(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2003 年2 月20 日 (20.02.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/014727 A1

(51) 国際特許分類[7]: G01N 33/15, 33/50

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/08069

(22) 国際出願日: 2002 年8 月7 日 (07.08.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-240852 2001 年8 月8 日 (08.08.2001) JP
特願2001-353047 2001 年11 月19 日 (19.11.2001) JP
特願2002-92363 2002 年3 月28 日 (28.03.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都 北区 浮間５丁目５番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 岡田 泰伸 (OKADA,Yasunobu) [JP/JP]; 〒444-0877 愛知県 岡崎市 竜美旭町１２−１３ Aichi (JP). 田辺 秀 (TANABE,Shigeru) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県 御殿場市 駒門１丁目１３５番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 社本 一夫, 外 (SHAMOTO,Ichio et al.); 〒100-0004 東京都 千代田区 大手町二丁目２番１号 新大手町ビル２０６区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: REMEDIES FOR HEART DISEASES

(54) 発明の名称: 心疾患治療剤

(57) Abstract: It is intended to provide a method of searching for a substance capable of selectively inhibiting apoptosis in heart/vascular cells. The above object can be achieved by providing a method of screening a remedy for heart diseases and/or a preventive for heart diseases characterized by comprising: the step of inducing apoptosis of cultured heart muscular cells and/or cultured vascular endothelial cells; the step of treating the cells with a Cl^- channel inhibitor which is a test substance; and the step of evaluating the therapeutic and/or preventive effects of the test substance on heart diseases based on its effect of inhibiting the apoptotic cell death of the muscular cells and/or vascular endothelial cells.

(57) 要約:

本発明は、心臓・血管系細胞のアポトーシスを選択的に抑制することができる物質を探索する方法を提供することを課題とする。

培養心筋細胞および／または培養血管内皮細胞にアポトーシスを誘導する工程；被検物質である Cl^-チャネル阻害剤で処理する工程；および筋細胞および／または血管内皮細胞のアポトーシス性細胞死の抑制効果により被検物質の心疾患に対する治療効果および／または予防効果を判定する工程；を含有することを特徴とする、心疾患治療剤および／または心疾患予防剤のスクリーニング方法を提供することにより上記課題を解決する。

WO 03/014727 A1

(84) 指定国 *(*広域*)*: ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

心疾患治療剤

技術分野

本発明は、心疾患治療剤若しくは心疾患予防剤に関する。より具体的には、容積感受性 Cl^-チャネル阻害剤を含有する心疾患治療剤もしくは心疾患予防剤に関する。

本発明はまた、これらの心疾患治療剤若しくは心疾患予防剤のスクリーニング方法に関する。より具体的には、本発明は、既知の方法により誘導されるアポトーシスを被検物質である Cl^-チャネル阻害剤により阻害することができるかどうかを検出することによる、心疾患治療剤若しくは心疾患予防剤のスクリーニング方法に関する。

背景技術

心疾患の多くは、主として冠動脈の器質的または機能的損傷が原因となり、冠動脈からの供給と心筋の需要との間に不均衡が生じ、この結果急性あるいは慢性の虚血性心筋障害が生じることにより引き起こされる。そして心筋細胞に虚血状態が生じると、その結果心筋細胞にアポトーシスが生じると考えられている。一旦アポトーシスの引き金が引かれてしまうと、心筋細胞がアポトーシスを回避することができず、その細胞が細胞死を起こすため、狭心症、心筋梗塞あるいは心不全などの重篤な心疾患症状を引き起こすこととなる。

生理学的細胞死として知られるアポトーシスの過程において、進行性の細胞収縮と、これに引き続いて細胞の断片化（アポトーシス小体の形成）が引き起こされることが知られている。このアポトーシスによる細胞死の時間経過のうち、アポトーシス小体が形成される以前のごく早い段階で、等張性の細胞収縮であるアポトーシス性細胞容積減少（Apoptotic Volume Decrease；AVD）と呼ばれる細胞収縮が生じる（Maeno, E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 97, 9487-9492, 2000）。

等張性条件下でのこのアポトーシス性細胞容積減少（AVD）の誘導は、細胞外低

浸透圧負荷によって細胞膨張を物理化学的に強制された後に生じる調節性容積減少（Regulatory Volume Decrease；RVD）の促進と関連している。そしてアポトーシス性細胞容積減少（AVD）の誘導および調節性容積減少（RVD）の促進は、ともに、ミトコンドリアからのチトクロームｃ放出、カスパーゼ（例えばカスパーゼ-3）の活性化、DNA のラダー形成、そして超微細構造変化よりも前の、アポトーシスの極めて初期の段階において生じることが知られている。

これまでに、上皮系細胞株（例えばヒト由来上皮 HeLa 細胞）、リンパ系細胞株（例えばヒト由来リンパ系 U937 細胞）、あるいは神経系細胞株（例えばラットクロム親和性細胞腫 PC12 細胞、マウス神経芽細胞腫とラット神経膠腫のハイブリッド NG108-15 細胞）などの細胞において、アポトーシス性細胞容積減少（AVD）や調節性容積減少（RVD）について詳細に調べられている。その結果、前述した調節性容積減少（RVD）は、主として Ca^{2+}依存性 K^+チャネルと容積感受性 Cl^-チャネル（VSOR-ClC）の並列的活性化による KCl 流出によって生じることがわかった。そして、容積調節性の Cl^-チャネルまたは K^+チャネルを阻害することによりアポトーシス性細胞容積減少（AVD）の誘導および調節性容積減少（RVD）の促進が妨げられると、これらの細胞はアポトーシスに伴う生化学的変化や形態学的変化を引き起こさず、そしてアポトーシスによる細胞死そのものも阻止することができることがわかっている。

多くの細胞において、K^+チャネルは、細胞の静止状態においても常に活性化されているのに対して、Cl^-チャネルは、骨格筋や赤血球などの一部の例外を除き、必要時以外には活性化されていないことが知られている。そのため、アポトーシス性細胞容積減少（AVD）の誘導および調節性容積減少（RVD）の促進に対してより重要な働きをしているのは容積感受性 Cl^-チャネルであると考えられているが、その実体は未だ解明されていない。

これまで、細胞の由来する組織が異なると、その発現する容積感受性 Cl^-チャネルの種類も異なることが、多くの研究により示されている。例えば、心筋細胞においては、ClC-3 が容積感受性 Cl^-チャネルの実体であることが示唆されている（Duan et al. Nature 1997;390:417-421；Britton et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000;279:H2225-2233；および Duan et al. J Physiol 2001;531:437-444）。

具体的には、gpClC-3 クローンがモルモット心臓からクローニングされ、ノザンブロット法により心房・心室において発現され、これをトランスフェクトした培養細胞（NIH/3T3 細胞）を用いて心筋で見られる VSOR-ClC 電流と同様の性質を持つ電流活性を検出したことを示す研究（Duan et al. Nature 1997;390:417-421）；ClC-3 特異的抗体を用いて、免疫組織化学的に、ClC-3 が心筋細胞膜（sarcolemmal membarane）と細胞質領域のどちらにも存在することを提示した研究（Britton et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000;279:H2225-2233）；抗-ClC-3 抗体（Alomone 社製）の細胞内への注入により gpClC-3 をトランスフェクトした NIH/3T3 細胞で VSOR-ClC 様電流が抑制されることを示し、さらに同抗体を注入することによりモルモット心筋で本来見られる VSOR-ClC 電流も同様に抑制されることを提示して、内在性の ClC-3 が心筋で本来見られる VSOR-ClC の実体であると主張する研究（Duan et al. J Physiol 2001;531:437-444）が知られている。

これに対してその他の組織に由来する細胞を用いた実験からは、ClC-3 が容積感受性 Cl^- チャネルの実体ではないことが示唆されている（Stobrawa et al. Neuron 2001;29:185-196；Weylandt et al. J Biol Chem 2001;276:17461-17467）。具体的には、ClC-3 遺伝子のエクソン 3 を欠失させたノックアウトマウスを初めて作出し、このノックアウトマウスでは、膜タンパクに ClC-3 が存在しないこと、ClC-4 と ClC-5 の亢進はないこと、肝細胞（Hepatocyto）および膵臓腺房細胞（pancreatic acinar cell）において VSOR-ClC 電流は影響されていないことから、VSOR-ClC の実体は ClC-3 以外であることを示唆し、さらに、ClC-3 は細胞内小胞膜に存在して機能すること、ホモノックアウトマウスは誕生後の成長（体重増加）が悪く、海馬や網膜に障害が生じることを提示している研究（Stobrawa et al. Neuron 2001;29:185-196）；いくつかの hClC-3 変異体をそれぞれ安定に発現させた HEK293 細胞を用いて、ClC-3 タンパクはゴルジ体などの細胞内小器官にあるが、細胞膜にも存在することを提示しているが、しかしながら、対照（トランスフェクトされていない）の細胞も一連のトランスフェクトされた細胞も VSOR-ClC 電流活性・調節性容積減少能ともに変化のなかったことから、hClC-3 は VSOR-ClC でないと主張している研究（Weylandt et al. J Biol Chem 2001;276:17461-17467）などが知られている。

したがって、容積感受性 Cl^-チャネルは、従来から調べられてきた細胞株以外の細胞あるいは組織、例えば心筋細胞においても同様な機構でアポトーシスを抑制することができるか否かについては、不明である。また、心筋細胞のアポトーシスがどのような機序により生じているのか、そしてかかる心筋細胞のアポトーシスを選択的に抑制することができる化合物にはどのようなものがあるのか、ほとんど知られていなかった。

発明の開示

発明が解決しようとする技術的課題

本発明は、心臓・血管系細胞のアポトーシスを選択的に抑制することができる物質からなる、心疾患治療剤若しくは心疾患予防剤を提供することを課題とする。

本発明はまた、心臓・血管系細胞のアポトーシスを選択的に抑制することができる物質をスクリーニングする方法を提供することを課題とする。

本発明はまた、上述した方法によりスクリーニングされた化合物を含む、心臓・血管系細胞のアポトーシスを抑制することによる心疾患治療剤若しくは心疾患予防剤を提供することもまた課題とする。

技術的課題の解決手段

本発明者らは、鋭意研究を継続した結果、上述した課題を解決することができることを見出した。

すなわち、Cl^-チャネル阻害剤を有効成分とすることにより、心疾患治療剤もしくは心疾患予防剤を提供するという本発明の上記課題を解決できることを見いだした。

本発明の発明者は、心臓・血管系細胞を用いて、Cl^-チャネル阻害剤の投与により、アポトーシスの発生を阻害または抑制できるか否かについて検討を行った。より具体的には、アポトーシスを誘導した心臓・血管系細胞に対して、被検物質であるCl^-チャネル阻害剤を投与することにより、誘導されたアポトーシスを回避することができるかどうかを検討した。その結果、Cl^-チャネル阻害剤を投与することにより、心臓・血管系細胞におけるアポトーシスの機序を阻害して、心臓・

血管系細胞において生じるアポトーシスを抑制できることを明らかにし、本発明を完成した。

本発明において、Cl^-チャネル阻害剤という用語は、Cl^-チャネルを介したCl^-の輸送を阻害する物質のことをいい、たとえばCl^-チャネル阻害効果を有する低分子化合物、抗体、アンチセンス化合物等が挙げられる。本発明において、Cl^-チャネル阻害剤は容積感受性Cl^-チャネル阻害剤であることが好ましく、したがって容積感受性Cl^-チャネル阻害効果を有する低分子化合物、抗体、アンチセンス化合物等が好ましい。Cl^-チャネル阻害剤のさらに好ましい例としては、容積感受性Cl^-チャネルであるClC-3を特異的に阻害する低分子化合物、抗体、アンチセンス化合物等が挙げられる。

本発明の容積感受性 Cl^-チャネル阻害剤として使用することができる低分子化合物としては、例えば、4-アセトアミド-4'-イソチオシアノスチルベン（SITS)、4,4'-ジイソチオシアノスチルベン-2,2'-ジスルホン酸（DIDS)、5-ニトロ-2-（3-フェニルプロピルアミノ）-ベンゾエート（NPPB)、フロレチン（Phloretin)、ニフルム酸、グリベンクラミド、フルオキセチン（fluoxetine)、タモキシフェン（tamoxifen)、クロミフェン（clomiphene)、ナフォキシジン（nafoxidine)、その他、以下の論文；DDT 2000;5:492-505、 Br J Pharmacol 1999;126:508-514、Br J Pharmacol 2001;132:135-142 に記載のものなどを例としてあげることができるが、これらには限定されず、容積感受性 Cl^-チャネル阻害剤作用を有する化合物であれば、いずれの化合物であってもかまわない。より具体的には、容積感受性Cl^-チャネルに対する選択性が高く、cAMP依存性Cl^-チャネル（CFTR）やCa^{2+}依存性Cl^-チャネル（CaCC）などの他のCl^-チャネルに対する選択性が低い、4-アセトアミド-4'-イソチオシアノスチルベン（SITS)、4,4'-ジイソチオシアノスチルベン-2,2'-ジスルホン酸（DIDS)、フロレチン（Phloretin）のような性質を有するCl^-チャネル阻害剤が特に好ましく、SITSおよびDIDSが特に好ましい。

このような低分子化合物のうち、心臓・血管系細胞のアポトーシス性細胞死の抑制効果を有する低分子化合物を、本発明の心疾患治療剤または心疾患予防剤として使用することができる。

本発明の容積感受性 Cl^-チャネル阻害剤として使用することができる抗体は、

容積感受性 Cl^-チャネルと結合してその機能を阻害する限り特に制限はなく、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヒツジ抗体、キメラ抗体、ヒト型化抗体、ヒト抗体等を適宜用いることができる。抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよいが、均質な抗体を安定に生産できる点でモノクローナル抗体が好ましい。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は当業者に周知の方法により作製することができる。

このような抗体を調製するための免疫源としては、本明細書中で上述した Cl^-チャネルタンパク質を使用することができる。より好ましくは、免疫源として容積感受性 Cl^-チャネルタンパク質を使用し、最も好ましくは容積感受性 Cl^-チャネルタンパク質の中でも ClC-3 タンパク質を使用する。

この抗体は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ等の動物を、上述したような免疫原を用いて免疫化することにより作成する。免疫化する際には、抗体を産生させる動物の免疫活性を増強するために、アジュバントとともに投与することができる。アジュバントの例としては、Martin, REMINGTON'S PHARM. SCI., 15th Ed. (Mack Publ. Co., Easton (1975)) を参照することができる。アジュバントとして、油中水型エマルジョン、水中油型エマルジョン、もしくはアルミニウムアジュバントなどのいずれをも使用することができる。油中水型エマルジョンの例としては、フロイント (Fleund) の完全アジュバント、フロイントの不完全アジュバントなど、水中油型エマルジョンの例としてはRIBIアジュバントシステム(RIBI Immunol. Res. Inc.) など、そしてアルミニウムアジュバントの例としては硫酸アルミニウムカリウム、などを使用することができるが、これらのものに限定されるものではない。

数回の免疫化の後、前記免疫動物の血液を微量採取し、Cl^-チャネルタンパク質と実質的に特異的に結合するという特徴を有する抗体が実際に産生されていることを確認する。免疫動物血液中に目的とする抗体が産生されている場合には、当該動物を犠死させて脾細胞を単離し、当該動物由来のミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマ細胞を得る。

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、所望の抗原自体や所望の抗原を発

現する細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞（ハイブリドーマ）を得て、これらの細胞が産生する抗体が免疫源に対して特異的な反応を示すかどうかをスクリーニングすることによって作製できる。ハイブリドーマの作製は、たとえば、ミルステインらの方法(Kohler. G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46) 等に準じて行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、アルブミン、KLH等の免疫原性を有する巨大分子と結合させ、免疫を行えばよい。上述した方法により得られたハイブリドーマ細胞のうち、標的タンパク質であるCl^-チャネルタンパク質に特異的に結合する抗体を産生することができるハイブリドーマ細胞をクローン化する。

また、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた遺伝子組換え型抗体を用いることができる（例えば、Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照)。具体的には、ハイブリドーマのmRNAから逆転写酵素を用いて抗体の可変領域（V領域）のcDNAを合成する。目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体のV領域をコードするDNAを、抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでもよい。上述したベクター中に組み込むDNAは、発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（Chimeric）抗体、ヒト型化（Humanized）抗体などを使用することもできる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる

抗体であり、マウス抗体の可変領域をコードするDNAをヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる（WO 86/01533）。

ヒト型化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域（CDR; complementarity determining region）をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域（framework region；FR）を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号 EP 239400、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照）。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Sato, K.et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856）。

また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球をin vitroで所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878参照）。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる（国際特許出願公開番号WO 93/12227、WO 92/03918、WO 94/02602、WO 94/25585、WO 96/34096、WO 96/33735 参照）。さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニング法によりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体（scFv）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合す

るscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既知であり、WO 92/01047、WO 92/20791、WO 93/06213、WO 93/11236、WO 93/19172、WO 95/01438、WO 95/15388を参考にすることができる。

抗体遺伝子を一旦単離し、適当な宿主に導入して抗体を作製する場合には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いることができる。動物細胞としては、(1)哺乳類細胞、例えば、CHO、COS、ミエローマ、BHK(baby hamster kidney)、HeLa、Vero、(2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは (3) 昆虫細胞、例えば、sf9、sf21、Tn5 などが知られている。植物細胞としては、ニコティアナ (Nicotiana)属、例えばニコティアナ・タバカム (Nicotiana tabacum)由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (Saccharomyces) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces serevisiae)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (Aspergillus) 属、例えばアスペスギルス・ニガー (Aspergillus niger) などが知られている。原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (E. coli)、枯草菌 (B. subtilis) が知られている。これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞を in vitro で培養することにより抗体が得られる。

本発明においてはまた、容積感受性 Cl^-チャネル阻害剤として、アンチセンス化合物を使用することもできる (O'Connor, J Neurochem (1991) 56:560 in Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)。また、容積感受性 Cl^-チャネルの遺伝子と三重らせんを形成するオリゴヌクレオチドを使用することができる (Lee ら、Nucleic Acids Res(1979)6: 3073; Cooney ら、Science(1988)241: 456; Dervan ら、Science(1991)251: 1360)。

このようなアンチセンス化合物またはオリゴヌクレオチドは、本発明の容積感受性 Cl^-チャネル阻害剤の標的と考えられている、ラットClC-3(Kawasaki M et al., Neuron 1994; 12: 597-604) またはヒトClC-3 (GenBank Accession No. AF172729

および Huang P et al., J. Biol. Chem. 2001; 276, 20093-20100）などのタンパク質をコードするDNAに基づいて作成することができる。具体的には、上述したアンチセンス化合物またはオリゴヌクレオチドは、当該遺伝子のプロモーター領域、エクソン領域、翻訳終了領域などのヌクレオチド配列に結合することができるように作成することができる。

上述した低分子化合物、抗体、アンチセンス化合物またはオリゴヌクレオチドなどの Cl^-チャネル阻害剤を心疾患治療剤および／または心疾患予防剤として使用することができるかどうかについては、in vivo および in vitro 両方またはいずれか一方の実験により確認することが可能である。具体的には、in vivo では、虚血／再灌流モデル等の生体を用いた実験により確認することができ、一方 in vitro では、その機能が知られていない低分子化合物、抗体、アンチセンス化合物またはオリゴヌクレオチドなどを用いて、実際に心臓・血管系細胞のアポトーシス性細胞死を抑制する機能を有しているか否かについてスクリーニングすることにより確認することができる。本発明においては、in vitro においてスクリーニングすることが好ましい。

このように、上述した低分子化合物、抗体、アンチセンス化合物またはオリゴヌクレオチドなどが、本発明の Cl^-チャネル阻害剤効果を有し、心臓・血管系細胞のアポトーシス性細胞死を抑制することができるかどうかをスクリーニングする方法を提供することにより、本発明の課題を解決する。

本発明のスクリーニング方法は、心臓・血管系細胞にアポトーシスを誘導する工程；被検物質である Cl^-チャネル阻害剤で処理する工程；および心臓・血管系細胞のアポトーシス性細胞死の抑制効果により被検物質の心疾患に対する治療効果および／または予防効果を判定する工程；を含有することを特徴とする。

本発明の一態様において、心臓・血管系細胞にアポトーシスを誘導し、このアポトーシスの誘導と同時にまたはそれに連続して、被検物質である化合物により当該心臓・血管系細胞を処理する。被検物質である化合物が存在しない場合と比較して、被検物質の存在下において、心臓・血管系細胞のアポトーシス性細胞死が抑制されるか否かを確認する。これにより、被検物質が心臓・血管系細胞のアポトーシスを抑制して心疾患に対する治療効果および／または予防効果を発揮す

る効果を有するかどうかについて、スクリーニングすることができる。

本発明において心臓・血管系細胞の例としては、心筋細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、線維芽細胞、筋線維芽細胞、周皮細胞、血管内皮前駆細胞が挙げられ、好ましくは、心筋細胞、血管内皮細胞が挙げられる。これらは初代培養細胞または細胞株由来細胞として使用することができる。心臓・血管系細胞として初代培養細胞を用いる場合、初代培養系が確立しているラット、マウス、モルモット、ウサギ、ウシ、ウマなどの動物から、心臓および／または血管を採取する。採取された心臓および／または血管は、コラゲナーゼ、トリプシンなどのタンパク質分解酵素による処理の後、所定細胞濃度の細胞浮遊液として調製することができる。心臓・血管系細胞として細胞株由来細胞を用いる場合、例えば、心筋細胞株、血管内皮細胞株、血管平滑筋細胞株、線維芽細胞株、筋線維芽細胞株、周皮細胞株、血管内皮前駆細胞株に由来する一般的に使用可能な細胞株のいずれかを使用することができ、好ましくは、心筋細胞株、血管内皮細胞株を使用することができる。この場合、使用する細胞株を適した条件下で培養した後、所定細胞濃度の細胞浮遊液として調製することができる。

本発明において心臓・血管系細胞に対してアポトーシスを誘導する方法としては、スタウロスポリン（STS)、腫瘍壊死因子（TNF)、シクロヘキシミド（CHX）との併用によるTNF、抗Fasアゴニスト抗体、抗癌剤、過酸化水素等による化学的方法；ウイルスを用いる生物学的方法；紫外線、放射線、温熱による物理的方法；またはこれらの組合せ；などが含まれるが、これらには限定されない。上述した心臓・血管系細胞に対してアポトーシスによる細胞死を誘導するために必要な物質の量および処理時間は、対象となる細胞とアポトーシスを誘導するための物質の種類とに依存して、当業者が適宜決定することができるが、例えば、スタウロスポリンを使用する場合には0.3～3μMの濃度で10分～24時間、好ましくは30分～8時間、腫瘍壊死因子（TNF）とシクロヘキシミド（CHX）の混合物を使用する場合にはTNFαを2～10ng/mlにシクロヘキシミドを0.1～1μg/ml加えて10分～24時間、好ましくは30分～8時間、処理することによりアポトーシスを誘導することができる。

本発明のスクリーニング方法においては、被検物質は、上述のアポトーシスの

誘導と同時に添加してもよく、あるいは上述のアポトーシスの誘導によるアポトーシス誘導刺激を行う前または行った後に添加してもよい。被検物質は、その有効性および有効濃度を確認するため、いくつかの濃度を用いて試験を行う。一般的には、被検物質の濃度を、10μM～10 mM程度の範囲で変化させて実験を行うことが好ましい。被検物質を用いて細胞を処理する時間は、対象となる細胞に依存して当業者が適宜決定することができるが、一般的には2～24時間処理することにより被検物質のアポトーシス抑制効果を試験することができる。

本発明において被検物質がアポトーシス抑制効果を有しているか否かについては、対象となる細胞がアポトーシス特有の特徴を呈しているか否かによって判断する。具体的にアポトーシス特有の特徴とは、例えば、細胞容積の減少；チトクロームc放出；カスパーゼ（好ましくは、カスパーゼ-3）の活性化；DNAの断片化；アポトーシス小体の形成などの形態学的特徴；アポトーシス関連特異抗原の発現などの生理学的変化；細胞生存率低下；などがあげられる。これらの特徴は、以下のような測定により、検出することができる。

細胞容積は、Coulter型細胞サイズ解析機（CDA-500；Sysmex, Kobe, Japan）を用いる電子的サイズ決定技術により、調べることができる（Hazama, A. and Okada, Y., J. Physiol., 402, 687-702, 1988）。

チトクロームcは、ミトコンドリアから放出されるものであり、共焦点レーザースキャニング蛍光顕微鏡（例えば、Bio-Rad MRC-1024）を用いて調べることができる。この場合、チトクロームcを、蛍光標識した抗チトクロームcモノクローナル抗体（例えば、6H2.B4（BD PharMingen, San Diego, CA, USA）など）を用いて標識することができる（Deshmukh, M. and Johnson, E.M. Jr., Neuron, 21, 695-705, 1998）。チトクロームcの放出は、細胞質画分をウェスタンブロット法を用いて解析することにより検出することもできる。この場合、細胞質画分をポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した後に、チトクロームcを、抗チトクロームcモノクローナル抗体（例えば、7H8.2C12（BD PharMingen, San Diego, CA, USA）など）を用いて検出することができる（Liu, X. et al., Cell, 86, 147-157, 1996）。

カスパーゼ-3（Caspase-3）の活性は、蛍光測定法を用いて検出することができる。その他の関連するプロテアーゼの関与を排除するため、カスパーゼ-3の特異

的阻害剤の非存在下および存在下の蛍光の間での差異を検出することが好ましい。蛍光色素の 7-アミノ 4-メチルクマリン（AMC）により標識した蛍光生成性基質を、カスパーゼ-3（Ac-DEVD-AMC）およびカスパーゼ-3 のテトラペプチド阻害剤（Ac-DEVD-CHO）を検出するために、CaspASE アッセイシステム（SIGMA CHEMICAL Co., St. Louis, MO, USA もしくは Promega, Madison, WI, USA）に添加した。

ヌクレオソーム間での DNA の断片化は、DNA ラダーとして検出することができる（Shiokawa, D. et al., Eur. J. Biochem., 226, 23-30, 1994）。簡略的には、溶解バッファー（10 mM EDTA/0.5%Na-N-ラウロイルサルコシネート/500μg/ml RnASE/50 mM Tris・HCl、pH 7.8）中で 37℃、1 時間処理し、その後 500μg/ml のプロテナーゼ K を用いて 37℃、1 時間処理して、細胞を溶解した。染色体 DNA をアガロースゲル電気泳動（2%）により解析し、その後エチジウムブロマイドにより染色した。

DNA の断片化はまた、TUNEL 変法（TdT アッセイ）、Sub-G1 測定法などのフローサイトメトリー法によっても検出することができる。TUNEL 変法（TdT アッセイ）は、細胞内の DNA 断端を TUNEL 法で FITC 標識し、さらに全 DNA を PI（ヨウ化プロピジウム）で染色し、両者の蛍光をフローサイトメトリーで同時に測定することにより DNA 断片化を検出する方法である。Sub-G1 測定法は、DNA 断片を細胞外に洗い出し、アポトーシス細胞を生きた G1 期細胞より DNA 量の少ない細胞（sub-G1 細胞）としてフローサイトメトリーで同定する方法である。

アポトーシス過程の早期に細胞膜表面に移行し、細胞外に露出するフォスファチジルセリンやフォスファチジルエタノールアミンなどを、アネキシン V 法によるフローサイトメトリー法によっても検出することができる。また、ミトコンドリア膜電位測定法などのフローサイトメトリー法によっても検出することができる。

細胞の透過電子顕微鏡観察は、JEM 100CX（Tokyo, Japan）により行った。細胞培養物を、$CaCl_2$ を添加していない 0.1 M Na-リン酸バッファーを用いて、Karnovsky 固定液により前固定する。水中 1% の OsO_4 によりオスミウム酸染色をした後、段階的エタノール勾配中で細胞を脱水して、エポン包埋した。

細胞生存率は、24 マルチウェルプレート上または 96 穴マルチウェルプレート

上で培養した細胞を、比色MTTアッセイを用いるミトコンドリアデヒドロゲナーゼ活性により評価した。比色MTTアッセイは、生細胞が3-（4,5-ジメチル-2-チアゾリル）-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウムブロマイド（MTT）を還元することができるが、死細胞は還元できない、という特徴を利用するものである。MTTの代わりに、WST-1あるいはWST-8などの改良されたホルマザン試薬を使用することもできる。例えば、細胞計測キット(Cell Counting Kit, DOJINDO LABORATORIES, Kumamoto, Japan)、細胞計測キット-8（Cell Counting Kit-8, DOJINDO LABORATORIES, Kumamoto, Japan）などを用いて検出する。細胞生存率は、0.4%のトリパンブルーを用いて5分間インキュベートし、生存細胞がトリパンブルーを排除することにより検出することもできる。

これらの他にも、組織標本を用いて、TUNEL法、ISEL法、ヘマトキシリン-エオジン（HE）染色、免疫組織化学染色、電子顕微鏡観察によりアポトーシスを検出することができる。

本発明はまた、上述したスクリーニング方法により得られたCl^-チャネル阻害剤を含む、心疾患治療剤若しくは心疾患予防剤を提供することにより上記課題を解決する。

本発明の心疾患治療剤若しくは心疾患予防剤は、上述したスクリーニング方法により得られたCl^-チャネル阻害剤がCl^-チャネル機能を阻害する結果、心筋細胞のアポトーシスを抑制することにより、その目的を達成することができる。

当該心疾患治療剤若しくは心疾患予防剤中に含まれるCl^-チャネル阻害剤の用量、投与方法および反復頻度は、投与される被験体の性別、年齢、体重、全身状態など様々なファクターを勘案して、当業者が容易に決定することができる。一般的には、投与量は、有効成分あたりで、0.001～1000μg／kg／日の範囲、好ましくは0.01～100μg／kg／日の範囲、より好ましくは0.1～10μg／kg／日の範囲である。たとえば、有効成分として容積感受性Clチャネル機能阻害抗体を用いる場合の投与量は有効成分当たりで一般的には0.001～1000 mg／kg／日、好ましくは0.1 mg～50 mg／kg／日、より好ましくは0.5 mg～10 mg／kg／日の範囲である。しかしながら、本発明の心疾患治療剤または心疾患予防剤はこれらの投与量に制限されるものではない。

投薬期間等の投薬スケジュールは、処置される疾患の状態の深刻さ、反応性および患者の体内の薬剤の蓄積に依存しており、数日間から数ヶ月、場合により数年間にわたり、あるいは治療が効果を示すか、あるいは疾患状態の減少または疾患リスクの予防が達せられるまで、1日に1～3回、若しくは1週間、1箇月、1年間に1回以上、続けて投与することができる。

本発明の心疾患治療剤若しくは心疾患予防剤は、局所性あるいは全身性の処置のどちらにおいても投与することができる。投与は、経口的あるいは非経口的のいずれであってもよい。非経口的投与は、静脈内点滴、カテーテルを使用した心臓内投与あるいは目的とする血管部位での投与、腹腔内あるいは筋肉内注射、などを含む。

経口投与のための心疾患治療剤若しくは心疾患予防剤は、粉末あるいは顆粒、水性あるいは非水性の媒質における懸濁液あるいは溶液、カプセル、サシェあるいは錠剤、を含む。濃縮剤、着香料、希釈剤、乳化剤、分散補助剤あるいは結合剤は所望されうる。非経口投与のための心疾患治療剤若しくは心疾患予防剤は、緩衝液、希釈剤および他の適した添加物も含む滅菌した水性溶液を含んでもよい。

本発明の心疾患治療剤若しくは心疾患予防剤には、医薬的に許容可能なキャリア、濃縮剤、希釈剤、緩衝剤、保存剤、界面活性剤、中性あるいは陽イオン脂質、脂質複合体、リポソーム、浸透亢進剤、キャリア化合物および他の医薬的に許容可能なキャリアあるいは補形剤など、心臓・血管系細胞に上述した心疾患治療剤および／または心疾患予防剤を投与するために適したものを含んでいてもよい。心疾患治療剤および／または心疾患予防剤の食餌性運搬を亢進するための浸透亢進剤、例えば脂肪酸、胆汁酸塩、キレート剤、界面活性剤および非界面活性剤、のいずれかを含んでいてもよい。

医薬的に許容可能なキャリアは、結合剤（例えば、α化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンあるいはヒドロキシプロピルメチルセルロースなど）；増量剤（例えば、ラクトースおよび他の糖、微結晶性セルロース、ペクチン、ゼラチン、硫酸カルシウム、エチルセルロース、ポリアクリレート、リン酸水素カルシウムなど）；潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ、コロイド状二酸化シリコン、ステアリン酸、金属ステアレート、硬化植物油、コーン

スターチ、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウムなど）；分解剤（例えば、デンプンなど）；あるいは湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウムなど）、を含むが、それらには限定されない。

本発明の心疾患治療剤若しくは心疾患予防剤は、本発明の Cl^- チャネル阻害剤の生物学的活性を阻害しない範囲内で、他の補助的要素を追加的に含んでもよい。例えば、本発明の心疾患治療剤若しくは心疾患予防剤は、例えば、色素、着香料、保存剤、抗酸化剤、乳白剤（opacifiers）、濃縮剤および安定剤などの、本発明の心疾患治療剤若しくは心疾患予防剤を物理的に製剤化するのに有用な追加的な物質を含有してもよい。

図面の簡単な説明

図1は、ラット初代培養心筋細胞において、24穴マルチウェルプレート上で、125、250または500μMのSITSによる、スタウロスポリン（STS-1）により誘導される細胞生存率の低下の抑制効果を示す図である。各カラムは平均値、バーは±標準誤差（SE）を示す（以下、同様）。

図2は、ラット初代培養心筋細胞において、24穴マルチウェルプレート上で、500または1000μMのSITSによる、スタウロスポリン（STS-1）により誘導される細胞生存率の低下の抑制効果を示す図である。

図3は、ラット初代培養心筋細胞において、96穴マルチウェルプレート上で、250または500μMのSITSによる、スタウロスポリン（STS-1）により誘導される細胞生存率の低下の抑制効果を示す図である。

図4は、ラット初代培養心筋細胞において、24穴マルチウェルプレート上で、62.5、125または250μMのDIDSによる、スタウロスポリン（STS-1）により誘導される細胞生存率の低下の抑制効果を示す図である。

図5は、ラット初代培養心筋細胞において、12穴マルチウェルプレート上で、250μMのDIDSによる、スタウロスポリン（STS-1）により誘導されるcaspase-3活性の上昇の抑制効果を示す図である。

図6は、ラット初代培養心筋細胞において、24穴マルチウェルプレート上で、HCO_3^-無添加培養液中でもスタウロスポリン（STS-1）により細胞生存率の低下が

誘導されること、および、62.5、125または250μMのDIDSによる、STS-1により誘導される細胞生存率の低下の抑制効果を示す図である。

図7は、ラット初代培養心筋細胞において、96穴マルチウェルプレート上で、HCO_3^-無添加培養液中でもスタウロスポリン（STS-1）により細胞生存率の低下が誘導されること、および、125、250または500μMのSITSによる、STS-1により誘導される細胞生存率の低下の抑制効果を示す図である。

図8は、ウシ動脈内皮細胞由来細胞株において、24穴マルチウェルプレート上で、125、250または500μMのSITSによる、スタウロスポリン（STS-1）により誘導される細胞生存率の低下の抑制効果を示す図である。

図9は、ウシ動脈内皮細胞由来細胞株において、24穴マルチウェルプレート上で、500μMのSITSによる、スタウロスポリン（STS-1またはSTS-3）により誘導される細胞生存率の低下の抑制効果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の一態様において、心臓・血管系細胞として、ラットの初代培養心筋細胞を用いて、スタウロスポリンのアポトーシス誘導作用と、SITS（4-アセトアミド-4'-イソチオシアノスチルベン）およびDIDS（4,4'-ジイソチオシアノスチルベン-2,2'-ジスルホン酸）によるアポトーシスからの保護効果について試験を行った。

細胞に対する培養時の操作はすべて滅菌条件下で行った。

心筋細胞としては、ラットの初代培養心筋細胞を用いた。初代培養心筋細胞は、胎齢20日のSD系ラット（日本SLC（株）から入手）から心臓を摘出し、コラゲナーゼ(Worthington Biochemical Corp.)とトリプシン(GIBCO BRL, Gaithersberg, MD）により酵素消化を行って、心筋細胞を単離し、細胞浮遊液を得ることにより調製した。通常の場合の培養液として、10%濃度となるようウシ胎児血清（FBS）を添加したD-MEM（GIBCO BRL, Gaithersberg, MD）を使用した。心臓・血管系細胞におけるアポトーシスおよびそれからの保護に対する、Cl^-／HCO_3^-交換体（anion exchanger）の関与の有無を検討する場合には、薬物を含む培養液を作製する際に、10%濃度となるようFBSを添加したLeibovitz's L-15 Medium (GIBCO

BRL, Gaithersberg, MD)をHCO_3^-無添加培養液として使用し、通常の場合の培養液を用いた結果と比較した。HCO_3^-無添加培養液を使用するのは、Cl^-／HCO_3^-交換体の機能をHCO_3^-を涸渇させることにより抑制させるためである。このCl^-/HCO_3^-交換体は、赤血球その他の組織に広く分布しており、赤血球では主にAE1が、心筋細胞・神経細胞では主にAE3が発現している。そしてこの交換体は、細胞内Cl^-の細胞外への排出と細胞外HCO_3^-の細胞内への取り込みを共役することにより、細胞内Cl^-およびpHの調節系として機能しており、調節性容積増加（Regulatory Volume Increase; RVI）の際の細胞容積の調節系としても働いている。病態との関連では、虚血に伴う心筋細胞の酸性化に関わる可能性が考えられている。

心筋細胞を3～5×10^5細胞／mLの密度になるように懸濁した細胞浮遊液を、ウェル当たり0.5 mLずつ24穴マルチウェルプレート（Falcon）に、若しくは0.1 mLずつ96穴マルチウェルプレート（Falcon）に、若しくは1 mLずつ12穴マルチウェルプレート（Falcon）に分注した。このプレートをCO_2インキュベーター中に静置し、5%CO_2、37℃にて、2～3日間培養した。このように培養した細胞を、後の実験に供した。

対照群として無細胞状態（ブランク）、培地のみ（D-MEM）および培地に0.3%の濃度でDMSO（DOJINDO LABORATORIES, Kumamoto, Japan）を添加したもの（0.3% DMSO）、試験群として0.3%DMSO中に溶解した1μMのスタウロスポリン（Sigma社）溶液あるいは1μMのスタウロスポリン溶液と125～1000μMの4-アセトアミド-4'-イソチオシアノスチルベン(SITS、SIGMA CHEMICAL Co., St. Louis, MO, USA)との混合溶液、あるいは1μMのスタウロスポリン溶液と62.5～250μMの4,4'-ジイソチオシアノスチルベン-2,2'-ジスルホン酸(DIDS、SIGMA CHEMICAL Co., St. Louis, MO, USA）との混合溶液を、試験群のそれぞれの条件で薬物を含む培養液（以下、これを条件培養液という）として調製し、使用した。

具体的には、培養液を吸引除去した後、24穴マルチウェルプレートの場合0.5 mL／ウェルずつの対照群溶液若しくは目的の条件培養液を添加した。条件培養液を添加した後、プレートをCO_2インキュベーター中に静置し、5%CO_2、37℃にて、2～4時間培養した。HCO_3^-無添加培養液をベースとした条件培養液の添加を行った場合には、プレートを大気組成のインキュベータ中に静置し、37℃にて培養した。

その後、条件培養液を吸引除去し、残存する条件培養液を完全に除去するため0.5～0.7 mL／ウェルのPBS（-）を用いてウェルを1回洗浄し、これを吸引除去した後、0.5 mL／ウェルの通常の培養液（10％濃度となるようウシ胎児血清を添加したD-MEM）を添加した。96穴マルチウェルプレートの場合には、それぞれ5分の1量を用いて、また12穴マルチウェルプレートの場合には、それぞれ1 mLを用いて、同様の操作を行った。

上述のように調製した細胞に対して、WST-8（(2-（2-メトキシ-4-ニトロフェニル）-3-（4-ニトロフェニル）-5-（2,4-ジスルホフェニル）-2H-テトラゾリウム・モノナトリウム塩)を発色基質(細胞計測キット-8(Cell Counting Kit-8)、DOJINDO LABORATORIES, Kumamoto, Japan）として反応させ、細胞生存率を測定した。

より具体的には、24穴マルチウェルプレートの場合には、培養液中に0.05 mL／ウェルの細胞計測キット-8溶液を添加し、プレートを再びCO_2インキュベーター中に静置し、5％CO_2、37℃にて1～4時間のうちの適切な時間、多くの場合は2時間、培養した。その後、それぞれのウェルから培養液0.11 mLずつを採取し、96穴マルチウェルプレートの所定位置に分注した。96穴マルチウェルプレートの場合は、培養液中に0.01 mL／ウェルの細胞計測キット-8溶液を添加して、24穴マルチウェルプレートの場合と同様にして培養を行った。このプレートをマイクロプレートリーダー(Bio-Rad, Model 3550, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA）により、450 nmの吸光度を測定し（参照波長：655 nm)、生細胞数の指標とした。

また、上述のように調製した細胞に対して、Caspase-3 Assay Kit, Fluorimetric（SIGMA CHEMICAL Co., St. Louis, MO, USA）を用い、caspase-3活性を測定した。

より具体的には、12穴マルチウェルプレートを用い、条件培養液を2時間添加して培養した後、条件培養液を除去し、引き続き適切な時間、多くの場合は2時間、培養した後、Caspase-3 Assay Kit, Fluorimetricを用いて細胞の溶解物を調製し、以後も本キットの測定手順に従い蛍光測光用マイクロプレートリーダー（SPECTRA Fluor, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan）で特異的蛍光色素の7-アミノ4-メチルクマリン（AMC）の生成量を測定し、caspase-

3活性の指標とした。

本発明の別の一態様において、心臓・血管系細胞として、ウシ動脈内皮細胞由来細胞株を用いて、スタウロスポリンのアポトーシス誘導作用と、SITSによるアポトーシスからの保護効果について試験を行った。

内皮細胞としては、ウシ動脈内皮細胞株由来培養細胞を用いた。内皮細胞株由来培養細胞は、ウシ血管（動脈）内皮由来の細胞株（GM07372）から調製した。培養液として、10%濃度となるようウシ胎児血清(FBS)を添加したD-MEM(GIBCO BRL, Gaithersberg, MD）を使用した。

内皮細胞を5×10^4細胞／mLの密度になるように懸濁した細胞浮遊液を、ウェル当たり0.5mLずつ、24穴マルチウェルプレートに分注した。このプレートをCO_2インキュベーター中に静置し、5%CO_2、37℃にて、2日間培養した。このように培養した細胞を、後の実験に供した。

試験においては、125～500μMのSITSを使用する以外は、ラットの初代培養心筋細胞の場合と同様にして、細胞生存率を測定した。

以下に実施例を提供する。これらの実施例は本発明を具体的に説明するために記載するものであり、本発明の技術的範囲を限定するために記載するものではない。

実施例

実施例１：初代培養心筋細胞における、スタウロスポリン誘発細胞傷害に対するSITS（4-アセトアミド-4'-イソチオシアノスチルベン）の保護効果

心筋細胞として、胎齢20日のSD系ラットの初代培養心筋細胞を、10%濃度となるようウシ胎児血清を添加したD-MEM中で培養したものを使用した。心筋細胞は、5×10^5細胞／mLの密度になるように、ウェル当たり0.5 mLずつ、24穴マルチウェルプレート上で培養した。

対照群として無細胞状態（ブランク）、培地のみ（D-MEM）および培地に0.3% DMSO、試験群として0.3%DMSO中に溶解した1μMのスタウロスポリン溶液(STS-1)あるいは1μMのスタウロスポリン溶液および125、250または500μMのSITSの混合溶液（STS-1＋SITS-125、STS-1＋SITS-250、STS-1＋SITS-500）を用いて、5%

CO_2、37℃にて、2時間培養した。10%濃度となるようウシ胎児血清を添加したD-MEM中でさらに1日培養した後、WST-8により細胞生存率を測定した。結果を、図1に示す。

この試験の結果、スタウロスポリンにより生じる細胞生存率の低下を、その処理時間の如何に関わらず、SITSの濃度依存的に抑制することができることがわかった。

スタウロスポリンにより生じる細胞生存率の低下に対する、SITSによる抑制の濃度依存性をさらに確認するために、同様の実験を、対照群として無細胞状態（ブランク）および何も加えていない0.3%DMSO、試験群として0.3%DMSO中に溶解した1μMのスタウロスポリン溶液（STS-1）あるいは1μMのスタウロスポリン溶液および500または1000μMの4-アセトアミド-4'-イソチオシアノスチルベンの混合溶液（STS-1＋SITS-500、STS-1＋SITS-1000）を用いて、5%CO_2、37℃にて、2時間培養することにより行った。結果を図2に示す。

この試験の結果、2時間のスタウロスポリン＋SITS刺激の場合には、SITSの濃度が500μM以上である場合には、その濃度に関わらず、ほぼ同程度の細胞生存率の低下抑制効果を示すことがわかった。

実施例2：初代培養心筋細胞における、スタウロスポリン誘発細胞傷害に対するSITSの保護効果

本実施例では、24穴マルチウェルプレートの代わりに96穴マルチウェルプレート上で、試験群として1μMのスタウロスポリン溶液および250または500μMのSITS（STS-1＋SITS-250、STS-1＋SITS-500）を用いて、培養したことを除き、実施例1と同様に試験を行った。結果を、図3に示す。

この試験の結果、24穴マルチウェルプレートの代わりに96穴マルチウェルプレートを使用しても、SITSの濃度依存的な細胞生存率低下抑制効果を示すことができることが明らかになった。このことから、上述した条件を用いることにより、被検物質の大規模スクリーニングを容易に行うこともできることが明らかになった。

実施例 3：初代培養心筋細胞における、スタウロスポリン誘発細胞障害に対するDIDS（4,4'-ジイソチオシアノスチルベン-2,2'-ジスルホン酸）の保護効果

本実施例では、試験群として1μMのスタウロスポリン溶液および62.5または125または250μMのDIDS（STS-1+DIDS-62.5、STS-1+DIDS-125、STS-1+DIDS-250）を用いて、培養したことを除き、実施例1と同様に試験を行った。結果を、図4に示す。

この試験の結果、SITSの代わりにDIDSを使用しても、DIDSの濃度依存的な細胞生存率低下抑制効果を示すことができることが明らかとなった。

実施例 4：初代培養心筋細胞における、スタウロスポリン誘発 caspase-3 活性上昇に対するDIDSの抑制効果

本実施例では、12穴マルチウェルプレートを用い、試験群として1μMのスタウロスポリン溶液および250μMのDIDS（STS-1+DIDS-250）を用いて培養したこと、および、条件培養液除去後引き続き2時間培養した後、Caspase-3 Assay Kit, Fluorimetric（SIGMA CHEMICAL Co., St. Louis, MO, USA）を用いて細胞のlysateを調製し、以後も本キットの測定手順に従い、蛍光測光用マイクロプレートリーダー（SPECTRA Fluor, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan）で特異的AMCの生成を指標にcaspase-3活性を測定したことを除き、実施例3と同様に試験を行った。結果を図5に示す。

この試験の結果、スタウロスポリンによるcaspase-3活性の上昇は、DIDSにより抑制されることが明らかとなった。

実施例 5：初代培養心筋細胞における、HCO_3^-無添加培養液中でのスタウロスポリン誘発細胞障害に対するDIDSの保護効果

本実施例では、条件培養液作製時のベースの培養液としてHCO_3^-無添加培養液を用いたこと、および本条件培養液適用中にプレートを大気組成のインキュベータ中に静置し、37℃にて培養したことを除き、実施例3と同様に試験を行った。結果を図6に示す。

本実施例においてHCO_3^-無添加培養液を用いたのは、Cl^-チャネルの例として知

られている Cl^-/HCO_3^-交換体の機能が HCO_3^-を涸渇させることにより抑制されることを利用し、この交換体が心臓・血管系細胞におけるアポトーシスおよびそれからの保護に関与しているか否かを確認するためである。

この試験の結果、条件培養液のベースとして通常の培養液を使用する代わりに HCO_3^-無添加培養液を用いても、1μMのスタウロスポリンを含む条件培養液を添加した細胞で同程度のスタウロスポリン誘発細胞障害を引き起こすことができること、およびDIDSの濃度依存的な細胞生存率低下抑制効果を示すことができることが明らかとなった。このことから、培養心筋細胞で形質細胞膜における Cl^-イオンの透過経路として Cl^-／HCO_3^-交換体の働きを著しく低下させた条件でも、スタウロスポリンで細胞死を引き起こすことができること、および、これに対してDIDSの濃度依存的な抑制効果を示すことができることが明らかとなった。

実施例 6：初代培養心筋細胞における、HCO_3^-無添加培養液中でのスタウロスポリン誘発細胞障害に対するSITSの保護効果

本実施例では、24穴マルチウェルプレートの代わりに96穴マルチウェルプレート上で、試験群として1μMのスタウロスポリン溶液および125または250または500μMのSITS（STS-1+SITS-125、STS-1+SITS-250、STS-1+SITS-500）を用いて、培養したことを除き、実施例4と同様に試験を行った。結果を、図7に示す。

この試験の結果、条件培養液のベースとして通常の培養液を使用する代わりに HCO_3^-無添加培養液を用いても、96穴マルチウェルプレート上で、1μMのスタウロスポリンを含む条件培養液を添加した細胞で同程度のスタウロスポリン誘発細胞障害を引き起こすことができること、およびSITSの濃度依存的な細胞生存率低下抑制効果を示すことができることが明らかとなった。このことから、実施例4の結果と同様、96穴マルチウェルプレート上で、培養心筋細胞で形質細胞膜における Cl^-イオンの透過経路として Cl^-／HCO_3^-交換体の働きを著しく低下させた条件でも、スタウロスポリンで細胞死を引き起こすことができること、および、これに対してSITSの濃度依存的な抑制効果を示すことができることが明らかとなり、このことから、SITSおよびDIDSが Cl^-チャネル阻害剤として心筋細胞でアポトーシス抑制効果を発揮することが明らかとなった。

実施例 7：ウシ動脈内皮細胞株由来細胞における、スタウロスポリン誘発細胞傷害に対するSITSの保護効果

内皮細胞として、ウシ血管（動脈）内皮由来の細胞株（GM07372；受託番号）を、10%濃度となるようウシ胎児血清を添加したD-MEM中で培養したものを使用した。内皮細胞は、はじめに5×10^4細胞／mLの密度で細胞を懸濁した培養液を、ウェル当たり0.5mLずつ、24穴マルチウェルプレートに分注し、2日間、5%CO_2、37℃の条件下にて培養し、その後以下に示すそれぞれの溶液条件で処置を行った。

対照として無細胞状態（ブランク）、何も加えていない0.3%DMSOおよびSITSのみを添加したもの（SITS-500）、試験群として0.3%DMSO中に溶解した1μMのスタウロスポリン溶液（STS-1）あるいは1μMのスタウロスポリン溶液および125、250または500μMのSITSの混合溶液（STS-1＋SITS-125、STS-1＋SITS-250、STS-1＋SITS-500）を用いて、5%CO_2、37℃にて、1時間培養した。その後、各ウェルに添加したそれぞれの条件の溶液を吸引除去し、PBS（-）をウェル当たり0.5mLずつ加えてすぐにこれを吸引除去した後、引き続き以下の処置を行った。すなわち、最初の1時間にスタウロスポリンとSITSを含む混合溶液またはSITSを含む溶液条件を与えたウェルは同濃度のSITSと0.3%DMSOのみを含む培養液（10%濃度となるようウシ胎児血清を添加したD-MEM）を、それ以外の溶液条件を与えたウェルは0.3%DMSOのみを含む培養液（10%濃度となるようウシ胎児血清を添加したD-MEM）をそれぞれ与え、5%CO_2、37℃にて引き続き3時間培養した。この後、それぞれの条件の溶液を吸引除去後、一旦PBS（-）をウェル当たり0.5 mLずつ加えて直ぐにこれを吸引除去し、培養液（10%濃度となるようウシ胎児血清を添加したD-MEM）を加えて5%CO_2、37℃にてさらに1日培養した後、WST-8により細胞生存率を測定した。結果を図8に示す。

この試験の結果、ウシ動脈内皮細胞株由来細胞を用いた場合でも、スタウロスポリンにより生じる細胞生存率の低下を、SITSの濃度依存的に抑制することができることがわかった。

次いで、複数種類の濃度のスタウロスポリンを用いて、細胞生存率の低下作用およびSITSによるその抑制作用のそれぞれにどのような効果が生じるかについ

て、調べた。具体的には、試験群として0.3%DMSO中に溶解した1μMまたは3μMのスタウロスポリン溶液（STS-1またはSTS-3）あるいは1μMまたは3μMのスタウロスポリン溶液および500μMのSITSの混合溶液（STS-1＋SITS-500、STS-3＋SITS-500）を用いて、3時間培養し、その後、各ウェルに添加したそれぞれの条件の溶液を吸引除去し、さらにPBS（-）をウェル当たり0.5 mLずつ加えてすぐにこれを吸引除去した後、引き続き以下の処置を行った。すなわち、最初の3時間にスタウロスポリンとSITSを含む混合溶液またはSITSを含む溶液条件を与えたウェルは同濃度のSITSと0.3%DMSOのみを含む培養液(10%濃度となるようウシ胎児血清を添加したD-MEM)を、それ以外の溶液条件を与えたウェルは0.3%DMSOのみを含む培養液（10%濃度となるようウシ胎児血清を添加したD-MEM）をそれぞれ与え、5%CO_2、37℃にて引き続き2時間培養した。これ以外は、本実験例において上述した条件と同一の条件下で試験を行った。結果を図8に示す。

この試験の結果、スタウロスポリンにより生じる細胞生存率の低下は、スタウロスポリンの濃度によらず、SITSにより抑制することができることがわかった。

産業上の利用可能性

本発明により、心臓・血管系細胞細胞において、誘導されたアポトーシスをCl^-チャネル阻害剤で処理することにより、そのアポトーシスを抑制することができることが明らかになった。この結果、本発明に開示した条件下で、アポトーシス刺激された心臓・血管系細胞に対する、被検物質のアポトーシス抑制効果を調べることにより、当該未知の被検物質が心臓・血管系細胞でのアポトーシスを抑制するかどうか、ひいては心疾患に対する治療効果あるいは予防効果を有するかどうかを調べることができる。

特許請求の範囲

1． 心臓・血管系細胞にアポトーシスを誘導する工程；

被検物質であるCl^-チャネル阻害剤で処理する工程；

心臓・血管系細胞のアポトーシス性細胞死の抑制効果により被検物質の心疾患に対する治療効果および／または予防効果を判定する工程；

を含有することを特徴とする、心疾患治療剤および／または心疾患予防剤のスクリーニング方法。

2． 心臓・血管系細胞が培養心筋細胞および／または培養血管内皮細胞である、請求項１に記載の方法。

3． アポトーシス性細胞死の抑制効果を、細胞生存率；細胞容積減少；チトクローム c 放出；カスパーゼの活性化；DNA の断片化；アポトーシス小体の形成；アポトーシス関連特異抗原の発現；により測定する、請求項１または２に記載の方法。

4． アポトーシスの誘導および被検物質の処理を同時に行う、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

5． アポトーシスの誘導および被検物質の処理を逐次的に行う、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

6． 心疾患が、虚血性心疾患である、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法。

7． Cl^-チャネル阻害剤を有効成分として含有する、心疾患治療剤。

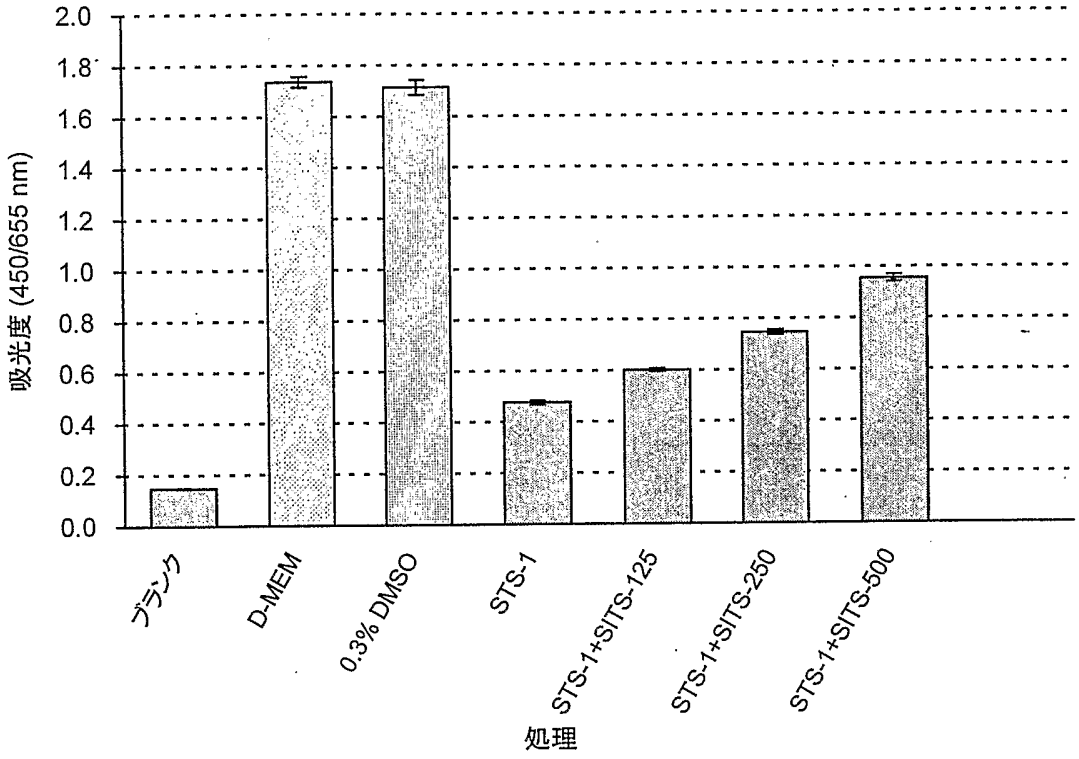

2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
吸光度 (450/655 nm)
ブランク
D-MEM
0.3% DMSO
STS-1
STS-1+SITS-125
STS-1+SITS-250
STS-1+SITS-500
処理

図 1

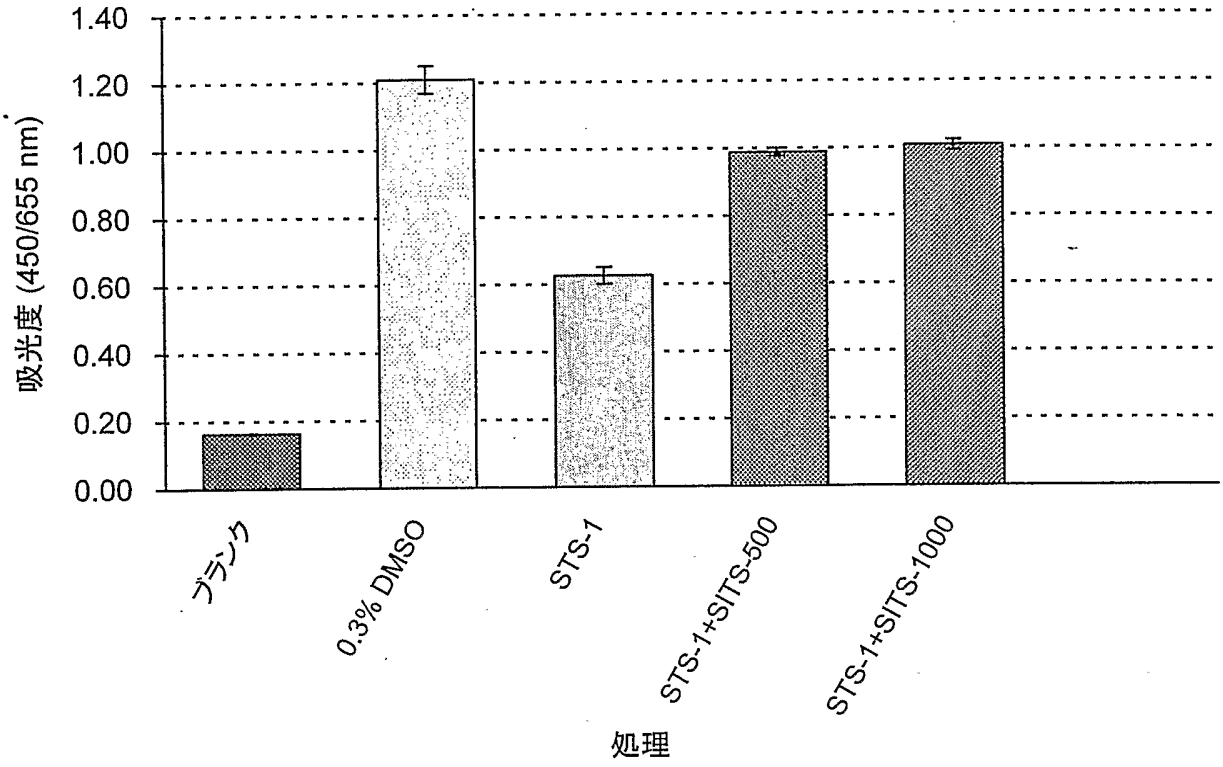

1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
吸光度 (450/655 nm)
ブランク
0.3% DMSO
STS-1
STS-1+SITS-500
STS-1+SITS-1000
処理

図2

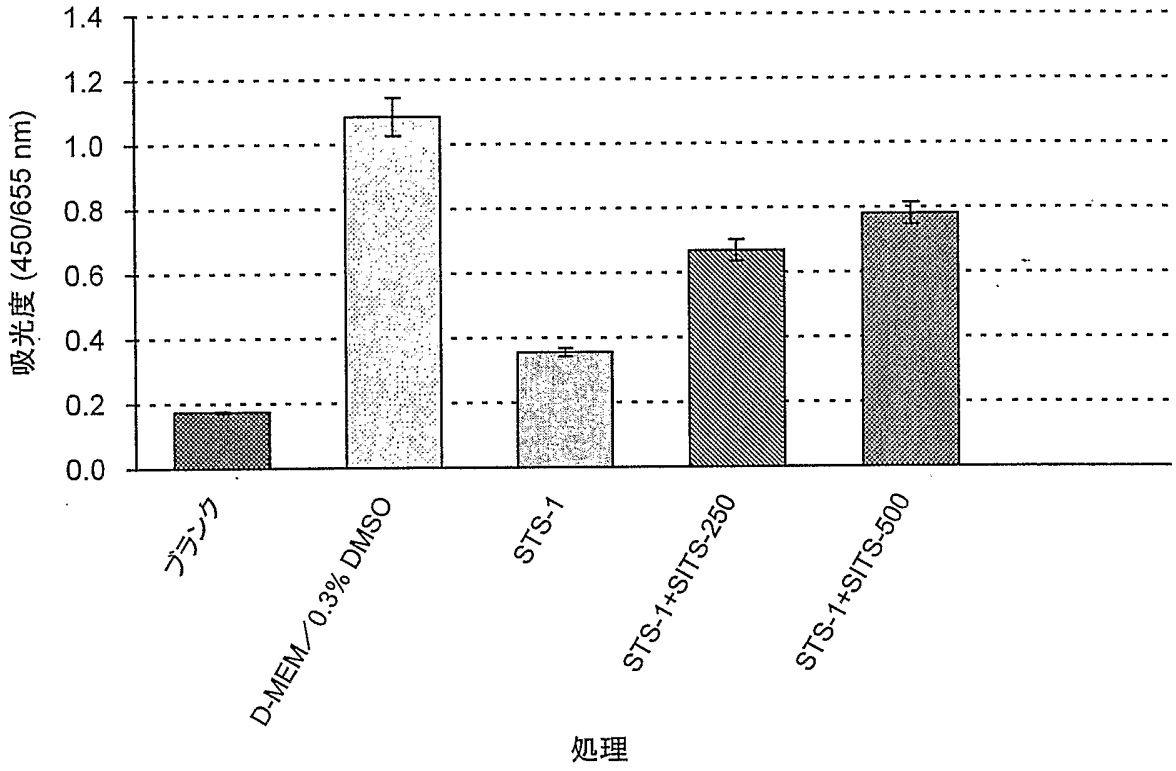

1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
吸光度 (450/655 nm)
ブランク
D-MEM／0.3% DMSO
STS-1
STS-1+SITS-250
STS-1+SITS-500
処理

図3

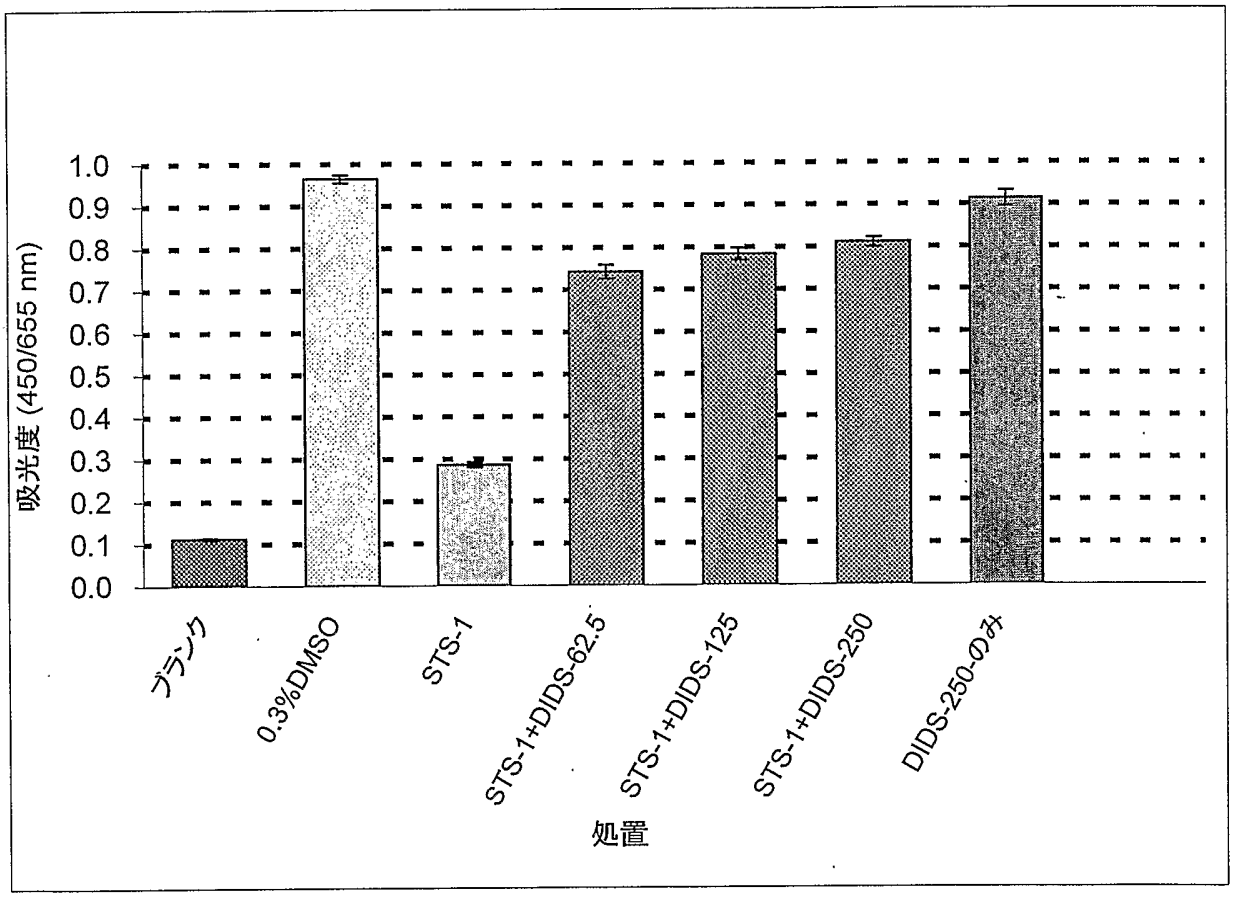

吸光度 (450/655 nm)
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
ブランク
0.3%DMSO
STS-1
STS-1+DIDS-62.5
STS-1+DIDS-125
STS-1+DIDS-250
DIDS-250-のみ
処置

図4

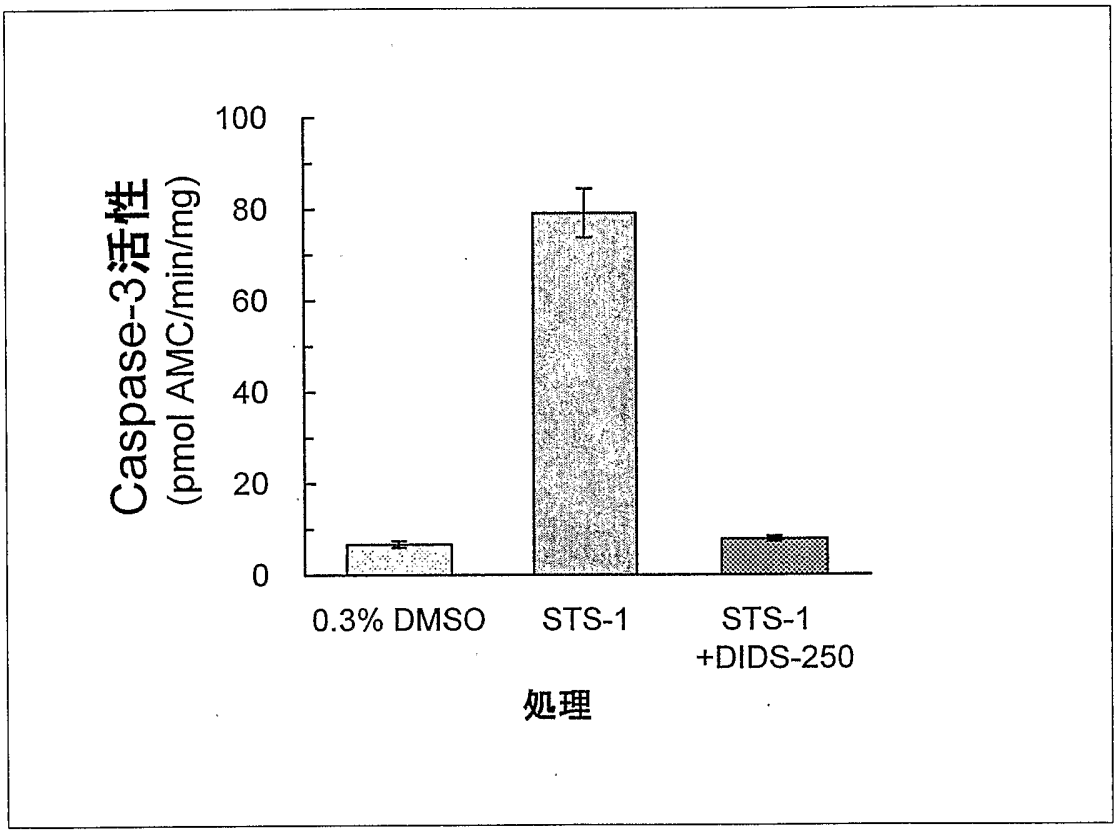

Caspase-3活性
(pmol AMC/min/mg)
100
80
60
40
20
0
0.3% DMSO
STS-1
STS-1
+DIDS-250
処理

図5

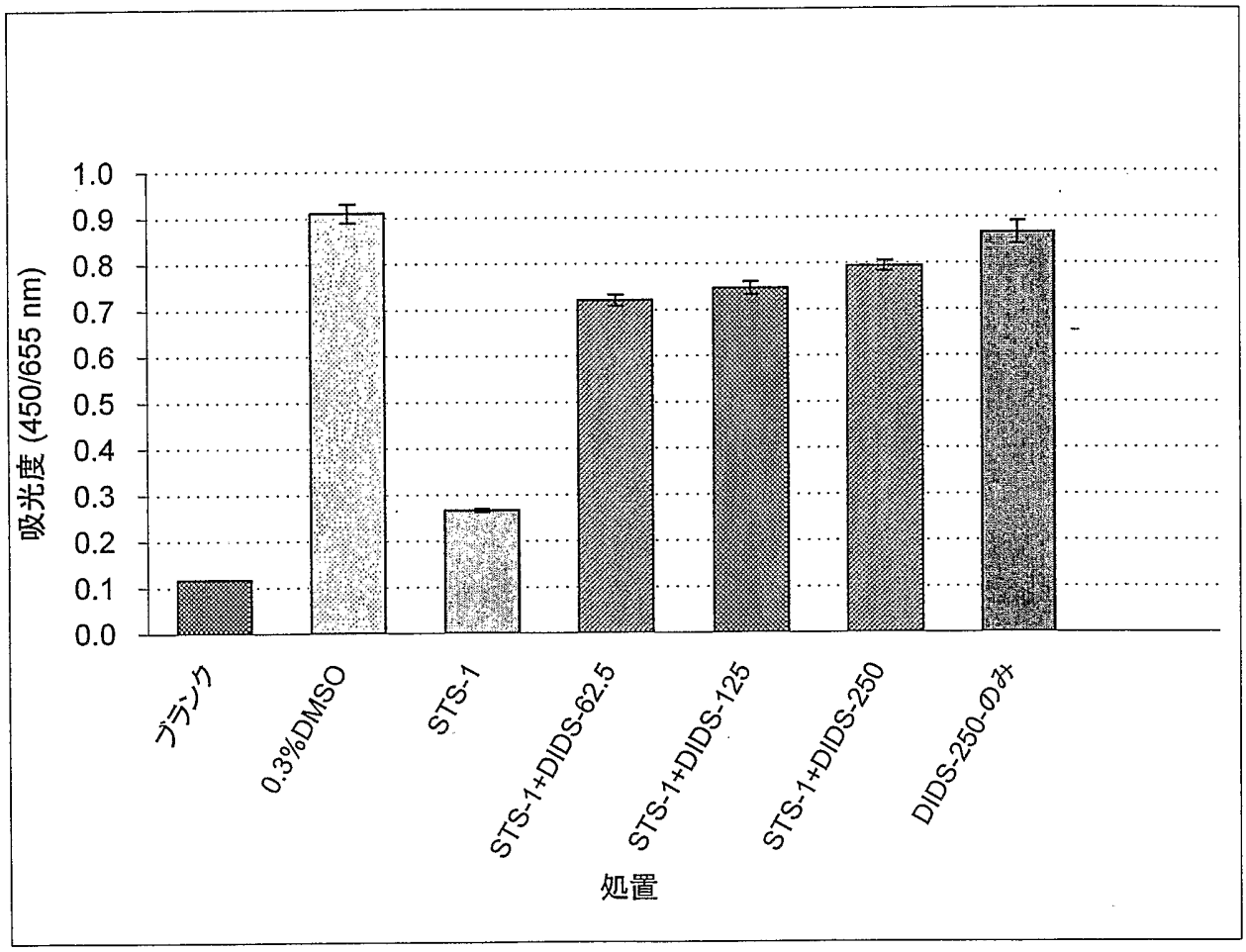

吸光度 (450/655 nm)
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
ブランク
0.3%DMSO
STS-1
STS-1+DIDS-62.5
STS-1+DIDS-125
STS-1+DIDS-250
DIDS-250-のみ
処置

図6

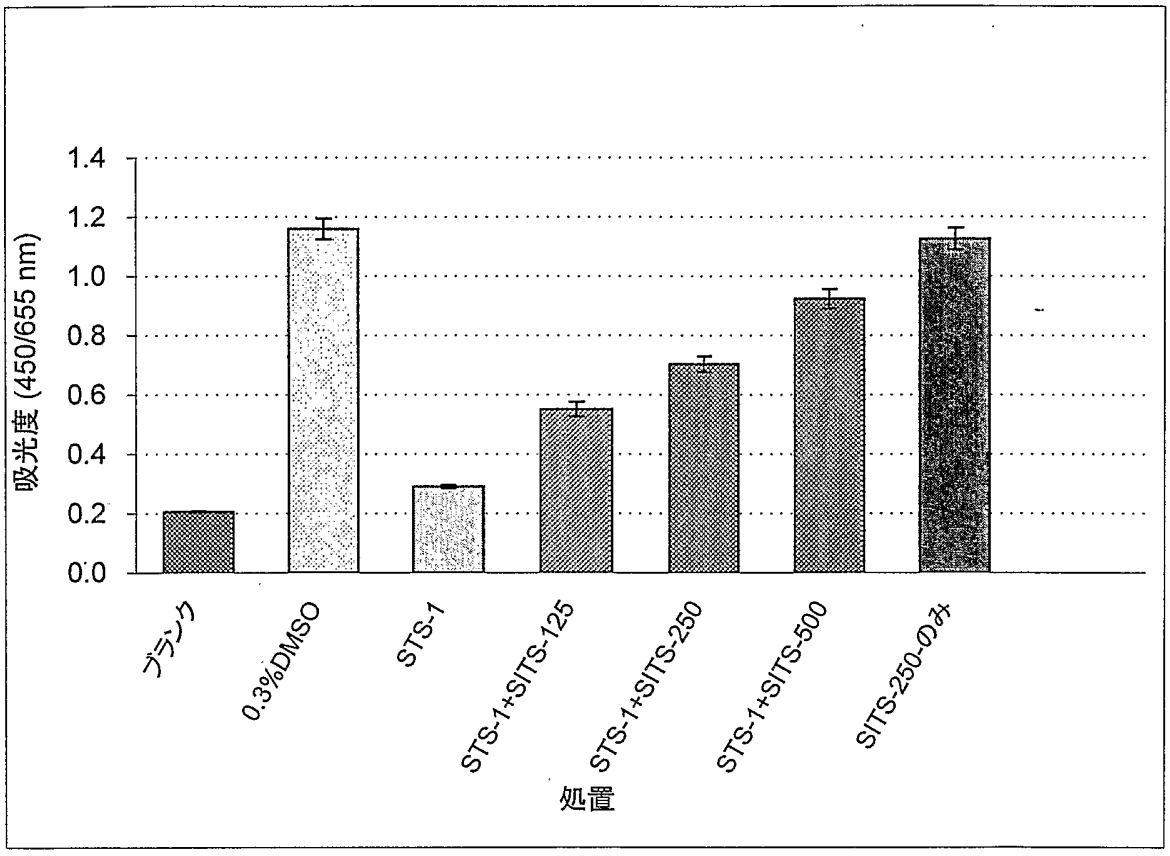

吸光度 (450/655 nm)
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
ブランク
0.3%DMSO
STS-1
STS-1+SITS-125
STS-1+SITS-250
STS-1+SITS-500
SITS-250-のみ
処置

図7

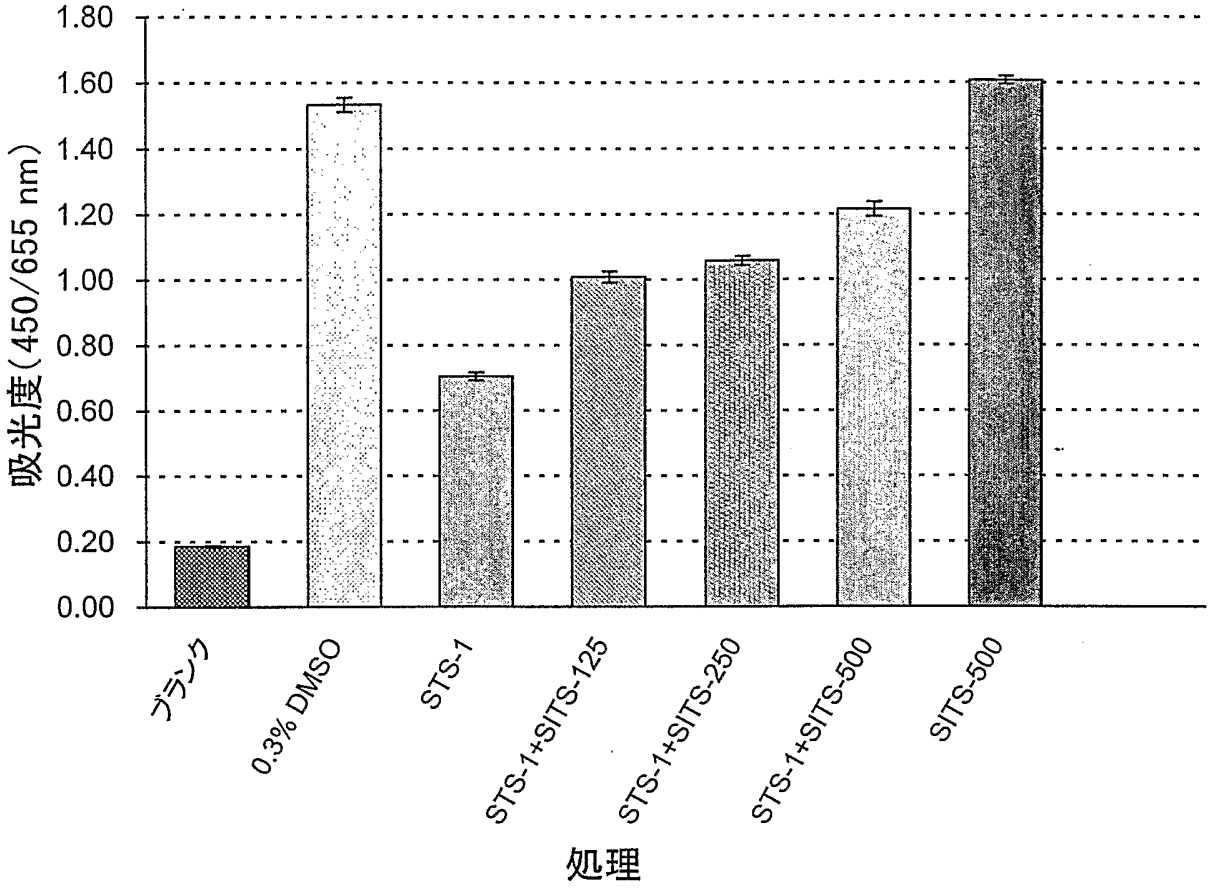

1.80
1.60
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
吸光度(450/655 nm)
ブランク
0.3% DMSO
STS-1
STS-1+SITS-125
STS-1+SITS-250
STS-1+SITS-500
SITS-500
処理

図8

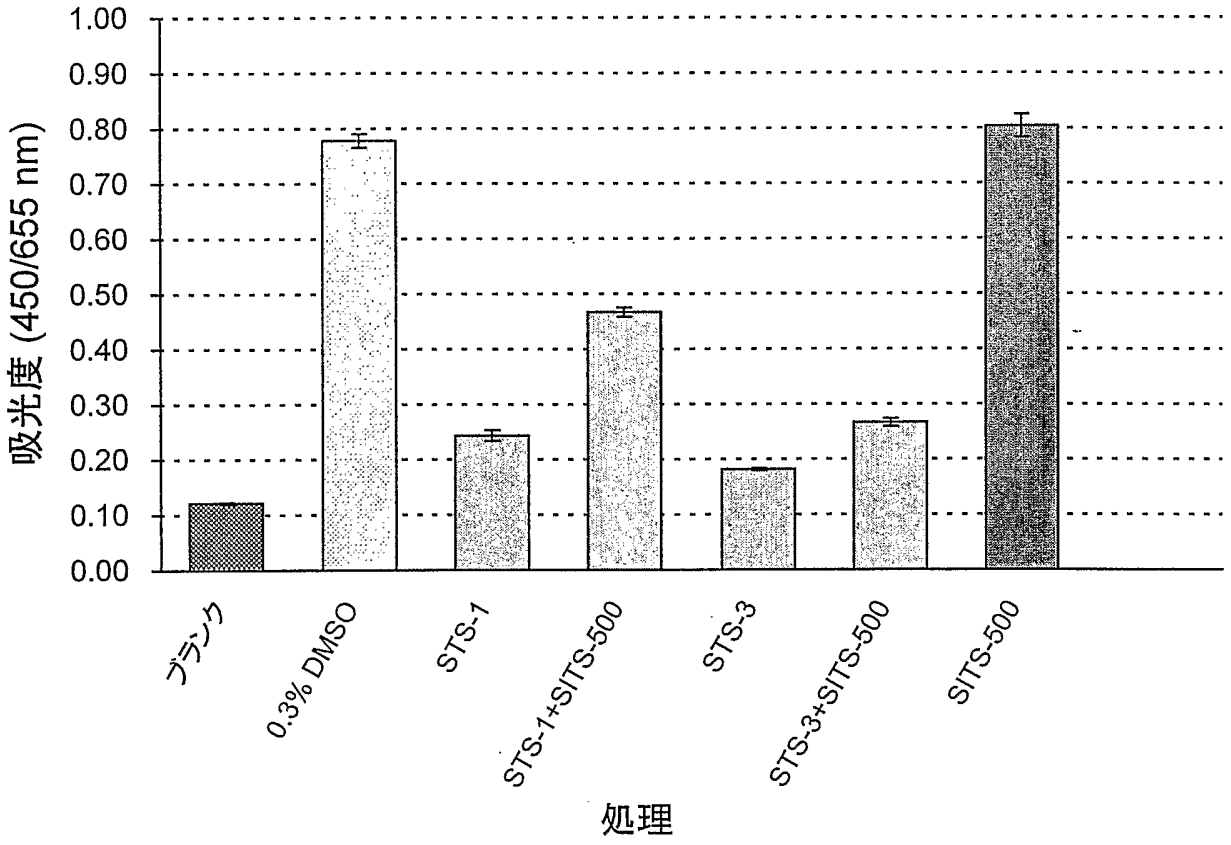

1.00
0.90
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
吸光度 (450/655 nm)
ブランク
0.3% DMSO
STS-1
STS-1+SITS-500
STS-3
STS-3+SITS-500
SITS-500
処理

図9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/08069

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] G01N33/15, G01N33/50

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl[7] G01N33/15, G01N33/50-33/98

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2002
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2002	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2002

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Yasunobu OKADA, "Saibo Yoseki Chosetsu Hatan to Apoptosis-Chloride Channel no Yakuwari", Cell Technology, 22 August, 2000 (22.08.00), Vol.19, No.9, pages 1334 to 1337	1-7
Y	Keisuke FUKUO, "Kyokessei Shinshikkan to Apoptosis", Journal of Circulation, 01 April, 2000 (01.04.00), Vol.21, No.4, pages 15 to 21	1-7
Y	Genzo TAKEMURA, "Kyokessei Shinshikkan ni okeru Saiboshi to Apoptosis", Circulation Control, 30 September, 1999 (30.09.99), Vol.20, No.3, pages 249 to 254	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 05 November, 2002 (05.11.02)	Date of mailing of the international search report 19 November, 2002 (19.11.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

国際調査報告	国際出願番号　PCT／JP02／08069

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl[7]　　G01N33／15, G01N33／50

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl[7]　　G01N33／15, G01N33／50－33／98

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922－1996年
日本国公開実用新案公報	1971－2002年
日本国登録実用新案公報	1994－2002年
日本国実用新案登録公報	1996－2002年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JICSTファイル

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y	岡田泰伸，細胞容積調節破綻とアポトーシス-クロライドチャネルの役割-，細胞工学，2000.08.22，第19巻，第9号，p1334-1337	1－7
Y	福尾恵介，虚血性心疾患とアポトーシス，循環，2000.04.01，第21巻，第4号，p15-21	1－7
Y	竹村元三，虚血性心疾患における細胞死とアポトーシス，循環制御，1999.09.30，第20巻，第3号，p249-254	1－7

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
05．11．02	19.11.02

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	
日本国特許庁（ISA／JP） 郵便番号100－8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	松本　征二	2J　9212
	電話番号　03－3581－1101　内線　3250	