 19】



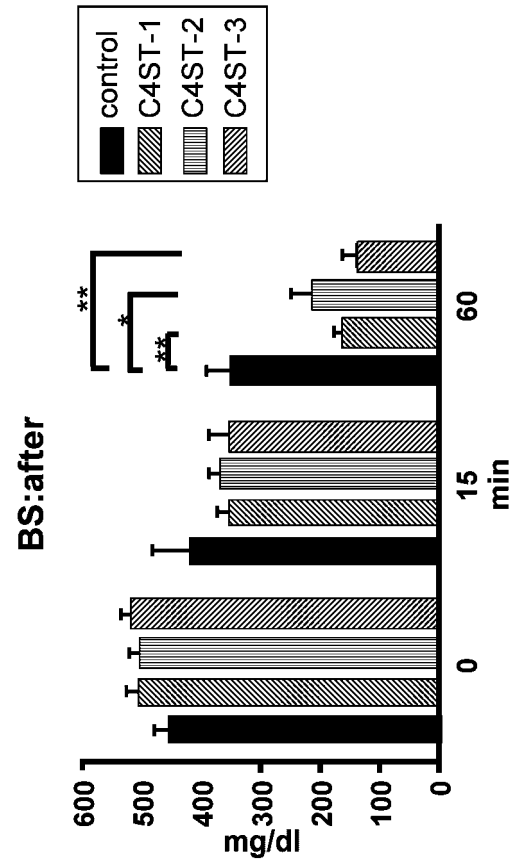
【図 20】



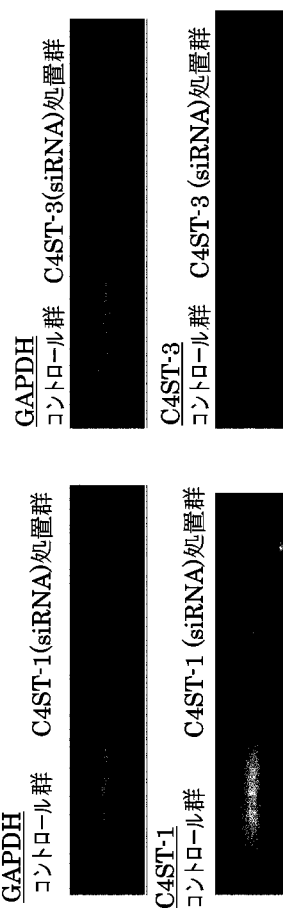
【図 2 1】



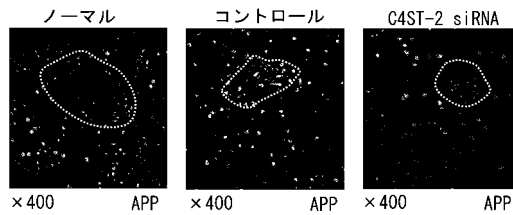
【図 2 2】



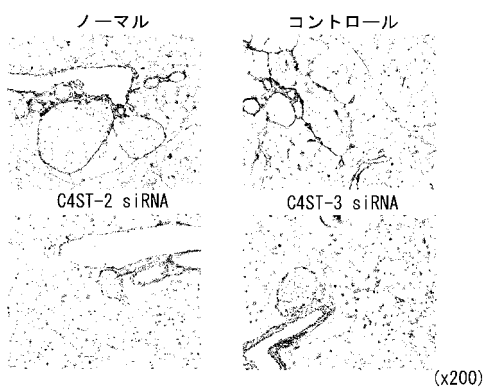
【図 2 3】



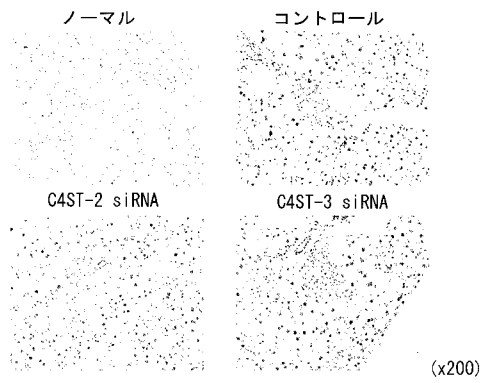
【図 2 4】



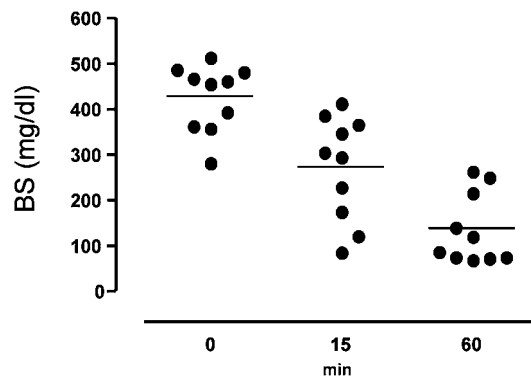
【図 2 5】



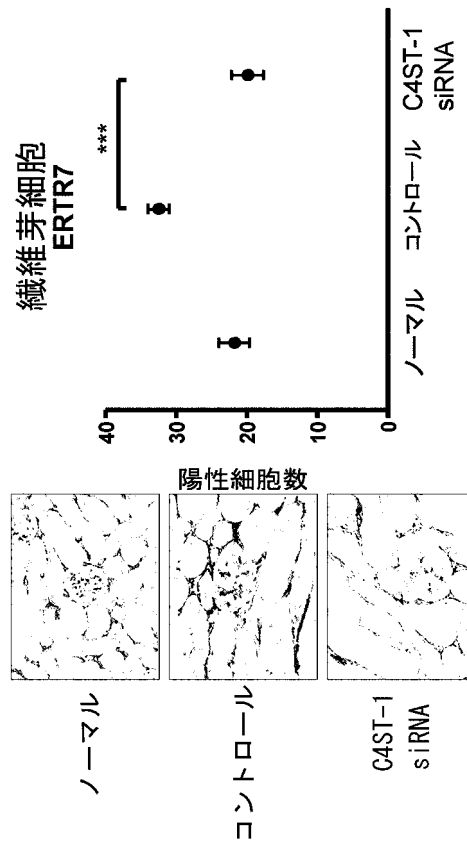
【図 26】



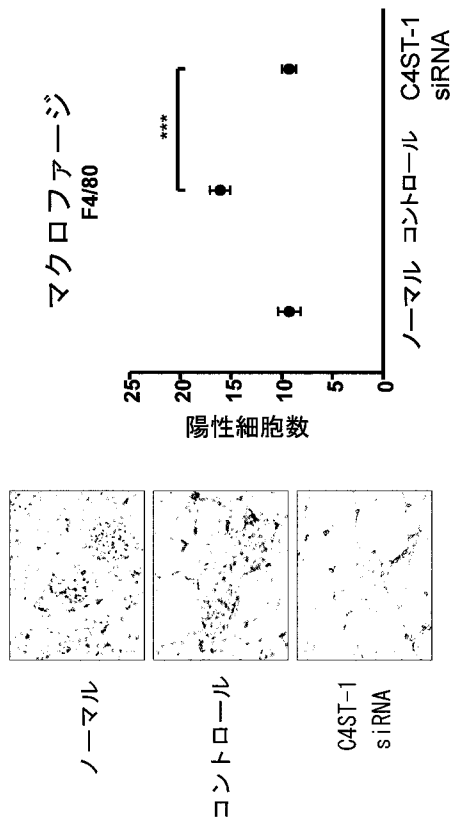
【図 27】



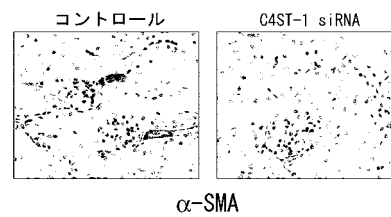
【図 28】



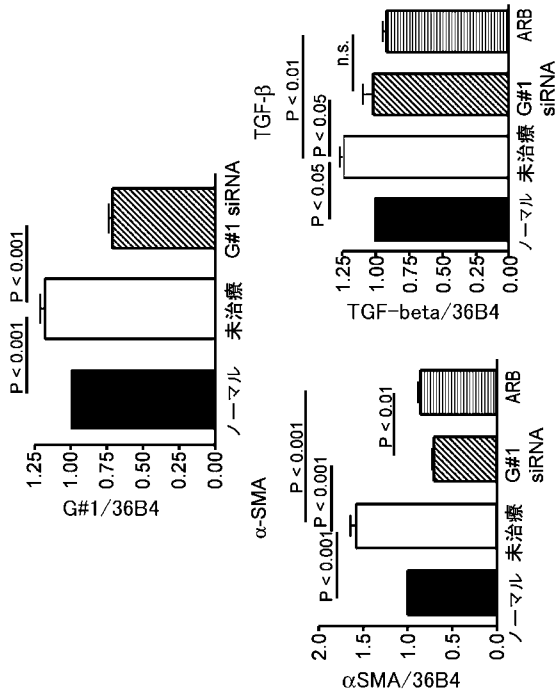
【図 29】



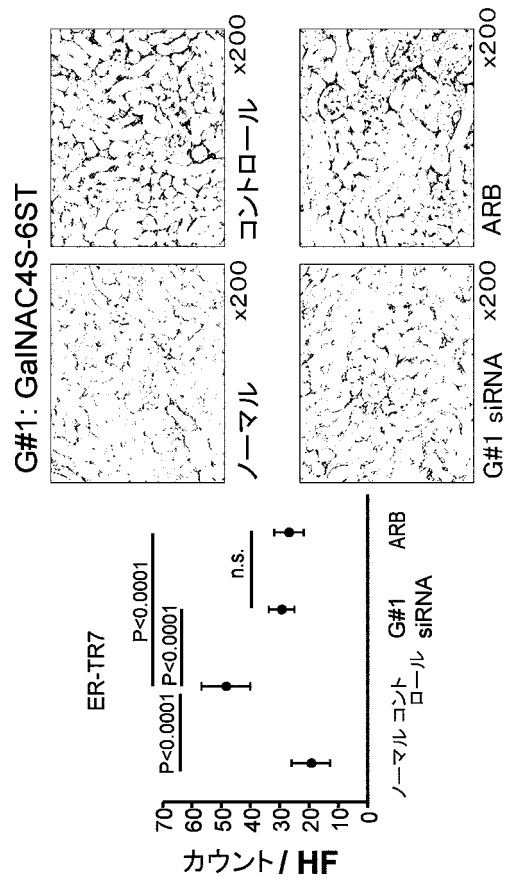
【図 30】



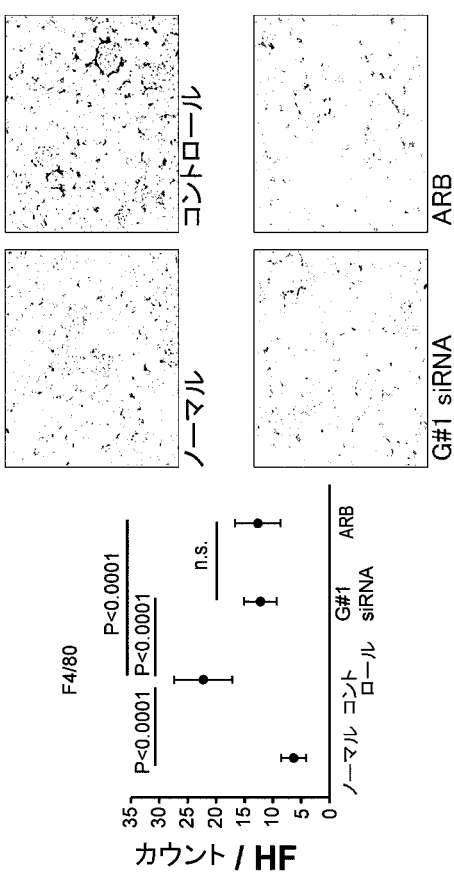
【図 3 1】



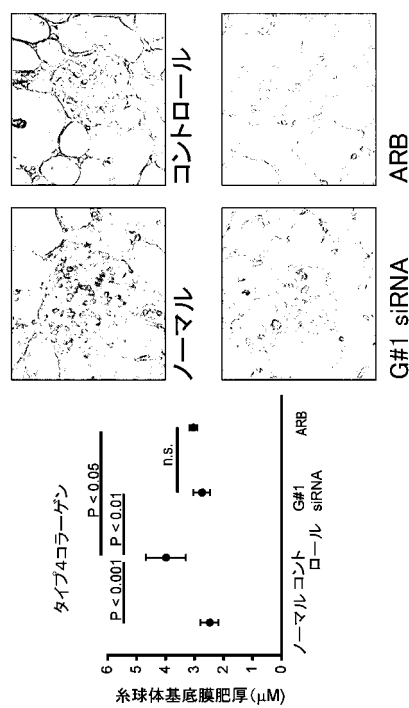
【図 3 2】



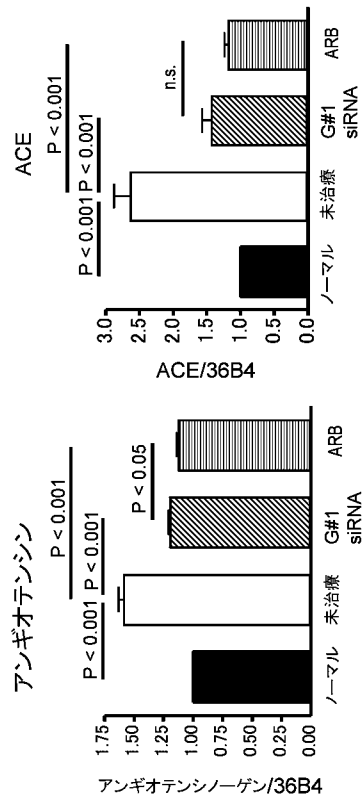
【図 3 3】



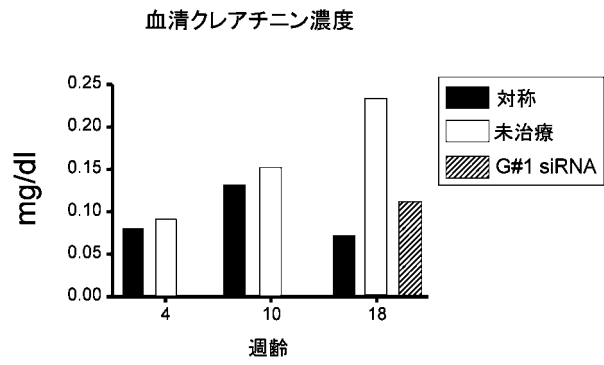
【図 3 4】



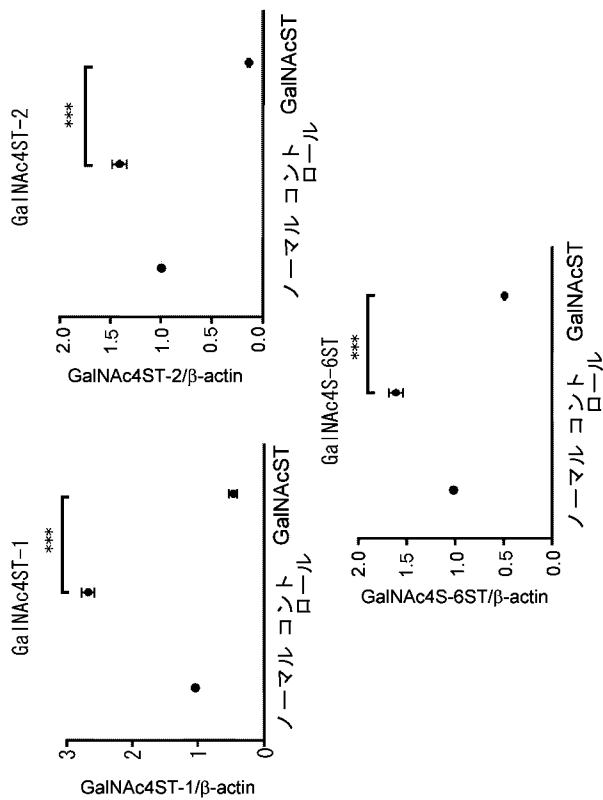
【図 3 5】



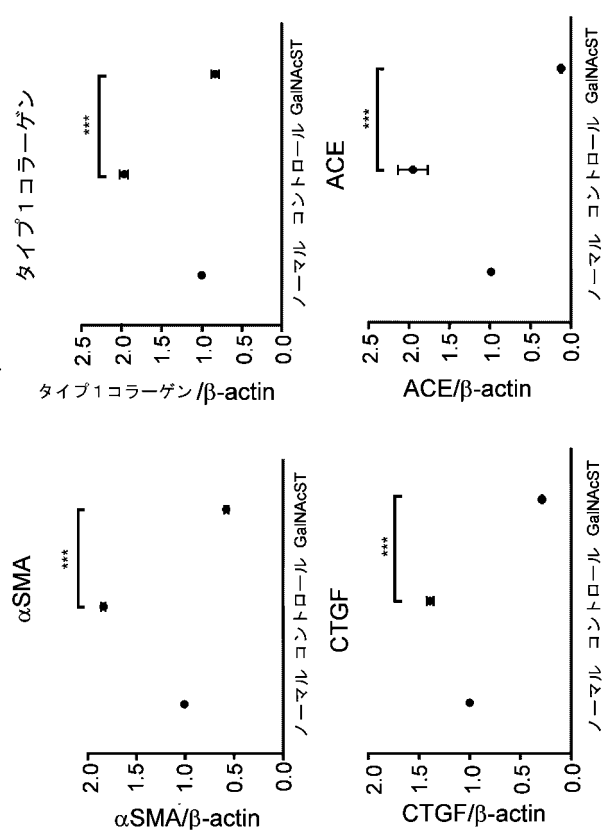
【図 3 6】



【図 3 7】

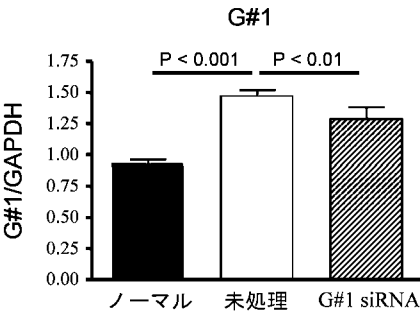


【図 3 8】

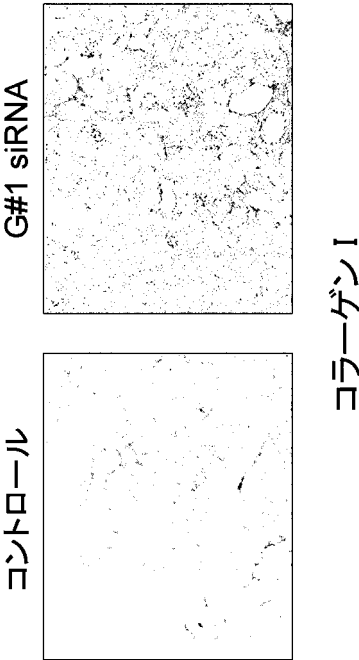




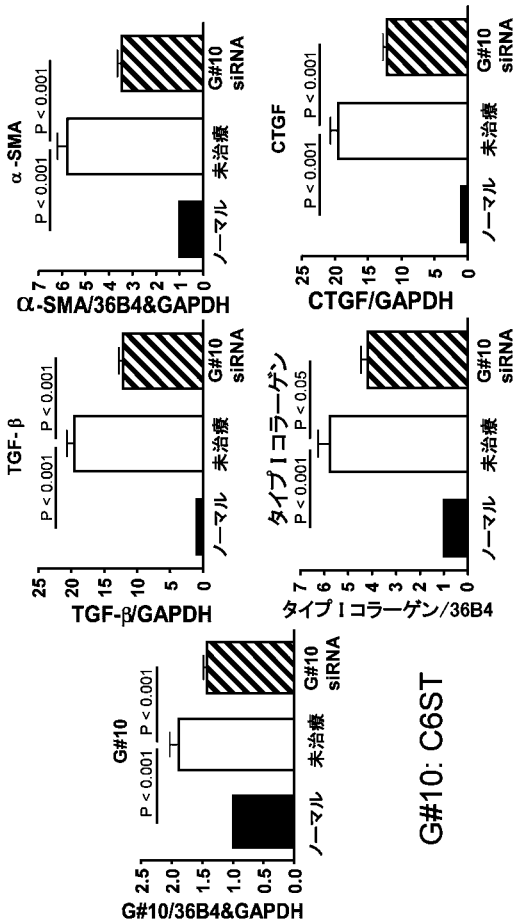
【図 39】



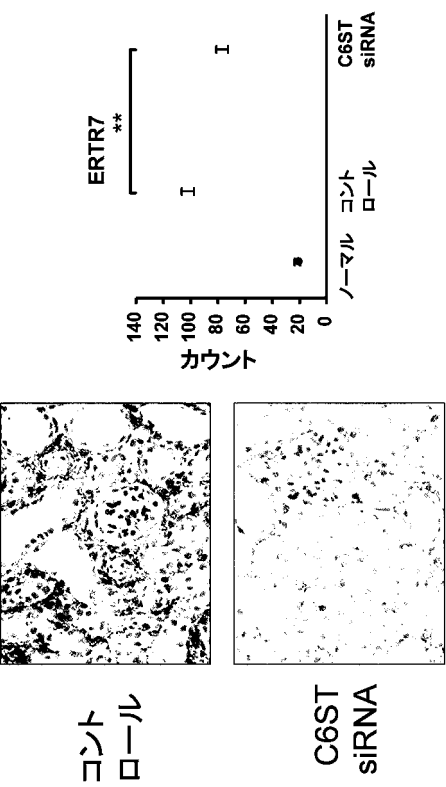
【図 40】



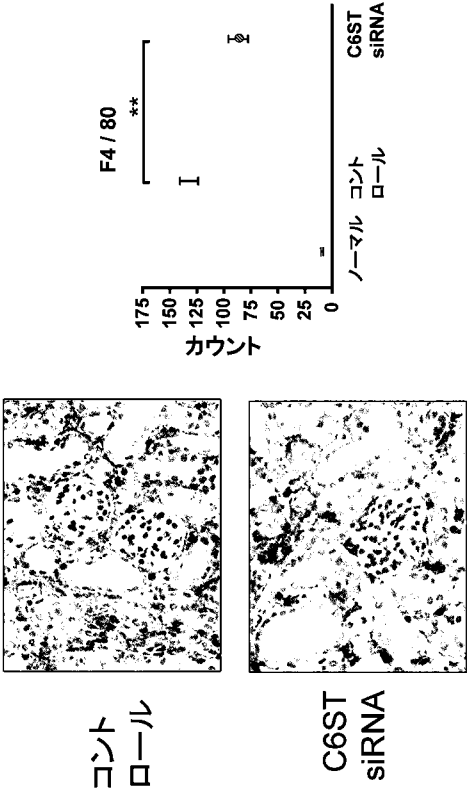
【図 41】



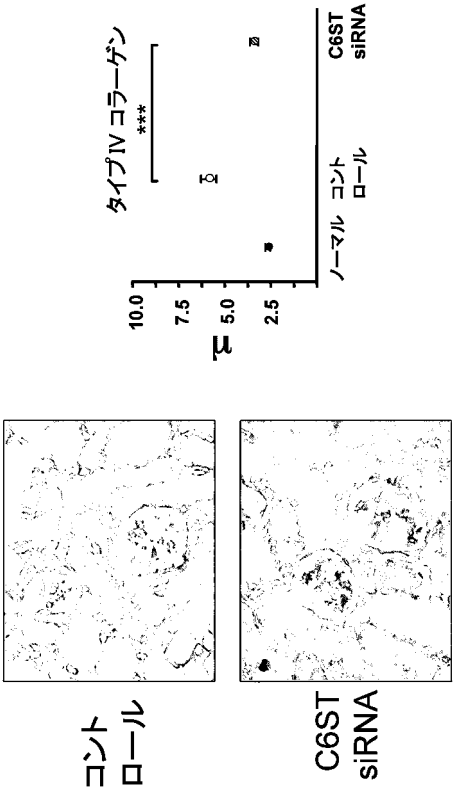
【図 42】



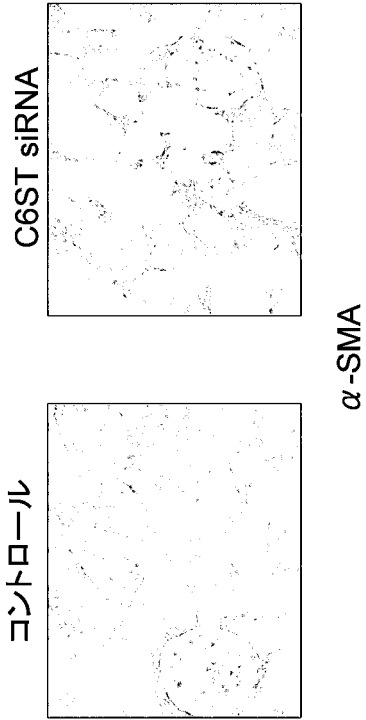
【 図 4 3 】



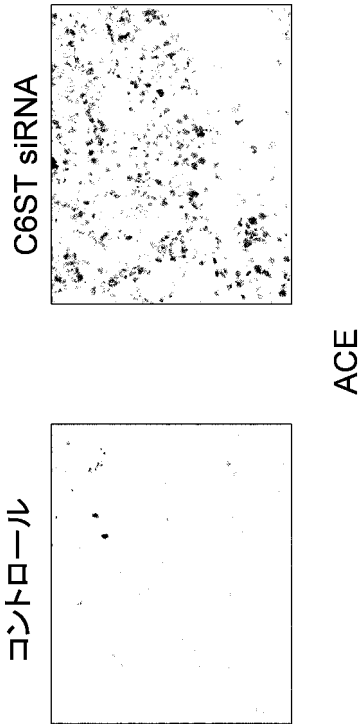
【 図 4 4 】



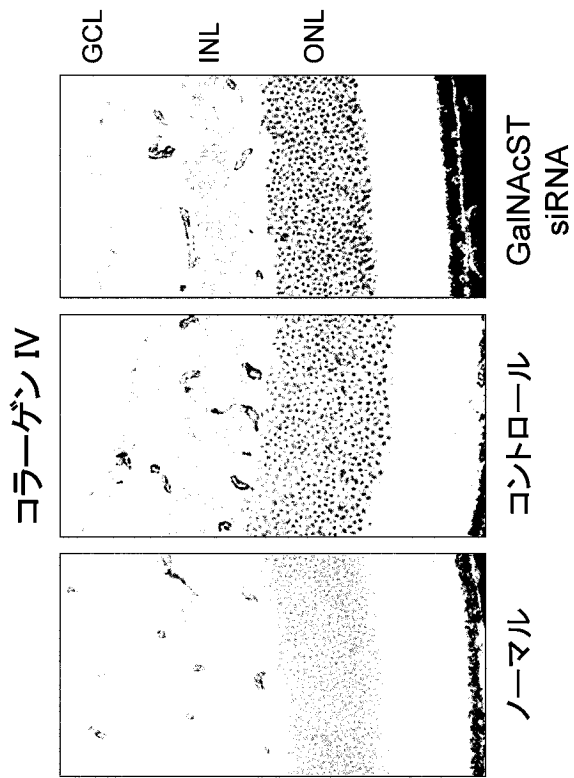
【 図 4 5 】



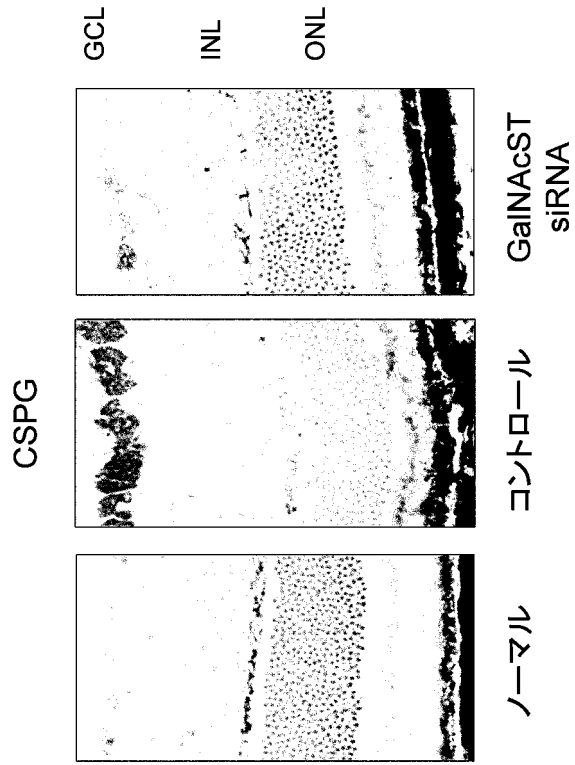
【 図 4 6 】



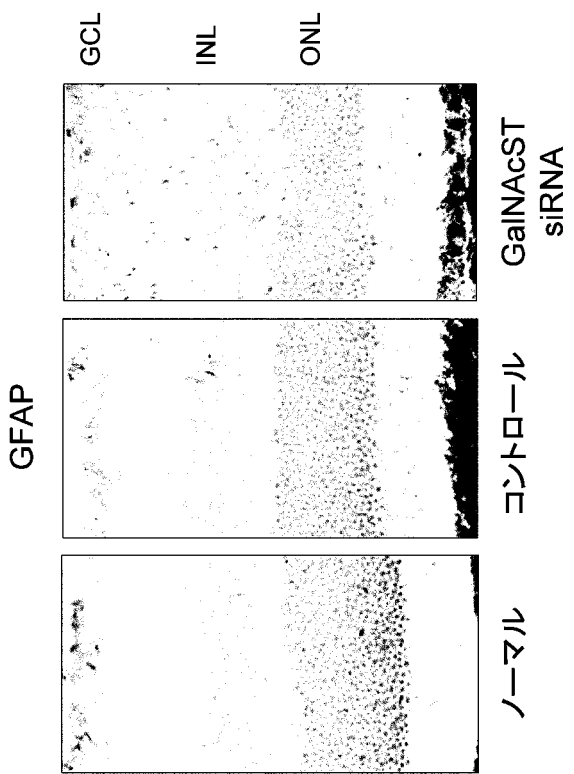
【図 47】



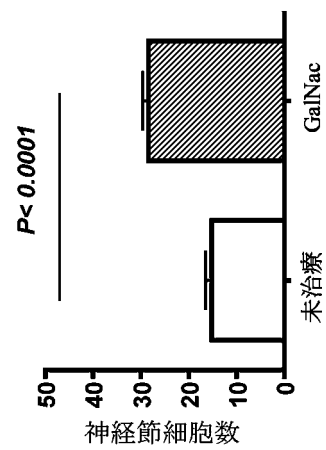
【図 48】



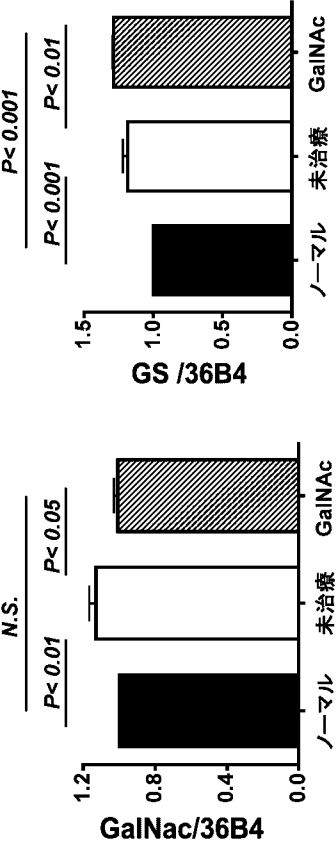
【図 49】



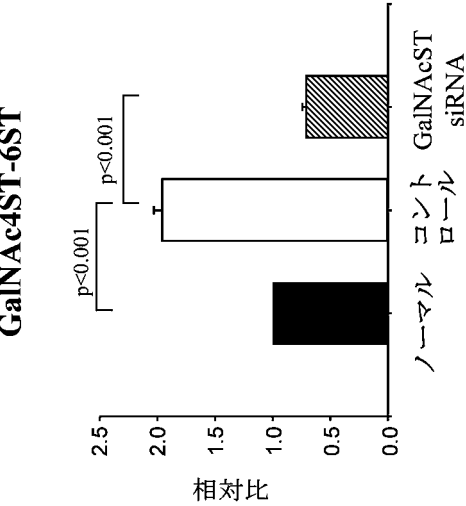
【図 50】



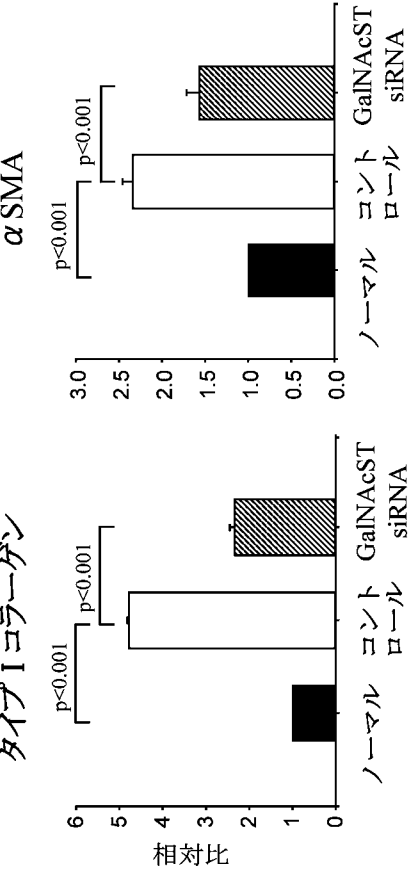
【図 5 1】



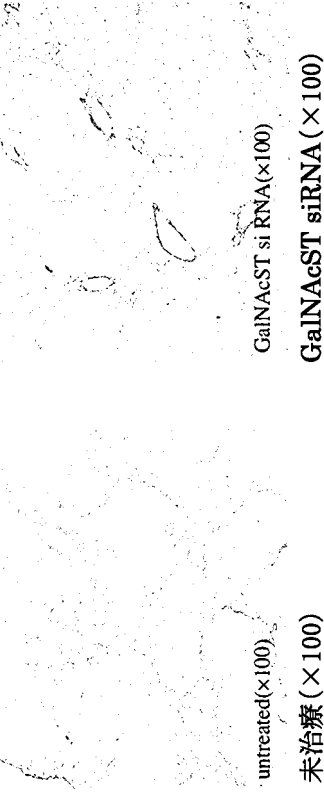
【図 5 2】



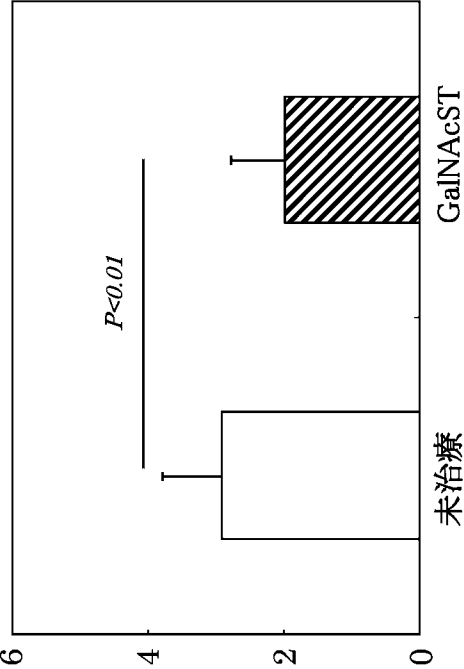
【図 5 3】



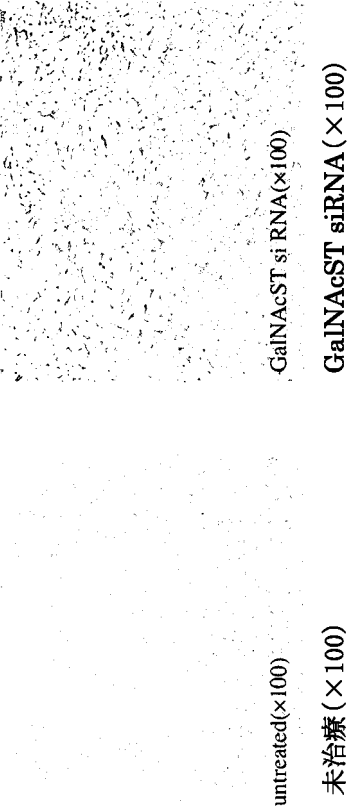
【図 5 4】



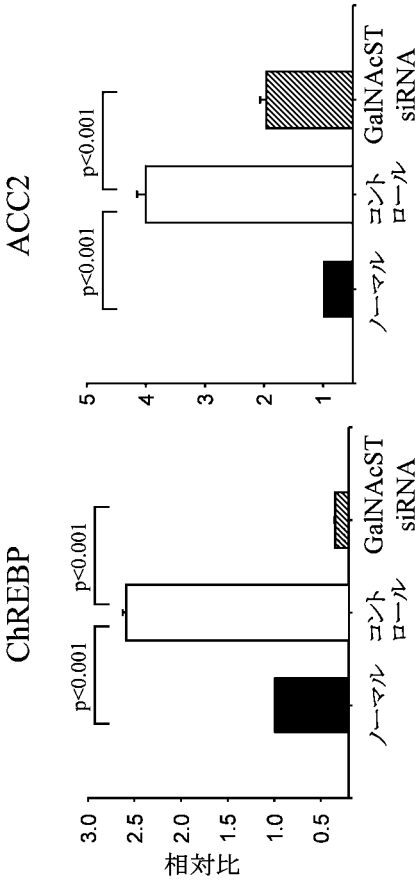
【 図 5 5 】



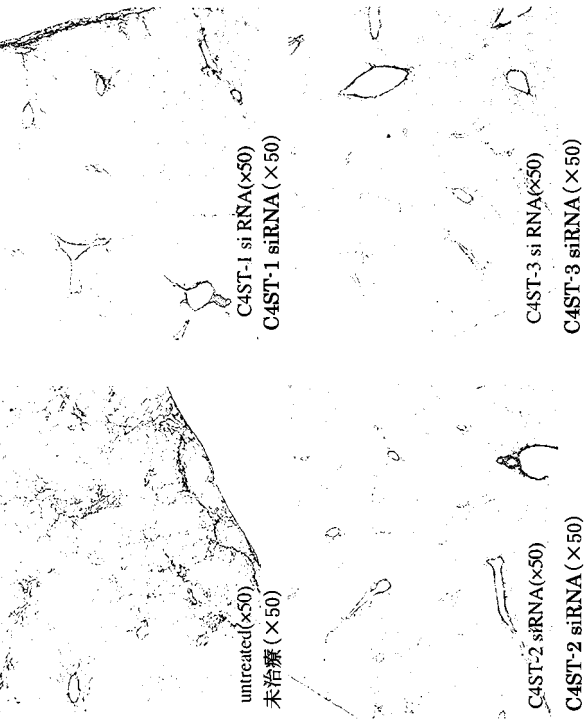
【 図 5 6 】



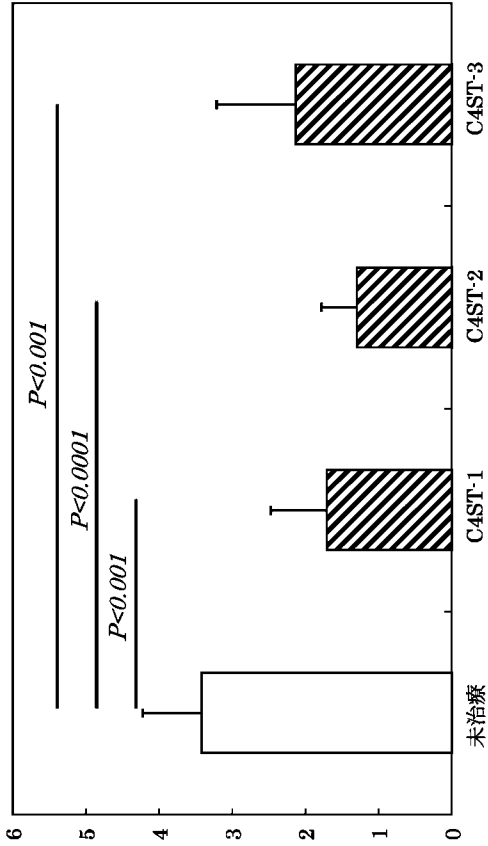
【 図 5 7 】



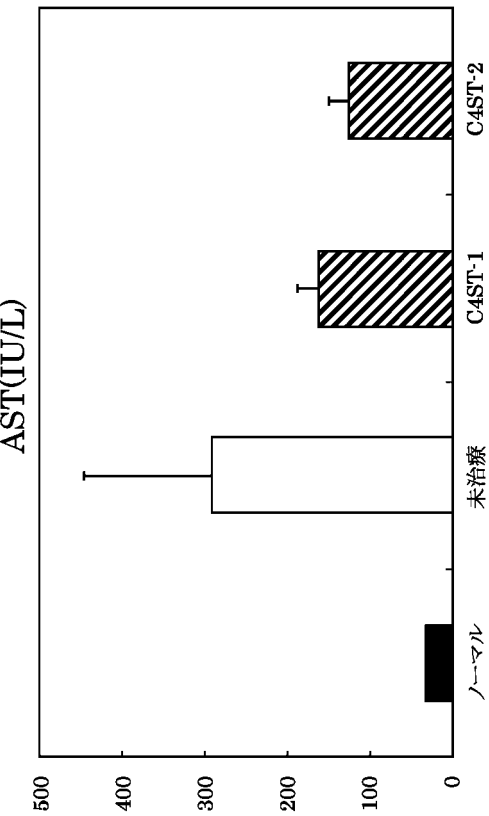
【 図 5 8 】



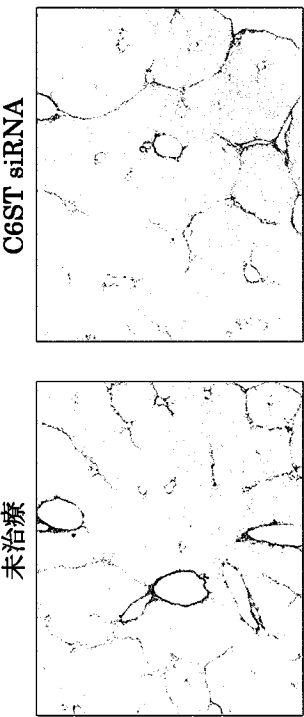
【 図 5 9 】



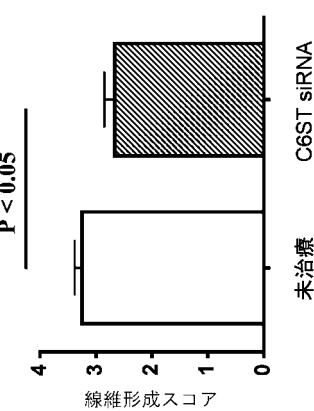
【 図 6 0 】



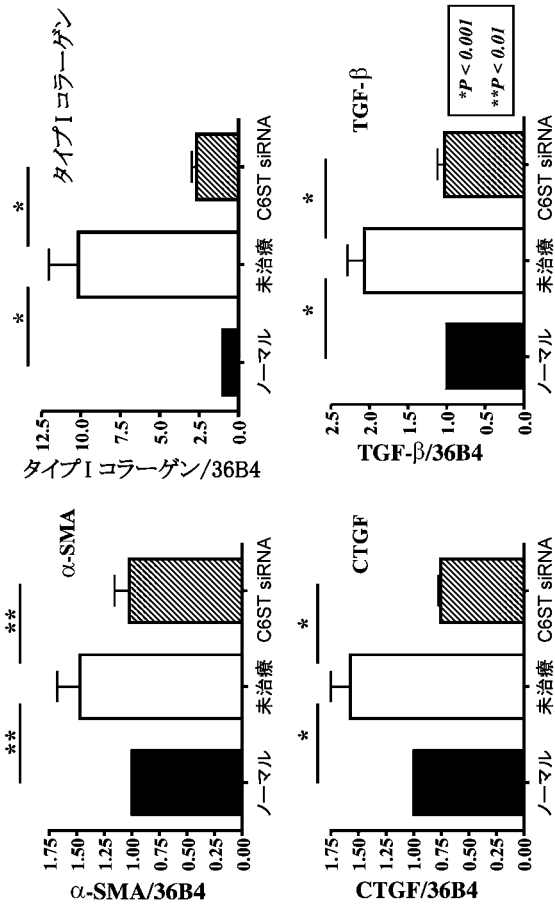
【 図 6 1 】



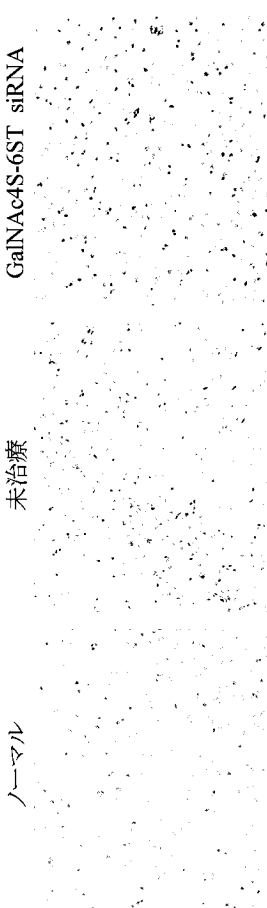
【 図 6 2 】



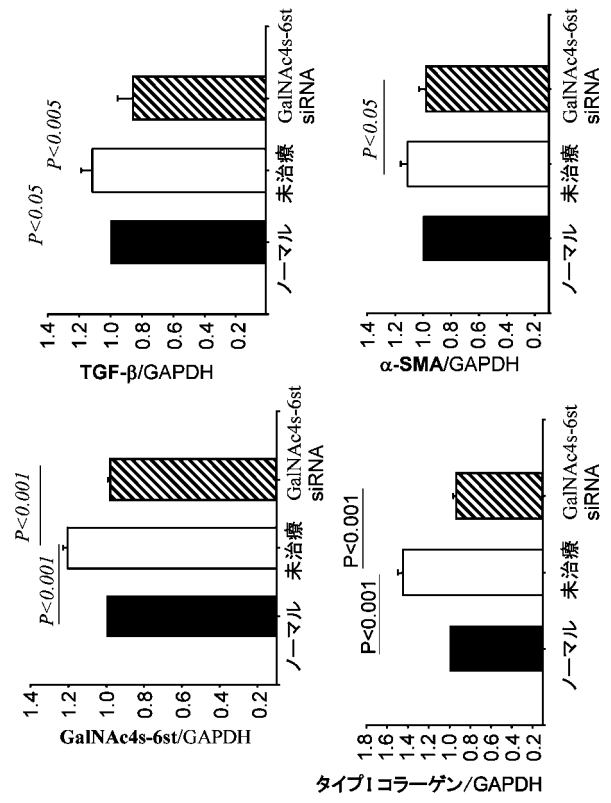
【図 6 3】



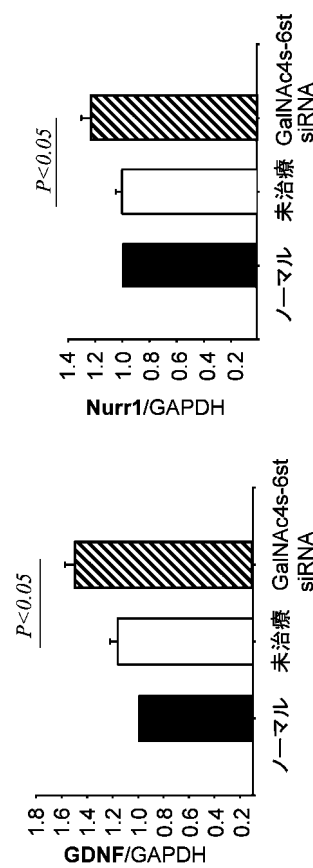
【図 6 5】



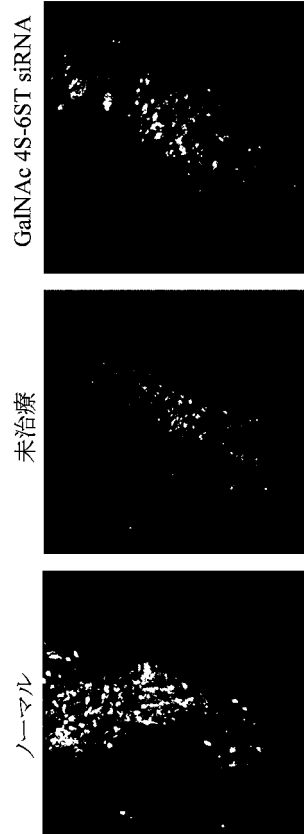
【図 6 4】



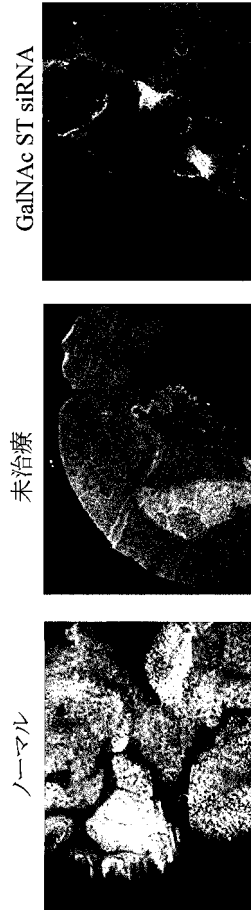
【図 6 6】



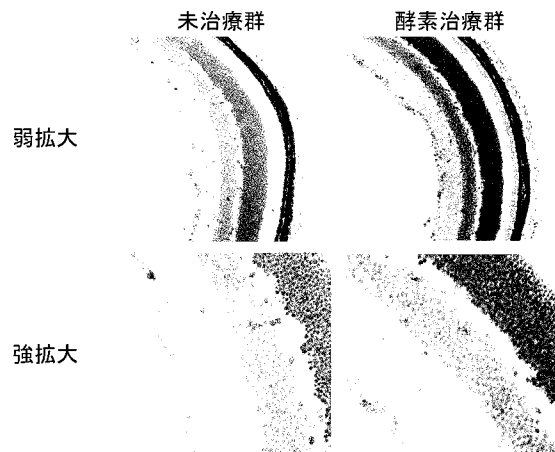
【図 67】



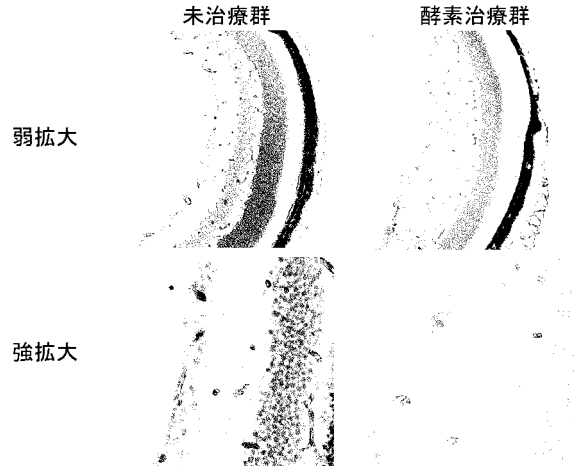
【図 68】



【図 69】

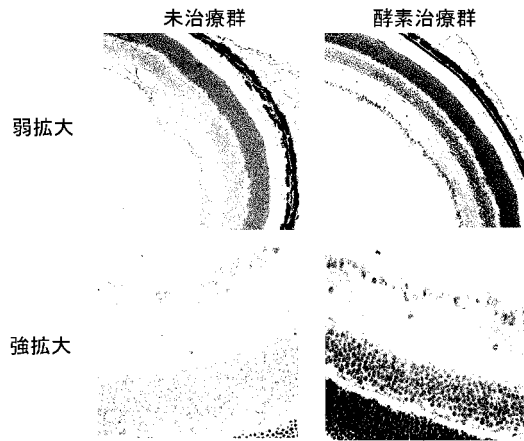


【図 70】

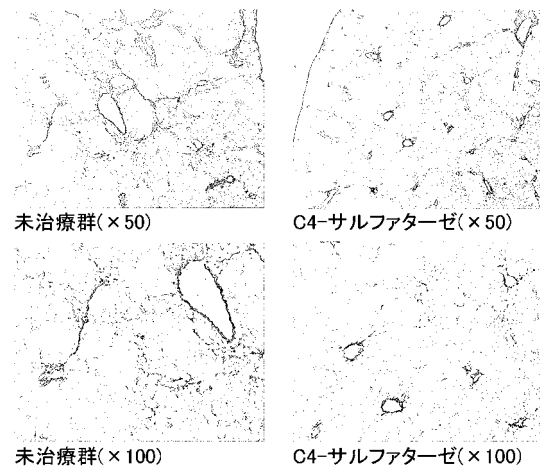




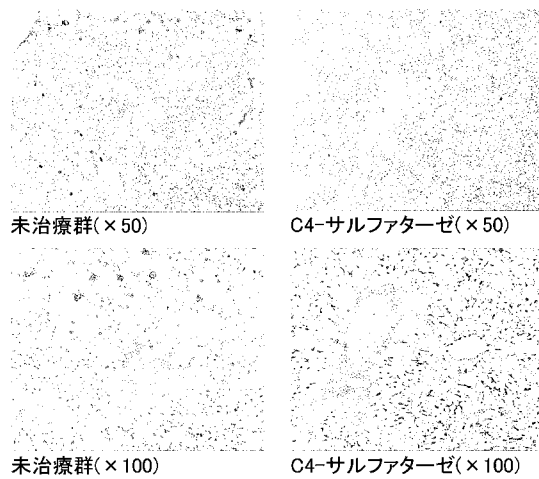
【図 7 1】



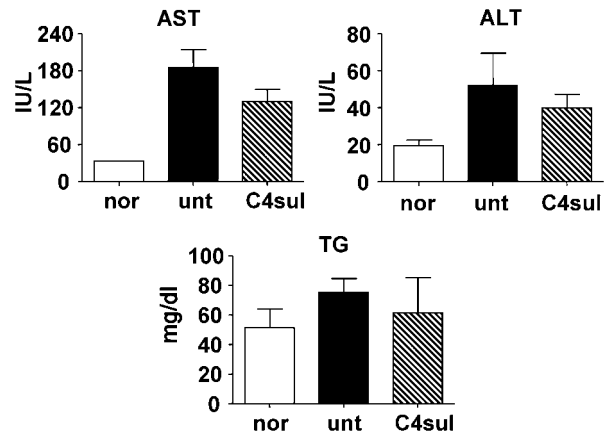
【図 7 2】



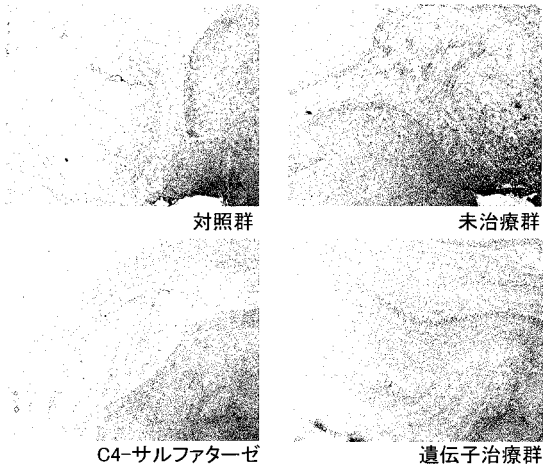
【図 7 3】



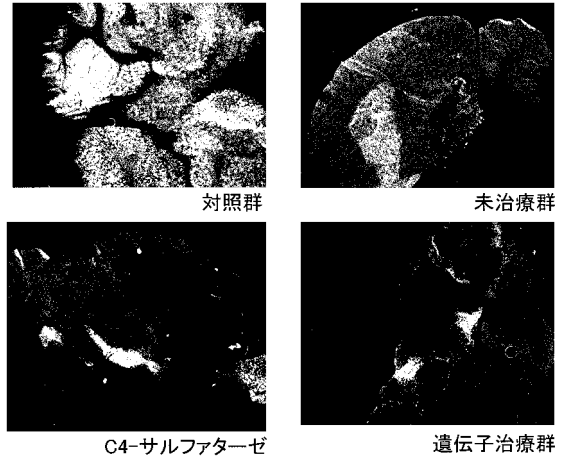
【図 7 4】



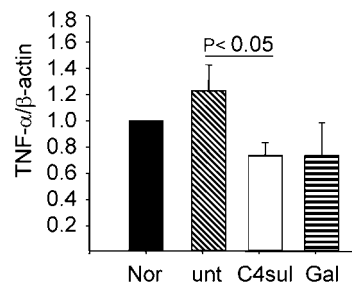
【図 75】



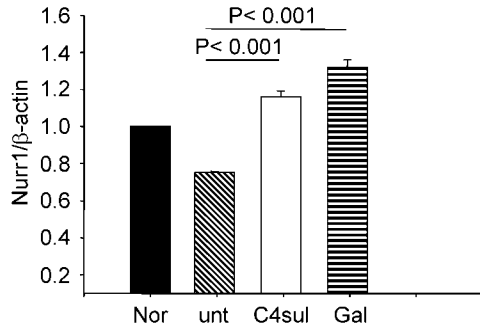
【図 76】



【図 77】



【図 78】



【配列表】

0004585611000001.app

---

フロントページの続き

- (74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100130845  
弁理士 渡邊 伸一
- (74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 米山 博之  
東京都港区東麻布 1 丁目 9 番 1 5 号 株式会社ステリック再生医科学研究所内
- (72)発明者 小山 純  
東京都港区東麻布 1 丁目 9 番 1 5 号 株式会社ステリック再生医科学研究所内
- (72)発明者 藤井 庄人  
東京都港区東麻布 1 丁目 9 番 1 5 号 株式会社ステリック再生医科学研究所内

審査官 横井 宏理

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 7 / 0 4 9 4 2 4 ( W O , A 1 )  
特表 2 0 0 4 - 5 0 4 2 6 2 ( J P , A )

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K 48/00  
A61K 31/00-713  
A61K 38/00-43  
A61P 1/00  
C12N 15/09  
MEDLINE(STN)  
BIOSIS(STN)  
EMBASE(STN)  
CAplus(STN)  
REGISTRY(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)