

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4430403号
(P4430403)

(45) 発行日 平成22年3月10日 (2010. 3. 10)

(24) 登録日 平成21年12月25日 (2009. 12. 25)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 38/00 (2006. 01)

A 6 1 K 37/02 Z N A

A 6 1 K 31/517 (2006. 01)

A 6 1 K 31/517

A 6 1 K 38/21 (2006. 01)

A 6 1 K 37/66 G

A 6 1 K 45/00 (2006. 01)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 31/513 (2006. 01)

A 6 1 K 31/513

請求項の数 25 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-581800 (P2003-581800)
 (86) (22) 出願日 平成15年3月26日 (2003. 3. 26)
 (65) 公表番号 特表2005-530720 (P2005-530720A)
 (43) 公表日 平成17年10月13日 (2005. 10. 13)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2003/050080
 (87) 国際公開番号 W02003/084560
 (87) 国際公開日 平成15年10月16日 (2003. 10. 16)
 審査請求日 平成18年1月13日 (2006. 1. 13)
 (31) 優先権主張番号 02100364.5
 (32) 優先日 平成14年4月10日 (2002. 4. 10)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 309025524
 メルク セローノ ソシエテ アノニム
 スイス国, ボー, 1 2 6 7 クワンサン,
 サントル アンデュストリエル
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次
 (74) 代理人 100111903
 弁理士 永坂 友康

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 線維化疾患の治療および／または予防のためのオステオプロテゲリンの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

線維化疾患の治療および／または予防のための医薬品を製造するための物質の使用であって、ここで、当該物質は、

a) 配列番号 2 または配列番号 4 を含んでなるポリペプチド；

b) 配列番号 2 または配列番号 4 に記載のアミノ酸 2 2 ~ 4 0 1 を含んでなるポリペプチド；

c) アミノ酸配列が (a) ~ (b) における配列のいずれかに対して少なくとも 9 0 % の同一性を有する、(a) ~ (b) のいずれかの突然変異タンパク質；

d) アミノ酸配列の 1 又は数個の変化が、(a) ~ (b) におけるアミノ酸配列に対する保存的アミノ酸置換である、(a) ~ (b) のいずれかの突然変異タンパク質；及び

h) (a) ~ (d) のいずれかの塩または F c 融合物、

からなる群から選択され、ここで、線維化疾患は、強皮症；肝線維症；肝硬変；腎線維症；肺線維症；特発性肺線維症；皮膚線維症；デュピュイトラン拘縮；ケロイド；瘢痕形成；又は膵臓の線維症である、使用。

【請求項 2】

線維化疾患が強皮症である、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

前記物質が単量体または二量体である、請求項 1 又は 2 に記載の使用。

【請求項 4】

10

20

前記物質が1つもしくはそれ以上の部位でグリコシル化される、請求項1～3のいずれか一項に記載の使用。

【請求項5】

前記融合タンパク質が免疫グロブリン(Ig)融合物を含んでなる、請求項1～4のいずれか一項に記載の使用。

【請求項6】

前記Ig融合物がFc融合物である、請求項5に記載の使用。

【請求項7】

線維化疾患の治療および/または予防のための医薬品を製造するための核酸分子の使用であって、ここで、当該核酸分子は、

a) 配列番号2または配列番号4を含んでなるポリペプチド；

b) 配列番号2または配列番号4に記載のアミノ酸22～401を含んでなるポリペプチド；

c) アミノ酸配列が(a)～(b)における配列のいずれかに対して少なくとも90%の同一性を有する、(a)～(b)のいずれかの突然変異タンパク質；

d) アミノ酸配列の1又は数個の変化が、(a)～(b)におけるアミノ酸配列に対する保守的アミノ酸置換である、(a)～(b)のいずれかの突然変異タンパク質；及び

h) (a)～(d)のいずれかのFc融合物、

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドをコードする核酸配列を含んでなり、ここで、線維化疾患は、強皮症；肝線維症；肝硬変；腎線維症；肺線維症；特発性肺線維症；皮膚線維症；デュピュイトラン拘縮；ケロイド；瘢痕形成；又は膵臓の線維症である、使用。

【請求項8】

線維化疾患が強皮症である、請求項7に記載の使用。

【請求項9】

前記核酸分子は発現ベクター配列を含んでなる、請求項7又は8に記載の使用。

【請求項10】

前記ベクター配列が遺伝子治療ベクター配列である、請求項9に記載の使用。

【請求項11】

強皮症；肝線維症；肝硬変；腎線維症；肺線維症；特発性肺線維症；皮膚線維症；デュピュイトラン拘縮；ケロイド；瘢痕形成；及び膵臓の線維症からなる群から選択される線維化疾患の治療および/または予防のための医薬品を調製するために、細胞における請求項1に記載のポリペプチドの内因性産生を誘導ならびに/あるいは増強するためのベクターの使用。

【請求項12】

線維化疾患が強皮症である、請求項11記載の使用。

【請求項13】

強皮症；肝線維症；肝硬変；腎線維症；肺線維症；特発性肺線維症；皮膚線維症；デュピュイトラン拘縮；ケロイド；瘢痕形成；及び膵臓の線維症からなる群から選択される線維化疾患の治療および/または予防のための医薬品を調製するために、請求項7～9のいずれか一項に記載の核酸分子を含んでなる細胞の使用。

【請求項14】

線維化疾患が強皮症である、請求項13記載の使用。

【請求項15】

強皮症；肝線維症；肝硬変；腎線維症；肺線維症；特発性肺線維症；皮膚線維症；デュピュイトラン拘縮；ケロイド；瘢痕形成；及び膵臓の線維症からなる群から選択される線維化疾患の治療および/または予防のための医薬品を製造するために、請求項1～6のいずれか一項に記載の物質を発現する細胞の使用。

【請求項16】

線維化疾患が強皮症である、請求項15記載の使用。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

強皮症；肝線維症；肝硬変；腎線維症；肺線維症；特発性肺線維症；皮膚線維症；デュピュイトラン拘縮；ケロイド；癬痕形成；及び脾臓の線維症からなる群から選択される線維化疾患の治療および／または予防のための医薬品を製造するために、請求項 1～6 のいずれか一項に記載のポリペプチドを産生するために遺伝的に改変されている細胞の使用。

【請求項 18】

線維化疾患が強皮症である、請求項 17 記載の使用。

【請求項 19】

前記医薬品が、同時、連続、または個別使用のために、インターフェロンをさらに含んでなる、請求項 1～18 のいずれか一項に記載の使用。

10

【請求項 20】

前記インターフェロンがインターフェロン-βである、請求項 19 に記載の使用。

【請求項 21】

前記医薬品が、同時、連続、または個別使用のために、腫瘍壊死因子(TNF)アンタゴニストをさらに含んでなる、請求項 1～20 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 22】

前記TNFアンタゴニストがTBPIおよび／またはTBPIIである、請求項 21 に記載の使用。

【請求項 23】

前記医薬品が、同時、連続、または個別使用のために、抗強皮症薬を含んでなる、請求項 1～22 のいずれか一項に記載の使用。

20

【請求項 24】

前記抗強皮症薬が、ハロフジノン、ACE阻害薬、カルシウムチャンネル遮断薬、プロトンポンプ阻害薬、NSAID阻害薬、COX阻害薬、コルチコステロイド、テトラサイクリン、ペントキシフィリン、ブシラミン、ゲラニルゲラニル転移酵素阻害薬、ロツテルリン、プロリル-4-ヒドロキシラーゼ阻害薬、c-プロテイナーゼ阻害薬、リシルオキシダーゼ阻害薬、レラキシニン、ハロフジノン、プロスタグランジン、プロスタサイクリン、エンドセリン-1、一酸化窒素、アンジオテンシンII阻害薬、抗酸化剤またはSARP-1よりなる群から選択される、請求項 23 に記載の使用。

【請求項 25】

30

請求項 1～24 のいずれか一項に記載の使用により製造された、強皮症；肝線維症；肝硬変；腎線維症；肺線維症；特発性肺線維症；皮膚線維症；デュピュイトラン拘縮；ケロイド；癬痕形成；及び脾臓の線維症からなる群から選択される線維化疾患の治療および／または予防のための医薬品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、線維化疾患および結合組織障害の分野に関する。より具体的には、本発明は、線維化疾患、特に強皮症の治療および／または予防のためのオステオプロテゲリンの使用に関する。オステオプロテゲリンとインターフェロン、TNFアンタゴニストまたはSARP-1などのさらなる抗線維化剤との組み合わせもまた、本発明の範囲内にある。

40

【背景技術】

【0002】

線維症は、例えば、腎臓、心臓、肺、胃および関節を含む内蔵におけるコラーゲンの過剰産生に関する状態である。

【0003】

肺線維症は、線維化疾患の中でも特に多い疾患である。特発性肺線維症(IPF)は、進行性線維症を伴う病因不明の肺胞壁の慢性炎症を特徴とする。IPF、または原因不明の線維性肺胞炎は、特発性間質性肺疾患の原因の50～60%を占める。

【0004】

50

通常型間質性肺炎（UIP）、間質性肺炎の特定の組織病理学的パターンは、IPFの肺生検に見出される古典的なパターンである。低倍率では、組織は不均一性を呈し、正常肺の改変領域、間質性炎症、線維症、および蜂巣状を伴う。間質性炎症は、II型肺胞細胞の過形成に関連するリンパ球、形質細胞、および組織球の肺中隔浸潤からなる。線維化区域は、主に密な無細胞コラーゲンからなるが、早期および進行中の疾患の部位である増殖線維芽細胞の散在巣（線維芽細胞巣）もまた、通常、肺胞内の位置に認めることができる。蜂巣領域は、しばしば気管支上皮で裏打ちされ、粘膜で満たされた嚢胞性線維空隙からなる。好中球は粘膜内にプールし得る。平滑筋過形成は、しばしば線維症および蜂巣の領域に生じる。胸膜下および傍隔壁での分布、不統一な特性、および一過的異質性は、UIPを同定するのに最も有用な特徴である。

10

【0005】

膠原病（例えば、RA、SLE、全身性進行性硬化症、混合型結合組織病、糖尿病）、塵肺（例えば、石綿症）、放射線障害、および所定の薬物誘導性肺疾患（例えば、ニトロフラントインによる）では、間質性炎症および線維症と同一のパターンが生じる。

【0006】

IPFの臨床経過は進行性であり；生存中央値は診断後4～6年である。プレドニゾンは、IPFの症例における通常の治療である。治療に対する応答は様々であるが、瘢痕形成が優位を占める前のより細胞段階の早期疾患の患者は、コルチコステロイドまたは細胞障害治療により改善する可能性が高い。支持療法および待機療法には、低酸素症を軽減するための高濃度のO₂が含まれ、細菌感染が生じる場合は抗生物質が含まれる。末期段階の肺疾患を有する患者では、肺移植が成功している。

20

【0007】

肺の線維症は、細胞外マトリックスの産生と分解との間の不均衡から生じ、既存線維の崩壊および濃縮によって顕著になる肝臓における結合組織の蓄積に関する。

【0008】

肝線維症は肝細胞壊死または損傷に対する一般的な応答であり、広範な因子、例えば、肝ホメオスタシスを攪乱する任意のプロセス（特に炎症、毒性損傷、または肝血流の改変）および肝臓の感染症（ウイルス、細菌、真菌、および寄生物）によって誘導され得る。先天的代謝障害から生じる多数の蓄積障害は、脂質異常（ゴーシェ病（Gaucher's disease））；糖原病（特に、III、IV、VI、IX、およびX型）；α₁-アンチトリプシン欠損症；鉄過剰症（ヘモクロマトーシス）および銅蓄積症（ウィルソン病（Wilson's disease））などに見られるような外因性物質の蓄積；毒性代謝物の蓄積（チロシン血症、フルクトース血症およびガラクトース血症）；ならびにペルオキシソーム障害（ツェルバーガー症候群（Zellweger syndrome））を含む線維症にしばしば関連する。多数の化学物質および薬物、特に、アルコール、メトトレキサート、イソニアジド、オキシフェニサチン、メチルドーパ、クロロプロマジン、トルブタミド、およびアミオダロンは線維症を生じる。肝循環障害（例えば、慢性心不全、バッド-キアリ症候群（Budd-Chiari syndrome）、静脈閉塞性疾患、門脈血栓症）および胆汁流に対する慢性閉塞は線維症をもたらし得る。最後に、先天的線維症は常染色体劣性形成異常である。

30

40

【0009】

正常な肝臓は、肝細胞ならびにコラーゲン（主にI、III、およびIV型）ならびに糖タンパク質（例えば、フィブネクチン、ラミニン）およびいくらかのプロテオグリカン（例えば、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヒアルロン酸）を含む非コラーゲンタンパク質からなる細胞外マトリックス内に分布する洞様毛細血管から構成される。通常、門脈路においてのみ見出される線維芽細胞は、コラーゲン、大きな糖タンパク質、およびプロテオグリカンを産生することができる。

【0010】

他の肝細胞（特に、肝細胞ならびに脂肪摂取クッパー（Kupffer）細胞および内皮細胞）もまた、細胞外マトリックス成分を産生することができる。ディッセ（Diss

50

e) 腔の洞様毛細血管内皮の下側に位置する脂肪摂取細胞は、増殖して過剰な細胞外マトリックスを産生することが可能な線維芽細胞の前駆体である。コラーゲンの能動的沈着からの線維症の発症は、肝細胞損傷、特に壊死および炎症細胞の結果である。これらの細胞から放出される正確な因子は不明であるが、1種もしくはそれ以上のサイトカインまたは脂質過酸化の産物が有望である。クッパー細胞および活性型マクロファージは炎症性サイトカインを産生する。新しい線維芽細胞が壊死性肝細胞の周囲に形成し；コラーゲン合成の増加により瘢痕形成が生じる。線維症は、能動的線維形成および正常または改変されたコラーゲンの分解障害から生じ得る。脂肪摂取細胞、クッパー細胞および内皮細胞は、I型コラーゲン、いくつかのプロテオグリカン、および変性したコラーゲンの浄化において重要である。これらの細胞の活性における変化は、線維症の程度を加減し得る。組織病理学者にとっては、線維性の組織は、既存線維の受動的崩壊および濃縮からより明らかである。

10

【0011】

従って、コラーゲンの合成の増加または分解の減少は、肝機能に影響を及ぼす過剰な結合組織の能動的沈着を生じる：(1) 細胞周囲性線維化により細胞の栄養物摂取が損なわれ、肝細胞萎縮が生じる。(2) ディッセ腔内では、線維組織が洞様毛細血管の周囲に蓄積し、血液から肝細胞への物質の自由な通過を妨害する。(3) 肝細静脈および門脈路周囲の線維化は肝血流を妨害する。肝臓の静脈抵抗は、門脈分枝から洞様毛細血管および最終的に肝静脈にかけて増加する。3つのすべての経路が関与し得る。

【0012】

20

門脈と中心静脈とを連結する線維結合もまた、吻合管を促進する：正常肝細胞を迂回する動脈血は遠心性肝静脈に短絡され、これは肝機能をさらに損ない、肝細胞壊死を顕著にし得る。これらの過程が存在する程度は、例えば先天性肝線維化における肝機能障害の大きさを決定し、大きな線維結合は主に門領域に関与するが、通常、肝実質までには及ばない。従って、先天性肝線維症は、肝細胞機能が保存された門脈圧亢進症として存在する。

【0013】

強皮症は、皮膚および臓器の線維症を特徴とする結合組織疾患であり、器官不全および死をもたらす(ブラック(Black)ら、1998；クレメンズ(Clements)およびフルスト(Furst)、1996)。強皮症は、広範な徴候および多様な治療結果を呈する。該強皮症は、限局型強皮症、全身性硬化症、強皮症様障害、および皮膚硬化を欠く強皮症(Sine scleroderma)を含んでなる(スミス(Smith)、2000)。限局型強皮症は線維症および皮膚に限局した徴候に関連する稀な皮膚疾患であるが、全身性硬化症は、臓器に係わる様々なリスクおよび様々な程度の皮膚疾患を伴う多系疾患である。全身性硬化症はびまん性または限局性であり得る。限局性全身性硬化症もまた、CREST(石灰沈着症、レイノー食道機能障害、手指硬化症、毛細管拡張)と呼ばれる。強皮症様障害は、産業環境への暴露に関連すると考えられている。皮膚硬化を欠く(Sine)疾患では、皮膚の変化を伴わない臓器への関連が認められる。

30

【0014】

強皮症、特に全身性硬化症の主な徴候は、不適切な過剰なコラーゲン合成および沈着、内皮機能障害、痙攣、虚脱ならびに線維症による閉塞である。

40

【0015】

強皮症は、100万人に約19症例の安定した発症率を有する稀な疾患である。強皮症の原因は不明である。しかし、遺伝的素因は重要である。異常は自己免疫ならびに内皮細胞および線維芽細胞機能の改変に関与する。実際、全身性硬化症は、おそらく最も重度な自己免疫疾患であり、診断5年以内の死亡率が50%であることが報告されている(シルマン(Silman)、1991)。

【0016】

診断上重要な臨床パラメータは、中手指節関節に近接での皮膚の肥厚である。レイノー(Raynaud)現象は、強皮症の頻度の高い、ほとんど普遍的な成分である。該レイノー現象は、低温暴露時の皮膚の色の変化によって診断される。虚血および皮膚肥厚は

50

、レイノー (Raynaud) 疾患の徴候である。

【0017】

いくらかの根本的な生物学的プロセスは該疾患の開始、重症度および進行に関係し、血管機能障害、内細胞活性化および損傷、白血球蓄積、自己免疫産生ならびに決定的に死をもたらす得る制御されていない線維化応答を含む (クレメンズ (Clements) およびフルスト (Furst)、1996)。線維芽細胞は、本疾患の病因において中枢的役割を果たす。強皮症患者から得られる初代線維芽細胞は、インビボで認められる疾患の多くの特徴的特性、顕著に増加した細胞外マトリックス合成ならびに特にコラーゲンおよびフィブロネクチンの沈着、ならびに TFGβ および CTGF などの改変された成長因子およびサイトカイン産生を示す (ストレロウ (Strehlow) およびコーン (Korn) 10、1998 ならびにレロイ (LeRoy)、1974)。

【0018】

強皮症の治療方法は認められていない。革新的であるがしかしリスクの高い療法として、幹細胞の自家移植が提唱された (マルチニ (Martini) ら、1999)。特に、線維化プロセスを標的とする強皮症の治療法は、現在のところ認められていない (ウィグレイ (Wigley) およびボーリング (Bolling)、2000)。

【0019】

疾患のリスクおよび強皮症の進行に関連する遺伝子を同定すれば、疾患の様々な段階での治療処置のための有効な戦略を開発することができ得る。

【0020】

オステオプロテグリン (OPG) は、1997年に線維芽細胞から分泌される新規のサイトカインとして同定された (シモネット (Simonet) ら、1997)。ヒト OPG は 401 アミノ酸タンパク質であり、グルタミン酸 22 の前で切断され、380 アミノ酸成熟タンパク質を生じる 21 アミノ酸のシグナルペプチドを含有する。従って、OPG は可溶性タンパク質である。該 OPG は TNF 受容体ファミリーのメンバーであり (モリナガ (Morinaga) ら、1998、ヤスダ (Yasuda) ら、1998)、N 末端部分に 4 つのシステインリッチ TNFR 様ドメインを含んでなる (シモネット (Simonet) ら、1997)。OPG は、骨の発達において役割を果たすことが示されており、OPG 遺伝子を欠くマウスは、骨粗鬆症表現型および顕著な骨格異常を有する (ミン (Min) ら、2000)。 30

【0021】

骨芽細胞および骨髄間質細胞から産生されるオステオプロテグリンは、膜貫通ドメインを欠き、直接的シグナル伝達能を有さない分泌されたデコイ受容体として作用する。OPG は、その天然のリガンドであり、RANKL (NF-κB リガンドの受容体アクチベーター) としても知られるオステオプロテグリンリガンド (OPGL) に結合することによって作用する。OPG と OPGL 結合との間の結合は、OPG がその同族受容体であり、破骨細胞の分化、活性化および生存に極めて重大な破骨細胞受容体である RANK に作用することを妨げる。

【0022】

ヒト OPG は、TNFR ファミリーのメンバーであり、5 つのエキソンからなり、29 kb に及ぶゲノムを有する単一コピー遺伝子である (シモネット (Simonet) ら、1997)。組換え OPG は、単量体および二量体型で存在し、見かけの分子量がそれぞれ 55 および 110 kDa である (シモネット (Simonet) ら、1997)。システイン 185 に対する N 末端ドメインをトランケーションすると、おそらく、TNFR 様ドメインの SS3 ジスルフィド結合の分裂によって不活性化が生じるが、アミノ酸 194 に対するタンパク質の C 末端部分をトランケーションしても生物学的活性は変わらない。従って、OPG の N 末端 TNFR 様ドメインは、破骨細胞形成を妨げるのに十分である (シモネット (Simonet) ら、1997)。 40

【0023】

トランスジェニックマウスで OPG が過剰産生されると、破骨細胞のほぼすべてが欠乏 50

することに付随して重大な大理石骨症が生じる。対照的に、マウスでOPG遺伝子が除去されると、重度の骨粗鬆症が生じる。OPGLまたはRANKが除去される場合でも重大な大理石骨症が生じ、これは、骨再吸収の調節においてこれらのタンパク質が重要な生理学的役割を果たすことを示す。骨芽細胞および間質細胞からのOPGならびにOPGLの分泌は、多数のホルモンおよびサイトカインによって、しばしば、相反する方法で調節される。OPGおよびOPGL産生の相対レベルは、骨再吸収の程度を究極的に指令すると考えられる。過剰のOPGLは骨再吸収を増加するが、過剰のOPGは再吸収を阻害する。組換えOPGは、インビトロおよびインビボで破骨細胞を刺激するすべての因子の効果を実質的に遮断する。OPGはまた、卵巣摘出誘導性骨粗鬆症、悪性腫瘍の体液性高カルシウム血症、および実験的骨転移を含む多様な動物疾患モデルにおいて骨再吸収を阻害する。従って、OPGは、過剰な破骨活性に関連する疾患について有効な治療選択肢を示すことができる(コステヌイック(Kosteniuk)およびシャルハウブ(Shalhoub)、2001)。

10

【0024】

しかし、オステオプロテゲリンが線維化疾患に関与していることについては未だ示唆されていない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0025】

本発明は、オステオプロテゲリンの投与により、樹立した肺線維症の動物モデルの疾患が著しく改善されるという研究結果に基づく。肺線維症は、強皮症の徴候の1つである。

20

【0026】

従って、本発明の第1の目的は、線維化疾患、特に強皮症の治療および/または予防のための医薬品を調製するために、オステオプロテゲリンを使用することである。本発明の第2の目的は、線維化疾患、特に全身性硬化症の治療および/または予防のための医薬品を調製するために、オステオプロテゲリンを発現する細胞、もしくはオステオプロテゲリンのコード配列を含んでなる発現ベクターを使用することである。オステオプロテゲリンおよびハロフジノンなどのさらなる抗線維化薬を含んでなる薬学的組成物、ならびにオステオプロテゲリンをヒト身体に投与することを含んでなる治療方法もまた、本発明の請求の範囲内にある。

30

【課題を解決するための手段】

【0027】

本発明に従って、DNA遺伝子フィルターマイクロアレイ技術を使用し、全身性硬化症(強皮症)患者から得られた正常皮膚線維芽細胞と比較して、同じ疾患から得られた線維化病変由来の皮膚線維芽細胞において特異に発現した遺伝子を同定した。強皮症線維芽細胞において一貫して負に調節された1つの遺伝子は、破骨細胞形成阻害因子とも呼ばれるオステオプロテゲリン(OPG)であった。異常な線維芽細胞は、試験した9例中7例において、正常線維芽細胞と比較して有意に低いレベルのOPG mRNAを発現した。これらの結果をリアルタイムPCR分析によって確認した。さらに、強皮症患者由来の異常皮膚の全生検標本から単離された総RNAのリアルタイムRT-PCR分析は、臨床的に正常、年齢、性別および解剖学的部位が一致したコントロール生検と比較して、低いレベルのOPG mRNAを示した。病変線維芽細胞のOPGタンパク質もまた、同じ患者から単離された正常線維芽細胞と比較して、減少した。インビトロでは、OPGは、OPG cDNAによる線維芽細胞のトランスフェクション後または組換えタンパク質による処置後にTGFβ仲介コラーゲン合成を減少することが可能である。OPGのさらなるインビトロ活性は、TGFβ誘導性結合組織成長因子(CTGF)発現を阻害するはずである。CTGFは通常、線維芽細胞において、細胞外マトリックス成分の合成を誘導する。

40

【0028】

これらのインビトロデータは、樹立された動物モデルのインビボデータによってさらに支持された。オステオプロテゲリンを投与すると、ブレオマイシン誘導性肺線維症モデル

50

の肺線維症が減少し、コラーゲン沈着が低下する。組織学的レベルでは、オステオプロテゲリン処置した動物の肺は、生来の未処置マウスの肺に類似する。

【 0 0 2 9 】

従って、本発明は、線維化疾患の治療および／または予防のための医薬品を製造するための物質の使用であって、ここで、物質は：

- a) 配列番号 2 または配列番号 4 を含んでなるポリペプチド；
- b) 配列番号 2 または配列番号 4 に記載のアミノ酸 2 2 ~ 4 0 1 を含んでなるポリペプチド；
- c) オステオプロテゲリンの 1、2、3 または 4 つのシステインリッチドメインを含んでなるポリペプチド；
- d) 配列番号 2 または配列番号 4 に記載のアミノ酸 2 2 ~ 1 9 4 を含んでなるポリペプチド；
- e) アミノ酸配列が (a) ~ (d) における配列の少なくとも 1 つに対して少なくとも 4 0 % または 5 0 % または 6 0 % または 7 0 % または 8 0 % または 9 0 % の同一性を有する、(a) ~ (d) のいずれかの突然変異タンパク質；
- f) 中程度にストリンジェントな条件下かまたは高度にストリンジェントな条件下で (a) ~ (d) のいずれかをコードする DNA 配列の相補体にハイブリダイズする DNA 配列によってコードされる、(a) ~ (d) のいずれかの突然変異タンパク質；
- g) アミノ酸配列の任意の変化は、(a) ~ (d) におけるアミノ酸配列に対する保存的アミノ酸置換である、(a) ~ (d) のいずれかの突然変異タンパク質；
- h) (a) ~ (g) のいずれかの塩またはイソ型、融合タンパク質、機能性誘導体、活性フラクションもしくは環状置換型誘導体、よりなる群から選択される上記使用に関する。

【 0 0 3 0 】

当業者であれば、本発明に従って、内因性オステオプロテゲリンの放出を刺激するかまたは該内因性オステオプロテゲリンの活性を増強する物質は、線維化疾患、特に強皮症の治療および／または予防にも同様に使用することができることを理解するであろう。前記物質は、成熟オステオプロテゲリン自体であっても、または O P G L に結合し、従って、R A N K に結合する O P G L を妨害し、R A N K を介するシグナル伝達を開始することを妨害するオステオプロテゲリンの任意のフラグメントであってもよい。そのような物質は、例えば、O P G L に対する抗体であってもよい。O P G が O P G L に結合し、この相互作用は、O P G L が、その受容体である R A N K に結合することを妨害することは公知である。従って、当業者であれば、O P G L が、その受容体である R A N K に結合することを妨害するいずれの物質、または R A N K 活性もしくはシグナル伝達を遮断する他のいずれの物質も、線維化疾患、特に強皮症の予防および／または治療において、オステオプロテゲリンと同じ活性を有することを理解するであろう。R A N K に結合する O P G L を遮断する薬剤は、例えば、O P G L に対するアンタゴニスト抗体であってもよい。R A N K 活性を遮断する薬剤は、さらに、例えば、R A N K に対するアンタゴニスト抗体であってもよい。さらに、O P G L / R A N K 相互作用を遮断する薬剤は、例えば、これらの 2 つのタンパク質が相互に結合することを妨害する化学化合物であってもよいが、またさらに R A N K 受容体を介するシグナル伝達の他のいずれの化学的または生物学的インヒビター

【 0 0 3 1 】

ヒトオステオプロテゲリンの全長 c D N A をクローニングし、添付の配列表の配列番号 1 として示す。対応するアミノ酸配列を添付の配列表の配列番号 2 として示す。配列については、www . n c b i . n l m . n i h . g o v において A B _ 0 0 8 8 2 1 の下で説明しており、ならびにモリナガ (M o r i n a g a) ら (1 9 9 8) も説明している。オステオプロテゲリンのイソ型または多型については、シモネット (S i m o n e t) ら (1 9 9 7) が説明している。シモネット (S i m o n e t) ら (1 9 9 7) による c D N A を添付の配列表の配列番号 3 として示し、対応するアミノ酸配列を配列番号 4 として示す。両配列とも、さらに www . n c b i . n l m . n i h . g o v において U 9 4 3

32の下で入手可能である。モリナガ(Morinaga)らおよびシモネット(Simonet)らが見出したタンパク質間の唯一の差異は、それぞれアスパラギン酸またはアラニンであり得るアミノ酸位置263に関する。

【0032】

本明細書で使用する用語「オステオプロテゲリン」は、(a)～(h)において上記で考慮した任意の物質に関する。

【0033】

本明細書で使用する用語「治療および/または予防」は、疾患の形成、発達、進行、あるいは疾患のいずれか1つもしくはいくらかもしくはすべての徴候の形成、発達または進行の任意の減弱、減少、または部分的、実質的もしくは完全な予防、あるいは妨害を包含する。

10

【0034】

本明細書で使用する用語「線維化疾患」は、例えば、慢性炎症または組織の修復および再構成によりなり得る線維症に關与する疾患に関する。線維症は、例えば、皮膚、肺、脾臓、肝臓または腎臓などのヒトの身体の任意の器官に關与し得る。従って、本発明はまた、肝硬変、間質性肺線維症、デュピュイトラン拘縮、ケロイドおよび他の瘢痕形成/創傷治癒異常、術後癒着および反応性線維症、ならびに特に心筋梗塞後の慢性心不全などの線維化疾患の治療および/または予防に関する。さらに、オステオプロテゲリンにより治療可能な疾患または障害は、創傷治癒疾患、特に肺の慢性炎症および究極的に肺表面の線維症もしくは瘢痕形成を含んでなる肺における創傷治癒を含んでなる。肺の炎症に關与する障害は、例えば、特発性肺線維症、サルコイドーシス、気管支肺異形成症、線維増殖性ARDS、ならびに肺徴候または慢性関節リウマチなどの全身性疾患を含んでなる(クレイン(Krein)ら、2001)。

20

【0035】

線維症は、一般に、所定の器官の機能的分化した組織を配置する結合組織の作製または増殖に關与する。従って、本発明の好適な実施態様では、線維化疾患は結合組織疾患である。

【0036】

好適な実施態様では、線維化疾患は強皮症である。

【0037】

本明細書で使用する用語「強皮症」は、全身性硬化症または全身性強皮症とも呼ばれる疾患に関する。これらの用語は、本出願の範囲内において同じ意味で使用される。全身性硬化症は、皮膚、関節構造、ならびに臓器(特に、例えば、食道、消化管、肺、心臓、および腎臓)におけるびまん性線維症;退行性変化;および血管異常を特徴とする原因不明の慢性疾患である。それは限局型または混合型、全身性、限局性、もしくはびまん性であり得る。

30

【0038】

用語「強皮症」は、好ましくは、限局型、全身性、限局性およびびまん性強皮症ならびに重複徴候に關連する。

【0039】

限局型強皮症は、主に皮膚に影響を及ぼすが、下にある筋肉および骨にも影響を及ぼし得る。しかし、一般に該限局型強皮症は臓器には影響しない。限局型強皮症は、比較的軽度であり、顕微鏡下での皮膚生検の外観などの同様の表面的徴候では、全身性強皮症に關連し得る。

40

【0040】

全身性強皮症は、CREST、限局性およびびまん性などの徴候のいくらかのタイプまたは徴候のグループを含んでなる。それは、進行性全身性硬化症、または家族性進行性全身性硬化症と称することもできる。全身性強皮症は、例えば、皮膚、血管、および/または臓器に影響を及ぼし得る。該全身性強皮症が皮膚に影響を及ぼす場合、最も一般的には手および/または顔の皮膚が硬化し得る。該硬化症が血管に影響を及ぼす場合、レイノー

50

疾患を発症し得る。最も重度の形態の全身性硬化症は臓器に影響を及ぼし、障害または死さえ生じ得る。特に、全身性硬化症は：強皮症肺疾患、強皮症腎クリーゼ、心臓の徴候、疲労または限局性CRESTを含む筋力低下、胃腸の運動障害および痙攣、ならびに中枢、抹消および自律神経系の異常を含んでなる。神経系の異常に関しては、手根管症候群に続いて三叉神経痛が出現するのが最も一般的である。

【0041】

限局性強皮症は、例えば、手に限局され得るが、顔および頸部も関与し得る。

【0042】

びまん性強皮症は皮膚の硬化を含んでなり、また、手首（または肘）より上で生じる。「皮膚症状を伴わない強皮症（scleroderma sine scleroderma）」（臓器線維症が認められるが、皮膚の硬化は認められない）などのびまん性全身性硬化症；および家族性進行性全身性硬化症（家族内に発症する稀な形態）のいくらかの下位範疇が存在する。

【0043】

重複徴候は、強皮症患者が他の自己免疫疾患（例えば、狼瘡、慢性関節リウマチなど）にも罹患している場合、例えば、狼瘡と重複するびまん性強皮症にあるという。強皮症の徴候は、混合型結合組織疾患（MCTD）、または分類不能の結合組織疾患（UCTD）の一部であり得る。

【0044】

本明細書で使用する用語「オステオプロテゲリン」は、添付の配列表の配列番号2または4の配列（両方ともヒト）の全部、もしくは一部を含んでなるタンパク質、ならびにその塩、イソ型、突然変異タンパク質、活性フラクション、機能性誘導体、および環状置換型誘導体に関する。マウスまたはラットなどのヒト以外の種由来のOPGも、該タンパク質がその生物学的活性を示すことを可能にするのに十分な同一性がタンパク質間に存在し、ヒトにおける実質的な免疫応答を誘発しない限り、本発明に従って使用することができる。

【0045】

好ましくは、用語「オステオプロテゲリン」は、シグナルペプチドを欠く成熟タンパク質を指す。シグナルペプチドは、配列番号2または4において規定されるOPGのN末端の21アミノ酸を含んでなり、即ち、成熟タンパク質は、配列番号2または4に記載のアミノ酸22～401を含んでなる。本明細書で使用する用語「オステオプロテゲリン」は、強皮症または他の線維化疾患において所望される活性を示す配列番号2または4に記載の任意のフラグメント、部分、ドメインもしくはサブドメインにさらに関する。タンパク質フラグメント、イソ型、特異的グリコシル化もしくはシアリル化型またはタンパク質の1つもしくはそれ以上のドメインは、それらが、線維化疾患に対して任意の有益な効果、好ましくは全長タンパク質に少なくとも匹敵する効果を示す限り、本発明に従って使用することができる。以下の実施例に記載のインビトロもしくはインビボ試験の1つ、または線維化疾患、特に強皮症における効果を実証するのに適切な他の任意のアッセイにおいて、有益な効果を測定することができる。

【0046】

例えば、オステオプロテゲリンは、シモネット（Simonet）ら（1997）が記載しているように、N末端部分にシステインリッチTNFR様ドメインを含んでなる。このドメインを含んでなるフラグメントは、インビトロ試験でOPGの生物学的活性を保持することが示された。従って、好適なOPGフラグメントは、OPGのTNFR様ドメイン、特に、配列番号2または4に記載のアミノ酸22～194を含んでなるフラグメントを含んでなる。

【0047】

本発明に従えば、オステオプロテゲリンは、天然に存在する、従って、生来のタンパク質であるか、または組換えタンパク質であることができる。組換え産生は、酵母細胞または哺乳動物細胞のような真核細胞、好ましくは、CHO細胞、HEK細胞（ヒト胎児腎細

10

20

30

40

50

胞)またはヒト線維芽細胞または細胞株において実施することができる。該タンパク質は、さらに、大腸菌(E. coli)などの原核細胞において産生させることもできる。

【0048】

オステオプロテゲリンは、単量体および二量体の形態で生じることが記載されている(シモネット(Simonet)ら(1997))。従って、本発明によれば、OPGは、単量体、二量体、または多量体であってもよい。

【0049】

好ましくは、オステオプロテゲリンは、1つもしくはそれ以上の部位でグリコシル化されている。該オステオプロテゲリンはまた、所定の必要性およびタンパク質の産生または単離の供給源に依存して、非グリコシル化されていてもよい。

【0050】

本明細書で使用する用語「塩」は、オステオプロテゲリン分子またはその類似体のカルボキシル基およびアミノ基の酸付加塩の両方をさす。カルボキシル基の塩は、当該分野において公知の手段によって形成することができ、無機塩、例えば、ナトリウム、カルシウム、アンモニウム、鉄または亜鉛塩などおよび例えば、トリエタノールアミン、アルギニンまたはリジン、ピペリジン、プロカインなどのアミン類と共に形成される基などの有機塩基との塩を含む。酸付加塩としては、例えば、塩酸または硫酸などの無機酸との塩、および例えば、酢酸またはシュウ酸などの有機酸との塩が挙げられる。もちろん、そのような任意の塩は、本発明に関するオステオプロテゲリンの生物学的活性を保持し、即ち、線維化疾患、特に強皮症に対して有益な効果を発揮する。

【0051】

オステオプロテゲリンのイソ型またはスプライス変異体もまた、それらが疾患の進行および/または該疾患の徴候を阻害することが可能ある限り、本発明に従って使用することができる。

【0052】

本明細書で使用する用語「突然変異タンパク質」は、天然のオステオプロテゲリンの1つもしくはそれ以上のアミノ酸残基が異なるアミノ酸残基で置き換えられているか、または欠失されているか、あるいは1つもしくはそれ以上のアミノ酸残基がオステオプロテゲリンの天然の配列に付加され、好ましくは、野生型オステオプロテゲリンと少なくとも同じ活性を有するかあるいはより強力な活性を有する、オステオプロテゲリンの類似体を指す。OPGの生物学的活性は、例えば、OPGの天然のリガンドであるOPGLへの結合をアッセイすることによって、測定することができる。タンパク質-タンパク質相互作用を評価するためのアッセイは、当業者に周知である。そのようなアッセイの例には、ELISA型結合アッセイ、免疫沈降アッセイ、またはBIAコア(BIAcore)システムなどの他の任意のシステムにおける測定がある。これらの突然変異タンパク質は、公知の合成および/または部位特異的変異、あるいは該突然変異タンパク質に適切な他の任意の公知の技術によって調製される。

【0053】

任意のそのような突然変異タンパク質は、好ましくは、オステオプロテゲリンに少なくとも実質的に類似の活性を有するように、成熟オステオプロテゲリンの配列に十分重複するアミノ酸配列を有する。オステオプロテゲリン変異体の活性は、以下の実施例で説明するアッセイでさらに試験することができる。例えば、OPGで処置した線維芽細胞におけるコラーゲン合成量を測定することは、オステオプロテゲリン突然変異タンパク質の活性を評価するのに適切な試験であり得る。

【0054】

本発明に従う突然変異タンパク質は、ストリンジェントな条件下で、本発明に従って、オステオプロテゲリンをコードするDNAもしくはRNAにハイブリダイズするDNAまたはRNAなどの核酸によってコードされるタンパク質を含む。用語「ストリンジェントな条件」は、当業者が慣例的に「ストリンジェント」と呼ぶハイブリダイゼーションおよびその後の洗浄条件を指す。アウスベル(Ausubel)ら、Current Pro

10

20

30

40

50

protocols in Molecular Biology、上掲、インターサイエンス (Interscience)、ニューヨーク (N.Y.)、セクション 6.3 および 6.4 (1987, 1992)、ならびにサンプブック (Sambrook) ら (サンプブック, J.C. (Sambrook, J.C.)、フリッス, E.F. (Fritsch, E.F.) および マニアティス, T. (Maniatis, T.) (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー出版 (Cold Spring Harbor Laboratory Press)、ニューヨーク州、コールド・スプリング・ハーバー (Cold Spring Harbor, NY)) を参照のこと。

【0055】

10

ストリンジェントな条件には、研究下でのハイブリッドの算出された T_m 未満の 12 ~ 20 での洗浄条件、例えば、 $2 \times SSC$ および 0.5% SDS 中で 5 分間、 $2 \times SSC$ および 0.1% SDS 中で 15 分間； $0.1 \times SSC$ および 0.5% SDS 中 37 で 30 ~ 60 分間、次いで、 $0.1 \times SSC$ および 0.5% SDS 中 68 で 30 ~ 60 分間が含まれるが、これに制限されない。当業者であれば、ストリンジェンシー条件はまた、DNA 配列、オリゴヌクレオチドプローブ (例えば、10 ~ 40 塩基) または混合型オリゴヌクレオチドプローブの長さに依存することを理解している。混合型プローブが使用される場合、SSC の代わりにテトラメチルアンモニウムクロライド (TMAC) を使用することが好ましい。アウスベル (Ausubel)、上掲を参照のこと。

【0056】

20

任意のそのような突然変異タンパク質は、好ましくは、オステオプロテグリンに実質的に類似するかまたはより良好な生物学的活性を有するように、オステオプロテグリンの配列に十分重複するアミノ酸配列を有する。

【0057】

オステオプロテグリンの 1 つの容易な測定可能な活性は、コラーゲン合成を減少する能力である。突然変異タンパク質が実質的なコラーゲン減少活性を有する限り、該突然変異タンパク質は、オステオプロテグリンに実質的に類似の活性を有するとみなすことができる。従って、所定の突然変異タンパク質を供することを含んでなる日常の実験によって、前記任意の所定の突然変異タンパク質がオステオプロテグリンに少なくとも実質的に類似の活性を有するかどうかを決定することができる。

30

【0058】

好適な実施態様では、任意のそのような突然変異タンパク質は、成熟オステオプロテグリンの配列に少なくとも 40% の同一性または相同性を有する。より好ましくは、該突然変異タンパク質は、該配列に少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、または最も好ましくは、少なくとも 90% の同一性もしくは相同性を有する。

【0059】

同一性は、配列を比較することによって決定される 2 つもしくはそれ以上のポリペプチドまたは 2 つもしくはそれ以上のポリヌクレオチド配列間の関係に反映する。一般に、同一性は、比較する配列の長さにわたって、2 つのポリヌクレオチドまたは 2 つのポリペプチド配列のそれぞれ正確なヌクレオチド対ヌクレオチドまたはアミノ酸対アミノ酸の対応関係を指す。

40

【0060】

正確な対応関係が存在しない配列については、「同一%」を決定することができる。一般に、比較しようとする 2 つの配列は、配列間の最大の相対関係を与えるように整列される。このことは、1 つまたは両方の配列のいずれかに「ギャップ」を挿入して、アラインメントの程度を増強することを含む。同一% は、同じまたは極めて類似の長さの配列に特に適切である比較する核配列の全長 (いわゆる包括的アラインメント) か、または等しくない長さの配列により適切であるより短い、規定された長さ (いわゆる局所アラインメント) にわたって決定することができる。

50

【0061】

2つもしくはそれ以上の配列の同一性および相同性を比較するための方法は、当該分野において周知である。従って、例えば、 Wisconsin Sequence Analysis Package)、バージョン9.1 (デベルクスJ (Devereux J)ら、1984)、例えば、プログラムBESTFITおよびGAPを使用して、2つのポリヌクレオチド間の同一%および2つのポリペプチド配列間の同一%および相同%を決定することができる。BESTFITは、スミス (Smith) およびウォーターマン (Waterman) の「局所相同性」アルゴリズム (1981) を使用し、2つの配列間で類似性の最も良好な単一の領域を見出す。配列間の同一性および・または類似性を決定するための他のプログラムもまた当該分野で知られている。例えば、プログラムのBLASTファミリー (アルスルスF (Altschul S F)ら、1990、アルスルスF (Altschul S F)ら、1997 (www.ncbi.nlm.nih.govのNCBIのホームページよりアクセス可能)) およびFASTA (ピアソンWR (Pearson W R)、1990; ピアソン (Pearson) 1988)。

10

【0062】

本発明に従って使用することができるオステオプロテグリンの突然変異タンパク質、または該突然変異タンパク質をコードする核酸は、本明細書に提示した教義および指針に基づいて、過度の実験を行うことなく、当業者が日常的に入手することができる置換ペプチドまたはポリヌクレオチドとして、実質的に対応する限定された組の配列を含む。

20

【0063】

本発明に従う突然変異タンパク質の好適な変化は、「保存的」置換として公知であるものである。オステオプロテグリンポリペプチドまたはタンパク質の保存的アミノ酸置換は、グループのメンバー間の置換が分子の生物学的機能を保存するような十分に類似の物理化学的特性を有するグループ内の同義のアミノ酸を含むことができる (グランタム (Grantam)、1974)。アミノ酸の挿入および欠失もまた、特に、挿入または欠失が数個のアミノ酸、例えば、30個未満、好ましくは10個未満のみに関与し、機能的コンホメーションに極めて重要なアミノ酸、例えば、システイン残基を除去することまたは置換することもない場合、上記で規定された配列において、該配列の機能を改変することなく作製することができることが明らかである。そのような欠失および/または挿入によって産生されるタンパク質ならびに突然変異タンパク質は、本発明の範囲内にある。

30

【0064】

好ましくは、同義のアミノ酸のグループは、表Iに規定されるグループである。より好ましくは、同義のアミノ酸のグループは、表IIに規定されるグループであり; 最も好ましくは、同義のアミノ酸のグループは、表IIIに規定されるグループである。

【0065】

【表 1】

表 1

同義のアミノ酸の好適なグループ

アミノ酸	同義のグループ
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

10

20

【 0 0 6 6 】

【表 2】

表 2

同義のアミノ酸のより好適なグループ

アミノ酸	同義のグループ	
Ser	Ser	
Arg	His, Lys, Arg	
Leu	Leu, Ile, Phe, Met	
Pro	Ala, Pro	10
Thr	Thr	
Ala	Pro, Ala	
Val	Val, Met, Ile	
Gly	Gly	
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu	
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe	
Tyr	Phe, Tyr	
Cys	Cys, Ser	
His	His, Gln, Arg	
Gln	Glu, Gln, His	
Asn	Asp, Asn	20
Lys	Lys, Arg	
Asp	Asp, Asn	
Glu	Glu, Gln	
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu	
Trp	Trp	

【 0 0 6 7 】

【表 3】

表 3
同義のアミノ酸の最も好適なグループ

アミノ酸	同義のグループ
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

10

20

【0068】

本発明における使用のために、オステオプロテゲリンポリペプチドまたはタンパク質の突然変異タンパク質を得るために使用することができるタンパク質のアミノ酸置換の生成の例として、マーク（Mark）らの米国特許第4,959,314号、米国特許第4,588,585号および米国特許第4,737,462号；コス（Koths）らの米国特許第5,116,943号、ネイメン（Namen）らの米国特許第4,965,195号；コング（Chong）らの米国特許第4,879,111号；ならびにリー（Lee）らの米国特許第5,017,691号に提示されるような任意の既知の方法；ならびに米国特許第4,904,584（シャウ（Shaw）ら）に提示されるリジン置換タンパク質などが挙げられる。

30

【0069】

用語「融合タンパク質」は、例えば、体液中に長期滞留時間を有する別のタンパク質と融合した、オステオプロテゲリンを含んでなるポリペプチド、またはその突然変異タンパク質を指す。ヒト身体内における半減期などの分子の生物学的活性を改善することが可能なタンパク質の全部もしくは機能的部分と融合したオステオプロテゲリンの全部または機能的部分を含んでなる融合タンパク質は、本発明では好適である。好適な実施態様では、融合タンパク質は、免疫グロブリン（Ig）融合物を含んでなる。免疫グロブリンの全部もしくは一部と融合したオステオプロテゲリンの全部または一部を含んでなる融合タンパク質は、極めて好適である。それらは、単量体または多量体、ヘテロもしくはホモ多量体であることができる。有利なことに、融合タンパク質は、免疫グロブリン、特に、免疫グロブリンのFc部分の定常領域を含んでなる。免疫グロブリンがIgG1またはIgG2イソタイプである実施態様は、本発明ではさらに好適である。好ましくは、融合物はFc融合物である。

40

50

【0070】

従って、オステオプロテゲリンは、別のタンパク質、ポリペプチドなど、例えば、免疫グロブリンまたはそのフラグメントと融合してもよい。融合物は直接的でもよく、または1～3アミノ酸残基長ほどの短いもしくはそれより長い、例えば、13アミノ酸残基長であり得る短いリンカーペプチドを介してもよい。前記リンカーは、例えば、配列E-F-M(Glu-Phe-Met)のトリペプチドであっても、またはオステオプロテゲリン配列と免疫グロブリン配列との間に導入されるGlu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Metを含んでなる13アミノ酸リンカー配列であってもよい。

【0071】

10

本明細書において使用される「機能性誘導体」は、オステオプロテゲリンの誘導体、ならびにそれらの突然変異タンパク質および融合タンパク質を含み、当該分野において既知の手段によって、残基上の側鎖またはNもしくはC末端基として存在する官能基から調製することができ、それらが薬学的許容可能性を保持し、すなわち、それらが、オステオプロテゲリンの活性に少なくとも実質的に類似するタンパク質の活性を破壊せず、該活性を含有する組成物に毒性を付与しない限り、本発明に含まれる。従って、好適な実施態様では、機能性誘導体は、アミノ酸残基上の1つもしくはそれ以上の側鎖として存在する1つもしくはそれ以上の官能基に結合した少なくとも1つの部分を含んでなる。

【0072】

20

本発明に従えば、ポリエチレングリコール(PEG)側鎖は極めて好適な部分である。PEG側鎖は、抗原部位を遮蔽し、体液中においてそれらが結合する物質の滞留を延長することができる。他の誘導体として、カルボキシル基の脂肪族エステル、アンモニアまたは第1級もしくは第2級アミンとの反応によるカルボキシル基のアミド、アシル部分により形成されるアミノ酸残基の遊離アミノ基のN-アシル誘導体(例えば、アルカノイルまたは炭素環式アロイル基)あるいはアシル部分により形成される遊離の水酸基(例えば、セリンまたはスレオニン残基の水酸基)のO-アシル誘導体が挙げられる。

【0073】

30

オステオプロテゲリンならびにその突然変異タンパク質および融合タンパク質の「活性フラクション」は、タンパク質分子単独かまたはそれに連結する関連分子または残基、例えば、糖もしくはリン酸残基を伴うタンパク質分子のポリペプチド鎖の任意のフラグメントまたは前駆体、あるいはタンパク質分子または糖残基自体の凝集体を含むが、但し、前記活性フラクションは、オステオプロテゲリンに対して少なくとも実質的に類似の活性を有する。

【0074】

本発明は、強皮症の治療および/または予防のための医薬品を製造するための核酸分子の使用に関連し、ここで、核酸分子は、線維化疾患の治療および/または予防のための医薬品を製造するために：

- a) 配列番号2または配列番号4を含んでなるポリペプチド；
- b) 配列番号2または配列番号4に記載のアミノ酸22～401を含んでなるポリペプチド；
- c) オステオプロテゲリンの1、2、3または4つのシステインリッチドメインを含んでなるポリペプチド；
- d) 配列番号2または配列番号4に記載のアミノ酸22～194を含んでなるポリペプチド；
- e) アミノ酸配列が(a)～(d)における配列の少なくとも1つに対して少なくとも40%または50%または60%または70%または80%または90%の同一性を有する、(a)～(d)のいずれかの突然変異タンパク質；
- f) 中程度にストリンジェントな条件下かまたは高度にストリンジェントな条件下で(a)～(d)のいずれかをコードする生来のDNA配列の相補体にハイブリダイズするDNA配列によってコードされる、(a)～(d)のいずれかの突然変異タンパク質；

50

g) アミノ酸配列の任意の変化は、(a) ~ (d) におけるアミノ酸配列に対する保存的アミノ酸置換である、(a) ~ (d) のいずれかの突然変異タンパク質；

h) (a) ~ (g) のいずれかのイソ型、融合タンパク質または活性フラクション、よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる、ポリペプチドをコードする核酸配列を含んでなる。本発明は、好ましくは、結合組織疾患、特に強皮症の治療および/または予防のための前記核酸分子の使用に関する。

【0075】

本発明に従えば、オステオプロテゲリンは、前記核酸分子を含んでなるベクターの形態で、ヒト身体に投与してもよい。従って、本発明は、強皮症もしくは別の線維化疾患の治療および/または予防のための医薬品を製造するための前記核酸分子を含んでなるベクターの使用にさらに関する。好ましくは、ベクターは、オステオプロテゲリンのコード配列の全部または一部に作動可能に連結したプロモーターを含んでなる発現ベクターである。さらに好適な実施態様では、ベクターは、遺伝子療法ベクターである。遺伝子療法ベクターは、当該分野において公知であり、それらのほとんどは、アデノウイルスまたはレンチウイルスベクターなどのウイルス由来ベクターである。

10

【0076】

本発明に従えば、オステオプロテゲリンはまた、オステオプロテゲリンを産生および/分泌する細胞の形態でヒト身体に投与してもよい。従って、本発明は、強皮症もしくは他の任意の線維化疾患の治療および/または予防のための医薬品を製造するためのオステオプロテゲリンを発現する細胞の使用、即ち、強皮症もしくは他の線維化疾患の治療および/または予防のための細胞療法にさらに関する。細胞は、天然にオステオプロテゲリンを産生する細胞および/または組換えオステオプロテゲリンを産生するトランスフェクトされた細胞であってもよい。オステオプロテゲリンをコードする核酸分子を含んでなる高コピー数の発現ベクターを担持する過剰発現細胞などの大量のタンパク質を発現および分泌する細胞が好ましい。

20

【0077】

線維芽細胞が線維症の機構を示すため、該線維芽細胞は抗線維化および強皮症療法に最も適切な細胞である。従って、好ましくは、線維芽細胞を発現するオステオプロテゲリンが、本発明に従って使用される。

【0078】

本発明は、線維化疾患、特に強皮症の治療および/または予防のための医薬品を調製するためのオステオプロテゲリンの全部もしくは一部をコードする核酸分子を含んでなるベクターを含んでなる細胞にさらに関する。本発明のポリペプチドを産生するように遺伝子が改変されている細胞もまた、本発明の範囲内にある。

30

【0079】

通常サイレントであるかもしくはインヒビターの発現量が十分ではない細胞において、オステオプロテゲリンの内因性産生を誘導および/または増強するための発現ベクターを使用することもまた、本発明に従って考慮される。従って、本発明は、所望されるタンパク質の産生のための内因性遺伝子活性化 (E G A) として知られる技術を使用する。

【0080】

いくつかの併用療法が本発明では好適である。従って、好ましくは本発明の医薬品は：

- ・ インターフェロン、特に、インターフェロン - β
- ・ 腫瘍壊死因子 (T N F) アンタゴニスト、特に、可溶性 p 5 5 (T B P I) および/または可溶性 p 7 5 (T B P I I) などの可溶性 T N F R ；
- ・ さらなる抗強皮症薬；
- ・ ハロフジノン、A C E 阻害薬、カルシウムチャンネル遮断薬、プロトンポンプ阻害薬、N S A I D 阻害薬、C O X 阻害薬、コルチコステロイド、テトラサイクリン、ベントキシフィリン、ブシラミン、ゲラニルゲラニル転移酵素阻害薬、ロツテルリン (r o t t e r l i n)、プロリル - 4 - ヒドロキシラーゼ阻害薬、c - プロテイナーゼ阻害薬、リシルオキシダーゼ阻害薬、レラキシン、ハロフジノン、プロスタグランジン、プロスタサイ

40

50

クリン、エンドセリン - 1、一酸化窒素、アンジオテンシン I I 阻害薬、抗酸化剤または S A R P - 1 からなる群から選択される抗強皮症薬、
をさらに含んでなる。

【 0 0 8 1 】

S A R P - 1 は、強皮症などの線維化疾患において有益な効果を有することが示されているタンパク質である（国際公開第 0 2 / 4 6 2 2 5 号パンフレット）。国際公開第 0 2 / 4 6 2 2 5 号パンフレットに記載されている S A R P - 1 のフラグメント、イソ型、活性フラクション、融合タンパク質または機能性誘導体はまた、本発明に従って、オステオプロテゲリンと組み合わせて使用してもよい。

【 0 0 8 2 】

すべての治療は、同時、連続または個別での使用を意図している。

【 0 0 8 3 】

1 つもしくはそれ以上の上記の物質をオステオプロテゲリンと共に含んでなる薬学的組成物は、本発明の範囲内にある。

【 0 0 8 4 】

強皮症の治療方法は現在のところ存在しないが、現在、いくつかの薬剤または治療法が強皮症の徴候を治療するために使用されている。本発明による併用療法として使用することができるそのような抗強皮症薬については、例えば、ライトン (L e i g h t o n) (2 0 0 1) またはウィグレイ (W i g l e y) およびシュール (S u l e) (2 0 0 1) が概要を述べており、本明細書において参照により完全に組み込まれている。

【 0 0 8 5 】

インターフェロンは、ウイルスの複製および細胞増殖に対する阻害効果が主に知られている。例えば、インターフェロン - γ は、免疫および炎症応答を促進するのに重要な役割を果たす。インターフェロン β (I F N - β 、インターフェロン I 型) は、抗炎症の役割を果たすといわれている。

【 0 0 8 6 】

本発明のなおさらなる実施態様では、オステオプロテゲリンは T N F アンタゴニストとの併用で使用される。T N F アンタゴニストは、いくつかの方法でそれらの活性を発揮する。第 1 に、アンタゴニストは、十分な親和性で T N F 分子自体に結合あるいは隔離し、T N F エピトープもしくは T N F 受容体結合を担うエピトープを部分的または実質的に中和することができる（以後「隔離アンタゴニスト」と称する）。隔離アンタゴニストは、例えば、T N F に対する抗体であってもよい。

【 0 0 8 7 】

あるいは、T N F アンタゴニストは、T N F 結合後に細胞表面受容体によって活性化された T N F シグナル伝達経路を阻害することができる（以後「シグナル伝達アンタゴニスト」と称する）。T N F アンタゴニストは、T N F が増殖および免疫グロブリン分泌を生じさせる感受性細胞株、例えば、ヒト B 細胞における生来の T N F の活性に対するインビトロでの効果に対する候補物の日常的なスクリーニングによって、容易に同定および評価される。アッセイは、様々な希釈の候補アンタゴニスト、例えば、アッセイに使用する T N F のモル量の 0 . 1 ~ 1 0 0 倍での T N F 処方、および T N F を伴わないかまたはアンタゴニストのみを伴うコントロールを含有する（ツッチ (T u c c i) ら、1 9 9 2) 。

【 0 0 8 8 】

隔離アンタゴニストは、本発明に従って使用すべき好適な T N F アンタゴニストである。隔離アンタゴニストのうち、高い親和性で T N F に結合し、低い免疫原性を有する該ポリペプチドが好適である。可溶性 T N F 受容体分子および T N F に対する中和抗体が特に好ましい。例えば、T N F - R I (p 5 5) および T N F - R I I (p 7 5) の可溶性形態は、本発明において有用である。受容体の細胞外ドメインまたはその機能性部分を含んでなるこれらの受容体の短縮型は、本発明の特に好適なアンタゴニストである。短縮型可溶性 T N F I 型および I I 型受容体については、例えば、E P 9 1 4 4 3 1 に記載されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 9 】

T N F 受容体の短縮型は可溶性であり、それぞれ T B P I および T B P I I と呼ばれる約 3 0 k D a または 4 0 k D a の T N F 阻害結合タンパク質として、尿および血清中に検出されている（インゲルマン（E n g e l m a n n）ら、1 9 9 0）。T N F アンタゴニストおよび / またはインターフェロンとのオステオプロテゲリンの同時、連続、または個別使用が、本発明では好適である。

【 0 0 9 0 】

本発明によれば、T B P I および T B P I I は、オステオプロテゲリンとの併用で使用するべき好適な T N F アンタゴニストである。受容体分子の誘導体、フラグメント、領域および生物学的に活性な部分は、本発明において使用することもできる受容体分子に機能的に類似する。受容体分子のそのような生物学的に活性な等価物あるいは誘導体とはポリペプチド、または受容体分子をコードする配列の部分进行指し、十分なサイズがありかつ膜結合型 T N F 受容体との相互作用が阻害もしくは遮断されるような親和性で T N F に結合可能な部分である。

【 0 0 9 1 】

さらに好適な実施態様では、ヒト可溶性 T N F - R I (T B P I) は、本発明に従って使用するべき T N F アンタゴニストである。天然および組換え可溶性 T N F 受容体分子およびそれらの産生方法については、欧州特許第 3 0 8 3 7 8 号明細書、欧州特許第 3 9 8 3 2 7 号明細書および欧州特許第 4 3 3 9 0 0 号明細書に記載されている。

【 0 0 9 2 】

該 T N F 受容体分子は、疾患の早期段階において T N F - α を遮断するのに有用であり得るが、後期段階では、T N F 自体は強皮症において有益な効果を発揮し得ることが考察されている（アブラハム（A b r a h a m）ら、2 0 0 0）。従って、本発明は、強皮症、特に進行した段階の疾患での治療または予防のためのオステオプロテゲリンと T N F との併用にさらに関する。本発明に従い、T N F - α または T N F - β を使用することができる。

【 0 0 9 3 】

本発明は、線維化疾患、特に強皮症の治療および / または予防のために、オステオプロテゲリンを、場合により 1 つもしくはそれ以上の薬学的に許容可能なキャリア、希釈剤または賦形剤と共に含んでなる薬学組成物にさらに関する。薬学的組成物は、上記で同定したさらなる成分を任意に、特に、インターフェロン、T B P または C O X 阻害薬をさらに含んでなり得る。

【 0 0 9 4 】

本発明の薬学的組成物はまた、本発明の核酸分子を含んでなるベクター、またはオステオプロテゲリンを発現する細胞を含んでなり得る。

【 0 0 9 5 】

製薬の有効成分、即ち、本発明のポリペプチド、核酸もしくは細胞、またはそれらの組み合わせ、ならびに上記の物質の組み合わせは、様々な方法で個体に投与することができる。投与経路としては、皮内、経皮（例えば、徐放性処方において）、筋肉内、腹膜内、静脈内、皮下、経口、硬膜外、局所、および鼻腔内経路が挙げられる。他の任意の治療上有効な投与経路、例えば、上皮もしくは内皮組織を介するか、または有効因子をコードする D N A 分子が（ベクターを介して）患者に投与される遺伝子療法（有効因子をインビボで発現および分泌させる）による吸収を使用することもできる。さらに、本発明のタンパク質は、薬学的に許容可能な界面活性剤、賦形剤、キャリア、希釈剤およびビヒクルなどの生物学的に活性な薬剤の他の成分と共に投与することができる。

【 0 0 9 6 】

「薬学的に許容可能な」の定義は、有効成分の生物学的活性の有効性を阻害せず、該有効成分を投与する宿主に毒性を示さない任意のキャリアを包含することを意味する。例えば、非経口投与用として、塩水、ブドウ糖溶液、血清アルブミンおよびリンゲル溶液（R i n g e r ' s s o l u t i o n）などのビヒクル中の注射用単位剤型で、活性タンバ

10

20

30

40

50

ク質を処方してもよい。

【0097】

非経口（例えば、静脈内、皮下、筋肉内）投与用には、薬学的に許容可能な非経口ビヒクル（例えば、水、塩水、ブドウ糖溶液）ならびに等張性（例えば、マンニトール）もしくは化学的安定性（例えば、保存剤および緩衝液）を維持する添加物を配合した溶液、懸濁液、乳濁液または凍結乾燥した粉末として、活性タンパク質を処方することができる。処方物は、一般に使用される技術によって滅菌される。

【0098】

本発明の活性タンパク質のバイオアベイラビリティはまた、ヒト身体において分子の半減期を増加する配合手順を使用すること、例えば、PCT特許出願国際公開第92/13095号パンフレットに記載のように、分子をポリエチレングリコールに連結させることによって、改善することもできる。

10

【0099】

活性タンパク質の治療有効量は、受容体のタイプ、本発明の物質のその受容体に対する親和性、それらが示す残存する任意の細胞障害性活性、投与経路、患者の臨床症状を含む多くの変数の関数である。

【0100】

「治療有効量」は、投与する場合に、本発明の物質が疾患の発達または進行に対してインビボで有益な効果を生じるような量である。個体に対する単回または複数投与としての投与量は、OPGの薬物動態学特性、投与経路、患者の症状および特徴（性別、年齢、体重、健康状態、サイズ）、徴候の程度、併用治療、治療回数ならびに所望される効果を含む様々な因子に依存して変動する。確立された用量範囲の調整および操作することは、十分に、当業者の能力の範囲内にある。

20

【0101】

要求される本発明のポリペプチドの用量は、約0.0001~100mg/kgまたは約0.01~10mg/kgまたは約0.1~5mg/kgまたは約1~3mg/kgにまで変動するが、上記のように、十分慎重に治療上の配慮がなされる。本発明の医薬品は、連日、隔日または週3回、投与することができる。

【0102】

連日投与は、通常、分割用量または所望される結果を得るのに有効な持効型で与えられる。第2またはその後の投与は、個体に投与された初回または前回の用量と同じか、より少ないかまたはより多い用量で実施することができる。第2またはその後の投与は、罹患中または発病前に投与することができる。

30

【0103】

さらに本発明は、線維化疾患、特に、強皮症を治療および/または予防するための方法に関し、該方法を必要とする患者に、治療有効量の本発明の物質を、場合により薬学的に許容可能なキャリアと共に投与することを含んでなる。あるいは、またはさらに、オステオプロテゲリンを産生する細胞または場合により発現ベクターに含まれる本発明の核酸分子を本発明に従って投与してもよい。

【0104】

発現ベクターは、全身投与することができる。好ましくは、発現ベクターは、筋肉内注射によって投与される。特に、肺線維症が疾患に関与する場合、さらなる好適な投与経路は吸入である。特に、皮膚への関与が認められる場合、OPG配列を含んでなる発現ベクターまたは本発明のOPGポリペプチドの局所投与は、さらなる好適な投与経路である。

40

【0105】

本発明は、薬学的組成物を調製するための方法であって、有効量のオステオプロテゲリンと薬学的に許容可能なキャリアとを混合することを含んでなる上記方法ならびに関節炎を治療および/または予防するための方法であって、該方法を必要とする宿主に有効阻害量のオステオプロテゲリンを投与することを含んでなる上記方法にさらに関する。

【0106】

50

ジャーナルの記事または要約、公開または非公開の米国もしくは外国の特許出願、発行された米国もしくは外国の特許あるいは他の任意の参考文献を含む本明細書において引用されたすべての参考文献は、引用文献に提示されたすべてのデータ、表、図および本文を含めてその全体が本明細書において参照として援用される。さらに、本明細書に引用された参考文献内において引用された参考文献のすべての内容もまた、その全体が参照として援用される。

【0107】

既知の方法工程、従来の方法工程、既知の方法または従来の方法を参照することは、本発明の任意の局面、説明または実施態様を当該分野において開示するか、教示するか、または示唆することを容認するいずれの様式にも当てはまらない。

10

【0108】

特定の実施態様に関する前述の説明は、当業者の知識（本明細書において引用した参考文献の内容を含む）を適用することによって、過度の実験を行うことなく、また本発明の一般概念から逸脱することなく、他者が多様な応用のために前記特定の実施態様を容易に改変および／または適応する程度に、本発明の一般的性質を十分に示している。従って、そのような適応および改変は、本発明において提示された教義および指針に基づいて、開示された実施態様の等価物の意味の範囲内にあることが意図される。本発明に記載の語句および専門用語は、説明を目的とするものであり、限定されるものではなく、このため、本明細書の専門用語および語句は、当業者の知識と組み合わせて、本明細書において提示された教義および指針に照らし合わせて当業者が解釈すべきものであることはいうまでもない。

20

【0109】

ここまで、本発明について説明してきたが、以下の実施例を参考にすることによって、本発明はさらに容易に理解されるであろう。但し、以下の実施例は例示により提供するものであって、本発明を制限することは意図していない。

【0110】

実施例

方法

患者サンプル

9例の年齢および性別の一致したびまん性全身性皮膚硬化症（SSc）患者の病変または非病変皮膚（通常、前腕の皮膚）から2mm³のパンチ型生検を採取した。すべての患者はSSc診断のための米国リウマチ学会（American College of Rheumatology）の基準を満たした。

30

【0111】

線維芽細胞の培養

線維芽細胞は、先に記載（アブラハム（Abraham）ら、1991）の通り、インビトロ培養によって生検から入手した。簡単に説明すると、生検を細かく切断し、滅菌プラスチック製ディッシュまたはフラスコに置いた。室温で15分間乾燥後、生検の片々を組織培養プラスチックに付着させ、次いで、10%ウシ胎児血清（FCS）、2mM L-グルタミン、1mMピルビン酸ナトリウム、1mlあたり100単位のペニシリン、1mlあたり100μgのストレプトマイシン、1mlあたり50μgのゲンタマイシンおよび1mlあたり2.5μgのアムホテリシンBを含有するダルベッコの改変イーグル培地（Dulbecco's modified Eagle's medium）（DMEM）からなる線維芽細胞増殖培地（FGM）中で培養した。空气中5%CO₂の加湿大気中で2～3週間のインキュベーション後、線維芽細胞の発芽後成長を簡単なトリプシン処理によって分離し、ゲンタマイシンおよびアムホテリシンBを含まないFGM中で再培養した。実験では、線維芽細胞を2～5継代の間で使用した。線維芽細胞の表現型は、単層および3次元コラーゲンゲル培養において、それらの典型的な形態学によって確認した。

40

【0112】

50

RNAの単離

総RNAは、製造者のプロトコルに従い、トリゾール (Trizol) (ライフ・テクノロジーズ (Life Technologies)) を使用して、初代継代の密集強皮症線維芽細胞から単離した。最終RNAペレットを滅菌DEPC処理した水中に $1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ の濃度で再懸濁し、 -80°C で保存した。

【0113】

cDNAプローブの合成

$2 \mu\text{g}$ の総RNAを $1.3 \mu\text{l}$ のサイトカイン特異的プライマー (R&Dシステムズ (R&D systems) カタログ番号GAC11) と混合し、 0.5 ml エッペンドルフチューブ中 70°C で2分間、インキュベートした。次いで、チューブを 50°C まで冷却し、2分後、 $2 \mu\text{l}$ の $5\times$ 反応緩衝液 (250 mM Tris-HCl pH 8.3、 37.5 mM KCl および 15 mM MgCl_2)、 $1 \mu\text{l}$ の $10\times$ dNTP 混合物 (5 mM dGTP、 5 mM dCTP および 5 mM dTTP)、 $3.5 \mu\text{l}$ の $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (3000 Ci/mmole 、アマシャム (Amersham) カタログ番号PB10204)、 $0.5 \mu\text{l}$ DTT (100 mM) ならびに $1 \mu\text{l}$ のスーパースクリプトII (ライフ・テクノロジーズ (Life Technologies)) を含有する反応混合物を添加した。反応混合物をピペティングで簡単に混合し、 50°C で25分間、インキュベートした。 1 mg/ml グリコーゲンを含む $1 \mu\text{l}$ の 0.1 M EDTA pH 8.0 を添加することによって、反応を停止した。次いで、製造者の指示に従い、クロマスピン (Chromaspin) - 200 DEPC- H_2O カラム (クローンテック (Clontech)) を使用して、標識したcDNAを、組み入れられなかったデオキシヌクレオチドから精製した。クゼレンコフ (Czerenkoff) 計数によって、cDNA含有画分を同定した。ピーク画分 (通常、回収した6本のすべての画分のうちの画分2) を、 1 mM EDTAを含む 0.1 容積の 1 M NaOHにより20分間、 70°C で処置して、RNAを加水分解し、次いで、 $2.5 \mu\text{g}$ のヒトCot-1 DNA (ライフ・テクノロジーズ (Life Technologies)) を含有する等容積の 1 M NaH_2PO_4 により、20分間、 70°C で中和した。次いで、熱処置かつ中和したcDNAプローブを、ハイブリダイゼーション混合物に直接添加した。

【0114】

遺伝子フィルターマイクロアレイに対するハイブリダイゼーション

遺伝子フィルターマイクロアレイ (ヒトサイトカイン発現アレイ、R&Dシステムズ (R&D systems) カタログ番号GA001) を、ハイバイド (Hybaid) ハイブリダイゼーション・オープン (MWGバイオテック (MWG Biotech)) 内のローラーボトル中 $0.5 \mu\text{g} / \text{ml}$ サケ精子DNA (ライフ・テクノロジーズ (Life Technologies)) を含有する 5 ml のエクスプレス・ハイブリダイゼーション (Express Hybridization) 溶液 (クローンテック (Clontech)) 中で、 68°C で2時間、プレハイブリダイズさせた。その後、プレハイブリダイゼーション溶液を、 $0.25 \sim 1 \times 10^6 \text{ cpm/ml}$ の比放射能のcDNAプローブ調製物を含有する新鮮ハイブリダイゼーション溶液と置き換えた。ハイブリダイゼーションは、 $16 \sim 20$ 時間、 68°C であった。ハイブリダイゼーション後、1回の洗浄あたり $2 \times \text{SSC} / 1\% \text{ SDS}$ により 68°C 、20分間で4回、1回の洗浄あたり $0.1 \times \text{SSC} / 0.5\% \text{ SDS}$ により15分間で2回、フィルターを洗浄した。フィルターをサラン・ラップ (Saran wrap) TM で密封し、Kタイプ・ストレージ・ホスホル・イメージング・スクリーン (K-type storage phosphor imaging screen) (バイオラド (Biorad)) に様々な時間 (4 時間 ~ 4 日間)、室温で暴露させた。

【0115】

画像解析

イメージング・スクリーンを、バイオラド・パーソナル・FXホスホイメージャー (Biorad Personal FX phosphor imager) を使用して、 50

μmの解像度でスキャンした。得られた16ビットのデジタルファイルをTIFF形式に変換し、アレイビジョン(Arrayvision)ソフトウェア(イメージング・リサーチ社(Imaging Research Inc.))を使用して、画像を解析した。それぞれのサンプルについて、本発明者らは、フィルター上に2回反復でスポットした384遺伝子のピクセル強度を測定した。バックグラウンドのシグナルを差し引いて、アレイにおける各対のスポットに対する平均のピクセル強度を作成した(=発現レベル)。

【0116】

RT-PCRによる選択された遺伝子に対するマイクロアレイ結果の確認

5mM MgCl₂、10mM Tris-HCl、50mM KCl、0.1%トリトンX-100(Triton X-100)、1mMのそれぞれdATP、dGTP、dCTP、dTTP、0.5単位の組換えRNasinリボヌクレアーゼ阻害剤(プロメガ(Promega))および15単位のAMV逆転写酵素(プロメガ(Promega))を含有する20μl反応容積中でオリゴdTプライマー(プロメガ(Promega))を使用して、各患者サンプル由来の1μgの総RNAを逆転写した。反応混合物を42℃で60分間、インキュベートし、95℃で5分間加熱し、次いで、滅菌水で200μlに希釈した。次いで、遺伝子フィルター製造者によって提供されたデータベースの取得番号に基づきプライマー・エクスプレス(Primer Express)ソフトウェア(PEアップライド・バイオシステムズ(PE Applied Biosystems))を使用してオステオプロテゲリン用に設計した特異的プライマー対：オステオプロテゲリン-112F 5'CTG CGC GCT CGT GTT TCT(配列番号5)およびオステオプロテゲリン-185R 5'AAT GAA GGT ACT TTG GAG GAA ACG(配列番号6)を使用し、逆転写酵素反応物の希釈物を、タックマン(Taqman)(PEアップライド・バイオシステムズ7700(PE Applied Biosystems 7700))上でリアルタイムPCR分析に供した。結果を、各サンプルにおけるハウスキーピング遺伝子グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)の発現に対して正規化し、異常患者サンプルの発現値を対応する正常患者サンプルで徐することによって決定された倍率変化として表す。

【0117】

ヒトオステオプロテゲリンの全cDNAコード配列のクローニング

次いで、OPGの全長cDNAコード配列を、EMBLデータベースにおいて利用可能なcDNA配列(取得番号U94332)に基づく次のプライマー：OPG F 5'CGG GAT CCGCCA CCA TGA ACA AGT TGC TGT GC T(配列番号7)およびOPG R 5'AAG CTC GAG TTA TAA GCA GCT TAT TTTをそれぞれ50pmoleで、0.3mM dNTP、1mM MgSO₄、5μlの正常ヒト皮膚(包皮)線維芽細胞cDNAテンプレート(上記の通りに調製した)、5μlの10×Pfx増幅緩衝液(ライフ・テクノロジーズ(Life Technologies))および1μlのプラチナ(Platinum)Pfx DNAポリメラーゼ(ライフ・テクノロジーズ(Life Technologies))を含有する50μl反応混合物中で使用する逆転写酵素PCRによって、クローニングした。反応混合物を94℃で2分間加熱し、次いで、次のような35サイクルのPCRに供した：94℃で15秒間、55℃で30秒間および68℃で1分間。増幅産物を1×TAE緩衝液(ライフ・テクノロジーズ(Life Technologies))中で1%アガロース上で分析し、予想される分子量(1205bp)に泳動するPCR産物を、ウィザード(Wizard)PCR精製キット(プロメガ(Promega))を使用してゲルから精製した。

【0118】

100ngのゲル精製したDNAを、製造者の条件に従って制限酵素BamHIおよびXhoI(ファルマシア(Pharmacia))により消化し、上記のように再精製し、標準的な分子生物学技術に従って、T4 DNAリガーゼ(ニュー・イングランド・バイオラボズ(New England Biolabs))を使用して、BamHI/X

hoI消化したプラスミドp cDNA3.1(+)(インビトロゲン(Invitrogen))に連結した。連結産物を、バイオラド・ジーン・パルサー(Biorad Gene Pulser)を使用するエレクトロポレーションによって、大腸菌(E.coli)TOP 10 F'株(インビトロゲン(Invitrogen))に形質転換した。プラスミドDNAを、得られるコロニーから増殖させた5mlの培養液から単離し、OPGの配列を確認するためにT7およびp cDNA3.1ASプライマー(インビトロゲン(Invitrogen))を使用して、アップライド・バイオシステムズ3700(Applied Biosystems 3700)シーケンサー上の自動化配列分析に供した。

【0119】

病変および正常皮膚線維芽細胞から単離したタンパク質抽出物におけるオステオプロテグリンの検出

上記のように培養した強皮症患者およびコントロール被験体由来の低継代病変および正常線維芽細胞を、1mM EDTAを含有するPBSで細胞単層を、5分間、37℃で処置することによって回収した。分離した細胞を、遠心分離で回収し、50μlのPBS中に再懸濁し、50μlのサンプル緩衝液(20%SDS、0.2%ブロモフェノールブルー、50%グリセロール、1M Tris pH6.8)により処置し、-80℃で凍結し、次いで融解した。製造者のプロトコルに従い、BCAキット(ピアス(Pierce))を使用して、タンパク質含有量を決定した。約10μgのタンパク質を0.1容積のDTT(0.1M)で処置し、製造者の指示に従って、4~12%SDSポリアクリルアミドゲル(ノベックス(Novex))上で稼動させた。次いで、ノベックス(Novex)ウェットボルト装置を30Vで1時間、使用して、タンパク質のバンドをニトロセルロースフィルターに移した。次いで、5%脱脂粉乳を含有するPBS中4℃で、膜を1晩ブロックし、次いで、PBSTで洗浄した。膜を、PBST/1%BSA中0.5μg/mlの1次抗体(R&Dシステムズ(R&D systems)、抗OPGモノクローナル抗体、カタログ番号MAB8051)と共に、1時間、室温で、振盪しながらインキュベートした。この後、PBST/1%BSA中、1/3000希釈で2次抗体(抗マウス西洋ワサビペルオキシダーゼ、シグマ(Sigma))と共にインキュベーションする前に、PBSTで徹底的に膜を洗浄した。ECL試薬およびアマシャム(Amersham)製のハイパーフィルム(Hyperfilm)TMを使用して現像および可視化する前に、最後に膜を徹底的に洗浄した。

【0120】

組換えOPGで処置したかまたはOPG/p cDNA3.1ベクターのトランスフェクション後の線維芽細胞の細胞培養上清中のI型コラーゲンを測定するためのELISA

シ・ウェン(Shi-wen)ら(シ・ウェン(Shi-wen)ら、1997)により記載されている捕捉ELISAシステムを使用して、培養ヒト線維芽細胞におけるコラーゲン合成をインビトロで測定した。簡単に説明すると、AG1518ヒト皮膚線維芽細胞(ATCCより購入)を、5%FCSおよび2mMグルタミンを含有するDMEM培地(ライフ・テクノロジーズ(Life Technologies))に維持した。トリプシン処理により細胞を回収し、48ウェル細胞培養プレート(ファルコン(Falcon))中70%のコンフルエンスで、5%血清を含有する培地中に播種し、次いで、8時間後に、血清を含まない培地に移した。24時間後、培地を取り出し、50μM L-アスコルビン酸(和光純薬工業(Wako Pure Chemical Industries))および漸増濃度のヒト組換えオステオプロテグリン(OPG-Fc、R&Dシステムズ(R&D systems)より購入)を含有する血清を含まない新鮮培地と置き換えた。16時間後、TGFβ1(ペプロテック(Peprotech))を、2ng/mlの最終濃度まで培地に添加し、さらに24時間後、培地を取り出し、遠心分離して、細胞破砕物を除去し、希釈し、下記のようにI型コラーゲンのためのELISAに供した。

【0121】

OPG cDNA (pcDNA3.1-OPG) によるトランスフェクション後または次の通りのモックトランスフェクション (pcDNA3.1ベクターのみ) 後の初代ヒト線維芽細胞におけるコラーゲン合成を測定した: OBHC細胞をトリプシン処理により回収し、48ウェルプレート中50%コンフルエンスで完全培地中にプレート化した。製造者の指示に従い、フューゼン (Fugene) Vトランスフェクション試薬 (ロッシュ (Roche)) を使用して、プラスミドをOBHC細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの5時間後、培地を、L-アスコルビン酸を含有する血清を含まない新鮮培地と1晩置き換え、次いで、上記のように、TGFβ1 (10 ng/ml) で24時間処置した。

【0122】

マキシソープ (MaxiSorp) プレート (ヌンク (Nunc)) を、1晩、4、PBS (pH 7.4) 中 5 μg/ml ヤギ抗ヒトI型コラーゲン (サザン・バイオテクノロジー・アソシエーツ社 (Southern Biotechnology Associates, Inc.)) で被覆した。次いで、抗体溶液を取り出し、プレートを、PBS-1% BSAにより、1時間、室温でブロックした。次いで、プレートを、PBS/0.05% ツイーン (Tween) 20 (PBST) で4回洗浄した。100 μl 馴化培地の3回重複サンプルを試験した。サンプルを2時間、室温 (RT) でインキュベートし、PBSTで4回洗浄した。次いで、サンプルを、1:2000希釈のビオチン化ヤギ抗体ヒトI型抗体 (サザン・バイオテクノロジー・アソシエーツ社 (Southern Biotechnology Associates, Inc.)) と共に1時間、RTでインキュベートし、次いで、PBSTで4回洗浄した。次いで、サンプルを1/4000希釈のHRP-ストレプトアビジン結合抗体 (ザイメド (Zymed)) と共に、1時間、RTで振盪しながらインキュベートした。最後に、サンプルをPBSTで4回洗浄した。OPD基質 (シグマ (Sigma)、カタログ番号P9187) を添加し、発色のために10分間、放置した。20% H₂SO₄ミックスで反応を停止し、ビクター (Victor)² マルチレベルカウンター (ワラック (Wallac)) 上、496 nmでプレートを読み取った。モレキュラー・プローブス (Molecular Probes) 製サイクアント (CyQuant) 細胞増殖アッセイキット (C-7026) を使用して、細胞数に対して、結果を正規化した。

【0123】

CTGF-SEAPプロモーターアッセイ

オリゴヌクレオチド 5' - ATCTCGAGGGCCACTCGTCCCTTGTCC (配列番号9) および 5' - ATAAGCTTGGAGTTCGCACCTGGCTGTCTCC (配列番号10) により実施されるPCRによって、CTGF-SEAPプロモーター-レポータープラスミドを構築し、ヒトCTGF (結合組織成長因子) 遺伝子プロモーター領域 (788 bp) を増幅した。ゲル精製した増幅産物をpSEAP2-ベシック (クローンテック (Clontech)) にサブクローニングした。

【0124】

NIH 3T3線維芽細胞 (ATCC) をT-75フラスコに播種し、5 μgのCTGF-SEAPおよび1 μgのpcDNA3.1 (インビトロゲン (Invitrogen)) プラスミドで同時トランスフェクトした。800 μg/mlのG418 (シグマ (Sigma)) 上で細胞を選択した。

【0125】

安定に組み込まれたCTGF-SEAPプロモーター-レポーターを有するクローンを樹立し、クローンについて分析し、細胞に基づくアッセイを開発するために最も感受性の高いクローンを選択した。

【0126】

このクローン (CTGF-SEAP) 由来の細胞を、0.5% FCSを含有するDMEM中、96ウェルプレートあたり10,000細胞でプレート化した。翌日、異なる濃度のTGFβおよびOPG (オステオプロテゲリン) を伴うかまたは伴わずに、新鮮培地を

10

20

30

40

50

添加し、S E A P アッセイのために上清を回収する前に、細胞をさらに72時間、インキュベートした。

【0127】

製造者のプロトコル(クローンテック(Clonotech)キット)に従って、S E A P 発現を測定した。

【0128】

インビボ研究

1日目に、塩水中ブレオマイシン(0.075IU)の気管内投与によって、雄性マウス(20~25g)に肺線維症を誘発させた。マウスを、10匹の3つの個別のグループに分けた。1つのグループには、5mg/kg(塩水中)のOPGの皮下(s.c.)注射を連日行った。第2のグループには、OPG(0.5mg/kg)s.c.連日投与を行った。第3のグループは、塩水(s.c.)を連日投与した。第4のグループは週齢および性別の一致した非処置の生来のマウスを含んだ。連日、体質量を測定し、すべてのマウスを12日目に屠殺した。ヒドロキシプロリン決定のために個々の肺胞を単離する(スミス(Smith)ら、1994)か、またはホルマリン固定化して、組織学のためにパラフィンで包埋した。肺切片を、コラーゲンのためにトリクロムまたはピクロ・シリウス・レッド(picrosirius red)で染色し(バンクロフト(Bancroft)およびスティーブンス(Stevens))、線維症/肺の程度を評価した。

【0129】

インビトロでハロフジノン処置した強皮症患者線維芽細胞におけるOPG mRNAの半定量的逆転写酵素PCR分析

病変および非病変線維芽細胞を上記の培地で維持した。細胞単層(70%のコンフルエント)をハロフジノン(10^{-8} M)(コルゲート・ファーマシューティカルズ(Collgard Pharmaceuticals))で12時間処置した。処置期間後、細胞を回収し、トリゾール(Trizol)方法を使用して、総RNAを単離した。次いで、オステオプロテゲリンに特異的なPCRプライマー(OPG 740 F 5'ACGCCCTAAC TGG CTT AGT GT(配列番号11)およびOPG 1280 R 5'CTG ATT GGA CCT GGT TAC CT 配列番号12)を使用して、1μgの総RNAを上記の逆転写酵素PCRに供した。30サイクルのPCR後、反応産物を臭化エチジウムで染色した1%アガロースゲル上で移動させ、コダック1Dデジタルサイエンス(Kodak 1D Digital Science)ソフトウェアを使用して写真撮影し、解析した。次いで、予想された分子量に泳動するPCR産物を、ゲル抽出したDNAの直接配列決定によって、オステオプロテゲリンであることを確認した。ゲノムDNA混入のコントロールとして、適切なRNAを含有するが逆転写酵素を含有しない逆転写酵素反応混合物上でPCR反応を実施した。逆転写酵素反応物もまた、初期反応のインプットRNAの完全性および量の陽性コントロールとして、GAPDH特異的PCRプライマーで増幅させた。

【0130】

I型コラーゲンα2プロモーター活性

マウス胚線維芽細胞(πS3細胞)を、2%FCSおよび2mMグルタミンを含有するDMEM-F12中で維持した。トリプシン処理により細胞を回収し、48ウェル細胞培養プレート中50%のコンフルエンスでプレート培養した。翌日、血清を含まない培地中、製造者の指示に従い、フュージン(Fugene)V試薬(ロッシュ(Roche))を使用して、ルシフェラーゼcDNAに連結された3.5kbのコラーゲン1α2プロモーター(ロイヤル・フリー・ホスピタル(the Royal Free Hospital)、英国、ロンドン(London, England))からデビッド・アブラハム博士(Dr. David Abraham)により贈与された)を含有するpGL3ベクター(プロメガ(Promega))で細胞をトランスフェクトした。5時間のトランスフェクション後、2%FCSを含有する新鮮培地に細胞を移し、0、1、10または100ng/mlの組換えヒトオステオプロテゲリンの存在下、ハロフジノン単独(10

10^{-10} M)、 $\text{TGF}\beta 1$ (5 ng/ml) 単独または HF (10^{-8} M) + $\text{TGF}\beta 1$ (5 ng/ml) で 12 時間、処置した。処置期間後、2% FCS および 2 mM グルタミンを含む完全培地に細胞を移し、プロメガ (Promega) より購入したブライト - グロ (Bright - Glo) アッセイシステムを使用して、各ウェルにおいて 48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。結果を相対発光単位として表し、サイクワント (Cyc quant) キット (モレキュラー・プローブス (Molecular Probes)) を使用して、平行実験で決定した細胞 / ウェルの数に正規化した。

【実施例】

【0131】

実施例 1：病変対非病変線維芽細胞においてオステオプロテゲリン mRNA は有意に負に調節される

10

6 例の強皮症患者由来の正常および異常線維芽細胞サンプルに対して、遺伝子フィルターマイクロアレイ分析を実施した。オステオプロテゲリン (OPG) の平均発現レベルを図 1 a に示し、各患者についての発現レベルを図 1 b に示す。

【0132】

マイクロアレイ上で得られた結果は、OPG 特異的 PCR プライマーを使用して 9 例の患者から単離された RNA サンプルのリアルタイム PCR 分析によってさらに確認した。結果を図 2 に示し、発現レベルの倍数の変化 (病変を非病変で割る) として表す。9 例中 7 例の患者において、OPG は、同じ患者から単離された非病変線維芽細胞と比較して病変線維芽細胞では少なくとも 2 分の 1 に調節された。

20

【0133】

正常ヒト皮膚線維芽細胞の初代培養物における OPG mRNA 発現は、細胞を継代する際に有意に変化しないことから、同じ患者由来の非病変および病変線維芽細胞間で観察された発現の差異は、2 つの集団間の培養条件の差異によるものではないと思われる (データ示さず)。さらに、強皮症患者由来の異常皮膚の全生検標本から単離された総 RNA のリアルタイム RT - PCR 分析は、同じ患者由来の临床上正常な外観を呈する解剖学的部位が一致する皮膚と比較して、オステオプロテゲリン mRNA のレベルは低いことを示した (図 3)。

【0134】

実施例 2：OPG は、強皮症患者由来の病変対非病変線維芽細胞において、タンパク質レベルで負に調節される

30

オステオプロテゲリン mRNA の負の調節がオステオプロテゲリンタンパク質の変化に反映するかどうかを決定するために、年齢および性別が一致する被験者由来の解剖学的部位が一致する正常および病変皮膚線維芽細胞の OPG 含有量を、抗ヒトオステオプロテゲリンモノクローナル抗体を使用するウエスタンブロット分析によって決定した。結果を図 4 に示す。オステオプロテゲリン単量体および二量体は、3 / 4 正常線維芽細胞において明らかに検出可能であり、1 つの正常サンプルでは弱く発現した。異常線維芽細胞では、試験した 4 つのすべてのサンプルにおいて単量体のバンドが弱く認められた。組換えにより発現される OPG - Fc 融合タンパク質は、染色の陽性コントロールとしての役割を果たす。

40

【0135】

実施例 3：ヒト OPG のクローニング

インビトロおよびインビボで OPG 活性を特徴付けるために、予想される開始および終止コドンに隣接する OPG の公開された配列に基づくプライマーを使用して、逆転写酵素 PCR によって、全 cDNA コード配列をクローニングした。得られる OPG cDNA クローン (pcDNA3.1 中) の配列分析は、モリナガ (Morinaga) ら (モリナガ (Morinaga) ら、1998) によって公開された OPG の配列のヌクレオチドレベルで 100% 同一を示したが、シモネット (Simonet) ら (1997) によって公開された配列に対しては 1 アミノ酸だけ異なった (配列番号 2 および 4 を参照のこと)。

50

【0136】

実施例4：ヒト皮膚線維芽細胞株におけるOPG I型コラーゲン合成に対する効果

L-アスコルビン酸の存在下で培養される線維芽細胞は、ELISAによるコラーゲン検出を可能にする培養培地にコラーゲンを分泌する。ヒト線維芽細胞は、前線維化（profibrotic）サイトカインTGFβ1による刺激応答するコラーゲン合成を正に調節する。従って、本発明者らは、AG1518C線維芽細胞におけるTGFβ1誘導性コラーゲン合成に対する組換えオステオプロテゲリン（オステオプロテゲリン-Fc融合タンパク質）の効果について試験した。TGFβ1処置の前に線維芽細胞培養物に添加されたオステオプロテゲリンは、用量依存的様式で、TGFβ1により仲介されるコラーゲン合成の増加を阻害することが可能であった（図5）。中和抗OPGモノクローナル抗体の存在下で実験を行った場合、コラーゲン合成に対する効果は認められなかった。同様に、組換えOPGの非存在下で抗OPGのみを投与すると、コラーゲン合成に対する効果が認められなかったことから、観察されるコラーゲン合成の減少は、OPGの特異的效果であることが示唆された。

10

【0137】

同様の効果は、OPGの全コード配列を含有するプラスミド（pcDNA3.1/OPG）による初代ヒト線維芽細胞（OBHC）のトランスフェクション時のコラーゲン合成に対して観察された。OPGプラスミドによりトランスフェクトされたOBHCでは、モック（pcDNA3.1空ベクター）トランスフェクトOBHCとは対照的に、TGFβ1刺激に対する応答でのコラーゲン合成の増加は観察されなかった（図6）。

20

【0138】

実施例5：OPG処置は、マウス肺線維芽細胞における基底およびTGFβ1誘導性両方の1型コラーゲンα2プロモーター活性を有意に減少する

OPGによるコラーゲン合成の減少がコラーゲンプロモーターに対する効果によるものであるかどうかを評価するために、本発明者らは、3.5kb領域のI型コラーゲンα2プロモーターの制御下にあるレポーター遺伝子cDNA、ルシフェラーゼを含有するプラスミドでトランスフェクトされているマウス肺線維芽細胞に対するOPG処置の効果について調べた。構築物中のコラーゲンプロモーターの刺激は、発光アッセイによって基質であるホタルルシフェリンの存在下で活性を測定することができるルシフェラーゼ遺伝子の転写活性を生じる。

30

【0139】

1ng/ml～100ng/mlでのOPGによる処置は、コラーゲンプロモーター活性の基底レベルを有意に減少することが可能であった（図7A、コントロール）。TGFβ1刺激の後、コラーゲンプロモーター活性の少なくとも2倍の増加が認められた（図7A、TGFβ1）。細胞が100ng/mlのOPGで同時に処置されると、これは有意に減少する（P=0.05）。

【0140】

植物アルカロイドのハロフジノンは、I型コラーゲン合成の特異的阻害剤であることが報告されている（グラノット（Granot）ら、1993）。線維芽細胞を低濃度のハロフジノン（ 10^{-10} M）で処置した場合、本発明者らは、試験した最も高いOPG用量（100ng/ml、P=0.01）で極めて有意であった漸増濃度のオステオプロテゲリン（1ng/ml～100ng/ml）でコラーゲンプロモーター活性が用量依存的に減少することを観察した（図7A、HF）。ハロフジノンは、TGFβ1誘導性コラーゲンプロモーター活性を阻害することができる（マックガハ（McGaha）ら、2002）。OPGはまた、用量依存的様式でコラーゲンプロモーター活性のTGFβ1誘導性増加を阻害することによって、ハロフジノンの効果を増強することが可能であった。この効果は、100ng/mlのOPGで極めて有意であり（P=0.01）、この濃度でコラーゲンプロモーター活性は、ほとんど基底レベルに戻る（図7、HF+TGFβ1）。

40

【0141】

実施例6：結合組織成長因子のTGFβ仲介トランス活性化はOPGによって妨げられる

50

結合組織成長因子 (CTGF)、38-kD システインリッチタンパク質は、線維芽細胞によって細胞外マトリックスの産生を刺激する。CTGF 過剰産生は、肺、皮膚、肝臓、腎臓および血管を含む多くのヒト線維化組織において見出されることが報告されている。インビトロでは、TGF β は、ヒト肺線維芽細胞における CTGF 遺伝子の転写を活性化する。CTGF プロモーター - レポーターを、レポーターとしての分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP) により構築したが、その発現は、細胞抽出物ではなく馴化培地で測定することができる。

【0142】

細胞発現について、CTGF - SEAP レポーター遺伝子を TGF β および 0.46、1.4 または 4.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の OPG と共にインキュベートした。この実験の結果を図 7B に示す。OPG とのインキュベーションは、TGF β 誘導性 CTGF 発現を抑制したことから、OPG の抗線維化活性がさらに示された。

10

【0143】

実施例 7：ハロフジノン処置した強皮症患者線維芽細胞における OPG mRNA の発現
ハロフジノンは、線維芽細胞でのコラーゲン合成を負に調節することが可能である機構については、十分に解明されていない。従って、本発明者らは、逆転写酵素 PCR によって、強皮症患者由来の病変および非病変線維芽細胞の対における OPG mRNA の発現に対するハロフジノンの効果を調べた。

【0144】

OPG mRNA 発現は、 10^{-8}M ハロフジノンによる処置の 12 時間後に測定する場合、試験したすべてのサンプル (正常 3 および異常 2) の病変および非病変線維芽細胞の両方で高度に正に調節される (少なくとも 3 倍) (図 8)。興味深いことに、遺伝子濾過マイクロアレイ分析実験では、OPG は、ハロフジノンによる線維芽細胞の処置に対して最も正に調節された遺伝子の 1 つであった (データ示さず)。

20

【0145】

実施例 8：インビボでの OPG 投与はマウスにおけるブレオマイシン誘導性肺線維症に対して保護する

単回の気管内注射のブレオマイシンの C57BL/6 マウスへの投与は、14 日以内に肺線維症の迅速な誘発を生じ、肺の間隙内におけるコラーゲン沈着の増加を特徴とする (ハットリ (Hattori) ら、2000)。OPG 投与が線維症の発達に対する任意の保護効果を有するかどうか、または実際に疾患の重症度が減少するかどうかを決定するために、本発明者らは、ブレオマイシン処置したマウスにおける OPG の連日注入の効果を試験した。

30

【0146】

ブレオマイシンを単回の気管内滴注によって 10 匹の 3 つのグループに投与した。ブレオマイシン処置の翌日に皮下注射を開始することにより OPG を投与した。1 つのグループは高用量 (5 mg/kg) および第 2 のグループはより低い用量 (0.5 mg/kg) を投与した。コントロールマウスには塩水 s.c. を連日投与した。比較のため、完全に非処置で、週齢および性別が一致した個体 (生来のマウス) を含んでなる第 4 のグループのマウスを研究に含めた。

40

【0147】

ブレオマイシンで処置した動物は、直ちに悪化した。不自由なく健康を保持し、正常な体重増加を示す非処置の動物とは対照的に、これは迅速な体質量の消失を生じ、死をもたらし得る (図 9A)。低用量の OPG で処置したマウスは、コントロールマウスに匹敵する重量の消失を示した。このグループでも死亡率の増加が上昇するようであった (図 9B)。高用量の OPG を投与したマウスの方がより良好で、体質量の低下は処置の最初の 5 日間のみであった。このことは、このグループの死亡率が低いこと (< 10%) にも反映した。

【0148】

ブレオマイシン処置の 12 日後に生存していたすべてのマウスを屠殺した。肺の組織学

50

的分析は、高用量のOPG処置動物では、線維化病変が肺表面の約70%を占めるコントロールマウスと比較して、線維化症に冒された肺の表面積が有意に低かったことを示した(図10A)。高用量のOPGで処置したマウスはまた、コントロールマウスと比較して、肺中のヒドロキシプロリンの含有量が有意に低く(P=0.05)、非処置マウスに認められる含有量に匹敵した(生来グループ、図10B)。低用量のOPGで処置したマウスでもヒドロキシプロリン含有量の減少が観察されたが、このグループでの生存数が少数であったため、統計的有意には至らなかった。ヒドロキシプロリンの含有量はコラーゲン沈着の測定になる。ここでの結果は、OPG処置が肺のコラーゲン沈着を効果的に減少することを示す。

【0149】

10

参考文献

1. アブラハム D. (Abraham D.), ルポリ S. (Lupoli S.), マックウィルター A. (McWhirter A.), プラッター-ザイベルク C. (Plater-Zyberk C.), ピーラ T.H. (Piela T.H.), コーン J.H. (Korn J.H.), オルセン I. (Olsen I.) およびブラック C. (Black C.) (1991) Expression and function of surface antigens on scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 34, 1164-1172.
2. アブラハム DJ (Abraham DJ), シーウェン X (Shiwen X), ブラック CM (Black CM), サ S (Sa S), キュ Y (Xu Y), リースク A. (Leask A.) *J Biol Chem.* 2000 May 19; 275(20): 15220-5.
3. アルトシュール S F (Altschul S F) ら, *J Mol Biol*, 215, 403-410, 1990
4. アルトシュール S F (Altschul S F) ら, *Nucleic Acids Res.*, 25: 389-3402, 1997
5. バンクロフト J.D. (Bancroft J.D.) およびスティーブンス A. (Stevens A.) *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone 30
6. ブラック C.M (Black C.M) およびデントン C.P. (Denton C.P.) (1998) Systemic sclerosis and related disorders. In "Oxford textbook of Rheumatology" (P.G. マディソン (P.G. Maddison), D.A. イーセンベルグ (D.A. Isenberg), P. ウー (P. Woo) および D.N. グラス (D.N. Glass) 編) 771-789 頁, オックスフォード大学出版 (Oxford Univ. Press), ニューヨーク (New York).
7. クレメンツ P.J. (Clements P.J.) およびフルスト D.E. (Furst D.E.) (1996) "Systemic Sclerosis" ウィリアマ・アンド・ウィリアムス (Williams and Williams), バルチモア (Baltimore).
8. デベルックス J (Devereux J) ら, *Nucleic Acids Res*, 12, 387-395, 1984.
9. エンゲルマン, H. (Engelmann, H.), ノビック, D. (Novick, D.), およびワラヒ, D. (Wallach, D.), 1990, *J. Biol. Chem.* 265, 1531-1536.
10. グラノット I (Granot I), ヘレビー O (Halevy O), ヒューイツ S (Hurwitz S), ピネス M (Pines M). (1993) Halofuginone: an inhibitor of collagen typ 50

- e I synthesis. Biochim Biophys Acta 1156, 107 - 112
11. グランタム (Grantham) (1974), Science, 185. 862 - 864.
12. ハットリ N. (Hattori N.), デーゲン J. L. (Degen J. L.), シッソン T. H. (Sisson T. H.), リウ H. (Liu H.), モーレ B. B. (Moore B. B.), パンドランギ R. G. (Pandurangi R. G.), シモン R. H. (Simon R. H.) およびデュルー A. F. (Drew A. F.) (2000) Bleomycin induced pulmonary fibrosis in fibrinogen null mice. J. Clin. Invest. 106, 1341 - 135
13. コステヌイック PJ (Kostenuik PJ), シャルハウブ V. (Shalhoub V.) Curr Pharm Des 2001 May; 7(8): 613 - 35
14. クレイン, PM (Krein, PM), ハング Y (Huang Y) およびウィンストン BW (Winston BW) (2001). Expert Opin. Ther. Patents 11(7): 1065 - 1079.
15. レイトン, C. (Leighton, C.) Drugs 2001 61(3), 419 - 427.
16. レロイ E. C. (LeRoy E. C.) (1974) Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro. J. Clin. Invest. 54, 880 - 889.
17. マーチニ (Martini), マッカリオ (Maccario), ラベリ (Ravelli) ら, Arthritis Rheum. 1999, 42, 807 - 811.
18. マックガハ TL (McGaha TL), フェルプス RG (Phelps RG), スピーラ H (Spiera H), ボナ C (Bona C). (2002) Halofuginone, an Inhibitor of Type - I Collagen Synthesis and Skin Sclerosis, Blocks Transforming - Growth - Factor - beta - Mediated Smad3 Activation in Fibroblasts. J Invest Dermatol. 118, 461 - 70.
19. ミン H. (Min H.), モロニー S. (Morony S.), サロシ I. (Sarosi I.), デュンスタン C. R. (Dunstan C. R.), カッパレリ C. (Capparelli C.) ら, (2000) Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. J. Exp. Med. 192, 463 - 474.
20. モリナガ T. (Morinaga T.), ナガカワ N. (Nagakawa N.), ヤスダ H. (Yasuda H.), ツダ E. (Tsuda E.) およびヒガシ K. (Higashi K.) (1998) Cloning and characterization of the gene encoding human osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor. Eur. J. Biochem. 254, 685 - 691.
21. ピアソン W R (Pearson W R), Methods in Enzymology, 183, 63 - 99, 1990
22. ピアソン W R (Pearson W R) およびリップマン D J (Lipman D J), Proc Nat Acad Sci USA, 85, 2444

- 2448, 1988
23. シルマン A. J. (Silman A. J.) (1991) Morat lity from scleroderma in England and Wales 1968 - 1975. Ann. Rheu. Dis. 50, 95 - 96.
24. シモネット W. S. (Simonet W. S.)、ラセイ D. (Lacey D.) : , ダンスタン C. R. (Dunstan C. R.)、ケリー M. (Kelley M.) ら (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell 89, 309 - 319.
25. シ-ウエン X. (Shi-wen X.)、デントン C. P. (Denton C. P.)、マックウィルター A. (McWhirter A.)、ボウ-ガリオス G. (Bou-Gharios G.)、アブラハム D. J. (Abraham D. J.)、デュ ボイス R. M. (du Bois R. M.) およびブラック C. M. (Black C. M.) (1997) Scleroderma lung fibroblasts exhibit elevated and dysregulated collagen type I biosynthesis. Arthritis Rheum. 40, 1237 - 1244. 10
26. シ-ウエン X (Shi-Wen X)、デントン CP (Denton CP)、マックウィルター A (McWhirter A)、ボウ-ガリオス G (Bou-Gharios G)、アブラハム DJ. (Abraham DJ)、デュ ボイス R M (du Bois RM)、ブラック CM (Black CM). (1997) Scleroderma lung fibroblasts exhibit elevated and dysregulated type I collagen biosynthesis. Arthritis Rheum. 40, 1237 - 1244 20
27. スミス (Smith) およびウォーターマン (Waterman) J Mol Biol, 147, 195 - 197, 1981, Advances in Applied Mathematics, 2, 482 - 489, 1981.
28. スミス R. E. (Smith R. E.)、ストリーター R. M. (Strieter R. M.)、ファン S. H. (Phan S. H.)、ルカクス N. W. (Lukacs N. W.)、ホッフネーグル G. B. (Huffnagle G. B.)、ウィルケ C. A. (Wilke C. A.)、ブルディック M. D. (Burdick M. D.)、リンカーン P. (Lincoln P.)、エバノッフ H. (Evanoff H.) およびクンケル S. L. (Kunkel S. L.) (1994) Production and function of murine macrophage inflammatory protein-1 α in bleomycin induced lung injury. J. Immunol. 153, 4704. 30
29. スミス (Smith)、Textbook of the Autoimmune Diseases、ラヒタ (Lahita)、キオラッジ (Chiorazzi) およびリーベス (Reeves) 編、リップピンコット ウィリアムス&ウィルキンス (Lippincott Williams & Wilkins)、フィラデルフィア (Philadelphia) 2000. 40
30. ストレロウ D. (Strehlow D.) およびコーン J (Korn J) (1998) Biology of the scleroderma fibroblast. Curr. Opin. Rheumatol. 10, 572 - 578.
31. ツッチ, A. (Tucci, A.)、ジェームス, H. (James, H.)、チケポルチシェ, R. (Chicheportiche, R.)、ボンネホイ, J. Y. (Bonnefoy, J. Y.)、デイヤー, J. M. (Dayer, J. M.)、およびツブラー, R. H. (Zubler, R. H.) 1992, J. Immunol. 148, 2778 - 2784.
32. フォン ハイジン G (Von Heijne G). (1986) Nuclei 50

c Acids Res. 14, 4683-4690.

33. ウィグレイ F. M. (Wigley F. M.) およびスーレ S. D. (Sule S. D.) (2001) Expert Opinions on Investigational Drugs 10(1) 31-48.

34. ウィグレイ F. M. (Wigley F. M.) およびボーリング C. L. (Boling C. L.) (2000) The treatment of scleroderma. 2, 276-292.

35. ウィルム M. (Wilm M.), シェベヘンコ A. (Shevchenko A.), ホウタエベ T. (Houthaeve T.) プレイト S. (Breit S.), シュバイガーラー L. (Schweigerer L.), フットシス T. (Fotsis T.) およびマン M. (Mann M.) (1996) Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. Nature, 379: 466-469

36. ヤスダ H. (Yasuda H.), シマ N. (Shima N.), ナガカワ N. (Nagakawa N.), モチヅキ S. (Mochizuki S.), ヤノ K. (Yano K.) ら (1998) Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. Endocrinology 139, 1329-1337.

【図面の簡単な説明】

【0150】

【図1】遺伝子フィルターマイクロアレイ分析によって決定した6例の強皮症患者由来の正常（斜線）および疾患（平行線）線維芽細胞におけるOPG mRNAの発現を表す。平均発現レベルを（a）に示し、中央値を（b）に示す。

【図2】9例の強皮症患者におけるOPG mRNAのリアルタイムPCR分析を表す。それぞれの患者に対する結果を、病変/非病変線維芽細胞におけるOPG mRNAの発現の割合として表す。

【図3】リアルタイムPCR分析によって決定した5例の強皮症患者の病変および非病変皮膚から採取した生検におけるOPG mRNA発現を表す。横棒は、各グループに対する発現の中央値を示す。

【図4】病変および正常皮膚線維芽細胞におけるOPG発現のウエスタンブロット分析を表す。病変線維芽細胞（A1～A4）および正常線維芽細胞（N1～N4）。ゲルの左側の矢印は生来のOPG（55kDa単量体）およびその二量体型（110kDa）の位置を示す。抗体に対する陽性コントロールとして、OPG Fc融合タンパク質（R&Dシステムズ（R&D systems）から購入）を使用した。

【図5】AG1518ヒト線維芽細胞のコラーゲン合成に対するOPGの影響を表す。AG1518細胞は、完全に未処置であるか、あるいは10、20もしくは40ng/ml OPGで24時間予め処置したか、または40ng OPG + 抗OPG中和モノクローナル抗体（1μg/ml）、もしくは抗OPG中和モノクローナル抗体単独で予め処置したかのいずれかの後、2ng/ml TGFβ1で24時間処置した。コラーゲン合成をELISAで決定した。結果は、3回測定した値 + S.E.M. の平均値である。

【図6】ヒト初代線維芽細胞（OBHC細胞）のI型コラーゲンアルファ2合成に対するOPGトランスフェクションの効果を表す。方法に記載のように、OBHC細胞を、pcDNA3.1/OPG（OPG）またはpcDNA3.1単独（モック）でトランスフェクトした。TGFβ1処置24時間後に馴化培地中のコラーゲンをELISAにより測定した。結果は、3回測定した値 ± S.E.M. の平均値である。

【図7A】マウス胚線維芽細胞のI型コラーゲンα2プロモーター活性OPGの影響を表

す。マウス胚線維芽細胞（ $\pi S3$ 細胞）を、ルシフェラーゼcDNAに連結した3.5 kbのコラーゲン1 α 2プロモーターを含有するpGL3ベクターでトランスフェクトした。トランスフェクション後、細胞を新鮮培地に移し、未処置（コントロール）か、またはハロフジノン（ 10^{-10} M）単独（HF）；TGF β 1（5 ng/ml）（TGF β 1）；もしくはTGF β 1（5 ng/ml）+HF（ 10^{-8} M）（HF+TGF β 1）のいずれかと共に、漸増濃度のオステオプロテゲリンで12時間処置した。結果は、3回測定した値の平均値である。*は $P < 0.05$ を示し、**は $P < 0.01$ を示す。

【図7B】TGF β 単独かまたは異なる量のOPGとの組み合わせのいずれかと共にインキュベーション後のCTGFプロモーター下でのレポーター遺伝子発現の程度を示す。

【図8】強皮症患者由来の病変および非病変線維芽細胞をハロフジノンでインビトロ処置した後のオステオプロテゲリンmRNAの逆転写酵素PCR分析を表す。病変（接尾辞A）、または非病変（接尾辞N）、線維芽細胞におけるオステオプロテゲリン（上部）およびGAPDH（下部）のRT-PCR反応産物を示す1%アガロース-臭化エチジウム染色ゲル。

【図9】プレオマイシン処置したマウスにおける肺線維症の発達に対するオステオプロテゲリンのインビボ投与の効果を表す。A：オステオプロテゲリン処置後のマウス体質量の変化。結果を、プレオマイシンの気管内滴注後毎日測定した平均質量（g/グループ）として表す。B：プレオマイシン投与による死亡率。結果を、10匹の動物あたりの死亡率の百分率として表す。

【図10】プレオマイシン処置したマウスにおける肺線維症の発達に対するオステオプロテゲリンのインビボ投与の効果を表す。A：プレオマイシン投与12日後に測定した肺における線維症の程度。肺はトリクロムで染色した。結果を、各生存動物について、線維症に冒された代表的肺葉の%として表す。B：プレオマイシン投与12日後に測定した肺におけるコラーゲン沈着の程度。各生存動物から採取した代表的肺葉において、ヒドロキシプロリン含有量を測定した。

【図1】

【図2】

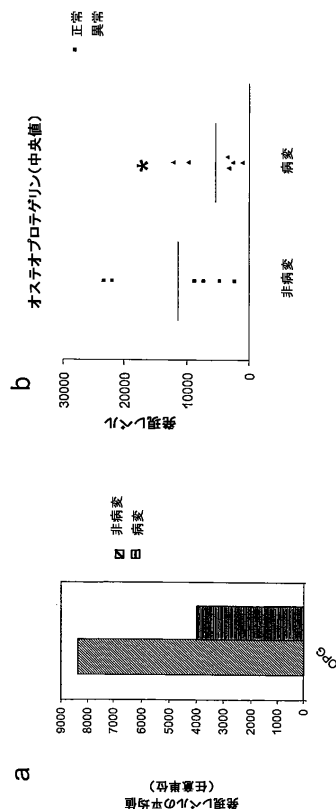


図 1

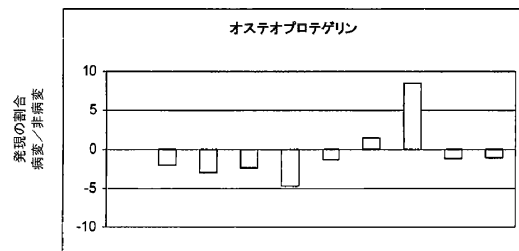


図 2

【図3】

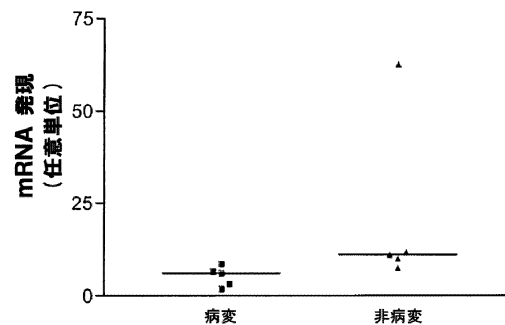
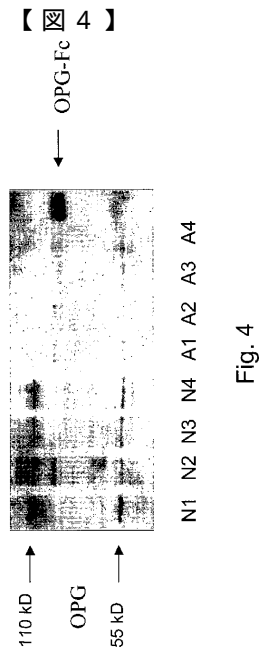


図 3



【図 5】

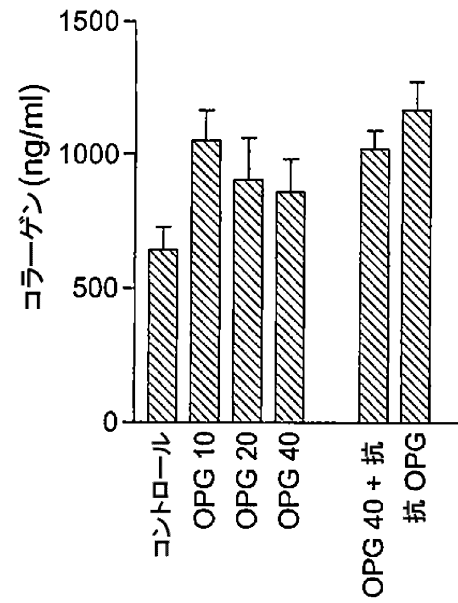


図 5

【図 6】

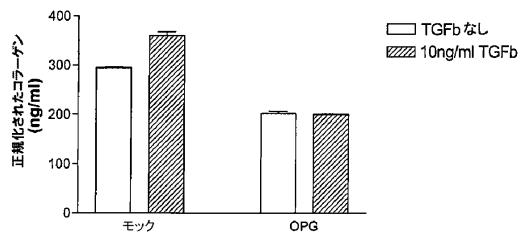


図 6

【図 7 A】

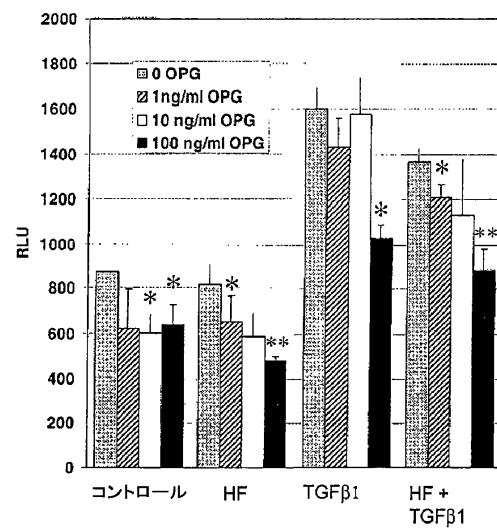


図 7A

【図 7 B】

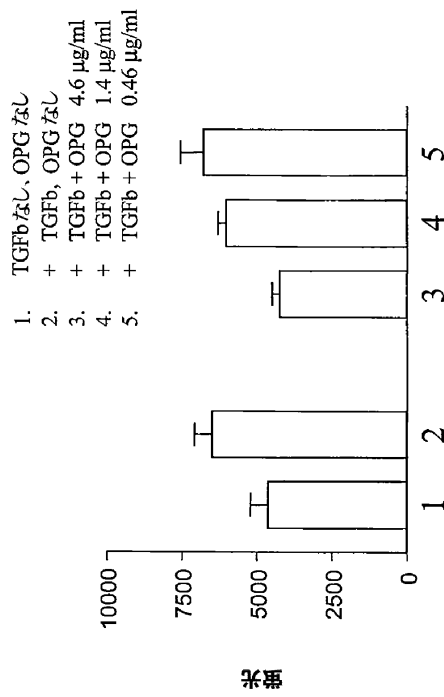


図 7B

【図 8】

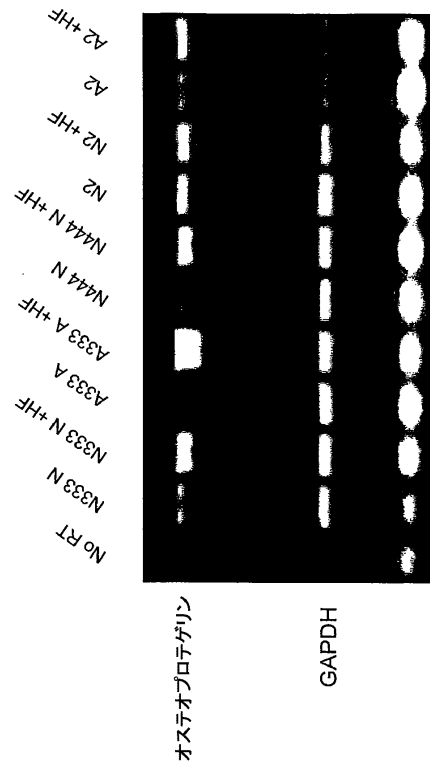


図 8

【図 9】

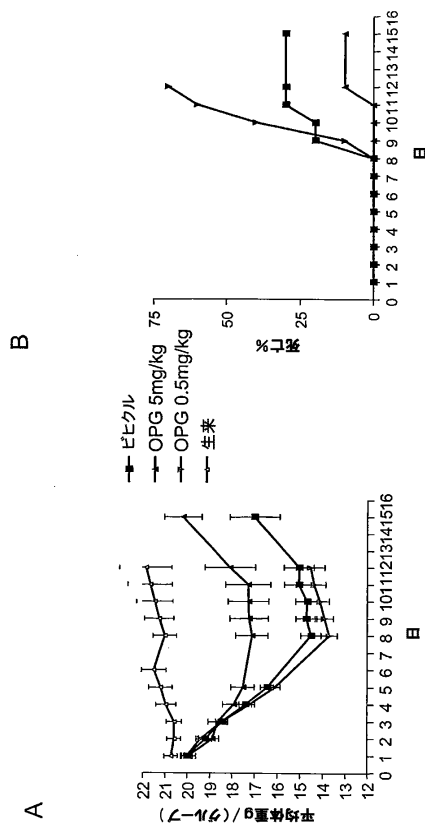


図 9

【図 10】

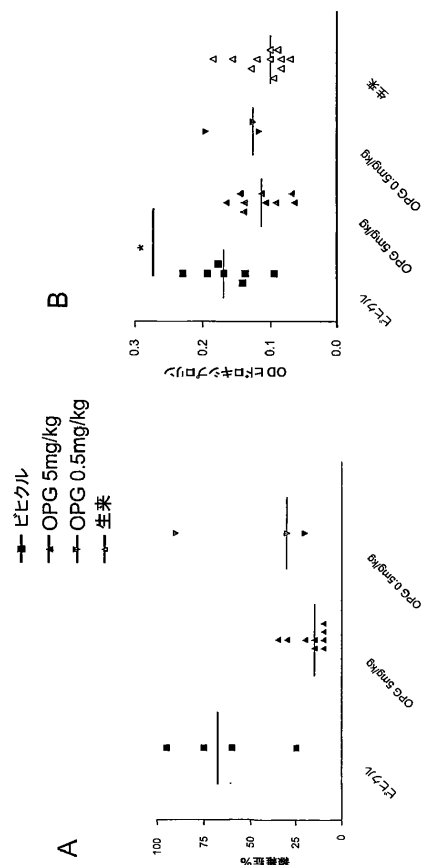


図 10

【配列表】

0004430403000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

A 6 1 K 31/56 (2006.01)
A 6 1 K 31/65 (2006.01)
A 6 1 K 31/522 (2006.01)
A 6 1 K 31/197 (2006.01)
A 6 1 K 31/557 (2006.01)
A 6 1 K 33/08 (2006.01)
A 6 1 K 31/352 (2006.01)
A 6 1 K 38/22 (2006.01)
A 6 1 P 1/16 (2006.01)
A 6 1 P 9/00 (2006.01)
A 6 1 P 9/04 (2006.01)
A 6 1 P 9/10 (2006.01)
A 6 1 P 11/00 (2006.01)
A 6 1 P 17/00 (2006.01)
A 6 1 P 17/02 (2006.01)
A 6 1 P 19/02 (2006.01)
A 6 1 P 29/00 (2006.01)
A 6 1 P 37/06 (2006.01)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)
C 0 7 K 14/52 (2006.01)
C 0 7 K 14/715 (2006.01)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)

F I

A 6 1 K 31/56
 A 6 1 K 31/65
 A 6 1 K 31/522
 A 6 1 K 31/197
 A 6 1 K 31/557
 A 6 1 K 33/08
 A 6 1 K 31/352
 A 6 1 K 37/24
 A 6 1 P 1/16
 A 6 1 P 9/00
 A 6 1 P 9/04
 A 6 1 P 9/10
 A 6 1 P 11/00
 A 6 1 P 17/00
 A 6 1 P 17/02
 A 6 1 P 19/02
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 P 37/06
 A 6 1 P 43/00 1 1 1
 A 6 1 P 43/00 1 2 1
 C 0 7 K 14/52
 C 0 7 K 14/715
 C 1 2 N 15/00 A

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100108903

弁理士 中村 和広

(74)代理人 100127085

弁理士 越阪部 倫子

(74)代理人 100134784

弁理士 中村 和美

(74)代理人 100138210

弁理士 池田 達則

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100145436

弁理士 小池 慎太郎

(74)代理人 100092624

弁理士 鶴田 準一

(74)代理人 100102990

弁理士 小林 良博

(74)代理人 100128495

弁理士 出野 知

(74)代理人 100093665

弁理士 蛭谷 厚志

(72)発明者 パワー, クリスティン

フランス国, エフ - 0 1 7 1 0 トワリー, リュ デ ジョンキーユ 1 0
(72)発明者 プラテ - ジベルク, クリスティーヌ
スイス国, セアッシュ - 1 2 2 7 カルージュ, ケ デュ シュバル ブラン, 1 6

審査官 安藤 倫世

(56)参考文献 特開 2 0 0 0 - 1 8 6 0 4 6 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K 38/00

A61K 31/197

A61K 31/352

A61K 31/513

A61K 31/517

A61K 31/522

A61K 31/557

A61K 31/56

A61K 31/65

A61K 33/08

A61K 38/21

A61K 38/22

A61K 45/00

A61P 1/16

A61P 9/00

A61P 9/04

A61P 9/10

A61P 11/00

A61P 17/00

A61P 17/02

A61P 19/02

A61P 29/00

A61P 37/06

A61P 43/00

C07K 14/52

C07K 14/715

C12N 15/09

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)