

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5247686号
(P5247686)

(45) 発行日 平成25年7月24日(2013.7.24)

(24) 登録日 平成25年4月19日(2013.4.19)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K 31/421	(2006.01)	A 6 1 K 31/421	
A 6 1 K 31/427	(2006.01)	A 6 1 K 31/427	
A 6 1 K 31/426	(2006.01)	A 6 1 K 31/426	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P 27/02	

請求項の数 6 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-515245 (P2009-515245)
 (86) (22) 出願日 平成20年5月20日(2008.5.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2008/059236
 (87) 国際公開番号 W02008/143254
 (87) 国際公開日 平成20年11月27日(2008.11.27)
 審査請求日 平成23年3月7日(2011.3.7)
 (31) 優先権主張番号 特願2007-134183 (P2007-134183)
 (32) 優先日 平成19年5月21日(2007.5.21)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 000199175
 千寿製薬株式会社
 大阪府大阪市中央区平野町2丁目5番8号
 (73) 特許権者 000228590
 日本ケミファ株式会社
 東京都千代田区岩本町2丁目2番3号
 (74) 代理人 100080791
 弁理士 高島 一
 (74) 代理人 100125070
 弁理士 土井 京子
 (74) 代理人 100136629
 弁理士 鎌田 光宜
 (74) 代理人 100121212
 弁理士 田村 弥栄子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PPAR δ アゴニスト含有医薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

〔3-〔2-〔4-イソプロピル-2-(4-トリフルオロメチル)フェニル-5-チアゾリル〕エチル〕-5-メチル-1,2-ベンズイソキサゾール-6-イル〕オキシ酢酸、〔4-〔3-〔2-(4-トリフルオロメチル)フェニル-4-イソプロピル-5-チアゾリル〕プロピオニル〕-2-メチルフェノキシ〕酢酸もしくは〔4-〔3-〔2-(2-ヒドロキシ-4-クロロフェニル)-5-イソプロピル-4-オキサゾリル〕プロピオニル〕-2-メチルフェノキシ〕酢酸またはそれらの薬理学的に許容される塩を含有するマイボーム腺上皮細胞の増殖促進剤。

【請求項2】

〔3-〔2-〔4-イソプロピル-2-(4-トリフルオロメチル)フェニル-5-チアゾリル〕エチル〕-5-メチル-1,2-ベンズイソキサゾール-6-イル〕オキシ酢酸、〔4-〔3-〔2-(4-トリフルオロメチル)フェニル-4-イソプロピル-5-チアゾリル〕プロピオニル〕-2-メチルフェノキシ〕酢酸もしくは〔4-〔3-〔2-(2-ヒドロキシ-4-クロロフェニル)-5-イソプロピル-4-オキサゾリル〕プロピオニル〕-2-メチルフェノキシ〕酢酸またはそれらの薬理学的に許容される塩を含有する角膜上皮細胞の増殖促進剤。

【請求項3】

〔3-〔2-〔4-イソプロピル-2-(4-トリフルオロメチル)フェニル-5-チアゾリル〕エチル〕-5-メチル-1,2-ベンズイソキサゾール-6-イル〕オキシ酢

10

20

酸、[4 - [3 - [2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 4 - イソプロピル - 5 - チアゾリル] プロピオニル] - 2 - メチルフェノキシ] 酢酸もしくは [4 - [3 - [2 - (2 - ヒドロキシ - 4 - クロロフェニル) - 5 - イソプロピル - 4 - オキサゾリル] プロピオニル] - 2 - メチルフェノキシ] 酢酸またはそれらの薬理学的に許容される塩を含有するマイボーム腺機能不全の治療剤。

【請求項 4】

[3 - [2 - [4 - イソプロピル - 2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 5 - チアゾリル] エチル] - 5 - メチル - 1 , 2 - ベンズイソキサゾール - 6 - イル] オキシ酢酸、[4 - [3 - [2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 4 - イソプロピル - 5 - チアゾリル] プロピオニル] - 2 - メチルフェノキシ] 酢酸もしくは [4 - [3 - [2 - (2 - ヒドロキシ - 4 - クロロフェニル) - 5 - イソプロピル - 4 - オキサゾリル] プロピオニル] - 2 - メチルフェノキシ] 酢酸またはそれらの薬理学的に許容される塩を含有する角膜上皮障害の治療剤。

10

【請求項 5】

[3 - [2 - [4 - イソプロピル - 2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 5 - チアゾリル] エチル] - 5 - メチル - 1 , 2 - ベンズイソキサゾール - 6 - イル] オキシ酢酸、[4 - [3 - [2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 4 - イソプロピル - 5 - チアゾリル] プロピオニル] - 2 - メチルフェノキシ] 酢酸もしくは [4 - [3 - [2 - (2 - ヒドロキシ - 4 - クロロフェニル) - 5 - イソプロピル - 4 - オキサゾリル] プロピオニル] - 2 - メチルフェノキシ] 酢酸またはそれらの薬理学的に許容される塩を含有するドライアイの治療剤。

20

【請求項 6】

ドライアイが涙液蒸発亢進型ドライアイである請求項 5 記載の治療剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、PPAR (ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 ; Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) δ アゴニストを有効成分として含有する、マイボーム腺上皮細胞または角膜上皮細胞の増殖促進剤に関する。

【背景技術】

30

【0002】

マイボーム腺は上下のまぶた (眼瞼) に内包された脂質産生腺であり、眼瞼のまつげ (睫毛) より結膜側に位置する開口部から脂質を分泌する。涙液を構成する油層は、マイボーム腺から供給される脂質を成分としており、眼表面からの涙液の蒸発を防いでいる。マイボーム腺機能不全やマイボーム腺炎患者においては、マイボーム腺の機能が低下して脂質の分泌量が少なくなるため、涙液蒸発亢進型ドライアイ、ドライアイに伴う角結膜上皮障害、角膜上皮糜爛、角膜潰瘍などを引き起こすことが知られている。

また、角膜は、上皮と外境界板 (ボーマン膜) ・実質・内境界板 (デスメ膜) ・内皮から成り立っている。角膜は眼球の最前部に位置しているので、外界の環境の影響を受けやすく、その結果として種々の障害が生じる。角膜上皮細胞の創傷または欠損に伴う疾患としては、ドライアイ症候群、角膜潰瘍、点状表層角膜症、角膜上皮糜爛、春季カタルやアトピー性角結膜炎などの角膜病変に伴う眼アレルギー性疾患などがあげられる。

40

【0003】

一方、PPAR は、殆どの脊椎動物において発現している核内レセプターの一つであり、細胞内の糖・脂質代謝や細胞の分化に密接に関与している転写因子群であるとされている。サブタイプとしては、 α 、 δ 、 γ 型が知られている。なお、PPAR δ は、PPAR β と表記されることもある (非特許文献 1) 。

PPAR の眼組織における分布としては、PPAR α および β がウサギの角膜上皮細胞に発現していることが知られている (非特許文献 2) 。

これまでに、主として PPAR γ 活性化作用を有すると考えられる 5 - [4 - (6 - メ

50

トキシ - 1 - メチル - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イルメトキシ) ベンジル] チアゾリジン - 2 , 4 - ジオンが、角結膜障害の治療剤として利用できること (特許文献 1 および 2)、眼疾患 (結膜炎、ドライアイ症候群、角膜炎など) の治療において P P A R α 、 δ または γ アゴニストが投与されること (特許文献 3) が報告されている。また、P P A R α に関しては、肝臓、腎臓などに分布し、脂質代謝・輸送に作用することが知られており、さらに、そのアゴニストが角膜疾患の治療剤として利用できることも報告されている (特許文献 4)。P P A R δ アゴニストについては、これまで、ラット皮脂腺上皮細胞の増殖および分化を促進すること (非特許文献 3)、皮膚の創傷治癒を促進すること (非特許文献 4) についての報告がある。その他にも、非チアゾリジンジオン P P A R リガンドと G L P - 1 誘導体を投与することにより β - 細胞の増殖を刺激する方法 (特許文献 5)、P P A R γ アゴニストであるピオグリタゾンが白血病細胞や前立腺癌細胞などの増殖を阻害すること (特許文献 6) などが知られている。

10

【 0 0 0 4 】

しかしながら、P P A R α 、 δ または γ の各動物種および各組織・細胞における発現や機能については不明な点が多く、P P A R δ アゴニストが、ヒトの眼疾患に有用であるかについて正確には知られていない。

【特許文献 1】国際公開第 2 0 0 5 / 0 3 9 5 7 4 号パンフレット

【特許文献 2】特開 2 0 0 1 - 3 9 9 7 6 号公報

【特許文献 3】国際公開第 2 0 0 2 / 0 7 6 1 7 7 号パンフレット

【特許文献 4】特開 2 0 0 5 - 0 0 8 5 7 0 号公報

20

【特許文献 5】国際公開第 2 0 0 2 / 6 9 9 9 4 号パンフレット

【特許文献 6】国際公開第 1 9 9 8 / 2 5 5 9 8 号パンフレット

【非特許文献 1】J Med Chem 2000, 43: 527-550

【非特許文献 2】J Biol Chem 2000, 275: 2837

【非特許文献 3】Molecular Genetic and Metabolism 2001, 74: 362-369

【非特許文献 4】Am J Clin Dermatol 2003, 4(8): 523-530

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 5 】

本発明の課題は、ドライアイなどの眼疾患の根本的な治療となり得るマイボーム腺上皮細胞および角膜上皮細胞の増殖を促進しうる薬剤を提供すること、並びに、該促進剤を用いたマイボーム腺機能不全、角膜上皮障害、ドライアイ等の眼疾患の治療剤を提供することである。

30

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 6 】

本発明者らは上記課題に鑑み、鋭意研究を重ねた結果、特定の P P A R δ アゴニストが、マイボーム腺上皮細胞および角膜上皮細胞の増殖促進作用に優れることを見出し、本発明を完成させるに至った。

したがって、本発明は以下の内容を少なくとも含む。

(1) [3 - [2 - [4 - イソプロピル - 2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 5 - チアゾリル] エチル] - 5 - メチル - 1 , 2 - ベンズイソキサゾール - 6 - イル] オキシ酢酸、[4 - [3 - [2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 4 - イソプロピル - 5 - チアゾリル] プロピオニル] - 2 - メチルフェノキシ] 酢酸もしくは [4 - [3 - [2 - (2 - ヒドロキシ - 4 - クロロフェニル) - 5 - イソプロピル - 4 - オキサゾリル] プロピオニル] - 2 - メチルフェノキシ] 酢酸またはそれらの薬理学的に許容される塩を含有するマイボーム腺上皮細胞の増殖促進剤。

40

(2) [3 - [2 - [4 - イソプロピル - 2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 5 - チアゾリル] エチル] - 5 - メチル - 1 , 2 - ベンズイソキサゾール - 6 - イル] オキシ酢酸、[4 - [3 - [2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 4 - イソプロピル - 5 - チアゾリル] プロピオニル] - 2 - メチルフェノキシ] 酢酸もしくは [4 - [3 -

50

[2 - (2 - ヒドロキシ - 4 - クロロフェニル) - 5 - イソプロピル - 4 - オキサゾリル] プロピオニル] - 2 - メチルフェノキシ] 酢酸またはそれらの薬理的に許容される塩を含有する角膜上皮細胞の増殖促進剤。

(3) [3 - [2 - [4 - イソプロピル - 2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 5 - チアゾリル] エチル] - 5 - メチル - 1 , 2 - ベンズイソキサゾール - 6 - イル] オキシ酢酸、[4 - [3 - [2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 4 - イソプロピル - 5 - チアゾリル] プロピオニル] - 2 - メチルフェノキシ] 酢酸もしくは [4 - [3 - [2 - (2 - ヒドロキシ - 4 - クロロフェニル) - 5 - イソプロピル - 4 - オキサゾリル] プロピオニル] - 2 - メチルフェノキシ] 酢酸またはそれらの薬理的に許容される塩を含有するマイボーム腺機能不全の治療剤。

10

(4) [3 - [2 - [4 - イソプロピル - 2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 5 - チアゾリル] エチル] - 5 - メチル - 1 , 2 - ベンズイソキサゾール - 6 - イル] オキシ酢酸、[4 - [3 - [2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 4 - イソプロピル - 5 - チアゾリル] プロピオニル] - 2 - メチルフェノキシ] 酢酸もしくは [4 - [3 - [2 - (2 - ヒドロキシ - 4 - クロロフェニル) - 5 - イソプロピル - 4 - オキサゾリル] プロピオニル] - 2 - メチルフェノキシ] 酢酸またはそれらの薬理的に許容される塩を含有する角膜上皮障害の治療剤。

(5) [3 - [2 - [4 - イソプロピル - 2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 5 - チアゾリル] エチル] - 5 - メチル - 1 , 2 - ベンズイソキサゾール - 6 - イル] オキシ酢酸、[4 - [3 - [2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 4 - イソプロピル - 5 - チアゾリル] プロピオニル] - 2 - メチルフェノキシ] 酢酸もしくは [4 - [3 - [2 - (2 - ヒドロキシ - 4 - クロロフェニル) - 5 - イソプロピル - 4 - オキサゾリル] プロピオニル] - 2 - メチルフェノキシ] 酢酸またはそれらの薬理的に許容される塩を含有するドライアイの治療剤。

20

(6) ドライアイが涙液蒸発亢進型ドライアイである前記 (5) 記載の治療剤。

(7) マイボーム腺上皮細胞の増殖促進剤を製造するための、[3 - [2 - [4 - イソプロピル - 2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 5 - チアゾリル] エチル] - 5 - メチル - 1 , 2 - ベンズイソキサゾール - 6 - イル] オキシ酢酸、[4 - [3 - [2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 4 - イソプロピル - 5 - チアゾリル] プロピオニル] - 2 - メチルフェノキシ] 酢酸もしくは [4 - [3 - [2 - (2 - ヒドロキシ - 4 - クロロフェニル) - 5 - イソプロピル - 4 - オキサゾリル] プロピオニル] - 2 - メチルフェノキシ] 酢酸またはそれらの薬理的に許容される塩の使用。

30

(8) 角膜上皮細胞の増殖促進剤を製造するための、[3 - [2 - [4 - イソプロピル - 2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 5 - チアゾリル] エチル] - 5 - メチル - 1 , 2 - ベンズイソキサゾール - 6 - イル] オキシ酢酸、[4 - [3 - [2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 4 - イソプロピル - 5 - チアゾリル] プロピオニル] - 2 - メチルフェノキシ] 酢酸もしくは [4 - [3 - [2 - (2 - ヒドロキシ - 4 - クロロフェニル) - 5 - イソプロピル - 4 - オキサゾリル] プロピオニル] - 2 - メチルフェノキシ] 酢酸またはそれらの薬理的に許容される塩の使用。

(9) マイボーム腺機能不全の治療薬を製造するための、[3 - [2 - [4 - イソプロピル - 2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 5 - チアゾリル] エチル] - 5 - メチル - 1 , 2 - ベンズイソキサゾール - 6 - イル] オキシ酢酸、[4 - [3 - [2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 4 - イソプロピル - 5 - チアゾリル] プロピオニル] - 2 - メチルフェノキシ] 酢酸もしくは [4 - [3 - [2 - (2 - ヒドロキシ - 4 - クロロフェニル) - 5 - イソプロピル - 4 - オキサゾリル] プロピオニル] - 2 - メチルフェノキシ] 酢酸またはそれらの薬理的に許容される塩の使用。

40

(10) 角膜上皮障害の治療薬を製造するための、[3 - [2 - [4 - イソプロピル - 2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 5 - チアゾリル] エチル] - 5 - メチル - 1 , 2 - ベンズイソキサゾール - 6 - イル] オキシ酢酸、[4 - [3 - [2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 4 - イソプロピル - 5 - チアゾリル] プロピオニル] - 2 - メ

50

チルフェノキシ]酢酸もしくは[4-[3-[2-(2-ヒドロキシ-4-クロロフェニル)-5-イソプロピル-4-オキサゾリル]プロピオニル]-2-メチルフェノキシ]酢酸またはそれらの薬理的に許容される塩の使用。

(11) ドライアイの治療薬を製造するための、[3-[2-[4-イソプロピル-2-(4-トリフルオロメチル)フェニル-5-チアゾリル]エチル]-5-メチル-1,2-ベンズイソキサゾール-6-イル]オキシ酢酸、[4-[3-[2-(4-トリフルオロメチル)フェニル-4-イソプロピル-5-チアゾリル]プロピオニル]-2-メチルフェノキシ]酢酸もしくは[4-[3-[2-(2-ヒドロキシ-4-クロロフェニル)-5-イソプロピル-4-オキサゾリル]プロピオニル]-2-メチルフェノキシ]酢酸またはそれらの薬理的に許容される塩の使用。

10

(12) ドライアイが涙液蒸発亢進型ドライアイである前記(11)記載の使用。

(13) マイボーム腺上皮細胞の増殖の促進を必要とする対象に、[3-[2-[4-イソプロピル-2-(4-トリフルオロメチル)フェニル-5-チアゾリル]エチル]-5-メチル-1,2-ベンズイソキサゾール-6-イル]オキシ酢酸、[4-[3-[2-(4-トリフルオロメチル)フェニル-4-イソプロピル-5-チアゾリル]プロピオニル]-2-メチルフェノキシ]酢酸もしくは[4-[3-[2-(2-ヒドロキシ-4-クロロフェニル)-5-イソプロピル-4-オキサゾリル]プロピオニル]-2-メチルフェノキシ]酢酸またはそれらの薬理的に許容される塩の有効量を投与することを含む、マイボーム腺上皮細胞の増殖を促進させる方法。

(14) 角膜上皮細胞の増殖の促進を必要とする対象に、[3-[2-[4-イソプロピル-2-(4-トリフルオロメチル)フェニル-5-チアゾリル]エチル]-5-メチル-1,2-ベンズイソキサゾール-6-イル]オキシ酢酸、[4-[3-[2-(4-トリフルオロメチル)フェニル-4-イソプロピル-5-チアゾリル]プロピオニル]-2-メチルフェノキシ]酢酸もしくは[4-[3-[2-(2-ヒドロキシ-4-クロロフェニル)-5-イソプロピル-4-オキサゾリル]プロピオニル]-2-メチルフェノキシ]酢酸またはそれらの薬理的に許容される塩の有効量を投与することを含む、角膜上皮細胞の増殖を促進させる方法。

20

(15) マイボーム腺機能不全の治療を必要とする対象に、[3-[2-[4-イソプロピル-2-(4-トリフルオロメチル)フェニル-5-チアゾリル]エチル]-5-メチル-1,2-ベンズイソキサゾール-6-イル]オキシ酢酸、[4-[3-[2-(4-トリフルオロメチル)フェニル-4-イソプロピル-5-チアゾリル]プロピオニル]-2-メチルフェノキシ]酢酸もしくは[4-[3-[2-(2-ヒドロキシ-4-クロロフェニル)-5-イソプロピル-4-オキサゾリル]プロピオニル]-2-メチルフェノキシ]酢酸またはそれらの薬理的に許容される塩の有効量を投与することを含む、マイボーム腺機能不全を治療する方法。

30

(16) 角膜上皮障害の治療を必要とする対象に、[3-[2-[4-イソプロピル-2-(4-トリフルオロメチル)フェニル-5-チアゾリル]エチル]-5-メチル-1,2-ベンズイソキサゾール-6-イル]オキシ酢酸、[4-[3-[2-(4-トリフルオロメチル)フェニル-4-イソプロピル-5-チアゾリル]プロピオニル]-2-メチルフェノキシ]酢酸もしくは[4-[3-[2-(2-ヒドロキシ-4-クロロフェニル)-5-イソプロピル-4-オキサゾリル]プロピオニル]-2-メチルフェノキシ]酢酸またはそれらの薬理的に許容される塩の有効量を投与することを含む、角膜上皮障害を治療する方法。

40

(17) ドライアイの治療を必要とする対象に、[3-[2-[4-イソプロピル-2-(4-トリフルオロメチル)フェニル-5-チアゾリル]エチル]-5-メチル-1,2-ベンズイソキサゾール-6-イル]オキシ酢酸、[4-[3-[2-(4-トリフルオロメチル)フェニル-4-イソプロピル-5-チアゾリル]プロピオニル]-2-メチルフェノキシ]酢酸もしくは[4-[3-[2-(2-ヒドロキシ-4-クロロフェニル)-5-イソプロピル-4-オキサゾリル]プロピオニル]-2-メチルフェノキシ]酢酸またはそれらの薬理的に許容される塩の有効量を投与することを含む、ドライアイを

50

治療する方法。

(1 8) ドライアイが涙液蒸発亢進型ドライアイである前記 (1 7) 記載の方法。

【発明の効果】

【 0 0 0 7 】

本発明によれば、新規のマイボーム腺上皮細胞増殖促進剤または角膜上皮細胞増殖促進剤が提供され、該促進剤は、マイボーム腺上皮細胞および角膜上皮細胞の増殖を促進する。また、本発明の治療剤は、マイボーム腺機能不全、角膜上皮障害、ドライアイなどの疾患の治療・改善に有効に用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 8 】

【図 1】図 1 は、培養ヒト角膜上皮細胞（上段）、培養ウサギ角膜上皮細胞（中段）、および培養サルマイボーム腺上皮細胞（下段）での P P A R α 、 δ 、 γ の m R N A の発現を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 0 9 】

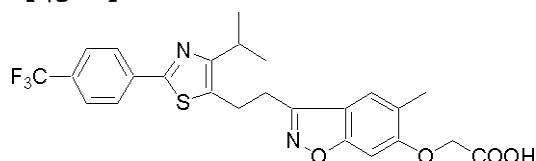
本発明は、[3 - [2 - [4 - イソプロピル - 2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 5 - チアゾリル] エチル] - 5 - メチル - 1 , 2 - ベンズイソキサゾール - 6 - イル] オキシ酢酸、[4 - [3 - [2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 4 - イソプロピル - 5 - チアゾリル] プロピオニル] - 2 - メチルフェノキシ] 酢酸もしくは [4 - [3 - [2 - (2 - ヒドロキシ - 4 - クロロフェニル) - 5 - イソプロピル - 4 - オキサゾリル] プロピオニル] - 2 - メチルフェノキシ] 酢酸またはその薬理的に許容される塩（以下総称して、「本発明の化合物」とも称する）を有効成分として含有する、マイボーム腺上皮細胞の増殖促進剤を提供する。該促進剤はマイボーム腺上皮細胞の増殖を促進するものである。また、本発明は、[3 - [2 - [4 - イソプロピル - 2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 5 - チアゾリル] エチル] - 5 - メチル - 1 , 2 - ベンズイソキサゾール - 6 - イル] オキシ酢酸、[4 - [3 - [2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 4 - イソプロピル - 5 - チアゾリル] プロピオニル] - 2 - メチルフェノキシ] 酢酸もしくは [4 - [3 - [2 - (2 - ヒドロキシ - 4 - クロロフェニル) - 5 - イソプロピル - 4 - オキサゾリル] プロピオニル] - 2 - メチルフェノキシ] 酢酸またはその薬理的に許容される塩を有効成分として含有する、角膜上皮細胞の増殖促進剤を提供する。該促進剤は角膜上皮細胞の増殖を促進するものである。なお、本発明にいう細胞増殖促進剤とは、細胞分裂を促進し細胞数を増加させる作用を有するもの、および細胞死を抑制して細胞数を増加させる作用を有するものの両者を意味する。

【 0 0 1 0 】

本発明の促進剤に有効成分として含まれる 3 - [2 - [4 - イソプロピル - 2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 5 - チアゾリル] エチル] - 5 - メチル - 1 , 2 - ベンズイソキサゾール - 6 - イル] オキシ酢酸 (C A S No . 5 1 5 1 3 8 - 0 6 - 4) :

【 0 0 1 1 】

【化 1】



【 0 0 1 2 】

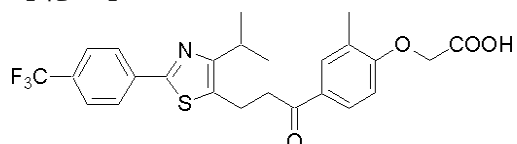
は、国際公開第 2 0 0 3 / 0 3 3 4 9 3 号パンフレット（特に実施例 5）に記載された P P A R δ アゴニスト活性を有する化合物である。

【 0 0 1 3 】

本発明の促進剤に有効成分として含まれる [4 - [3 - [2 - (4 - トリフルオロメチル) フェニル - 4 - イソプロピル - 5 - チアゾリル] プロピオニル] - 2 - メチルフェノキシ] 酢酸 (C A S No . 5 0 0 5 8 1 - 2 5 - 8) :

【 0 0 1 4 】

【 化 2 】



【 0 0 1 5 】

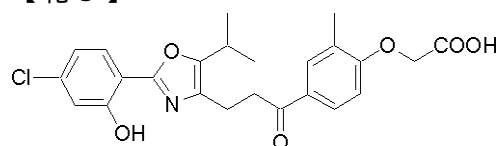
は、国際公開第 2 0 0 3 / 0 1 6 2 9 1 号パンフレット（特に実施例 3）に記載された P P A R δ アゴニスト活性を有する化合物である。

【 0 0 1 6 】

本発明の促進剤に有効成分として含まれる [4 - [3 - [2 - (2 - ヒドロキシ - 4 - クロロフェニル) - 5 - イソプロピル - 4 - オキサゾリル] プロピオニル] - 2 - メチルフェノキシ] 酢酸 (C A S No . 5 0 0 5 8 1 - 2 7 - 1) :

【 0 0 1 7 】

【 化 3 】



【 0 0 1 8 】

は、国際公開第 2 0 0 3 / 0 1 6 2 9 1 号パンフレット（特に実施例 6）に記載された P P A R δ アゴニスト活性を有する化合物である。

【 0 0 1 9 】

これらの化合物の薬理学的に許容される塩としては、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属；カルシウム、マグネシウム等のアルカリ土類金属等との金属塩などがあげられる。また、本発明の化合物は、その溶媒和物も含まれる。

【 0 0 2 0 】

本発明において P P A R δ アゴニストとは、P P A R δ のリガンド結合ドメイン (L B D) に結合して、当該受容体を活性化し、P P A R 標的遺伝子の転写を調節する物質をいう。P P A R δ アゴニスト活性は、哺乳動物の細胞に内在する他の核受容体の影響を除外するため、L B D と酵母 (y e a s t) の G A L 4 とのキメラ受容体と、レポーター遺伝子とを用いた酵母ツーハイブリッド法により測定することができる。具体的な測定方法は、参考文献、T.M. Willson et al., Journal of Medicinal Chemistry, 2000, vol.43, No.4, p.528-550およびJ.M. Lehmann et al., The Journal of Biological Chemistry, 1995, vol.270, No.22, p.12953-12956に記載の P P A R - G A L 4 アッセイがあげられる。本発明の化合物は、国際公開第 2 0 0 3 / 0 3 3 4 9 3 号パンフレットの実施例 1 2 および同 2 0 0 3 / 0 1 6 2 9 1 号パンフレットの実施例 5 1 に記載された方法により、P P A R δ アゴニスト活性を有することが確認されている。

【 0 0 2 1 】

本発明の化合物は、国際公開第 2 0 0 3 / 0 3 3 4 9 3 号パンフレット（特に実施例 5）および同 2 0 0 3 / 0 1 6 2 9 1 号パンフレット（特に実施例 3、6）の記載に準じて合成することができる。

【 0 0 2 2 】

本発明の促進剤において、有効成分の含有量は、通常 0 . 0 0 0 0 0 1 ~ 1 重量%、好ましくは 0 . 0 0 0 0 1 ~ 1 重量%、最も好ましくは 0 . 0 0 0 1 ~ 0 . 1 重量%である。

【 0 0 2 3 】

本発明の促進剤は、上記有効成分に加え、任意の担体を含むことができる。かかる担体としては、例えば、溶媒（例えば、水、アルコールなど）、緩衝剤（例えば、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス緩衝液、グルタミ

10

20

30

40

50

ン酸、イブシロンアミノカブロン酸など）、保存剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、グルコン酸クロルヘキシジン、クロロブタノール、ベンジルアルコール、デヒドロ酢酸ナトリウム、パラオキシ安息香酸エステル類、エデト酸ナトリウム、ホウ酸など）、等張化剤（例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、グリセリン、マンニトール、ソルビトール、ホウ酸、ブドウ糖、プロピレングリコールなど）などがあげられる。

【0024】

本発明の促進剤は、医薬または試験用試薬などとして、インビボまたはインビトロにおいて用いられ得る。

本発明の促進剤を試験用試薬として使用する場合、生理学・生物化学分野における試験用試薬として、様々な態様で利用可能である。

【0025】

医薬として用いる場合、本発明の促進剤は、マイボーム腺上皮細胞の増殖を促進するため、マイボーム腺上皮細胞の損傷または萎縮を伴う疾患、およびマイボーム腺上皮細胞の機能が低下することによって生じる疾患の治療剤として有用である。該疾患としてはマイボーム腺機能不全やマイボーム腺炎などがあげられる。さらに、マイボーム腺上皮細胞は、涙液中の脂質成分を分泌し、この脂質は涙液の蒸発を防ぎ、涙液層を安定化するものであるため、本発明の治療剤は涙液中の脂質異常（分泌量減少、成分変化）を伴う疾患に対して有用である。該疾患としては、涙液蒸発亢進型ドライアイがあげられる。

【0026】

また、本発明の促進剤は、角膜上皮細胞の増殖を促進するため、角膜上皮細胞の損傷（すなわち、創傷または欠損）を伴う疾患の治療剤としても有用である。本発明の促進剤は、角膜上皮障害、具体的には、シェーグレン症候群、スティーブンス・ジョンソン症候群、眼球乾燥症候群（ドライアイ）等の内因性疾患に伴う角膜上皮障害；術後、薬剤性、外傷、角膜潰瘍、マイボーム腺炎、コンタクトレンズ装用等における外因性疾患に伴う角膜上皮障害；春季カタルやアトピー性角結膜炎等の角膜病変を伴う眼アレルギー性疾患に伴う角膜上皮障害の治療剤として有用である。本発明の促進剤は、点状表層角膜症、角膜上皮糜爛の治療にも有用である。さらに、本発明の促進剤は、角膜創傷治癒促進剤としても有用である。

【0027】

さらに、本発明の促進剤は、角膜上皮細胞増殖促進作用とマイボーム腺上皮細胞増殖作用を併せ持つことにより、角膜組織に直接作用する効果とマイボーム腺細胞に働くことにより涙液の機能を改善するという効果を発揮するため、ドライアイの治療剤として有用であり、特に涙液蒸発亢進型ドライアイの治療剤として非常に有用である。

【0028】

本発明の治療剤において、有効成分の含有量は、通常0.000001～1重量%、好ましくは0.00001～1重量%、最も好ましくは0.0001～0.1重量%である。

【0029】

本発明の促進剤または治療剤の投与対象としては、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ヒツジ、サル等）があげられる。

【0030】

本発明の治療剤は、点眼剤、貼付剤、軟膏剤、ローション剤、クリーム剤、経口剤等の剤形で用いられ得、上記有効成分に加え、任意の担体、例えば医薬上許容され得る担体を含むことができる。

【0031】

本発明の治療剤は、上述の治療効果を奏する限りその投与経路は特に限定されないが、好ましくは眼局所投与される。眼局所投与用剤形には、例えば、点眼剤や眼軟膏剤があげられる。

例えば、本発明の治療剤を点眼剤または眼軟膏剤として用いる場合、安定剤（例えば、

10

20

30

40

50

亜硫酸水素ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、アスコルビン酸、ジブチルヒドロキシルエンなど)、溶解補助剤(例えば、グリセリン、プロピレングリコール、マクロゴール、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油など)、懸濁化剤(例えば、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムなど)、乳化剤(例えば、ポリビニルピロリドン、大豆レシチン、卵黄レシチン、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリソルベート80など)、緩衝剤(例えば、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス緩衝液、グルタミン酸、イプシロンアミノカプロン酸など)、粘稠剤(例えば、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースなどの水溶性セルロース誘導体、コンドロイチン硫酸ナトリウム、ヒアルロン酸ナトリウム、カルボキシビニルポリマー、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、マクロゴールなど)、保存剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、グルコン酸クロルヘキシジン、クロロブタノール、ベンジルアルコール、デヒドロ酢酸ナトリウム、パラオキシ安息香酸エステル類、エデト酸ナトリウム、ホウ酸など)、等張化剤(例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、グリセリン、マンニトール、ソルビトール、ホウ酸、ブドウ糖、プロピレングリコールなど)、pH調整剤(例えば、塩酸、水酸化ナトリウム、リン酸、酢酸など)、清涼化剤(例えば、l-メントール、d-カンフル、d-ボルネオール、ハッカ油など)、軟膏基剤(白色ワセリン、精製ラノリン、流動パラフィン、植物油(オリーブ油、椿油、落花生油など)など)などを添加剤として加えることができる。これら添加剤の添加量は、添加剤の種類、用途などによって異なるが、添加剤の目的を達成し得る濃度となるように添加すればよい。

10

20

本発明の治療剤を点眼剤または眼軟膏剤とする場合、製剤分野で通常用いられている方法に従って製造すればよく、例えば第14改正日本薬局方、製剤総則、点眼剤の項および眼軟膏剤の項に記載された方法に基づき製造することができる。

【0032】

点眼剤の形態は、水性点眼剤(水性点眼液、水性懸濁点眼液、粘性点眼液等)、非水性点眼剤(非水性点眼液、非水性懸濁点眼液等)またはエマルション点眼剤などが挙げられる。

【0033】

点眼剤のpHは、その点眼剤の形態によって適宜設定されるが、通常4~8の範囲である。また、点眼剤が水性点眼液の場合、有効成分の溶解性の観点から、pHは、6~8に設定されることが特に好ましい。

30

【0034】

点眼剤は通常、濾過滅菌、照射滅菌(例えば、電子線滅菌、紫外線滅菌、ガンマ線滅菌等)、オートクレーブ滅菌、乾熱滅菌などの方法により無菌化された製剤である。

【0035】

点眼剤として製剤化される場合、液剤は、眼への滴下を容易にするための液滴量を制御可能な小径の注液孔を備えた点眼容器に収容されていることが好ましい。該容器の材質は、合成樹脂、ガラス、セルロース、パルプなどが用いられ、有効成分および基剤の性質や使用量によって適宜選択される。スクイズ性及び耐久性の観点から、該容器は合成樹脂製が好ましい。合成樹脂の具体的な材質としては、ポリエチレン樹脂(例えば、低密度ポリエチレンまたは高密度ポリエチレン)、ポリプロピレン樹脂、エチレン-プロピレン共重合体樹脂、ポリエチレンテレフタレート樹脂等が挙げられる。

40

【0036】

点眼容器は、別々に成形された容器本体と中栓部材とが嵌合された容器や、容器の成形と同時に液剤が密封充填される一体成形充填容器(例えば、WO2004/006826)等が挙げられる。一体成形充填容器を採用した場合、容器と液剤とが一環生産されるため、コスト面または衛生面に優れている。点眼容器は、1回ずつ使い捨てにするユニットドーズ型の容器(例えば、特開平9-207959号)であってもよい。この容器を採用

50

した場合、角膜に対して安全性の高い、防腐剤を配合しない製剤の処方化が可能となる。また、これらの容器は紫外線遮断性フィルムで密着包装されていてもよい。また、容器は、紫外線遮断性を高めるため、着色（茶色、緑色、青色、黄色等）されていてもよい。

【0037】

本発明は、マイボーム腺上皮細胞の増殖促進を必要とする対象に、本発明の化合物の有効量を投与することを含む、マイボーム腺上皮細胞の増殖促進方法を提供する。当該方法は、マイボーム腺機能不全の治療のために行なわれることが望ましい。

【0038】

また、本発明は、角膜上皮細胞の増殖促進を必要とする対象に、本発明の化合物の有効量を投与することを含む、角膜上皮細胞の増殖促進方法を提供する。当該方法は、角膜上皮障害の治療のために行なわれることが望ましい。

10

【0039】

また、本発明は、ドライアイを患う患者に、本発明の化合物の有効量を投与することを含む、ドライアイの治療方法を提供する。

【0040】

本発明の化合物の有効量は、投与対象の年齢、体重、状態、治療目的等により一概に規定できないが、本発明の促進剤または治療剤をヒトに投与する場合には、通常0.000001～1重量%、好ましくは0.000001～1重量%、最も好ましくは0.00001～0.1重量%の本発明の化合物を含む溶液を、1日1回～8回、1回に片眼あたり1～2滴、すなわち、1回当たり約50～200μLの量が例示され、かかる濃度と容量の範囲内の溶液に含まれる化合物の量を有効量として例示することができる。

20

【実施例】

【0041】

以下、本発明を詳細に説明するため試験例を挙げるが、本発明はこれらによってなんら限定されるものではない。

【0042】

（試験例1）

正常ヒト角膜上皮細胞の細胞数増加に対する効果

1. 使用細胞

正常ヒト角膜上皮細胞（KURABO）を用いた。

30

【0043】

2. 被験物質溶液の調製方法

被験物質として、[3-[2-[4-イソプロピル-2-(4-トリフルオロメチル)フェニル-5-チアゾリル]エチル]-5-メチル-1,2-ベンズイソキサゾール-6-イル]オキシ酢酸（以下、化合物Aと称する）を用いた。化合物Aは、培養液中での最終濃度の200倍濃度になるようにエタノール（和光純薬）に溶解し、使用直前まで-80で保存した。

なお、化合物Aによる細胞数増加効果検討のための細胞培養液として、EpiLife（KURABO）にHCGS増殖添加剤セット（KURABO）に含まれるインスリン、ヒドロコチゾン、トランスフェリンを添加した培養液（基礎培地）を用いた。

40

【0044】

3. 試験方法

1) 細胞培養および化合物Aの添加

液体窒素中に凍結保存された正常ヒト角膜上皮細胞を解凍し、その細胞数を計数した後、その全量をHCGS増殖添加剤セット（インスリン、マウス由来上皮成長因子mEGF、ヒドロコチゾン、トランスフェリン、ウシ脳下垂体抽出物）の全てを添加した4 mLのEpiLife（完全培地）中に移してよく懸濁した。この細胞懸濁液をフィブロネクチンコート24ウェルプレート（Becton Dickinson）に、細胞数が 2×10^4 cells/500 μL/穴となるように播種した（底面面積が2 cm²であるため、 1×10^4 cells/cm²）。

細胞播種完了後、培養皿を37℃、5% CO₂、95% air、100% humidityに設定した培養器内

50

で24時間培養し、ついで培養液を400 μ Lの基礎培地（HCGS増殖添加剤のうち、インスリン、ハイドロコチゾン、トランスフェリンを添加したEpiLife）に交換した。

さらにその24時間後、培養液を下記の培養液、各400 μ Lに交換した。

〔 1 〕基礎培地のみ（無添加群）

〔 2 〕基礎培地 + mEGF（最終濃度：1ng/mL；陽性対照群）

〔 3 〕基礎培地 + 化合物 A（最終濃度：0.1nM、1nM、0.01 μ M、0.1 μ M；化合物 A 添加群）

なお、全ての培養液中のエタノール濃度を0.5%に統一させるため、培養液〔 1 〕および〔 2 〕に対しては1mLあたり5 μ Lのエタノールを添加した。

2) 細胞数測定

10

化合物 A による刺激開始から24時間後、各穴の培養上清を除去し、ついで各穴に10%のCell Counting Kit-8（DOJINDO）を添加した基礎培地を200 μ Lずつ分注した。分注後、培養皿を37℃、5% CO₂、95% air、100% humidityに設定した培養器内に移して2時間加温した。100 μ Lの上清を96穴組織培養用培養皿（Corning）に移した後、各穴の450 nmの吸光度をマイクロプレートリーダー（大日本住友製薬）を用いて測定し、これを細胞数増加の指標とした。

【 0 0 4 5 】

4. 統計学的解析

無添加群の吸光度の平均値を100%としたときの、陽性対照群、化合物 A 添加群の値を算出し、無添加群と化合物 A 添加群および陽性対照群との比較をDunnettの多重比較検定法（片側）を用いて行なった。検定の結果、危険率5%未満の場合を有意と判定した。

20

【 0 0 4 6 】

5. 試験結果

各群の細胞数増加効果を表 1 に示した。測定した吸光度から無添加群の細胞数を100%とした場合、陽性対照群および化合物 A 添加群の細胞数は無添加群のそれよりも有意に高く、これらの群では細胞数が増加していることが示唆された（ $p < 0.01$ ）。この試験結果より、化合物 A は正常ヒト角膜上皮細胞の細胞数を増加させることが明らかとなった。

【 0 0 4 7 】

【表 1】

30

群	細胞数増加率 (%)	有意差 (対 無添加群)
無添加群	100.0 $\pm$ 7.7	
mEGF	147.5 $\pm$ 47.2	**
10 ⁻¹⁰ M 化合物 A	177.4 $\pm$ 20.8	**
10 ⁻⁹ M 化合物 A	169.0 $\pm$ 8.2	**
10 ⁻⁸ M 化合物 A	187.4 $\pm$ 10.2	**
10 ⁻⁷ M 化合物 A	172.6 $\pm$ 16.0	**

40

【 0 0 4 8 】

培養正常ヒト角膜上皮細胞に化合物 A を添加した際の細胞数の変化を、無添加群の平均値を100%とした際の値として示している(平均値 $\pm$ 標準偏差、N=3-4)。表中の**は無添加群に対する有意差（ $p < 0.01$ ）を示す。

【 0 0 4 9 】

（試験例 2）

50

角膜上皮創傷治癒促進作用の検討

1. 使用動物

雄性日本白色種家兔（北山ラベス）を用いた。実験動物の使用にあたっては、動物を用いる生物医学研究に関する原則（International Guiding Principles for Biomedical Research involving Animals）に従った。

【 0 0 5 0 】

2. 被験物質点眼液の調製方法

被験物質として化合物 A を用いた。化合物 A は、0.0005% になるように下記の基剤に溶解したもの、または 0.005% になるように下記の基剤に懸濁したものを点眼液として使用した。

リン酸二水素ナトリウム二水和物	0.05 g
塩化ナトリウム	0.45 g
超純水	適量
ポリソルベート 80	0.05 mL
水酸化ナトリウム	適量
全量	50 mL (pH 7.0)

なお、化合物 A 投与群の対照として、薬剤を含まない上記の基剤点眼群を設定した。

【 0 0 5 1 】

3. 実験方法

1) 角膜上皮搔爬

セラクタル（2% xylazine；バイエル）：ケタラル（5% ketamine；第一三共）＝1：1 混合液の筋肉内注射（1mL/kg）により動物に全身麻酔を施した後、塩酸オキシブプロカイン点眼液（ペノキシール点眼液 0.4%；参天製薬）を点眼し、眼球を脱臼させた。直径 10mm のトレパンを用いて角膜中央部の角膜上皮上に直径 10mm の刻印を施し、実体顕微鏡下、ハンディルーターを用いて刻印した円周内の角膜上皮全層を搔爬した。搔爬後、生理食塩液（大塚製薬工場）を用いて角膜表面を洗浄し、眼球を眼窩内に復位させて角膜上皮搔爬処置を完了した。

2) 投与

角膜上皮搔爬当日は 1 日 2 回、翌日以降、試験終了までは 1 日 4 回、処置眼に対し、化合物 A 点眼液または点眼液基剤をそれぞれ 1 回 50 μ L ずつ、マイクロピペットを用いて点眼した。

3) 評価

全個体の角膜上皮搔爬が完了した時点を試験開始時間（0 時間目）とし、その 40、48、56、64 時間後の角膜上皮欠損面積を定量することにより、角膜上皮の修復を評価した。すなわち、各時点で処置眼に 0.1% フルオレセインナトリウム（和光純薬）溶液を 10 μ L 点眼し、ただちにブルーフィルターを取り付けたスリットランプを用いて動物の前眼部写真を撮影することにより、フルオレセイン染色された角膜上皮欠損領域を記録した。現像された写真をコンピュータにデジタル画像として保存し、画像解析ソフト（Image-Pro Plus）を用いてフルオレセイン染色された角膜上皮欠損部の面積を測定した。

【 0 0 5 2 】

4. 統計学的解析

各時点で測定された角膜上皮欠損面積について、各個体ごとにその初期値を 100% とした際の値を算出し、これを残存する角膜上皮欠損の割合とした。各時点での残存角膜上皮欠損の割合について、基剤点眼群と化合物 A 点眼群との比較を t 検定を用いて行なった。検定の結果、危険率 5% 未満を有意であると判定した。

【 0 0 5 3 】

5. 試験結果

基剤点眼群および 0.0005%、0.005% 化合物 A 点眼群の測定各時点での残存する角膜上皮欠損の割合を表 2 に示す。角膜上皮搔爬の 40 時間後に、角膜上皮欠損の割合が 0.005% 化合物 A 点眼群で有意に小さくなっていることが示された。また、48 時間後では、0.0005%

10

20

30

40

50

および0.005% 化合物A点眼群で有意に小さくなっていることが示された。この試験結果から、化合物Aを点眼することにより、欠損した角膜上皮の修復が促進されることが明らかとなった。

【 0 0 5 4 】

【表 2】

群	基剤点眼群 (%)	0.0005% 化合物A 点眼群 (%)	0.005%化合物A 点眼群 (%)
0 時間目 (初期値)	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
40 時間後	28.1 ± 5.3	24.8 ± 2.7	18.6 ± 8.0 *
48 時間後	18.1 ± 6.1	11.8 ± 2.9 *	9.1 ± 6.4 *
56 時間後	11.1 ± 8.1	3.8 ± 2.8	3.4 ± 3.7
64 時間後	5.1 ± 6.9	0.8 ± 1.4	0.9 ± 1.3

10

【 0 0 5 5 】

20

ウサギ眼に対して角膜上皮搔爬処置を施した後、残存する角膜上皮欠損の割合(%)を、各個体ごとにその初期値を100%として算出した値を示している(平均値 ± 標準偏差、N=6)。表中の*は基剤点眼群に対する有意差(p<0.05)を示す。

【 0 0 5 6 】

(試験例 3)

マイボーム腺上皮細胞の細胞数増加に対する効果

1. サルマイボーム腺上皮細胞の調製

D-PBS中に保存された摘出サル眼瞼をクリーンベンチ内に移し、以下のとおり、無菌的に細胞調製操作を行なった。

摘出眼瞼を80%のエタノール中に30秒間浸漬した後、1%のpenicillin-streptomycin (Invitrogen) を添加したD-PBS中で3回洗浄し、minimum essential medium (MEM; Invitrogen) 中に移した。実体顕微鏡下で眼瞼のマイボーム腺組織を取り囲む脂肪組織および筋組織を除去し、これを、0.3U/mL collagenase A (Roche Diagnostics) および2.4U/mL dispase II (Roche Diagnostics) を含むMEM中に移して37℃で4時間、ついで4℃で終夜、振盪した。酵素処理した組織を実体顕微鏡下におき、睫毛および眼瞼結合組織を除去してマイボーム腺組織を単離した。単離した腺組織に4mLのtrypsin-EDTA (Invitrogen) を添加して37℃で10分間加温した。加温後、これに10%のFBS (Invitrogen) を含むMEMを5mL加えて酵素反応を停止させ、ついで、21Gの注射針を付けた注射筒で5回、吸引排出を繰り返して組織構成細胞を分散させた。細胞分散液を、100μm、ついで、40μmのナイロンフィルター (Cell Strainer; Falcon) に供し、これに含まれる酵素処理できなかった細胞塊などを除去した。フィルターを通過させた細胞懸濁液は50mLの遠沈管に回収し、室温、1,500回転、5分間の遠心分離に供した。遠心分離により得た目的細胞を含む細胞層に、0.5%のbovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich) を含むD-PBSを80μL添加して細胞を十分に懸濁させた後、これに、20μLのAnti-Fibroblast Microbeads (Miltenyi Biotec) を加えて室温で30分間静置した。抗体との反応終了後、これに0.5%のBSAを含むD-PBSを2mL添加して、再度、室温、1,500回転、5分間の遠心分離に供した。遠心分離により得た目的細胞を含む細胞層に、0.5%のBSAを含むD-PBSを1mL添加して細胞を十分に懸濁させ、あらかじめ、カラム洗浄液 (2mMのEDTA (同仁化学) および0.5%のBSAを含むD-PBS) を用いて平衡化しておいたLD column (Miltenyi Biotec) にこれを滴下した。ついで、2mLのカラム洗浄液をLD columnに滴下した。細胞懸濁液滴下直後からカラム洗浄液滴下終了までの間

30

40

50

、カラムに吸着しなかった抗体非標識の目的細胞（非線維芽細胞）を50mL遠沈管に回収した。遠沈管に回収した細胞を、室温、1,500回転、5分間の遠心分離に供して上清を除去した。この沈渣を、5mLのDefined Keratinocyte Serum Free Mediumに懸濁させ、室温、1,500回転、5分間の遠心分離に供して上清を除去した。再度、沈渣を3mLのDK-SFMに懸濁させ、室温、1,500回転、5分間の遠心分離に供して上清を除去した後、これを2 mLのDK-SFMに懸濁させて、コラーゲン処理を施した6ウェル細胞培養用マルチウェルプレートに播種した。播種した細胞は、Defined keratinocyte-Serum Free Medium（DK-SFM；Invitrogen、添付されたSupplementを調製プロトコルどおりに添加）を用いて、37℃、5% CO₂、95% air、100% humidityに設定した培養器（SANYO）内で培養し、培養液は細胞がサブコンフルエントに達するまで48時間ごとに新しいものに交換した。

10

【0057】

2. 被験物質溶液の調製方法

被験物質として化合物A、[4-[3-[2-(4-トリフルオロメチル)フェニル-4-イソプロピル-5-チアゾリル]プロピオニル]-2-メチルフェノキシ]酢酸（以下、化合物Bと称する）または[4-[3-[2-(2-ヒドロキシ-4-クロロフェニル)-5-イソプロピル-4-オキサゾリル]プロピオニル]-2-メチルフェノキシ]酢酸（以下、化合物Cと称する）を用いた。被験物質は、培養液中での最終濃度の200倍濃度になるようにエタノール（ナカライテスク）に溶解し、使用直前まで-80℃で保存した。

なお、被験物質による細胞増殖促進効果の検討には、DK-SFMからこれに添付されたsupplementを除いた培養液を基礎培地（basal DK-SFM）として用いた。また、細胞増殖促進効果確認のための陽性対照として、基礎培地に添付のsupplementを添加した培養液（complete DK-SFM）を用いた。

20

【0058】

3. 試験方法

1) 培養皿のコラーゲン処理

培養皿使用の前日に、培養皿の各穴に0.01%のI型コラーゲン（新田ゼラチン）を50μLずつ分注して試験直前まで4℃でコーティングを行なった。試験当日、I型コラーゲン溶液を除去した後、D-PBSを用いて3度、培養皿底面を洗浄し、これをコラーゲン処理培養皿として試験に用いた。

30

2) 細胞培養および被験物質の添加

試験には、直径3.5cmの培養皿でサブコンフルエントになるまで培養し、液体窒素中で凍結保存しておいたサルマイボーム腺上皮細胞を用いた。セルバンカー（日本全薬工業）に懸濁して凍結保存しておいた細胞を解凍した後、50mL遠沈管に移して10倍量のcomplete DK-SFMを添加した。室温、1,500回転、5分間の遠心分離に供して細胞層を回収した後、得られた細胞濃度が 3×10^6 細胞/mLとなるように適量のcomplete DK-SFMを添加して細胞を懸濁させた。この細胞懸濁液を、コラーゲン処理した96穴組織培養用培養皿の底面面積（0.32 cm²）あたりの細胞数が 6×10^4 細胞/cm²となるよう、各穴に64μLずつ分注した。細胞播種完了後、培養皿を37℃、5% CO₂、95% air、100% humidityに設定した培養器内に移し、24時間培養した。培養液を100μLのbasal DK-SFMに交換してさらに24時間の培養を行い、次いで培養皿の各穴の培養液を各100μLの下記培養液に交換して、その培養皿を培養器内に戻し、細胞刺激を開始した。

40

〔1〕基礎培地のみ（basal DK-SFM、無添加群）

〔2〕基礎培地 + supplement（complete DK-SFM、陽性対照群）

〔3〕基礎培地 + 化合物A（最終濃度：0.01μM、0.1μMおよび1μM；化合物A添加群）

〔4〕基礎培地 + 化合物B（最終濃度：0.01μM、0.1μMおよび1μM；化合物B添加群）

〔5〕基礎培地 + 化合物C（最終濃度：0.01μM、0.1μMおよび1μM；化合物C添加群）

なお、全ての培養液中のエタノール濃度を0.5%に統一させるため、培養液〔1〕および〔2〕に対してはそれぞれ1 mLあたり5μLのエタノールを添加した。

3) 細胞数測定

50

初回の細胞刺激の48時間後、培養液を新たに調製した上記〔1〕～〔5〕の培養液に交換した。その48時間後、もう一度培養液を新たに調製した上記〔1〕～〔5〕の培養液に交換した。さらにその48時間後、各穴の培養上清を除去し、ついで各穴に10%のCell Counting Kit-8 (DOJINDO) を添加した基礎培地を100 μ Lずつ分注した。分注後、培養皿を37、5% CO₂、95% air、100% humidityに設定した培養器内に移して2時間加温した。2時間の加温後、マイクロプレートリーダー（大日本住友製薬）を用いて450nmの吸光度を測定し、これを細胞数増加の指標とした。

【0059】

4. 統計学的解析

無添加群の吸光度の平均値を100%としたときの、陽性対照群、各被験物質添加群の各群の値を算出し、無添加群と各被験物質添加群および陽性対照群との比較をDunnettの多重比較検定法（片側）を用いて行なった。検定の結果、危険率5%未満の場合を有意と判定した。

【0060】

5. 試験結果

各群の細胞数増加促進効果を表3に示した。測定した吸光度から無添加群の細胞数を100%とした場合、各被験物質添加群での細胞増殖は、無添加群よりも有意に高く、細胞が増加していることが示唆された。細胞数増加促進効果を確認するための陽性対照群では、有意ではないが、細胞数を増加させる傾向が認められた。この試験結果より、各被験物質はサルマイボーム腺上皮細胞の細胞数を増加させることが明らかとなった。

【0061】

【表3】

群	細胞数増加率 (%)	有意差 (対 無添加群)
無添加群	100.0 $\pm$ 7.1	
supplement	114.2 $\pm$ 6.7	
10 ⁻⁸ M 化合物A	175.3 $\pm$ 9.0	**
10 ⁻⁷ M 化合物A	177.1 $\pm$ 9.7	**
10 ⁻⁶ M 化合物A	189.8 $\pm$ 13.1	**
10 ⁻⁸ M 化合物B	155.0 $\pm$ 28.0	**
10 ⁻⁷ M 化合物B	174.4 $\pm$ 8.9	**
10 ⁻⁶ M 化合物B	158.8 $\pm$ 15.2	**
10 ⁻⁸ M 化合物C	155.0 $\pm$ 11.6	**
10 ⁻⁷ M 化合物C	175.2 $\pm$ 7.8	**
10 ⁻⁶ M 化合物C	179.4 $\pm$ 7.5	**

【0062】

培養サルマイボーム腺上皮細胞に各被験物質またはsupplement（陽性対照）を添加した際の細胞数の変化を、無添加群の平均値を100%とした際の値として示している（平均値 $\pm$ 標準偏差、N=5または10）。表中の**は無添加群に対する有意差（p<0.01）を示す。

【0063】

（試験例4）

正常ヒト角膜上皮細胞の細胞数増加に対する効果

1. 使用細胞

正常ヒト角膜上皮細胞（KURABO）を用いた。

2. 被験物質および調製方法

被験物質として、化合物 B または化合物 C を用いた。化合物 B および化合物 C は、それぞれ培養液中での最終濃度の200倍濃度になるようにエタノール（和光純薬）に溶解し、使用直前まで-80 で保存した。

なお、化合物 B および化合物 C による細胞数増加効果検討のための細胞培養液として、EpiLife（KURABO）にHCGS増殖添加剤セット（KURABO）に含まれるインスリン、ハイドロコチゾン、トランスフェリンを添加した培養液（基礎培地）を用いた。

【0064】

3. 試験方法

1) 細胞培養および被験物質の添加

液体窒素中に凍結保存された正常ヒト角膜上皮細胞を解凍し、その細胞数を計数した後、その全量をHCGS増殖添加剤セット（インスリン、マウス由来上皮成長因子mEGF、ハイドロコチゾン、トランスフェリン、ウシ脳下垂体抽出物）の全てを添加した4mLのEpiLife（完全培地）中に移してよく懸濁した。この細胞懸濁液をフィブロネクチンコート24ウェルプレート（Becton Dickinson）に、細胞数が 2×10^4 cells/500 μ L/穴となるように播種した（底面面積が 2cm^2 であるため、 1×10^4 cells/ cm^2 ）。細胞播種完了後、培養皿を37、5% CO₂、95% air、100% humidityに設定した培養器内で24時間培養し、ついで培養液を400 μ Lの基礎培地（HCGS増殖添加剤のうち、インスリン、ハイドロコチゾン、トランスフェリンを添加したEpiLife）に交換した。さらにその24時間後、培養液を下記の培養液、各400 μ Lに交換した。

〔1〕基礎培地のみ（無添加群）

〔2〕基礎培地 + mEGF（最終濃度：1ng/mL；陽性対照群）

〔3〕基礎培地 + 化合物 B（最終濃度：0.01 μ M、0.1 μ M、1 μ M；化合物 B 添加群）

〔4〕基礎培地 + 化合物 C（最終濃度：0.01 μ M、0.1 μ M、1 μ M；化合物 C 添加群）

なお、全ての培養液中のエタノール濃度を0.5%に統一させるため、培養液〔1〕および〔2〕に対しては1mLあたり5 μ Lのエタノールを添加した。

2) 細胞数測定

化合物 B または化合物 C による刺激開始から24時間後、各穴の培養上清を除去し、ついで各穴に10%のCell Counting Kit-8（DOJINDO）を添加した基礎培地を200 μ Lずつ分注した。分注後、培養皿を37、5% CO₂、95% air、100% humidityに設定した培養器内に移して2時間加温した。100 μ Lの上清を96穴組織培養用培養皿（Corning）に移した後、各穴の450nmの吸光度をマイクロプレートリーダー（大日本住友製薬）を用いて測定して、これを細胞数増加の指標とした。

【0065】

4. 統計学的解析

無添加群の吸光度の平均値を100%としたときの、陽性対照群、化合物 B または化合物 C 添加群の値を算出し、無添加群と化合物 B または化合物 C 添加群および陽性対照群との比較をDunnettの多重比較検定法（片側）を用いて行なった。検定の結果、危険率5%未満の場合を有意と判定した。

【0066】

5. 試験結果

各群の細胞数増加効果を表4に示した。測定した吸光度から無添加群の細胞数増加を100%とした場合、陽性対照群、化合物 B 添加群および化合物 C 添加群の細胞数は、無添加群のそれよりも有意に高く、これらの群では細胞数が増加していることが示唆された（ $p < 0.01$ ）。この試験結果より、化合物 B および化合物 C の両者は正常ヒト角膜上皮細胞の細胞数を増加させることが明らかとなった。

【0067】

【表 4】

群	細胞数増加率 (%)	有意差 (対 無添加群)
無添加群	100.0 ± 32.2	
mEGF	232.8 ± 22.5	**
10 ⁻⁸ M 化合物B	252.4 ± 34.7	**
10 ⁻⁷ M 化合物B	256.4 ± 11.0	**
10 ⁻⁶ M 化合物B	254.3 ± 11.7	**
10 ⁻⁸ M 化合物C	243.3 ± 6.6	**
10 ⁻⁷ M 化合物C	247.5 ± 14.1	**
10 ⁻⁶ M 化合物C	260.2 ± 2.5	**

【 0 0 6 8 】

培養正常ヒト角膜上皮細胞に化合物 B または化合物 C を添加した際の細胞数の変化を、無添加群の平均値を100%とした際の値として示している(平均値 ± 標準偏差, N=4)。表中の**は無添加群に対する有意差 (p<0.01) を示す。

【 0 0 6 9 】

(試験例 5)

角膜上皮細胞およびマイボーム腺上皮細胞でのPPARsの発現

1. 使用細胞

サルマイボーム腺上皮細胞は(試験例3)と同様の方法で調製、培養したものを用いた。ヒト角膜上皮細胞(クラブウ)は正常ヒト角膜上皮細胞増殖用無血清基礎培地(EpiLife; クラブウ)を用いて37℃、5% CO₂、95% air、100% humidityに設定した培養器内で培養したものをを用いた。ウサギ角膜上皮細胞は、以下の方法で調製、培養したものをを用いた。

安楽死させたウサギから摘出した眼球から角膜を切り出してDulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS; Invitrogen) 中に保存し、これをクリーンベンチ内に移した。以下の細胞調製操作は全て無菌的に行なった。

摘出角膜片を1%のpenicillin-streptomycin (Invitrogen) を添加したD-PBS中で3回洗浄し、minimum essential medium (MEM; Invitrogen) 中に移した。MEM中に浸漬した角膜片の角膜内皮細胞およびデスメ膜を眼科手術用ナイフ (Alcon) で剥離し、剥離後の角膜片(角膜実質および角膜上皮)を2.4U/mLとなるようにdispase II (Roche Diagnostics) を添加したMEMに移した。これを37℃で1時間加温し、その後、dispase II処理した角膜片をMEM中に移した。MEM中に浸漬した角膜片の角膜上皮を眼科手術用ナイフで剥離し、角膜片残渣(角膜実質)をMEMから取り除いた。剥離した角膜上皮細胞を含むMEMを50mLの遠沈管に回収し、室温、1,500回転、5分間の遠心分離に供して上清を廃棄することにより、角膜上皮細胞層を得た。角膜上皮細胞層に1mLのtrypsin-EDTA (Invitrogen) を添加してよく混合した後、37℃で5分間加温して細胞間の接着を乖離させた。これに10%のfetal bovine serum (FBS; Invitrogen) を含むMEMを9mL添加して酵素反応を停止させ、再度、室温、1,500回転、5分間の遠心分離に供して角膜上皮細胞層を得た。得られた角膜上皮細胞層に1mLの正常ウサギ角膜上皮細胞増殖用無血清液体培地(RCGM2; クラブウ)を添加して細胞を懸濁させ、9mLのRCGM2を添加した直径10cmの細胞培養用培養皿(IWAKI)に播種した。播種細胞は37℃、5% CO₂、95% air、100% humidityに設定した培養器(SANYO)内で培養した。培養液は試験当日まで48時間ごとに新しいものに交換した。

【 0 0 7 0 】

2. 試験方法

10

20

30

40

50

1)細胞からの全RNAの抽出

TRIzol Reagent (Invitrogen) の常法に従って各細胞からの全RNAを抽出した。

2)抽出全RNAからのcDNA作製

DNA-free (Ambion) の常法に従って抽出した全RNAのDNase処理を37℃で30分間行ない、ゲノムDNAを除去した。

抽出全RNAからのcDNA作製はSuperscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) の常法に従って行なった。すなわち、DNase処理した1μgの全RNAから、ランダムプライマー (Invitrogen) を用いてこれらに相補するcDNAを作製した。

3)PPARs遺伝子の増幅 (Polymerase Chain Reaction; PCR)

PPARs遺伝子のPCRはPlatinum PCR SuperMix (Invitrogen) の常法に従って行なった。PPARsプライマーは、既知のヒト、チンパンジー、カニクイザル、ウシ、マウスなどの配列を参考に、PCR産物が約200bpsとなるように設計した。

PPAR α : GTAGAATCTGCGGGGACAAG (sense) (配列番号 1)

: GTTGTGTGACATCCCCGACAG (antisense) (配列番号 2)

PPAR δ : TTCCTTCCAGCAGCTACACA (sense) (配列番号 3)

: GATCGTACGACGGAAGAAGC (antisense) (配列番号 4)

PPAR γ : CTCCGTGGATCTCTCCGTAA (sense) (配列番号 5)

: GATGCAGGCTCCACTTTGAT (antisense) (配列番号 6)

PCR反応は、94℃で2分15秒間反応させた後、94℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で30秒間の3段階の反応を35回繰り返すことで完了させた。PCRの反応後の試料を2%のアガロースゲルを用いた電気泳動に供し、ついでゲル内に分離されたDNAをSYBR Gold (Molecular Probes) を用いて染色した。染色されたDNAをUVトランスイルミネーター上で発光させ、この画像をデジタルデータとして保存した。

【0071】

3. 試験結果

電気泳動後の染色されたDNAのバンドを図1に示す。本試験の結果、ヒト角膜上皮細胞およびサルマイボーム腺上皮細胞にはPPAR α、PPAR δ およびPPAR γ の全てが発現していることが確認された。なお、ウサギ角膜上皮細胞ではPPAR δ の発現のみが確認された。Bonazziらはウサギ角膜上皮細胞にはPPARsのうちPPAR α およびPPAR β (= δ) が発現すると報告しているが (Bonazzi A. et al., J. Biol. Chem. (2000); 275 (4): 2837-2844)、その報告の中で、彼らは特殊な方法を用いてPPAR α を検出していることから、ウサギ角膜上皮細胞でのPPAR α 発現量は非常に少ないと推測される。

【産業上の利用可能性】

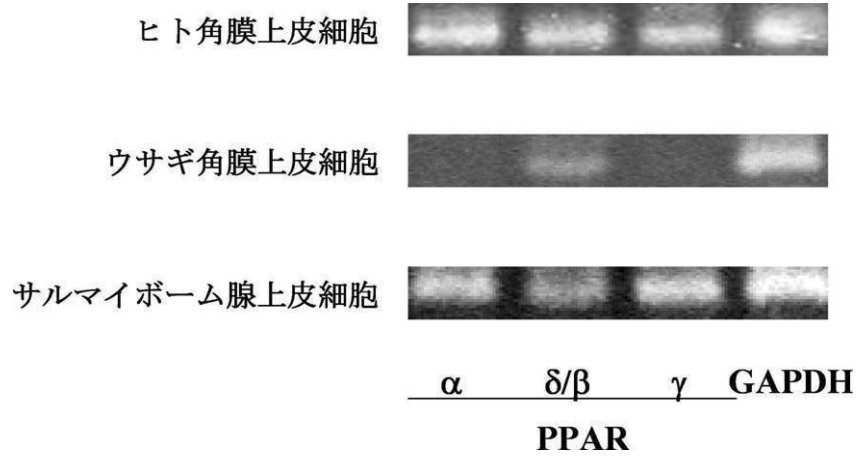
【0072】

本発明によれば、新規のマイボーム腺上皮細胞増殖促進剤または角膜上皮細胞増殖促進剤が提供され、該促進剤は、マイボーム腺上皮細胞および角膜上皮細胞の増殖を促進する。また、本発明の治療剤は、マイボーム腺機能不全、角膜上皮障害、ドライアイなどの疾患の治療・改善に有効に用いることができる。

【0073】

本出願は、日本で出願された特願2007-134183 (出願日: 2007年5月21日) を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

【図 1】



【配列表】

0005247686000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 27/04 (2006.01) A 6 1 P 27/04
A 6 1 P 27/14 (2006.01) A 6 1 P 27/14
A 6 1 P 43/00 1 0 7

(74)代理人 100122688
弁理士 山本 健二

(74)代理人 100117743
弁理士 村田 美由紀

(72)発明者 中村 義邦
兵庫県神戸市西区室谷 1 丁目 5 番 4 号 千寿製薬株式会社 コーベクリエイティブセンター内

(72)発明者 花野 郁子
兵庫県神戸市西区室谷 1 丁目 5 番 4 号 千寿製薬株式会社 コーベクリエイティブセンター内

(72)発明者 井上 淳
兵庫県神戸市西区室谷 1 丁目 5 番 4 号 千寿製薬株式会社 コーベクリエイティブセンター内

審査官 福井 悟

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 5 / 0 3 9 5 7 4 (W O , A 1)
特開 2 0 0 5 - 8 5 7 0 (J P , A)
国際公開第 2 0 0 2 / 0 7 6 1 7 7 (W O , A 2)
国際公開第 2 0 0 3 / 0 1 6 2 9 1 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 0 3 / 0 3 3 4 9 3 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 0 7 / 0 6 1 0 9 4 (W O , A 1)
BEAUREGARD, C., et al., Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Agonists Inhibit In
terleukin-1 β -Mediated Nitric Oxide Pr, Journal of ocular pharmacology and therapeutic
s, 2 0 0 3 年, 19(6), p. 579-587

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 K 3 1 / 3 3 - 3 3 / 4 4
C A / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I)