

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/072580

発行日 平成29年3月16日 (2017. 3. 16)

(43) 国際公開日 **平成27年5月21日 (2015. 5. 21)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/4439 (2006.01)	A 6 1 K 31/4439	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/5377 (2006.01)	A 6 1 K 31/5377	4 C 2 0 6
A 6 1 K 31/4412 (2006.01)	A 6 1 K 31/4412	
A 6 1 K 31/444 (2006.01)	A 6 1 K 31/444	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 60 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2015-547822 (P2015-547822)	(71) 出願人	503027931 学校法人同志社 京都府京都市上京区今出川通烏丸東入玄武町601番地
(21) 国際出願番号	PCT/JP2014/080831		
(22) 国際出願日	平成26年11月13日 (2014. 11. 13)		
(31) 優先権主張番号	特願2013-235768 (P2013-235768)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成25年11月14日 (2013. 11. 14)	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100118371 弁理士 ▲胸▼谷 剛志
		(72) 発明者	小泉 範子 京都府京田辺市多々羅都谷1-3 同志社大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞増殖促進または細胞障害抑制による角膜内皮治療薬

(57) 【要約】

本発明は、細胞増殖を必要とする角膜内皮障害の治療または予防を提供する。より詳細には本発明は、p38MAPキナーゼ阻害薬を含む、細胞増殖を必要とする角膜内皮障害の治療または予防薬を提供する。好ましい実施形態では、角膜内皮障害は、創傷である。好ましい実施形態では、p38MAPキナーゼ阻害薬は水溶性である。p38MAPキナーゼ阻害薬は4-[4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-1H-イミダゾール-5-イル]ピリジン(SB203580)またはその塩を含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

p 3 8 M A P キナーゼ阻害薬を含む、細胞増殖、細胞障害抑制または細胞老化抑制を必要とする角膜内皮疾患、障害または状態の治療または予防薬。

【請求項 2】

前記角膜内皮障害は、フックス角膜内皮ジストロフィ、角膜移植後の持続する角膜内皮密度減少、外傷、眼科手術、加齢、および角膜内皮炎に関連する障害からなる群より選択される少なくとも 1 つである、請求項 1 に記載の治療または予防薬。

【請求項 3】

前記 p 3 8 M A P キナーゼ阻害薬は水溶性である、請求項 1 に記載の治療または予防薬。

10

【請求項 4】

前記 p 3 8 M A P キナーゼ阻害薬は、4 - (4 - フルオロフェニル) - 2 - (4 - ヒドロキシフェニル) - 5 - (4 - ピリジル) - 1 H - イミダゾール (S B - 2 0 2 1 9 0)、trans - 4 - [4 - (4 - フルオロフェニル) - 5 - (2 - メトキシ - 4 - ピリミジン) - 1 H - イミダゾール - 1 - イル]シクロヘキサノール (S B - 2 3 9 0 6 3)、4 - (4 - フルオロフェニル) - 2 - (4 - メチルスルフィニルフェニル) - 5 - (4 - ピリジル) - 1 H - イミダゾール (S B - 2 0 3 5 8 0)、4 - (4 - フルオロフェニル) - 5 - (2 - メトキシピリミジン - 4 - イル) - 1 - (ピペリジン - 4 - イル)イミダゾール (S B - 2 4 2 2 3 5)、4 - (4 - フルオロフェニル) - 2 - (4 - ヒドロキシ - 1 - ブチニル) - 1 - (3 - フェニルプロピル) - 5 - (4 - ピリジル)イミダゾール (R W J - 6 7 6 5 7)、4 - (4 - フルオロフェニル) - 1 - (ピペリジン - 4 - イル) - 5 - (4 - ピリジル)イミダゾール (H E P - 6 8 9)、(S) - 2 - (2 - アミノ - 3 - フェニルプロピルアミノ) - 1 - メチル - 5 - (2 - ナフチル) - 4 - (4 - ピリジル)ピリミジン - 6 - オン (A M G - 5 4 8)、2 - クロロ - 4 - (4 - フルオロ - 2 - メチルアニリノ) - 2' - メチルベンゾフェノン (E O - 1 6 0 6)、3 - (4 - クロロフェニル) - 5 - (1 - ヒドロキシアセチルピペリジン - 4 - イル) - 4 - (ピリミジン - 4 - イル)ピラゾール (S D - 0 6)、5 - (2, 6 - ジクロロフェニル) - 2 - (2, 4 - ジフルオロフェニルチオ)ピリミド [3, 4 - b]ピリダジン - 6 - オン (V X - 7 4 5)、4 - アセチルアミノ - N - tert - ブチルベンズアミド (C P I - 1 1 8 9)、N - [3 - tert - ブチル - 1 - (4 - メチルフェニル)ピラゾール - 5 - イル] - N' - [4 - (2 - モルホリノエトキシ) - 1 - ナフチル]ウレア (ドラマピモド (D o r a m a p i m o d (B I R B 7 9 6)))、2 - ベンズアミド - 4 - [2 - エチル - 4 - (3 - メチルフェニル)チアゾール - 5 - イル]ピリジン (T A K - 7 1 5)、タルマピモド (T a l m a p i m o d ; S C I O - 4 6 9)、1 - (カルバモイル - 6 - (2, 4 - ジフルオロフェニル)ピリジン - 2 - イル) - 1 - (2, 6 - ジフルオロフェニル)尿素 (V X - 7 0 2 ; 2 - (2, 4 - ジフルオロフェニル) - 6 - (1 - (2, 6 - ジフルオロフェニル)ウレイド)ニコチンアミド)、ジルマピモド (d i l m a p i m o d ; G S K - 6 8 1 3 2 3)、4 - (5 - (シクロプロピルカルバモイル) - 2 - メチルフェニルアミノ) - 5 - メチル - N - プロピルピロロ (1, 2 - f) (1, 2, 4)トリアジン - 6 - カルボキサミド (P S - 5 4 0 4 4 6)、抗 F G F - 7 抗体 (S C - 8 0 0 3 6)、A V E - 9 9 4 0、[5 - アミノ - 1 - (4 - フルオロフェニル) - 1 H - ピラゾール - 4 - イル] [3 - (3 - アミノ - 2 - ヒドロキシプロポキシ)フェニル]メタノン (R O - 3 2 0 - 1 1 9 5)、1 - (1, 3 - ジヒドロキシプロブ - 2 - イル) - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 5 - [2 - フェノキシピリミジン - 4 - イル]イミダゾール (S B - 2 8 1 8 3 2)、2 - [5 - (4 - [(4 - フルオロフェニル)メチル]ピペリジン - 1 - イル}カルボニル) - 6 - メトキシ - 1 - メチル - 1 H - インドル - 3 - イル] - N, N' - ジメチル - 2 - オキソアセトアミド (S C I O - 3 2 3)、2 - (5 - tert - ブチル - 2 - m - トリル - 2 H - ピラゾール - 3 - イル) - 2 - ヒドロキシイミド - N - [4 - (2 - モルホリン - 4 - イル - エトキシ) - ナフタレン - 1 - イル] - アセトアミド (K C - 7 0 6)、N, N' - ビス [3, 5 - ビス [1 - (2 - アミジノヒドラ

20

30

40

50

ゾノ)エチル]フェニル]デカンジアミド、N, N' - ビス[3, 5 - ビス[1 - [2 - (アミノイミノメチル)ヒドラゾノ]エチル]フェニル]デカンジアミド(セマピモド(Semapi mod))、および3 - (3 - プロモ - 4 - ((2, 4 - ジフルオロベンジル)オキシ) - 6 - メチル - 2 - オキソピリジン - 1(2H) - イル) - N, 4 - ジメチルベンズアミド(PH - 797804)、および5 - (2 - (tert - ブチル) - 5 - (4 - フルオロフェニル) - 1H - イミダゾール - 4 - イル) - 3 - ネオペンチル - 3H - イミダゾ[4, 5 - b]ピリジン - 2 - アミン(LY2228820)からなる群より選択される少なくとも1つを含む、請求項1に記載の治療または予防薬。

【請求項5】

前記p38MAPキナーゼ阻害薬は4 - [4 - (4 - フルオロフェニル) - 2 - (4 - メチルスルフィニルフェニル) - 1H - イミダゾール - 5 - イル]ピリジン)(SB203580)またはその塩を含む、請求項1に記載の治療または予防薬。

10

【請求項6】

前記p38MAPキナーゼ阻害薬は4 - [4 - (4 - フルオロフェニル) - 2 - (4 - メチルスルフィニルフェニル) - 1H - イミダゾール - 5 - イル]ピリジン)(SB203580)塩酸塩を含む、請求項1に記載の治療または予防薬。

【請求項7】

細胞増殖を必要とする角膜内皮障害の治療または予防のためのp38MAPキナーゼ阻害物質。

【請求項8】

p38MAPキナーゼ阻害薬の有効量をそれを必要な被験体に投与する工程を含む、細胞増殖を必要とする角膜内皮障害の治療または予防のための方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、角膜内皮細胞を正常な状態で培養するための技術、方法、ならびにそのための薬剤および培地に関する。

【背景技術】

【0002】

視覚情報は、眼球の最前面の透明な組織である角膜から取り入れられた光が、網膜に達して網膜の神経細胞を興奮させ、発生した電気信号が視神経を經由して大脳の視覚野に伝達することで認識される。良好な視力を得るためには、角膜が透明であることが必要である。角膜の透明性は、角膜内皮細胞のポンプ機能とバリア機能により、含水率が一定に保たれることにより保持される。

30

【0003】

ヒトの角膜内皮細胞は、出生時には1平方ミリメートル当たり約3000個の密度で存在しているが、一度障害を受けると再生する能力を持たない。角膜内皮変性症や種々の原因による角膜内皮の機能不全によって生じる水疱性角膜症では、角膜が浮腫と混濁を生じ、著しい視力低下をきたす。現在、水疱性角膜症に対しては、角膜の上皮、実質および内皮の3層構造のすべてを移植する全層角膜移植術が行われている。しかし、日本での角膜提供は不足しており、角膜移植の待機患者約2600人に対し、年間に国内で行われている角膜移植件数は1700件程度である。

40

【0004】

角膜は眼球の前方に位置し、主に角膜上皮細胞層、角膜実質層、角膜内皮細胞層の3層構造を持った透明な組織である。角膜内皮細胞層は角膜深層部に存在する単層の細胞層であり、バリア機能とポンプ機能を持ち、角膜の水分量を一定に保つことで角膜の透明性を維持する役割を果たしている。また、障害を受けても生体内で増殖しないことが知られており、角膜内皮細胞が外傷や疾患等によって障害されて細胞数が減少することで、重篤な視覚障害が生じることが知られている。

【0005】

50

特許文献1は、眼表面の疾患の局所療法の概説である。非特許文献1は、p38 MAPキナーゼの、TNF誘導性の角膜内皮におけるバリア機能(integrity)の損失に対する影響を記載する。非特許文献2は、p38 MAPキナーゼの、TNF誘導性の角膜内皮におけるバリア機能(integrity)の損失に対する影響を記載する。非特許文献3および4はp38キナーゼを利用した角膜上皮細胞に関する処置方法を記載する。非特許文献5は、線維性創傷修復過程に関するp38 MAPキナーゼシグナルの関与を記載する。非特許文献6は、角膜内皮細胞の遊走とMAPキナーゼとの関係について記載する。非特許文献7は、角膜内皮障害とTGFとの関連を記載する。非特許文献8は、角膜創傷に関する再生治癒に関するTGFとの関連を記載する。非特許文献9は、角膜内皮細胞とTGFとの関連を記載する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特表2009-539977号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Song JS et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 51(2), 822-829 2010

【非特許文献2】Shivanna Met al., Invest, Ophthalmol. Vis. Sci. 51(3), 1575-1582 2010

【非特許文献3】Li C. et al., J Cell Physiol Vol. 226, No. 9, Page. 2429-2437 (2011)

【非特許文献4】Kang MG et al., J Biol Chem Vol. 278, No. 24, Page. 21989-21997 (2003)

【非特許文献5】Sharma GD et al., J Cell Biochem Vol. 108, No. 2, Page. 476-488 (2009)

【非特許文献6】上甲ら、角膜カンファランス・日本角膜移植学会プログラム・抄録集 Vol. 32nd-44th, Page. 55 (2008)

【非特許文献7】<http://kaken.nii.ac.jp/d/p/21791705/2009/3/ja.ja.html>、2013年11月6日ダウンロード

【非特許文献8】Mi H. et al., Histol Histopathol. 2009 Nov; 24(11): 1405-16.

【非特許文献9】Joko T. et al., Exp Eye Res. 2013 Mar; 108: 23-32

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、p38 MAPキナーゼ阻害薬が、細胞増殖を必要とする角膜内皮障害の治療または予防に使用することができることを見出し、本発明を完成するに至った。したがって、本発明は代表的に以下を提供する。

(1) p38 MAPキナーゼ阻害薬を含む、細胞増殖、細胞障害抑制または細胞老化抑制を必要とする角膜内皮疾患、障害または状態の治療または予防薬。

(2) 前記角膜内皮障害は、フックス角膜内皮ジストロフィ、角膜移植後の持続する角膜内皮密度減少、外傷、眼科手術、加齢、および角膜内皮炎に関連する障害からなる群より選択される少なくとも1つである、項目(1)に記載の治療または予防薬。

(3) 前記p38 MAPキナーゼ阻害薬は水溶性である、項目(1)または(2)に記載の治療または予防薬。

(4) 前記p38 MAPキナーゼ阻害薬は、4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-ヒドロキシフェニル)-5-(4-ピリジル)-1H-イミダゾール(SB-202190)、trans-4-[4-(4-フルオロフェニル)-5-(2-メトキシ-4-ピリミジニル)-1H-イミダゾール-1-イル]シクロヘキサノール(SB-23906

10

20

30

40

50

3)、4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-5-(4-ピリジル)-1H-イミダゾール(SB-203580)、4-(4-フルオロフェニル)-5-(2-メトキシピリミジン-4-イル)-1-(ピペリジン-4-イル)イミダゾール(SB-242235)、4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-ヒドロキシ-1-ブチニル)-1-(3-フェニルプロピル)-5-(4-ピリジル)イミダゾール(RWJ-67657)、4-(4-フルオロフェニル)-1-(ピペリジン-4-イル)-5-(4-ピリジル)イミダゾール(HEP-689)、(S)-2-(2-アミノ-3-フェニルプロピルアミノ)-1-メチル-5-(2-ナフチル)-4-(4-ピリジル)ピリミジン-6-オン(AMG-548)、2-クロロ-4-(4-フルオロ-2-メチルアニリノ)-2'-メチルベンゾフェノン(EO-1606)、3-(4-クロロフェニル)-5-(1-ヒドロキシアセチルピペリジン-4-イル)-4-(ピリミジン-4-イル)ピラゾール(SD-06)、5-(2,6-ジクロロフェニル)-2-(2,4-ジフルオロフェニルチオ)ピリミド[3,4-b]ピリダジン-6-オン(VX-745)、4-アセチルアミノ-N-tert-ブチルベンズアミド(CPI-1189)、N-[3-tert-ブチル-1-(4-メチルフェニル)ピラゾール-5-イル]-N'-[4-(2-ホルホリノエトキシ)-1-ナフチル]ウレア(ドラマピモド(Doramapimod))、2-ベンズアミド-4-[2-エチル-4-(3-メチルフェニル)チアゾール-5-イル]ピリジン(TAK-715)、タルマピモド(Talmapimod; SCIO-469)、1-(カルバモイル-6-(2,4-ジフルオロフェニル)ピリジン-2-イル)-1-(2,6-ジフルオロフェニル)尿素(VX-702; 2-(2,4-ジフルオロフェニル)-6-(1-(2,6-ジフルオロフェニル)ウレイド)ニコチンアミド)、ジルマピモド(dilmapiomod; GSK-681323)、4-(5-(シクロプロピルカルバモイル)-2-メチルフェニルアミノ)-5-メチル-N-プロピルピロロ(1,2-f)(1,2,4)トリアジン-6-カルボキサミド(PS-540446)、抗FGF-7抗体(SC-80036)、AVE-9940、[5-アミノ-1-(4-フルオロフェニル)-1H-ピラゾール-4-イル][3-(3-アミノ-2-ヒドロキシプロポキシ)フェニル]メタノン(RO-320-1195)、1-(1,3-ジヒドロキシプロブ-2-イル)-4-(4-フルオロフェニル)-5-[2-フェノキシピリミジン-4-イル]イミダゾール(SB-281832)、2-[5-(4-[4-フルオロフェニル]メチル)ピペリジン-1-イル]カルボニル)-6-メトキシ-1-メチル-1H-インドル-3-イル]-N,N'-ジメチル-2-オキソアセトアミド(SCIO-323)、2-(5-tert-ブチル-2-m-トリル-2H-ピラゾール-3-イル)-2-ヒドロキシイミド-N-[4-(2-ホルホリン-4-イル-エトキシ)-ナフタレン-1-イル]-アセトアミド(KC-706)、N,N'-ビス[3,5-ビス[1-(2-アミジノヒドラゾノ)エチル]フェニル]デカンジアミド、N,N'-ビス[3,5-ビス[1-[2-(アミノイミノメチル)ヒドラゾノ]エチル]フェニル]デカンジアミド(セマピモド(Semapimod))、3-(3-プロモ-4-(2,4-ジフルオロベンジル)オキシ)-6-メチル-2-オキソピリジン-1(2H)-イル)-N,4-ジメチルベンズアミド(PH-797804)、および5-(2-(tert-ブチル)-5-(4-フルオロフェニル)-1H-イミダゾール-4-イル)-3-ネオペンチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-2-アミン(LY2228820)からなる群より選択される少なくとも1つを含む、項目(1)~(3)のいずれか1項に記載の治療または予防薬。

(5)前記p38MAPキナーゼ阻害薬は4-[4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-1H-イミダゾール-5-イル]ピリジン)(SB203580)またはその塩を含む、項目(1)~(4)のいずれか1項に記載の治療または予防薬。

(6)前記p38MAPキナーゼ阻害薬は4-[4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-1H-イミダゾール-5-イル]ピリジン)(SB203580)塩酸塩を含む、項目(1)~(5)のいずれか1項に記載の治療または予

10

20

30

40

50

防薬。

(7) 細胞増殖を必要とする角膜内皮障害の治療または予防のための p38MAPキナーゼ阻害物質。

(8) p38MAPキナーゼ阻害薬の有効量をそれを必要な被験体に投与する工程を含む、細胞増殖を必要とする角膜内皮障害の治療または予防のための方法。

【0009】

本発明において、上記1または複数の特徴は、明示された組み合わせに加え、さらに組み合わせで提供されることが意図される。本発明のなおさらなる実施形態および利点は、必要に応じて以下の詳細な説明を読んで理解すれば、当業者に認識される。

【発明の効果】

10

【0010】

本発明は、従来では達成が困難であった角膜内皮障害を予防または治癒させることができる技術を提供する。特に、非特許文献1および2では、凍結処置やTNF誘導性のバリア機能(integrety)の損失等の特殊な系でのp38MAPキナーゼの角膜内皮における役割が解析され、その阻害剤の効果も説明されているが、創傷(外傷)等の細胞増殖を必要とする角膜内皮障害における効果は予測できなかった。特に、実施例等に示されるように、創傷等の回復は極めて顕著であり、その治癒効果は従来医薬品に比べても顕著であり、点眼薬として有用であることが理解される。また、理論に束縛されることを望まないが、実施例に示される細胞障害抑制効果についても従来技術から予測できないものであり、フックス角膜内皮ジストロフィ、角膜移植後、角膜内皮炎など細胞障害が継続的に進行する疾患において有用であると理解される。

20

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1は、p38MAPキナーゼシグナル阻害はサイクリン依存性キナーゼ阻害因子を抑制し角膜内皮細胞の細胞周期を移行させることを示す。シアトルアイバンクから輸入した研究用角膜より培養した角膜内皮細胞を培養して以下の検討に用いた。細胞培養用培地にp38MAPキナーゼ阻害薬であるSB203580を添加して20日後にサイクリン依存性キナーゼ阻害因子であるp27、p21、p16の発現をウエスタンブロッティング法にて検討した。p27、p21、p16は全てSB203580を添加により抑制された(A;上から順にp27、p21、p16、GAPDHを示す。左レーンはコントロール、中央はSB203580 10μM、右レーンはSB203580 30μMを示す。)。p27、p21、p16は角膜内皮細胞の細胞増殖を負に制御するサイクリン依存性キナーゼ阻害因子であることが報告されている。また、細胞周期のG1/S期の移行に関わる分子としてRbタンパクのリン酸化、サイクリンD1およびD3の発現をウエスタンブロッティング法にて検討したところSB203580を添加により12時間後、24時間後それぞれでこれらの分子の発現が促進された(B;上から2段ずつ、リン酸化Rbタンパク、サイクリンD1、サイクリンD3、GAPDHを示す。各2段において上側はコントロール、下側SB203580(10μM)による刺激を示す。左レーンは12時間、右レーンは24時間を示す。)。また、SB203580によりp38MAPキナーゼシグナルの下流分子であるATF2のリン酸化が抑制されていることを刺激後20日後の時点のウエスタンブロッティング法にて確認した(C;上からリン酸化p38、リン酸化ATF2、GAPDHを示す。左レーンからコントロール、中央はSB203580 10μM、右レーンはSB203580 30μMを示す。)。これらのことよりp38MAPキナーゼシグナル阻害はサイクリン依存性キナーゼ阻害因子を抑制し角膜内皮細胞の細胞周期を移行させることが示された。また、p27、p21、p16の発現は老化により促進されることが知られているが、SB203580により抑制され細胞老化を抑制することが示された。

30

40

【図2】図2は、p38MAPキナーゼシグナル阻害は角膜内皮細胞の細胞増殖を促進することを示す。培養したヒト角膜内皮細胞をp38MAPキナーゼ阻害薬であるSB203580により刺激して3日後に細胞増殖のマーカであるKi67にて免疫染色を行っ

50

た。SB203580による刺激により有意に多くの細胞にKi67の発現を認めた(A, B; Aの左側写真はコントロールを示し、右側はSB203580刺激を示す(10 μ M)。BはKi67陽性の細胞の割合を示す。縦軸はKi67陽性細胞の比率であり(%)、左バーはコントロール、右バーはSB203580刺激(10 μ M)を示す。)。また、同様に3日後に細胞増殖のマーカとしてBrdUの取り込み量を指標にELISA法により検討したところ、SB203580による刺激により有意にBrdUの取り込みが促進された(C; 縦軸はBrdU取り込み量(コントロールに対する相対値)を示し、横軸はSB203580を種々の量(0、1 μ M、3 μ M、10 μ M、30 μ M)で刺激した結果を示す。)。これらのことからp38MAPキナーゼシグナル阻害は角膜内皮細胞の細胞増殖を促進することが示された。

10

【図3】図3は、p38MAPキナーゼ阻害薬点眼はウサギ部分的角膜内皮障害モデルにおいての創傷治癒を促進することを示す。ウサギの部分的角膜内皮障害モデルを用いてp38MAPキナーゼシグナル阻害が生体において角膜内皮の細胞増殖を促進するかどうかについて検討を行った。直径7mmのステンレス製チップを液体窒素に浸漬して冷却した後、全身麻酔下の白色ウサギの角膜中央部に15秒間接触させ、中央部分の角膜内皮細胞を部分的に脱落させた。その後、10mMに調整したSB203580を1回50 μ lを1日4回、2日間点眼投与した(左パネル写真、右側。右上写真は全体像を示し、右下写真は創傷部分を示す。)。コントロールとして同様に部分的角膜内皮障害を作製した眼に基剤を点眼した(左パネル写真、左側。左上写真は全体像を示し、左下写真は創傷部分を示す。)。2日目に前眼部写真よりSB203580点眼群で角膜の透明性の回復が早いことを確認した。また、安楽死させて角膜を摘出してアリザリン染色により角膜内皮の創傷範囲を染色したところ、SB203580点眼群はコントロールより縮小していた(左パネル写真、各下側)。また、合計6眼ずつで検討を行ったところ、有意に創傷面積はSB203580点眼群において縮小しており(右グラフ、縦軸は創傷面積(mm²))を示し、右がDMSO(コントロール)、左がSB203580による刺激の結果を示す。*はp<0.01での統計学的有意を示す。)、p38MAPキナーゼシグナル阻害は角膜内皮の創傷治癒を促進することが示された。

20

【図4】図4は、p38MAPキナーゼ阻害薬点眼はウサギ部分的角膜内皮障害モデルにおいて角膜内皮細胞の細胞増殖を促進することを示す。図3に加え、さらに、細胞増殖のマーカであるKi67にて角膜組織の免疫染色を行った(左写真; 写真中左側はコントロールを示し、右側はSB203580(10mM)点眼群を示す。右側グラフは、Ki67陽性細胞の比率をコントロール(左)およびSB203580点眼(10mM)に関して示す。)。SB203580による点眼により有意に多くの細胞にKi67の発現を認めた。これらのことからp38MAPキナーゼシグナル阻害は生体においても角膜内皮細胞の細胞増殖を促進することが示された。

30

【図5】図5は、p38MAPキナーゼシグナル阻害は培養環境で生じる細胞の肥大化による細胞密度低下を抑制することを示す。角膜内皮細胞は生体において、加齢とともに年率0.5%程度細胞密度の低下が生じる。また、種々の角膜内皮疾患によっても細胞密度の低下が生じる。細胞培養によっても生体内同様に細胞の肥大化および密度低下という生体同様の細胞老化様減少が生じる。そこでp38MAPキナーゼシグナル阻害により角膜内皮細胞密度低下という細胞老化様減少への影響を検討した。培養したヒト角膜内皮細胞をp38MAPキナーゼ阻害薬であるSB203580を用いて各種濃度で刺激して20日後の位相差顕微鏡写真を示す(上パネル; 左からコントロール、SB203580 1 μ M、3 μ M、10 μ Mを示す。)。SB203580の濃度依存的に培養による細胞密度低下は阻害され、細胞密度が上昇した。(下パネル: 縦軸は細胞密度(mm²))を示し、横軸は、左からコントロール、SB203580 1 μ M、3 μ M、10 μ Mを示す。**)はコントロールに対する統計学的有意(p<0.05)を意味する。)

40

【図6】図6は、p38MAPキナーゼシグナル阻害はポンプ機能およびバリア機能を維持して培養による細胞密度低下を阻害することを示す。培養したヒト角膜内皮細胞をp38MAPキナーゼ阻害薬であるSB203580を用いて各種濃度で刺激して20日後に

50

、角膜内皮細胞の機能であるポンプ機能、バリア機能についてそれぞれのマーカーとして $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{ATPase}$ および $\text{ZO} - 1$ による免疫染色を行った (左: $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 、右: $\text{ZO} - 1$ 。各パネル中、左上はコントロール、右上は、 $\text{SB} 203580$ $1 \mu\text{M}$ 、左下は $\text{SB} 203580$ $3 \mu\text{M}$ 、右下は $\text{SB} 203580$ $10 \mu\text{M}$ を示す。)。 $\text{p} 38 \text{MAPK}$ キナーゼシグナル阻害により角膜内皮細胞は、全ての細胞において $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{ATPase}$ および $\text{ZO} - 1$ を発現しており正常な機能を維持していることが示された。

【図7】図7は、 $\text{p} 38 \text{MAPK}$ キナーゼシグナル阻害は角膜内皮細胞が産生するサイトカインを抑制することを示す結果である。Reference Spotは参照スポットを示す。GROa、sICAM-1、IL-6、IL-8、IL-23、MCP-1、MIF、SerpinE1は、それぞれのマーカーのスポットを示す。コントロール(上段)ではGROa、sICAM-1、IL-6、IL-8、IL-23、MCP-1、MIF、SerpinE1が検出された。他方、 $\text{SB} 203580$ (下段)を添加した培養上清においてserpinE1以外のサイトカインはコントロールと比較して減少していた。

【図8】図8は、 $\text{p} 38 \text{MAPK}$ キナーゼシグナル阻害は角膜内皮細胞が産生するIL-6を抑制することを示す。コントロールと比べて $\text{SB} 203580$ を添加して培養することで、IL-6の産生が低下することをPCR法(左)、ELISA(右)により示された。左欄では、左レーンがコントロールを示し、右レーンが $\text{SB} 203580$ を示し、上段はIL-6、下段はコントロールであるGAPDHを示す。右欄のグラフは左からコントロールであるDMSOを示し、右が $\text{SB} 203580$ を示す。y軸はIL-6産生量(pg / mL)を示す。

【図9】図9は、 $\text{p} 38 \text{MAPK}$ キナーゼシグナル阻害は角膜内皮の細胞死を抑制することを示す。左側の写真は左上がコントロール右上が $\text{SB} 203580$ を示し、左下がUV照射のみ、右下がUV照射に $\text{SB} 203580$ を組み合わせた結果を示す。左側のグラフは、それぞれ示されるUVの照射、および $\text{SB} 203580$ での処置を行った結果を示す。y軸は細胞数(コントロールに対する%)を示す。*は $p < 0.05$ での統計学的有意を示す。 $\text{p} 38 \text{MAPK}$ キナーゼシグナル阻害の細胞死への影響を検討するために、培養したヒト角膜内皮細胞を $100 \text{J} / \text{m}^2$ の紫外線(UV)にて刺激して細胞死を誘導し $\text{SB} 203580$ の効果を検討した。位相差顕微鏡写真(左)はUV照射後9時間である。右は生細胞数のコントロールに対する割合で表記した、UV照射後12時間後のグラフである。UV照射により生細胞数は低下するが $\text{SB} 203580$ により有意に増加する。このことより $\text{p} 38 \text{MAPK}$ キナーゼシグナル阻害により角膜内皮細胞の細胞障害が抑制され細胞死が抑制されるものと理解される。

【図10】図10は、 $\text{p} 38 \text{MAPK}$ キナーゼシグナル阻害が角膜内皮のUV刺激時のアポトーシスを抑制することを示す。左右ともウェスタンブロットの結果である。各レーンはUV照射および $\text{SB} 203580$ の有無での相違を示し、上パネルからカスパーゼ3、PARP、GAPDHを示す。右もUV照射および $\text{SB} 203580$ の有無での相違を示し、上パネルからH2AX、GAPDHを示す。左は $\text{SB} 203580$ によりUV照射によるアポトーシスの実行分子であるカスパーゼ3およびPARPの切断による活性化が抑制されることを示す。右は $\text{SB} 203580$ によりUV照射によるDNAの二本鎖切断により誘導されるリン酸化ヒストンH2AXの発現が抑制されることを示す。

【図11】図11は、 $\text{p} 38 \text{MAPK}$ 阻害薬である $\text{SB} 203580$ が培養角膜内皮細胞の増殖を促進することを示す。BrdU取り込みをコントロールに対する割合で示す(y軸)。x軸は、左から、コントロール($\text{SB} 203580$ 添加なし)、最終濃度 $0.3 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M}$ 、 $3 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ 、 $30 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$ を示す。*は $p < 0.01$ を示す。

【図12】図12は、 $\text{p} 38 \text{MAPK}$ 阻害薬であるSemapimodが培養角膜内皮細胞の増殖を促進することを示す。BrdU取り込みをコントロールに対する割合で示す(y軸)。x軸は、左から、コントロール(Semapimod添加なし)、最終濃度 $0.1 \mu\text{M}$ 、 $0.3 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M}$ 、 $3 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ を示す。*は $p < 0.01$ を示す。

10

20

30

40

50

【図13】図13は、p38MAPK阻害薬であるBIRB796が培養角膜内皮細胞の増殖を促進することを示す。BrdU取り込みをコントロールに対する割合で示す(y軸)。x軸は、左から、コントロール(BIRB796添加なし)、最終濃度0.1μM、0.3μM、1μM、3μM、10μM、30μM、100μMを示す。*はp<0.01を示す。

【図14】図14は、p38MAPK阻害薬であるPH-797804が培養角膜内皮細胞の増殖を促進することを示す。BrdU取り込みをコントロールに対する割合で示す(y軸)。x軸は、左から、コントロール(BIRB796添加なし)、最終濃度0.1μM、0.3μM、1μM、3μM、10μM、30μMを示す。*はp<0.01を示す。

【図15】図15は、p38MAPK阻害薬であるVX-702が培養角膜内皮細胞の増殖を促進することを示す。BrdU取り込みをコントロールに対する割合で示す(y軸)。x軸は、左から、コントロール(BIRB796添加なし)、最終濃度0.1μM、0.3μM、1μM、3μM、10μM、30μM、100μMを示す。*はp<0.01を示す。

【図16】図16は、p38MAPK阻害薬であるLY2228820が培養角膜内皮細胞の増殖を促進することを示す。BrdU取り込みをコントロールに対する割合で示す(y軸)。x軸は、左から、コントロール(BIRB796添加なし)、最終濃度0.1μM、0.3μM、1μM、3μM、10μM、30μMを示す。*はp<0.01を示す。

【図17】図17は、p38MAPK阻害薬であるTAK-715が培養角膜内皮細胞の増殖を促進することを示す。BrdU取り込みをコントロールに対する割合で示す(y軸)。x軸は、左から、コントロール(BIRB796添加なし)、最終濃度0.1μM、0.3μM、1μM、3μM、10μM、30μM、100μMを示す。*はp<0.01を示す。

【図18】図18は、p38MAPK阻害薬は培養サル角膜内皮細胞の増殖を促進することを示す。BrdU取り込みをコントロールに対する割合で示す(y軸)。x軸は、左から、コントロール(DMSO1/1000、薬剤添加なし)、SB203580 10μM、Semapimod 1μM、BIRB796 3μM、PH-797804 1μM、VX-702 3μM、LY2228820 3μM、TAK-715 3μMを示す。*はp<0.01を示す。

【図19】図19は、p38MAPK阻害剤は培養ヒト角膜内皮細胞の増殖を促進することを示す。BrdU取り込みをコントロールに対する割合で示す(y軸)。x軸は、左から、コントロール(DMSO1/1000、薬剤添加なし)、SB203580 10μM、Semapimod 1μM、BIRB796 3μM、PH-797804 1μM、VX-702 3μM、LY2228820 3μM、TAK-715 3μMを示す。*はp<0.01を示す。

【図20】図20は、p38MAPKの活性化はアポトーシスを誘導することを示す。左パネルは、位相差顕微鏡下で細胞形態を観察した(9時間後)写真である。上からコントロールアノマイシン群、アノマイシンおよびZ-VAD-FMK群を示す。9時間後、細胞からタンパク質を回収し、タンパク質の発現量の比較をwestern Blot法により行った結果を右パネルに示す。上からp38MAPK、リン酸化p38MAPK、Caspase3およびGADPH(コントロール)の発現を示す。左列よりアノマイシンもZ-VAD-FMKも加えていないもの(コントロール)、アノマイシンのみを加えたもの、アノマイシンもZ-VAD-FMKも両方加えたものを示す。

【図21】図21は、SB203580点眼は霊長類の角膜内皮の増殖を促進することを示す。免疫染色により増殖促進を確認した。上段はコントロールを示し、下段はSB203580(3mM)を示す。左からDAPI染色、抗Ki67抗体での免疫染色およびマージの写真を示す。

【図22】図22は、SB203580点眼は霊長類の角膜内皮の増殖を促進することを

10

20

30

40

50

示す。コントロール（左）およびSB203580（右）でのKi67陽性細胞の割合を示す（y軸）。右眼、左眼それぞれ5視野ずつ写真撮影を行い、Ki67の陽性細胞率について解析したところ、SB203580を点眼した眼ではKi67の陽性細胞を有意に多く認めた。*は $p < 0.01$ を示す。

【図23】図23は、p38MAPK阻害薬は培養角膜内皮細胞の細胞死を抑制することを示す。上段左からコントロール（DMSOのみ添加）、UV（ 100 J/m^2 ）、Z-VADでの染色を示し、中段は、左からSB203580、BIRB796、PH-797804を示す。下段は、左から、VX-702、LY2228820、およびTAK-715を示す。使用した濃度はそれぞれ、SB203580が $10\text{ }\mu\text{M}$ 、Semapimodが $1\text{ }\mu\text{M}$ 、BIRB796が $3\text{ }\mu\text{M}$ 、PH-797804が $1\text{ }\mu\text{M}$ 、VX-702が $3\text{ }\mu\text{M}$ 、LY2228820が $3\text{ }\mu\text{M}$ 、TAK-715が $3\text{ }\mu\text{M}$ であるUVにより生じる細胞障害が用いた全てのp38MAPK阻害剤により抑制された。スケールバーは $100\text{ }\mu\text{m}$ を示す。

10

【図24】図24は、p38MAPK阻害薬は培養角膜内皮細胞のアポトーシスを抑制することを示す。上段左からコントロール（DMSOのみ添加）、UV（ 100 J/m^2 ）、Z-VADでの染色を示し、中段は、左からSB203580、BIRB796、PH-797804を示す。下段は、左から、VX-702、LY2228820、およびTAK-715を示す。緑色染色はアネキシンVを示し、青色染色はDAPI染色を示す。UVにより生じるアポトーシスが用いた全てのp38MAPK阻害剤により抑制された。スケールバーは $100\text{ }\mu\text{m}$ を示す。

20

【図25】図25は、p38MAPK阻害薬は角膜内皮のアポトーシスを抑制することを示す。Annexin VおよびDAPIの染色をした結果である。緑色染色はアネキシンVを示し、青色染色はDAPI染色を示す。上段は、左から、UV（ 100 J/m^2 ）照射（コントロールとしてDMSO）、VX-702、PH-797804を示す。中段は、SB203580、LY2228820を示す。下段は、BIRB796、TAK-715を示す。使用した濃度はそれぞれ、SB203580が $10\text{ }\mu\text{M}$ 、Semapimodが $1\text{ }\mu\text{M}$ 、BIRB796が $3\text{ }\mu\text{M}$ 、PH-797804が $1\text{ }\mu\text{M}$ 、VX-702が $3\text{ }\mu\text{M}$ 、LY2228820が $3\text{ }\mu\text{M}$ 、TAK-715が $3\text{ }\mu\text{M}$ である。UVにより生じるアポトーシスが用いた全てのp38MAPK阻害剤により抑制された。スケールバーは $100\text{ }\mu\text{m}$ を示す。

30

【図26】図26はp38MAPK阻害薬は角膜内皮のアポトーシスを抑制することを示す。アネキシンV陽性細胞の割合を示す。左から、UV照射、SB203580、BIRB796、PH-797804、VX-702、LY2228820、およびTAK715を示す。検定はDunnett検定を行い、*は $p < 0.05$ を示す。

【発明を実施するための形態】

【0012】

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用されるすべての専門用語および科学技術用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

40

【0013】

（定義）

本明細書において「細胞分裂因子（マイトージェン）活性化タンパク質（MAP）キナーゼ」とは、マイトージェン活性化タンパク質（MAP）をリン酸化する酵素であり、セリン/トレオニンキナーゼのファミリーである。MAPキナーゼは、様々な細胞外刺激に反応して活性化され、細胞表面から核へのシグナル伝達を仲介するタンパク質セリン/ス

50

レオニンキナーゼ群である。MAPキナーゼはまた、細胞外シグナル調節性プロテインキナーゼ (extracellular signal-regulated protein kinases) またはERKとも呼ばれ、3キナーゼカスケードの末端酵素である。関係するが区切られたシグナル伝達経路に対する3キナーゼカスケードの反復が、一経路内で逐次的に作用するモジュール多機能シグナル伝達要素としてのMAPキナーゼ経路の概念を生み、この経路ではそれぞれの酵素がリン酸化してそれによりシーケンスの次のメンバーを活性化することが特徴である。このようにして、標準的MAPキナーゼモジュールは3つのプロテインキナーゼからなる。すなわち、あるMAPキナーゼキナーゼ (またはMEKK) があるMAPキナーゼキナーゼ (またはMEK) を活性化し、これが、順に、あるMAPK/ERK酵素を活性化する。MAPK/ERK、JNK (c-jun アミノ末端プロテインキナーゼ (またはSAPK))、およびp38カスケードは、それぞれMEKK、MEKおよびERK、またはMAPキナーゼスーパーファミリーメンバーを含む3つの酵素モジュールからなる。様々な細胞外シグナルはそれらのそれぞれの細胞表面レセプターと連合すると初期事象をトリガーし、次いでこのシグナルが細胞内部に伝達され、そこで適切なカスケードを活性化する。

10

【0014】

MAPキナーゼはマイトージェン活性化プロテインキナーゼ (またはERK) スーパーファミリーであって、TXYコンセンサス配列を触媒コアに有する。ERK1/2、p38HOG、およびJNK/SAPKは、平行経路における関係するが別個の末端酵素である。

20

【0015】

Sebolt-Leopold et al., Nat. Med., 5(7): 810-6 (Jul, 1999) は、MAPキナーゼ (MAPK) 経路の小分子阻害剤を同定するためのin vitroカスケードアッセイシステムを記載している。グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) - MEK1およびGST-MAPK融合タンパク質を細菌細胞から調製して、これらをこのアッセイシステムにおいてMEK1のMAPKへ、MBP (myelin basic protein (ミエリン塩基性タンパク質)) への逐次リン酸化に使用した。MEK1を直接阻害するPD184352 [2-(2-クロロ-4-ヨード-フェニルアミノ)-N-シクロプロピルメトキシ-3,4-ジフルオロ-ベンズアミド] も見出されている。

30

【0016】

本明細書において「p38MAPキナーゼ阻害薬 (「p38MAPK阻害薬」ともいう。)」とは、p38に関連するMAPキナーゼのシグナル伝達を阻害する任意の薬剤をいう。したがって、p38MAPキナーゼ阻害薬は、MAPキナーゼファミリーメンバーであるp38-MAPキナーゼを標的とし、低下させる、または阻害する化合物に関する。p38MAPキナーゼ阻害薬は水溶性のものが好ましい。水溶性でなければ、溶媒として身体に適合しにくいものを使用することが必要となりうるからである。水溶性かどうかについては薬局方の溶解度の定義に基づき分類されうる。すなわち、溶質1g又は1mLを溶かすに要する溶媒量として、極めて溶けやすい: 1mL未満; 溶けやすい: 1mL以上10mL未満; やや溶けやすい: 10mL以上30mL未満; やや溶けにくい: 30mL以上100mL未満; 溶けにくい: 100mL以上1000mL未満; 極めて溶けにくい: 1000mL以上10000mL未満; ほとんど溶けない: 10000mL以上と定義されており、本明細書においても同様に評価する。水溶性とは、水を溶媒としたときに、これらのうち有効量を溶解させるものであれば、任意の溶解性のものを利用することができることが理解される。たとえば、4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-5-(4-ピリジル)-1H-イミダゾール (SB-203580) であれば、メタノールに可溶であるが水には溶けにくいとされ、4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-5-(4-ピリジル)-1H-イミダゾール (SB-203580) の塩酸塩であれば、水に可溶とされ、水溶性に分類される。

40

50

【 0 0 1 7 】

p 3 8 は哺乳類動物 M A P キナーゼスーパーファミリーメンバーであって、ストレス、紫外光、および炎症性サイトカインにより活性化される。触媒コアに T G Y コンセンサス配列を有する。

【 0 0 1 8 】

異常調節されたキナーゼは多くの疾患、特に増殖性および炎症性障害における主な病因であるということが次第に認識されている。癌領域において最初に同定される発癌遺伝子の1つは、上皮増殖因子レセプターキナーゼ (E G F R) に対するものであったが、その過剰発現は肺、乳、脳、前立腺、 G I および卵巣癌と関連している。例えば、 M A P キナーゼの構成的活性化は多数の癌細胞系統 (膵臓、大腸、肺、卵巣、および腎臓) および様々なヒト器官 (腎臓、大腸、および肺) 由来の原発腫瘍と関連している (H o s h i n o et al . , O n c o g e n e , 1 8 (3) : 8 1 3 - 2 2 (J a n . 1 9 9 9)) 。さらに、 p 3 8 M A P キナーゼは、炎症の発症および進行と関連する2つのサイトカイン、 T N F および I L - 1 の産生を調節する。

10

【 0 0 1 9 】

本発明において使用されうる p 3 8 M A P キナーゼ阻害薬は、 V X - 7 4 5 (V e r t e x P h a r m a c e u t i c a l s I n c .) の他、 p 3 8 M A P キナーゼ阻害活性を有する化合物であれば特に制限されず、例えば特開 2 0 0 2 - 9 7 1 8 9 号公報、特表 2 0 0 0 - 5 0 3 3 0 4 号公報、特表 2 0 0 1 - 5 2 2 3 5 7 号公報、特表 2 0 0 3 - 5 3 5 0 2 3 号、特表 2 0 0 1 - 5 0 6 2 6 6 号公報、特表平 9 - 5 0 8 1 2 3 号公報、国際公開第 0 1 / 5 6 5 5 3 号公報、国際公開第 9 3 / 1 4 0 8 1 号公報、国際公開第 0 1 / 3 5 9 5 9 号公報、国際公開第 0 3 / 6 8 2 2 9 号公報、国際公開第 0 3 / 8 5 8 5 9 号公報、特表 2 0 0 2 - 5 3 4 4 6 8 号公報、特表 2 0 0 1 - 5 2 6 2 2 2 号公報、特表 2 0 0 1 - 5 2 6 2 2 3 号公報、米国特許第 6 3 4 4 4 7 6 号明細書、国際公開第 0 3 / 9 9 8 1 1 号公報、国際公開第 0 3 / 9 9 7 9 6 号公報、特表 2 0 0 4 - 5 0 6 0 4 2 号公報、国際公開第 0 4 / 6 0 2 8 6 号公報、特表 2 0 0 2 - 3 6 3 1 7 9 号公報、特表 2 0 0 4 - 1 0 7 3 5 8 号公報、米国特許第 5 6 7 0 5 2 7 号明細書、米国特許第 6 0 9 6 7 5 3 号明細書、国際公開第 0 1 / 4 2 1 8 9 号公報、国際公開第 0 0 / 3 1 0 6 3 号公報などの特許公報に記載された化合物が挙げられ、好ましくは 4 - (4 - フルオロフェニル) - 2 - (4 - ヒドロキシフェニル) - 5 - (4 - ピリジル) - 1 H - イミダゾール (S B - 2 0 2 1 9 0) 、 t r a n s - 4 - [4 - (4 - フルオロフェニル) - 5 - (2 - メトキシ - 4 - ピリミジニル) - 1 H - イミダゾール - 1 - イル] シクロヘキサノール (S B - 2 3 9 0 6 3) 、 4 - (4 - フルオロフェニル) - 2 - (4 - メチルスルフィニルフェニル) - 5 - (4 - ピリジル) - 1 H - イミダゾール (S B - 2 0 3 5 8 0) 、 4 - (4 - フルオロフェニル) - 5 - (2 - メトキシピリミジン - 4 - イル) - 1 - (ピペリジン - 4 - イル) イミダゾール (S B - 2 4 2 2 3 5) 、 4 - (4 - フルオロフェニル) - 2 - (4 - ヒドロキシ - 1 - ブチニル) - 1 - (3 - フェニルプロピル) - 5 - (4 - ピリジル) イミダゾール (R W J - 6 7 6 5 7) 、 4 - (4 - フルオロフェニル) - 1 - (ピペリジン - 4 - イル) - 5 - (4 - ピリジル) イミダゾール (H E P - 6 8 9) 、 (S) - 2 - (2 - アミノ - 3 - フェニルプロピルアミノ) - 1 - メチル - 5 - (2 - ナフチル) - 4 - (4 - ピリジル) ピリミジン - 6 - オン (A M G - 5 4 8) 、 2 - クロロ - 4 - (4 - フルオロ - 2 - メチルアニリノ) - 2 ' - メチルベンゾフェノン (E O - 1 6 0 6) 、 3 - (4 - クロロフェニル) - 5 - (1 - ヒドロキシアセチルピペリジン - 4 - イル) - 4 - (ピリミジン - 4 - イル) ピラゾール (S D - 0 6) 、 5 - (2 , 6 - ジクロロフェニル) - 2 - (2 , 4 - ジフルオロフェニルチオ) ピリミド [3 , 4 - b] ピリダジン - 6 - オン (V X - 7 4 5) 、 4 - アセチルアミノ - N - t e r t - ブチルベンズアミド (C P I - 1 1 8 9) 、 N - [3 - t e r t - ブチル - 1 - (4 - メチルフェニル) ピラゾール - 5 - イル] - N ' - [4 - (2 - モルホリノエトキシ) - 1 - ナフチル] ウレア (ドラマピモド (D o r a m a p i m o d)) 、 2 - ベンズアミド - 4 - [2 - エチル - 4 - (3 - メチルフェニル) チアゾール - 5 - イル] ピリジン (T A K - 7

20

30

40

50

15)、SCIO-469、1-(カルバモイル-6-(2,4-ジフルオロフェニル)ピリジン-2-イル)-1-(2,6-ジフルオロフェニル)尿素(VX-702;2-(2,4-ジフルオロフェニル)-6-(1-(2,6-ジフルオロフェニル)ウレイド)ニコチンアミド)、GSK-681323、PS-540446、SC-80036、AVE-9940、RO-320-1195、1-(1,3-ジヒドロキシプロブ-2-イル)-4-(4-フルオロフェニル)-5-[2-フェノキシピリミジン-4-イル]イミダゾール(SB-281832)、2-[5-(4-[4-フルオロフェニル)メチル]ピペリジン-1-イル)カルボニル]-6-メトキシ-1-メチル-1H-インドル-3-イル]-N,N'-ジメチル-2-オキソアセトアミド(SCIO-323)、2-(5-tert-ブチル-2-m-トリル-2H-ピラゾル-3-イル)-2-ヒドロキシイミド-N-[4-(2-モルホリン-4-イル-エトキシ)-ナフタレン-1-イル]-アセトアミド(KC-706)、:N,N'-ビス[3,5-ビス[1-(2-アミジノヒドラゾノ)エチル]フェニル]デカンジアミド、N,N'-ビス[3,5-ビス[1-[2-(アミノイミノメチル)ヒドラゾノ]エチル]フェニル]デカンジアミド(セマピモド(Semapimod))、3-(3-プロモ-4-(2,4-ジフルオロベンジル)オキシ)-6-メチル-2-オキソピリジン-1(2H)-イル)-N,4-ジメチルベンズアミド(PH-797804)および5-(2-(tert-ブチル)-5-(4-フルオロフェニル)-1H-イミダゾール-4-イル)-3-ネオペンチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-2-アミン(LY2228820)である。

10

20

【0020】

さらに、Tocris Cookson社(St Louis, USA)は<http://www.tocris.com/>に例示される様々なMAPキナーゼ阻害薬を提供する。例えば、SB202190(4-[4-(4-フルオロフェニル)-5-(4-ピリジニル)-1H-イミダゾール-2-イル]フェノール)は、高度に選択的、強力、かつ細胞浸透性のp38 MAPキナーゼ阻害薬である(SmithKline Beecham, plc)(Jiang et al., J. Biol. Chem., 271:17920(1996); Frantzet al., Biochemistry, 37:138-46(1998); Nemoto et al., J. Biol. Chem., 273:16415(1998); および Davies et al., Biochem. J., 351:95(2000))。また、アニソマイシン((2R,3S,4S)-2-[4-(4-メトキシフェニル)メチル]-3,4-ピロリジンジオール-3-アセテート)は、タンパク質合成インヒビター(翻訳をブロックする)である。これは、ストレス活性化プロテインキナーゼ(JNK/SAPK)およびp38 MAPキナーゼの強力なアクチベーターであり、前初期遺伝子(c-fos、fosB、c-jun、junB、およびjunD)誘導の相同期脱感作を選択的に誘発する強力なシグナル伝達アゴニストとして作用する。PD98059(2-(2-アミノ-3-メトキシフェニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オン)は、マイトージェン活性化プロテインキナーゼキナーゼ(MAPKK)の特異的阻害薬である(Pfizer=Warner-Lambert Company)。SB203580(4-[5-(4-フルオロフェニル)-2-[4-(メチルスルホニル)フェニル]-1H-イミダゾール-4-イル]ピリジン)は、p38マイトージェン活性化プロテインキナーゼの高度に選択的な阻害薬(SmithKline Beecham, plc)である。インターロイキン-2誘導によるT細胞増殖、シクロオキシゲナーゼ-1および-2、ならびにトロンボキサンシンターゼを阻害することが示されている。SB203580塩酸塩(4-[5-(4-フルオロフェニル)-2-[4-(メチルスルホニル)フェニル]-1H-イミダゾール-4-イル]ピリジン)化合物は、高度に選択的なp38マイトージェン活性化プロテインキナーゼの阻害薬の水溶性塩である。インターロイキン-2誘導によるT細胞増殖、シクロオキシゲナーゼ-1および-2、ならびにトロンボキサンシンターゼを阻害することが示されている。U0126(1,4-ジアミノ-2,3-ジシアノ-1,4-ビス[2-アミノフェニルチオ]ブタジエ

30

40

50

ン)は、MAPキナーゼキナーゼの強力かつ選択的な非競合性の阻害薬である。

【0021】

好ましいp38MAPキナーゼ阻害薬としては、SB203580(4-[4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-1H-イミダゾール-5-イル]ピリジン)が例示されるがそれに限定されない。

【0022】

このほかの、本発明で用いることができるp38MAPキナーゼ阻害薬としては、例えば、p38MAPキナーゼに対する中和抗体、p38MAPキナーゼの活性を阻害する化合物、p38MAPキナーゼをコードする遺伝子の転写を阻害する化合物(例えば、アンチセンス核酸、RNAi、リボザイム)、ペプチド、および植物成分(例えば、ポリフェノール、フラボノイド、配糖体)等の化合物が挙げられる。使用される濃度として、約50nmol/l~100μmol/lが例示され、通常、約0.001~100μmol/l、好ましくは、約0.01~75μmol/l、約0.05~50μmol/l、約1~10μmol/l、約0.01~10μmol/l、約0.05~10μmol/l、約0.075~10μmol/l、約0.1~10μmol/l、約0.5~10μmol/l、約0.75~10μmol/l、約1.0~10μmol/l、約1.25~10μmol/l、約1.5~10μmol/l、約1.75~10μmol/l、約2.0~10μmol/l、約2.5~10μmol/l、約3.0~10μmol/l、約4.0~10μmol/l、約5.0~10μmol/l、約6.0~10μmol/l、約7.0~10μmol/l、約8.0~10μmol/l、約9.0~10μmol/l、約0.01~50μmol/l、約0.05~5.0μmol/l、約0.075~5.0μmol/l、約0.1~5.0μmol/l、約0.5~5.0μmol/l、約0.75~5.0μmol/l、約1.0~5.0μmol/l、約1.25~5.0μmol/l、約1.5~5.0μmol/l、約1.75~5.0μmol/l、約2.0~5.0μmol/l、約2.5~5.0μmol/l、約3.0~5.0μmol/l、約4.0~5.0μmol/l、約0.01~3.0μmol/l、約0.05~3.0μmol/l、約0.075~3.0μmol/l、約0.1~3.0μmol/l、約0.5~3.0μmol/l、約0.75~3.0μmol/l、約1.0~3.0μmol/l、約1.25~3.0μmol/l、約1.5~3.0μmol/l、約1.75~3.0μmol/l、約2.0~3.0μmol/l、約0.01~1.0μmol/l、約0.05~1.0μmol/l、約0.075~1.0μmol/l、約0.1~1.0μmol/l、約0.5~1.0μmol/l、約0.75~1.0μmol/l、約0.09~35μmol/l、約0.09~3.2μmol/lであり、より好ましくは、約0.05~1.0μmol/l、約0.075~1.0μmol/l、約0.1~1.0μmol/l、約0.5~1.0μmol/l、約0.75~1.0μmol/lであるがこれらに限定されない。

【0023】

本発明で用いられるアンチセンス核酸は、上記のいずれの作用により、上述のP38MAPキナーゼのシグナル伝達経路のメンバー等をコードする遺伝子(核酸)の発現および/または機能を阻害してもよい。一つの実施形態としては、上述のP38MAPキナーゼ等をコードする遺伝子のmRNAの5'端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的と考えられる。また、コード領域もしくは3'の非翻訳領域に相補的な配列も使用することができる。このように、上述のP38MAPキナーゼ等をコードする遺伝子の翻訳領域だけでなく、非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含む核酸も、本発明で利用されるアンチセンス核酸に含まれる。使用されるアンチセンス核酸は、適当なプロモーターの下流に連結され、好ましくは3'側に転写終結シグナルを含む配列が連結される。このようにして調製された核酸は、公知の方法を用いることで所望の動物(細胞)に形質転換することができる。アンチセンス核酸の配列は、形質転換される動物(細胞)が有するP38MAPキナーゼ等をコードする遺伝子またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を有効に抑制できる

限りにおいて、完全に相補的でなくてもよい。転写されたRNAは標的遺伝子の転写産物に対して好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相補性を有する。アンチセンス核酸を用いて標的遺伝子の発現を効果的に阻害するには、アンチセンス核酸の長さは少なくとも12塩基以上25塩基未満であることが好ましいが、本発明のアンチセンス核酸は必ずしもこの長さ限定されず、例えば、11塩基以下、100塩基以上、または500塩基以上であってもよい。アンチセンス核酸は、DNAのみから構成されていてもよいが、DNA以外の核酸、例えば、ロックド核酸(LNA)を含んでいてもよい。1つの実施形態としては、本発明で用いられるアンチセンス核酸は、5'末端にLNA、3'末端にLNAを含むLNA含有アンチセンス核酸であってもよい。また、本発明において、アンチセンス核酸を用いる実施形態では、例えば平島および井上、*新生化学実験講座2* 核酸IV遺伝子の複製と発現、日本生化学会編、東京化学同人、1993、319-347.に記載される方法を用いて、P38 MAPキナーゼ等の核酸配列に基づき、アンチセンス配列を設計することができる。

10

20

30

40

50

【0024】

P38 MAPキナーゼ等の発現の阻害は、リボザイム、またはリボザイムをコードするDNAを利用して行うことも可能である。リボザイムとは触媒活性を有するRNA分子を指す。リボザイムには種々の活性を有するものが存在するが、中でもRNAを切断する酵素としてのリボザイムに焦点を当てた研究により、RNAを部位特異的に切断するリボザイムの設計が可能となった。リボザイムには、グループIイントロン型やRNase Pに含まれるM1 RNAのように400ヌクレオチド以上の大きさのものもあるが、ハンマーヘッド型やヘアピン型と呼ばれる40ヌクレオチド程度の活性ドメインを有するものもある(小泉誠および大塚栄子、*タンパク質核酸酵素*、1990、35、2191.)。

【0025】

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

【0026】

また、ヘアピン型リボザイムも本発明の目的に有用である。このリボザイムは、例えば、タバコリングスポットウイルスのサテライトRNAのマイナス鎖に見出される(Buzayan, J.M., *Nature*, 1986, 323, 349.)。ヘアピン型リボザイムからも、標的特異的なRNA切断リボザイムを作出できることが示されている(Kikuchi, Y. & Sasaki, N., *Nucl. Acids Res.*, 1991, 19, 6751.; 菊池洋、*化学と生物*、1992、30、112.)。このように、リボザイムを用いてP38 MAPキナーゼ等をコードする遺伝子の転写産物を特異的に切断することで、該遺伝子の発現を阻害することができる。

【0027】

P38 MAPキナーゼ等の内在性遺伝子の発現の抑制は、さらに、標的遺伝子配列と同一もしくは類似した配列を有する二本鎖RNAを用いたRNA干渉(RNA interference、以下「RNAi」と略称する)によっても行うことができる。RNAiは、二本鎖RNA(dsRNA)が直接細胞内に取り込まれると、このdsRNAと相同な配列を持つ遺伝子の発現が抑えられ現在注目を浴びている手法である。哺乳類細胞においては、短鎖dsRNA(siRNA)を用いることにより、RNAiを誘導する事が可

能で、RNA_iは、ノックアウトマウスと比較して、効果が安定、実験が容易、費用が安価であるなど、多くの利点を有している。siRNAについては、本明細書において他の箇所において詳述される。

【0028】

本明細書において、「siRNA」とは、15～40塩基からなる二本鎖RNA部分を有するRNA分子であり、前記siRNAのアンチセンス鎖と相補的な配列をもつ標的遺伝子のmRNAを切断し、標的遺伝子の発現を抑制する機能を有する。詳細には、本発明におけるsiRNAは、P38 MAPキナーゼ等のmRNA中の連続したRNA配列と相同な配列からなるセンスRNA鎖と、該センスRNA配列に相補的な配列からなるアンチセンスRNA鎖とからなる二本鎖RNA部分を含むRNAである。かかるsiRNAおよび後述の変異体siRNAの設計および製造は当業者の技量の範囲内である。P38 MAPキナーゼ等の配列の転写産物であるmRNAの任意の連続するRNA領域を選択し、この領域に対応する二本鎖RNAを作製することは、当業者においては、通常の試行の範囲内において適宜行い得ることである。また、該配列の転写産物であるmRNA配列から、より強いRNA_i効果を有するsiRNA配列を選択することも、当業者においては、公知の方法によって適宜実施することが可能である。また、一方の鎖が判明していれば、当業者においては容易に他方の鎖（相補鎖）の塩基配列を知ることができる。siRNAは、当業者においては市販の核酸合成機を用いて適宜作製することが可能である。また、所望のRNAの合成については、一般の合成受託サービスを利用することができる。

10

【0029】

二本鎖RNA部分の長さは、塩基として、15～40塩基、好ましくは15～30塩基、より好ましくは15～25塩基、更に好ましくは18～23塩基、最も好ましくは19～21塩基である。これらの上限および下限は、これら特定のものに限定されず、これら列挙されているものの任意の組み合わせであってもよいことが理解される。siRNAのセンス鎖またはアンチセンス鎖の末端構造としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、平滑末端を有するものであってもよいし、突出末端（オーバーハング）を有するものであってもよく、3'末端が突き出したタイプが好ましい。センスRNA鎖およびアンチセンスRNA鎖の3'末端に数個の塩基、好ましくは1～3個の塩基、さらに好ましくは2個の塩基からなるオーバーハングを有するsiRNAは、標的遺伝子の発現を抑制する効果が大きい場合が多く、好ましいものである。オーバーハングの塩基の種類は特に制限はなく、RNAを構成する塩基あるいはDNAを構成する塩基のいずれであってもよい。好ましいオーバーハング配列としては、3'末端にdTdT（デオキシTを2bp）等を挙げることができる。例えば、好ましいsiRNAとしては、全てのsiRNAのセンス・アンチセンス鎖の、3'末端にdTdT（デオキシTを2bp）をつけているものが挙げられるがそれに限定されない。

20

30

【0030】

さらに、上記siRNAのセンス鎖またはアンチセンス鎖の一方または両方において1～数个までのヌクレオチドが欠失、置換、挿入および/または付加されているsiRNAも用いることができる。ここで、1～数塩基とは、特に限定されるものではないが、好ましくは1～4塩基、さらに好ましくは1～3塩基、最も好ましくは1～2塩基である。かかる変異の具体例としては、3'オーバーハング部分の塩基数を0～3個としたもの、3'-オーバーハング部分の塩基配列を他の塩基配列に変更したもの、あるいは塩基の挿入、付加または欠失により上記センスRNA鎖とアンチセンスRNA鎖の長さが1～3塩基異なるもの、センス鎖および/またはアンチセンス鎖において塩基が別の塩基にて置換されているもの等が挙げられるが、これらに限定されない。ただし、これらの変異体siRNAにおいてセンス鎖とアンチセンス鎖とがハイブリダイゼーションしうること、ならびにこれらの変異体siRNAが変異を有しないsiRNAと同等の遺伝子発現抑制能を有することが必要である。

40

【0031】

さらに、siRNAは、一方の端が閉じた構造の分子、例えば、ヘアピン構造を有する

50

s i R N A (S h o r t H a i r p i n R N A ; s h R N A) であつてもよい。s h R N A は、標的遺伝子の特定配列のセンス鎖 R N A、該センス鎖配列に相補的な配列からなるアンチセンス鎖 R N A、およびその両鎖を繋ぐリンカー配列を含む R N A であり、センス鎖部分とアンチセンス鎖部分がハイブリダイズし、二本鎖 R N A 部分を形成する。

【 0 0 3 2 】

s i R N A は、臨床使用の際には、いわゆる o f f - t a r g e t 効果を示さないことが望ましい。o f f - t a r g e t 効果とは、標的遺伝子以外に、使用した s i R N A に部分的にホモロジーのある別の遺伝子の発現を抑制する作用をいう。o f f - t a r g e t 効果を避けるために、候補 s i R N A について、予め D N A マイクロアレイなどを利用して交差反応がないことを確認することが可能である。また、N C B I (N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n) などが提供する公知のデータベースを用いて、標的となる遺伝子以外に候補 s i R N A の配列と相同性が高い部分を含む遺伝子が存在しないかを確認する事によって、o f f - t a r g e t 効果を避けることが可能である。

10

【 0 0 3 3 】

本発明の s i R N A を作製するには、化学合成による方法および遺伝子組換え技術を用いる方法等、公知の方法を適宜用いることができる。合成による方法では、配列情報に基づき、常法により二本鎖 R N A を合成することができる。また、遺伝子組換え技術を用いる方法では、センス鎖配列やアンチセンス鎖配列をコードする発現ベクターを構築し、該ベクターを宿主細胞に導入後、転写により生成されたセンス鎖 R N A やアンチセンス鎖 R N A をそれぞれ取得することによって作製することもできる。また、標的遺伝子の特定配列のセンス鎖、該センス鎖配列に相補的な配列からなるアンチセンス鎖、およびその両鎖を繋ぐリンカー配列を含み、ヘアピン構造を形成する s h R N A を発現させることにより、所望の二本鎖 R N A を作製することもできる。

20

【 0 0 3 4 】

s i R N A は、標的遺伝子の発現抑制活性を有する限りにおいては、s i R N A を構成する核酸の全体またはその一部は、天然の核酸であつてもよいし、修飾された核酸であつてもよい。

【 0 0 3 5 】

本発明における s i R N A は、必ずしも標的配列に対する一組の 2 本鎖 R N A である必要はなく、標的配列を含んだ領域に対する複数組(この「複数」とは特に制限されないが、好ましくは 2 ~ 5 個程度の少数を指す。)の 2 本鎖 R N A の混合物であつてもよい。ここで標的配列に対応した核酸混合物としての s i R N A は、当業者においては市販の核酸合成機および D I C E R 酵素を用いて適宜作製することが可能であり、また、所望の R N A の合成については、一般の合成受託サービスを利用することができる。なお、本発明の s i R N A には、所謂「カクテル s i R N A」が含まれる。また、本発明における s i R N A は、必ずしも全てのヌクレオチドがリボヌクレオチド(R N A)でなくともよい。即ち、本発明において、s i R N A を構成する 1 もしくは複数のリボヌクレオチドは、対応するデオキシリボヌクレオチドであつてもよい。この「対応する」とは、糖部分の構造は異なるものの、同一の塩基種(アデニン、グアニン、シトシン、チミン(ウラシル))であることを指す。例えば、アデニンを有するリボヌクレオチドに対応するデオキシリボヌクレオチドとは、アデニンを有するデオキシリボヌクレオチドのことをいう。

30

40

【 0 0 3 6 】

さらに、本発明の上記 R N A を発現し得る D N A (ベクター)もまた、P 3 8 M A P キナーゼ等の発現を抑制し得る核酸の好ましい実施形態に含まれる。例えば、本発明の上記二本鎖 R N A を発現し得る D N A (ベクター)は、該二本鎖 R N A の一方の鎖をコードする D N A、および該二本鎖 R N A の他方の鎖をコードする D N A が、それぞれ発現し得るようにプロモーターと連結した構造を有する D N A である。本発明の上記 D N A は、当業者においては、一般的な遺伝子工学技術により、適宜作製することができる。より具体的には、目的の R N A をコードする D N A を公知の種々の発現ベクターへ適宜挿入するこ

50

とによって、本発明の発現ベクターを作製することが可能である。

【0037】

本発明において標的遺伝子の発現を抑制する核酸には、修飾された核酸を用いてもよい。修飾された核酸とは、ヌクレオシド（塩基部位、糖部位）および/またはヌクレオシド間結合部位に修飾が施されていて、天然の核酸と異なった構造を有するものを意味する。修飾された核酸を構成する「修飾されたヌクレオシド」としては、例えば、無塩基（*abasic*）ヌクレオシド；アラビノヌクレオシド、2'-デオキシウリジン、-デオキシリボヌクレオシド、-L-デオキシリボヌクレオシド、その他の糖修飾を有するヌクレオシド；ペプチド核酸（PNA）、ホスフェート基が結合したペプチド核酸（PHONA）、ロックド核酸（LNA）、モルホリノ核酸等が挙げられる。上記糖修飾を有するヌクレオシドには、2'-O-メチルリボース、2'-デオキシ-2'-フルオロリボース、3'-O-メチルリボース等の置換五単糖；1', 2'-デオキシリボース；アラビノース；置換アラビノース糖；六単糖およびアルファ-アノマーの糖修飾を有するヌクレオシドが含まれる。これらのヌクレオシドは塩基部位が修飾された修飾塩基であってもよい。このような修飾塩基には、例えば、5-ヒドロキシシトシン、5-フルオロウラシル、4-チオウラシル等のピリミジン；6-メテルアデニン、6-チオグアノシン等のプリン；および他の複素環塩基等が挙げられる。

10

【0038】

修飾された核酸を構成する「修飾されたヌクレオシド間結合」としては、例えば、アルキルリンカー、グリセリルリンカー、アミノリンカー、ポリ（エチレングリコール）結合、メチルホスホネートヌクレオシド間結合；メチルホスホチオエート、ホスホトリエステル、ホスホチオトリエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、トリエステルプロドラッグ、スルホン、スルホンアミド、サルファメート、ホルムアセタール、N-メチルヒドロキシルアミン、カルボネート、カルバメート、モルホリノ、ボラノホスホネート、ホスホルアミデートなどの非天然ヌクレオシド間結合が挙げられる。

20

【0039】

本発明の二本鎖 *siRNA* に含まれる核酸配列としては、P38 MAPキナーゼまたは他のP38 MAPキナーゼシグナルのメンバーに対する *siRNA* などを挙げる事ができる。

【0040】

また、本発明の核酸または薬剤をリボソームなどのリン脂質小胞体に導入し、その小胞体を投与することも可能である。*siRNA* または *shRNA* を保持させた小胞体をリポフェクション法により所定の細胞に導入することができる。そして、得られる細胞を例えば、静脈内、動脈内等に全身投与する。眼の必要な部位等に局所的に投与することもできる。*siRNA* は *in vitro* においては非常に優れた特異的転写後抑制効果を示すが、*in vivo* においては血清中のヌクレアーゼ活性により速やかに分解されてしまうため持続時間が限られるためより最適で効果的なデリバリーシステム開発が求められてきた。一つの例としては、Ochiya, T et al., Nature Med., 5:707-710, 1999、Curr. Gene Ther., 1:31-52, 2001より生体親和性材料であるアテロコラーゲンが核酸と混合し複合体を形成させると、生体中の分解酵素から核酸を保護する作用があり *siRNA* のキャリアーとして非常に適しているキャリアーであると報告されており、このような形態を利用することができるが、本発明の核酸、治療または予防薬の導入の方法はこれには限られない。このようにして、生体内においては血清中の核酸分解酵素の働きにより、速やかに分解されてしまうため長時間の効果の継続を達成することができる。例えば、Takeshita F. PNAS. (2003) 102(34) 12177-82、Minakuchi Y Nucleic Acids Research (2004) 32(13) e109では、牛皮膚由来のアテロコラーゲンが核酸と複合体を形成し、生体内の分解酵素から核酸を保護する作用があり、*siRNA* のキャリアーとして非常に適していると報告されており、このような技術を用いることができる。

30

40

50

【0041】

本明細書において「細胞増殖、細胞障害抑制または細胞老化抑制を必要とする角膜内皮疾患、障害または状態」は、角膜内皮の疾患、障害または状態であって、細胞増殖が必要とされる角膜内皮の障害、細胞障害または細胞老化の少なくとも1つに関連する任意の疾患、障害または状態であって、細胞増殖、細胞障害抑制または細胞老化抑制を行うことによって改善または治癒が達成されうる任意の疾患、障害または状態をいう。細胞増殖、細胞障害抑制または細胞老化抑制を必要とする角膜内皮疾患、障害または状態としては、たとえば、フックス角膜内皮ジストロフィ、角膜移植後の持続する角膜内皮密度減少、外傷、眼科手術、加齢、角膜内皮炎等に関連する障害等を挙げることができるがそれらに限定されない。本明細書において「細胞増殖が必要とされる角膜内皮の障害」とは、外傷、手術などにより角膜内皮が欠損している状態をいい、「細胞障害」とは、フックス角膜内皮ジストロフィ、角膜内皮炎などによりアポトーシス、細胞死などが生じている状態をいい、「細胞老化」とは細胞質の拡大、細胞密度の低下、細胞の大小不同の増加、六角形細胞率の低下、細胞増殖能の低下などが生じている状態をいう。

10

【0042】

(一般技術)

本明細書において用いられる分子生物学的手法、生化学的手法、微生物学的手法は、当該分野において周知であり慣用されるものであり、例えば、Sambrook J. et al. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harborおよびその3rd Ed. (2001); Ausubel, F. M. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Ausubel, F. M. (1989). *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Innis, M. A. (1990). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press; Ausubel, F. M. (1992). *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates; Ausubel, F. M. (1995). *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates; Innis, M. A. et al. (1995). *PCR Strategies*, Academic Press; Ausubel, F. M. (1999). *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, and annual updates; Sninsky, J. J. et al. (1999). *PCR Applications: Protocols for Functional Genomics*, Academic Press; Gait, M. J. (1985). *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Gait, M. J. (1990). *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein, F. (1991). *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Adams, R. L. et al. (1992

20

30

40

50

) . The Biochemistry of the Nucleic Acids , Chapman & Hall ; Shabarova , Z . et al . (1994) . Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids , Weinheim ; Blackburn , G . M . et al . (1996) . Nucleic Acids in Chemistry and Biology , Oxford University Press ; Hermanson , G . T . (1996) . Bioconjugate Techniques , Academic Press 、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載されている。角膜内皮細胞については、Nancy Joyceらの報告{Joyce, 2004 #161}{Joyce, 2003 #7}がよく知られているが、前述のごとく長期培養、継代培養により線維芽細胞様の形質転換を生じ、効率的な培養法の研究が現在も行われている。これらは本明細書において関連する部分(全部であり得る)が参考として援用される。

10

【0043】

(好ましい実施形態の説明)

以下に好ましい実施形態の説明を記載するが、この実施形態は本発明の例示であり、本発明の範囲はそのような好ましい実施形態に限定されないことが理解されるべきである。当業者はまた、以下のような好ましい実施例を参考にして、本発明の範囲内にある改変、変更などを容易に行うことができることが理解されるべきである。これらの実施形態について、当業者は適宜、任意の実施形態を組み合わせ得る。

20

【0044】

1つの局面において、本発明は、p38MAPキナーゼ阻害薬を含む、細胞増殖を必要とする角膜内皮障害の治療または予防薬を提供する。p38MAPキナーゼは、種々のシグナル伝達に關与するとされており、炎症に關与するともされているが、角膜内皮では、そのメカニズムのすべては明らかにされておらず、特に細胞増殖を必要とする角膜内皮障害、たとえば、その阻害によって創傷の治療または予防に有効であることは予想できなかった。したがって、p38MAPキナーゼ阻害薬を細胞増殖を必要とする角膜内皮障害の治療または予防に応用することは本発明者らが予想外に見出した発見であるといえる。特に、点眼薬として利用可能な実施形態のものは、従来見出されておらず、そのような形態についても実際の離床現場において評価が高いというべきである。

30

【0045】

1つの実施形態では、前記p38MAPキナーゼ阻害薬は水溶性である。水溶性であれば、溶媒として生体適合性に問題ではない水を利用することができるからである。水溶性でなくても、医薬として許容される溶媒(例えば、エタノール等)に溶解するものであれば、利用することができる。溶解性については薬局方の溶解度の定義に基づき分類される。すなわち、溶質1g又は1mLを溶かすに要する溶媒量として、極めて溶けやすい: 1mL未満; 溶けやすい: 1mL以上10mL未満; やや溶けやすい: 10mL以上30mL未満; やや溶けにくい: 30mL以上100mL未満; 溶けにくい: 100mL以上1000mL未満; 極めて溶けにくい: 1000mL以上10000mL未満; ほとんど溶けない: 10000mL以上とされており、本発明の成分の評価においても同様に判断する。水溶性とは、水を溶媒としたときに、これらのうち有効量を溶解させるものであれば、任意の溶解性のものを利用することができることが理解される。標準的には、本発明についていえば、対象となる溶解性(水であれば、水溶性)は、「溶けやすい」の範疇以上のものをいうが、「やや溶けやすい」ものも場合によって使用することができ、低濃度で効果があるものであれば、「やや溶けにくい」ものや「溶けにくい」の分類にあたるものも使用することができる。たとえば、4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-5-(4-ピリジル)-1H-イミダゾール(SB-203580)であれば、メタノールに可溶であるが水には溶けにくいとされ、4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-5-(4-ピリジル)-1H-イミダゾール(SB-203580)の塩酸塩であれば、水に可溶とされ、水溶

40

50

性に分類される。

【 0 0 4 6 】

1つの実施形態において、本発明の利用法としては、点眼薬以外に前房内への注射、徐放剤への含浸、結膜下注射、全身投与（内服、静脈注射）などの投与方法を挙げることができる。

【 0 0 4 7 】

1つの実施形態では、本発明において用いられる p 3 8 M A P キナーゼ阻害薬は、4 - (4 - フルオロフェニル) - 2 - (4 - ヒドロキシフェニル) - 5 - (4 - ピリジル) - 1 H - イミダゾール (S B - 2 0 2 1 9 0)、trans - 4 - [4 - (4 - フルオロフェニル) - 5 - (2 - メトキシ - 4 - ピリミジニル) - 1 H - イミダゾール - 1 - イル] シクロヘキサノール (S B - 2 3 9 0 6 3)、4 - (4 - フルオロフェニル) - 2 - (4 - メチルスルフィニルフェニル) - 5 - (4 - ピリジル) - 1 H - イミダゾール (S B - 2 0 3 5 8 0)、4 - (4 - フルオロフェニル) - 5 - (2 - メトキシピリミジン - 4 - イル) - 1 - (ピペリジン - 4 - イル) イミダゾール (S B - 2 4 2 2 3 5)、4 - (4 - フルオロフェニル) - 2 - (4 - ヒドロキシ - 1 - ブチニル) - 1 - (3 - フェニルプロピル) - 5 - (4 - ピリジル) イミダゾール (R W J - 6 7 6 5 7)、4 - (4 - フルオロフェニル) - 1 - (ピペリジン - 4 - イル) - 5 - (4 - ピリジル) イミダゾール (H E P - 6 8 9)、(S) - 2 - (2 - アミノ - 3 - フェニルプロピルアミノ) - 1 - メチル - 5 - (2 - ナフチル) - 4 - (4 - ピリジル) ピリミジン - 6 - オン (A M G - 5 4 8)、2 - クロロ - 4 - (4 - フルオロ - 2 - メチルアニリノ) - 2' - メチルベンゾフェノン (E O - 1 6 0 6)、3 - (4 - クロロフェニル) - 5 - (1 - ヒドロキシアセチルピペリジン - 4 - イル) - 4 - (ピリミジン - 4 - イル) ピラゾール (S D - 0 6)、5 - (2, 6 - ジクロロフェニル) - 2 - (2, 4 - ジフルオロフェニルチオ) ピリミド [3, 4 - b] ピリダジン - 6 - オン (V X - 7 4 5)、4 - アセチルアミノ - N - tert - ブチルベンズアミド (C P I - 1 1 8 9)、N - [3 - tert - ブチル - 1 - (4 - メチルフェニル) ピラゾール - 5 - イル] - N' - [4 - (2 - モルホリノエトキシ) - 1 - ナフチル] ウレア (ドラマピモド (D o r a m a p i m o d))、2 - ベンズアミド - 4 - [2 - エチル - 4 - (3 - メチルフェニル) チアゾール - 5 - イル] ピリジン (T A K - 7 1 5)、タルマピモド (T a l m a p i m o d ; S C I O - 4 6 9)、1 - (カルバモイル - 6 - (2, 4 - ジフルオロフェニル) ピリジン - 2 - イル) - 1 - (2, 6 - ジフルオロフェニル) 尿素 (V X - 7 0 2 ; 2 - (2, 4 - ジフルオロフェニル) - 6 - (1 - (2, 6 - ジフルオロフェニル) ウレイド) ニコチンアミド)、ジルマピモド (d i l m a p i m o d ; G S K - 6 8 1 3 2 3)、4 - (5 - (シクロプロピルカルバモイル) - 2 - メチルフェニルアミノ) - 5 - メチル - N - プロピルピロロ (1, 2 - f) (1, 2, 4) トリアジン - 6 - カルボキサミド (P S - 5 4 0 4 4 6)、抗 F G F - 7 抗体 (S C - 8 0 0 3 6)、A V E - 9 9 4 0 (S a n o f i - A v e n t i s)、[5 - アミノ - 1 - (4 - フルオロフェニル) - 1 H - ピラゾール - 4 - イル] [3 - (3 - アミノ - 2 - ヒドロキシプロボキシ) フェニル] メタノン (R O - 3 2 0 - 1 1 9 5)、1 - (1, 3 - ジヒドロキシプロブ - 2 - イル) - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 5 - [2 - フェノキシピリミジン - 4 - イル] イミダゾール (S B - 2 8 1 8 3 2)、2 - [5 - ({4 - [(4 - フルオロフェニル) メチル] ピペリジン - 1 - イル} カルボニル) - 6 - メトキシ - 1 - メチル - 1 H - インドル - 3 - イル] - N, N' - ジメチル - 2 - オキソアセトアミド (S C I O - 3 2 3)、2 - (5 - tert - ブチル - 2 - m - トリル - 2 H - ピラゾール - 3 - イル) - 2 - ヒドロキシイミド - N - [4 - (2 - モルホリン - 4 - イル - エトキシ) - ナフタレン - 1 - イル] - アセトアミド (K C - 7 0 6)、N, N' - ビス [3, 5 - ビス [1 - (2 - アミジノヒドラゾノ) エチル] フェニル] デカンジアミド、N, N' - ビス [3, 5 - ビス [1 - [2 - (アミノイミノメチル) ヒドラゾノ] エチル] フェニル] デカンジアミド (セマピモド (S e m a p i m o d))、3 - (3 - プロモ - 4 - ((2, 4 - ジフルオロベンジル) オキシ) - 6 - メチル - 2 - オキソピリジン - 1 (2 H) - イル) - N, 4 - ジメチルベンズアミド (P H - 7 9 7 8

10

20

30

40

50

04)、および5-(2-(tert-ブチル)-5-(4-フルオロフェニル)-1H-イミダゾール-4-イル)-3-ネオペンチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-2-アミン(LY2228820)からなる群より選択される少なくとも1つを含む。

【0048】

好ましい実施形態では、p38MAPキナーゼ阻害薬は、4-[4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-1H-イミダゾール-5-イル]ピリジン(SB203580)、N-[3-tert-ブチル-1-(4-メチルフェニル)ピラゾール-5-イル]-N'-[4-(2-ホルホリノエトキシ)-1-ナフチル]ウレア(ドラマピモド(Doramapimod); BIRB796)、2-ベンズアミド-4-[2-エチル-4-(3-メチルフェニル)チアゾール-5-イル]ピリジン(TAK-715)、1-(カルバモイル-6-(2,4-ジフルオロフェニル)ピリジン-2-イル)-1-(2,6-ジフルオロフェニル)尿素(VX-702; 2-(2,4-ジフルオロフェニル)-6-(1-(2,6-ジフルオロフェニル)ウレイド)ニコチンアミド)N,N'-ビス[3,5-ビス[1-[2-(アミノイミノメチル)ヒドラゾノ]エチル]フェニル]デカンジアミド(セマピモド(Semapimod))、3-(3-プロモ-4-(2,4-ジフルオロベンジル)オキシ)-6-メチル-2-オキソピリジン-1(2H)-イル)-N,4-ジメチルベンズアミド(PH-797804)、および5-(2-(tert-ブチル)-5-(4-フルオロフェニル)-1H-イミダゾール-4-イル)-3-ネオペンチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-2-アミン(LY2228820)、ならびにそれらの塩からなる群より選択される。より好ましくは、p38MAPキナーゼ阻害薬は4-[4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-1H-イミダゾール-5-イル]ピリジン(SB203580)またはその塩を含む。好ましくは、塩は、医薬として許容される塩である。

10

20

【0049】

別の実施形態では、p38MAPキナーゼ阻害薬は4-[4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-1H-イミダゾール-5-イル]ピリジン(SB203580)塩酸塩を含む。4-[4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-1H-イミダゾール-5-イル]ピリジン(SB203580)塩酸塩は水溶性であり、点眼薬として直接利用可能であり、副作用の危険性も少なく、創傷治癒として好ましいからである。

30

【0050】

本発明で使用されるp38MAPキナーゼ剤の濃度は、通常約0.1~100μmol/l、好ましくは約0.1~30μmol/l、より好ましくは約1μmol/lであり、数種類使用する場合は適宜変更することができ、他の濃度範囲としては、例えば、通常、約0.001~100μmol/l、好ましくは、約0.01~75μmol/l、約0.05~50μmol/l、約1~10μmol/l、約0.01~10μmol/l、約0.05~10μmol/l、約0.075~10μmol/l、約0.1~10μmol/l、約0.5~10μmol/l、約0.75~10μmol/l、約1.0~10μmol/l、約1.25~10μmol/l、約1.5~10μmol/l、約1.75~10μmol/l、約2.0~10μmol/l、約2.5~10μmol/l、約3.0~10μmol/l、約4.0~10μmol/l、約5.0~10μmol/l、約6.0~10μmol/l、約7.0~10μmol/l、約8.0~10μmol/l、約9.0~10μmol/l、約0.01~50μmol/l、約0.05~5.0μmol/l、約0.075~5.0μmol/l、約0.1~5.0μmol/l、約0.5~5.0μmol/l、約0.75~5.0μmol/l、約1.0~5.0μmol/l、約1.25~5.0μmol/l、約1.5~5.0μmol/l、約1.75~5.0μmol/l、約2.0~5.0μmol/l、約2.5~5.0μmol/l、約3.0~5.0μmol/l、約4.0~5.0μmol/l、約0.0

40

50

1 ~ 3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.05 ~ 3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.075 ~ 3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.1 ~ 3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.5 ~ 3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.75 ~ 3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約1.0 ~ 3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約1.25 ~ 3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約1.5 ~ 3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約1.75 ~ 3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約2.0 ~ 3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.01 ~ 1.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.05 ~ 1.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.075 ~ 1.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.1 ~ 1.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.5 ~ 1.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.75 ~ 1.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.09 ~ 35 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.09 ~ 3.2 $\mu\text{mol/l}$ であり、より好ましくは、約0.05 ~ 1.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.075 ~ 1.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.1 ~ 1.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.5 ~ 1.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.75 ~ 1.0 $\mu\text{mol/l}$ を挙げることができるがこれらに限定されない。

10

【0051】

1つの実施形態では、本発明の治療または予防薬は、角膜内皮を有する任意の動物、例えば哺乳動物を対象とすることができ、好ましくは霊長類の角膜内皮の治療または予防を目的とする。好ましくは、この治療または予防の対象は、ヒトの角膜内皮である。

【0052】

1つの実施形態では、本発明の治療および予防薬が対象とする角膜内皮疾患、障害または状態は、細胞増殖、細胞障害抑制または細胞老化抑制を必要とする角膜内皮疾患、障害または状態であり、例えば、フックス角膜内皮ジストロフィ、角膜移植後の持続する角膜内皮密度減少、外傷、眼科手術、加齢、角膜内皮炎等に関連する障害等を挙げることができるがそれらに限定されない。

20

【0053】

別の局面では、本発明は、p38MAPキナーゼ阻害薬の有効量をそれを必要な被験体に投与する工程を含む、細胞増殖を必要とする角膜内皮障害の治療または予防のための方法を提供する。

【0054】

本発明の治療および予防薬または方法の投与（移植）対象は、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ウマ、ヒツジ、サル等）があげられるが、霊長類が好ましく、特にヒトが好ましい。霊長類での角膜内皮治療はこれまで十分な成績が達成されておらず、その意味で本発明は画期的な治療法および医薬を提供する。特に、角膜内皮の創傷モデルを用いた症例でp38MAPキナーゼ阻害薬を用いて良好な治療成績を上げたのは本発明が初めてである。投与量、投与回数は、症状、年齢、体重、投与形態により異なるが、通常成人に対し、例えば点眼剤として使用する場合には、有効成分を約0.0001 ~ 0.5 w/v %、好ましくは約0.003 ~ 0.03 w/v %含有する製剤を、1日あたり1 ~ 10回、好ましくは1 ~ 6回、より好ましくは1 ~ 3回、1回あたり約0.01 ~ 0.1 mL投与することができる。本発明の医薬を前房内に注入する場合には、上記濃度の10分の1 ~ 1000分の1の濃度のものが使用され得る。当業者は疾患の状態によって、p38MAPキナーゼ阻害薬の種類および濃度を適宜選択することができる。

30

【0055】

本明細書において引用された、科学文献、特許、特許出願などの参考文献は、その全体が、各々具体的に記載されたのと同じ程度に本明細書において参考として援用される。

40

【0056】

以上、本発明を、理解の容易のために好ましい実施形態を示して説明してきた。以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、上述の説明および以下の実施例は、例示の目的のみに提供され、本発明を限定する目的で提供したのではない。従って、本発明の範囲は、本明細書に具体的に記載された実施形態にも実施例にも限定されず、特許請求の範囲によってのみ限定される。

【実施例】

【0057】

50

以下に、本発明の角膜内皮細胞の細胞を正常に培養する例を記載する。実験動物の使用にあたっては、動物を用いる生物医学研究に関する原則 (International Guiding Principles for Biomedical Research involving Animals) ならびに、動物の愛護および管理に関する法律、実験動物の飼養および保管等に関する基準に従った。また、本実験は Guidelines of the Association for Research in Vision and Ophthalmology on the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research に従って行った。組織の単離は、それぞれ、日精バイリス株式会社滋賀研究所 (Shiga Laboratory, Nissei Bilis Co., Ltd.) (滋賀県大津市) (Ohtsu, Japan) の動物実験倫理委員会および株式会社イブバイオサイエンス (Eve Bioscience, Co., Ltd.) (和歌山県橋本市) (Hashimoto, Japan) の動物実験委員会による承認を受けた。また、該当する場合生物試料等の取り扱い、厚生労働省、文部科学省等において規定される基準を遵守し、該当する場合はヘルシンキ宣言またはその宣言に基づき作成された倫理規定に基づいて行った。研究のための眼の寄贈については、全ての故人ドナーの近親者から同意書を得た。

10

【0058】

(実験手法：研究グレードのヒト角膜組織)

12個のヒトドナー角膜は、SightLifeTM アイバンクから入手し、全ての角膜を、初代培養前に14日未満の期間にわたり、保存培地 (Optisol; Chiron Vision Corporation, Irvine, CA) 中、4℃で保存した。

20

【0059】

(統計解析)

2サンプルの比較の平均値における統計的有意差 (P値) は、スチューデントの t 検定を用いて決定した。複数のサンプルセットの比較における統計的有意差は、ダネットの多重比較検定を用いて解析した。グラフに示す値は平均 ± SE を表す。

【0060】

(材料および方法)

・ヒト角膜内皮細胞 (HCEC、入手先および培養方法)：HCEC は、以下のように培養した。簡単に述べると、シアトルアイバンクから購入した研究用角膜より、角膜内皮細胞を含むデスメ膜を剥離し、角膜内皮細胞を基底膜とともに機械的に剥離して、コラゲナーゼ (ROCHE カタログ番号：10 103 586 001) を用いて基底膜よりはがして (代表的には、1 mg/mL コラゲナーゼ A (Roche Applied Science) を用いて 37℃ にて 2 時間処理した。) 回収後、初代培養を行った。培地はヒトは Opti-MEM I Reduced-Serum Medium, Liquid (INVITROGEN カタログ番号：31985-070) に、8% ウシ胎仔血清 (FBS) (BIOWEST、カタログ番号：S1820-500)、200 mg/mL CaCl₂ · 2H₂O (SIGMA カタログ番号：C7902-500G)、0.08% コンドロイチン硫酸 (SIGMA カタログ番号：C9819-5G)、20 μg/mL アスコルビン酸 (SIGMA カタログ番号：A4544-25G)、50 μg/mL ゲンタマイシン (INVITROGEN カタログ番号：15710-064) および 5 ng/mL EGF (INVITROGEN カタログ番号：PHG0311) を加えた 3T3 フィーダー細胞用に馴化させたものを用いた。具体的には、37℃ での消化後、個々の角膜から得られた HCEC を培養培地中に再懸濁させ、FNC Coating Mix (登録商標) でコーティングした 12 ウェルプレートの 1 ウェルにプレートのコーティングした。培養培地は、一部の改変を加えた公開されたプロトコルに従って調製した。簡単に述べると、OptiMEM-I (Life Technologies)、8% FBS、5 ng/mL 上皮増殖因子 (EGF) (Sigma-Aldrich Co

30

40

50

、St. Louis, MO)、20 µg/mL アスコルビン酸 (Sigma-Aldrich)、200 mg/L 塩化カルシウム (Sigma-Aldrich)、0.08% コンドロイチン硫酸 (和光純薬工業株式会社、大阪市) および 50 µg/mL のゲンタマイシンを含有する基本培養培地を準備し、次いで、不活性化 3T3 線維芽細胞の培養後に馴化培地を回収した。3T3 線維芽細胞の不活性化は、以前に記載されたとおりに実施した。簡単に述べると、コンフルエントな 3T3 線維芽細胞を 4 µg/mL マイトマイシン C (MMC) (協和発酵キリン株式会社、東京都) とともに、5% CO₂ 下で 37 °C にて 2 時間インキュベートし、次いでトリプシン処理し、そして、2 × 10⁴ 細胞/cm² の密度でプラスチック皿にプレイングした。HCEC は、5% CO₂ 中 37 °C にて加湿雰囲気下で培養し、2 日おきに培養培地を交換した。HCEC が 14 ~ 28 日でコンフルエントに達すると、これらを、Ca²⁺ および Mg²⁺ 非含有 PBS 中でリンスし、37 °C にて 5 分間 0.05% トリプシン-EDTA でトリプシン処理し、そして、1 : 2 の比で継代した。

・染色等の細胞観察方法 (組織学的試験) : 細胞観察は位相差顕微鏡にて行った。また、細胞を固定した後に機能関連マーカーとして ZO-1、Na⁺/K⁺-ATPase を用いて免疫染色を行い蛍光顕微鏡にて観察を行った。組織染色検査のために、培養した HCEC を Lab-TekTM Chamber SlidesTM (NUNC A/S, Roskilde, Denmark) に入れ、4% ホルムアルデヒドで 10 分間室温 (RT) で固定し、1% ウシ血清アルブミン (BSA) とともに 30 分間インキュベートした。

具体的には、Lab-TekTM Chamber SlidesTM (NUNC A/S, Roskilde, Denmark) 上の培養 HCEC を室温で 10 分間 4% ホルムアルデヒド中で固定し、1% ウシ血清アルブミン (BSA) とともに 30 分間インキュベートした。CEC の表現型を調べるために、密着結合関連タンパク質である ZO-1 (Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, CA)、ポンプ機能に関連するタンパク質である Na⁺/K⁺-ATPase (Upstate Biotech, Inc., Lake Placid, NY)、フィブロネクチン (BD, Franklin Lakes, NJ) およびアクチンの免疫組織化学分析を行った。CEC の機能に関連するマーカーとして ZO-1 および Na⁺/K⁺-ATPase を使用し、線維芽細胞様の変化を評価するためにフィブロネクチンおよび 1 型コラーゲンを使用し、そして、細胞の形態を評価するためにアクチンの染色を使用した。ZO-1、Na⁺/K⁺-ATPase、1 型コラーゲンおよびフィブロネクチンの染色は、それぞれ、ZO-1 ポリクローナル抗体、Na⁺/K⁺-ATPase モノクローナル抗体、およびフィブロネクチンモノクローナル抗体の 1 : 200 希釈を用いて実施した。二次抗体には、Alexa Fluor (登録商標) 488 標識、または、Alexa Fluor (登録商標) 594 標識ヤギ抗マウス IgG (Life Technologies) の 1 : 2000 希釈を使用した。アクチンの染色は、Alexa Fluor (登録商標) 488 標識ファロイジン (Life Technologies) の 1 : 400 希釈を用いて実施した。次いで、細胞の核を DAPI (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) または PI (Sigma-Aldrich) で染色した。次いで、スライドを蛍光顕微鏡 (TCS SP2 AOBIS; Leica Microsystems, Welzlar, Germany) で観察した。

・ウェスタンブロット法 : RIPA バッファーで抽出し得られたタンパク質を 7.5% ポリアクリルアミドで電気泳動した。分離されたタンパク質は PVDF 膜 (PALL LIFE SCIENCE 社製、カタログ番号 : EH-2222) に転写した。0.1% (vol/vol) ポリエチレンソルビタンモノラウレート (ナカライテスク、カタログ番号 : 28353-85) (TBS-T) と 5% 無脂肪乾燥乳 (CELL SIGNALING 社、カタログ番号 : 9999) を補った Tris 緩衝化食塩水 (10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 100 mM NaCl) と、ブロットした膜を 1 時間インキュベートすることによりブロッキング操作を行った。この後、p27 (SC-527, Santa Cruz)、p21 (2946, Cell Signaling)、p16 (4824、

10

20

30

40

50

Cell Signaling)、p-pRb(9308、Cell Signaling)、サイクリンD1(2926、Cell Signaling)、サイクリンD3(2936、Cell Signaling)、pp38(4631、Cell Signaling)、p-ATF2(SC-8398、Santa Cruz)、GAPDH(2118、Cell Signaling)に対する抗体を補ったTBS-Tにて1000倍に希釈したものをメンブレンに浸し、室温で1時間反応させた。T-TBSで3回洗浄後、マウス-IgG抗体HRP複合体(CELL SIGNALING社、カタログ番号:7074P2)とウサギ-IgG抗体HRP複合体(GE Healthcare、カタログ番号:NA934)インキュベートし、洗浄後、ECL-ADVANCE(GEヘルスケア・ジャパン社、カタログ番号:RPN2135V)で発光させたバンドを検出した。・免疫染色:コンフルエントに達した細胞をPBS(ニッスイ、カタログ番号:5913)洗浄後、氷冷したエタノール(ナカライテスク、カタログ番号:14713-95)と酢酸(WAKO カタログ番号:017-00256)(95:5)にて10分間固定した。

【0061】

0.1%(vol/vol)ポリエチレンソルビタンモノラウレート(ナカライテスク、カタログ番号:28353-85)(TBS-T)と10%ウシ胎仔血清を補ったTris緩衝化食塩水(10mM Tris-HCl、pH7.4;100mM NaCl)で1時間インキュベートすることによりブロッキング操作を行った。ウサギ抗ヒトZO-1抗体(1:200)、マウス抗ヒトNa⁺/K⁺-ATPase抗体(1:200)を一次抗体として使用し、室温にて1時間反応させた。希釈率は、1:200または1:1000を適宜使用した。

【0062】

次いでTBS-Tにて1000倍に希釈したALEXA FLUOR 594(INVITROGEN社製(カタログ番号:A21203))とALEXA FLUOR 488(INVITROGEN社製(カタログ番号:A21206))で室温で1時間反応させた。PBSで洗浄後、VECTASHIELD WITH DAPI(VECTOR LABORATORIES社(カタログ番号:94010))とともにスライドに封入し、共焦点顕微鏡(ライカ社製)で観察した。

・Na⁺/K⁺-ATPaseに対する抗体:MILLIPORE社製(MILLIPORE カタログ番号:05-369)のものを用いた。

・ZO-1に対する抗体:マウスINVITROGEN社製(INVITROGEN カタログ番号:339100)、ウサギZYMED LABORATORIES社製(ZYMED LABORATORIES カタログ番号:61-7300)のものを用いた。

・GAPDHに対する抗体:ABCAM社製(カタログ番号:ab36840)のものを用いた。

・二次抗体(HRP結合抗ウサギIgG二次抗体)Cell Signaling Technology社製(カタログ番号:7074)

・二次抗体(抗ウサギIgG二次抗体)Cell Signaling Technology社製(カタログ番号:7076)

・サイトカイン抗体

角膜内皮細胞を10μM SB203580存在下で培養して培養上清を回収し試料液とした。Proteome Profiler(#ARY005,R&D)で培養上清中のサイトカインを網羅的に半定量した。サイトカイン抗体をプロットしたメンブレンをトレイに置き、ブロッキング液を2ml添加し、室温で1時間インキュベートした。試料液にビオチン抗体を加え、室温で1時間インキュベートした。ブロッキング液を捨て抗体溶液をメンブレンに浸して4℃で一晩インキュベートした。メンブレンを洗浄後、ブロッキング液で希釈したHRP標識ストレプトアビジン溶液を2ml加え、30分間室温でインキュベートした。メンブレンを洗浄後、基質液を加え、LAS400(フジフィルム)で検出した。

10

20

30

40

50

・PCR法：RT-PCR（半定量的逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応）により、各ラミニン鎖およびインテグリン鎖に対するPCR法を行った。プライマーは、オリゴヌクレオチド合成会社であるINVITROGENから購入し、脱塩処理したものをを用いた。細胞からの総RNAの抽出にはRNeasy Mini Kit（QIAGEN社、カタログ番号：74106）を用いた。シアトルアイバンクから購入した研究用角膜より、角膜内皮細胞を含むデスメ膜を剥離し、角膜内皮細胞を基底膜とともに機械的に剥離して、角膜内皮細胞からのRNA抽出に用いた。RNAはReverTra Ace（TOYOBO社（カタログ番号：TRT-101））により逆転写反応（42、60分間）を行い、TAKARA TaqHotStart Version（タカラバイオ社、カタログ番号：RR001A）によりGAPDHを内部標準としてCD166、CD73を増幅した。同量のcDNAを、PCR機（GeneAmp9700；Applied Biosystems）と、下記のプライマーペアによって増幅した。PCR反応には下記に示すプライマーを用いた。これらのプライマーはライフテクノロジーズジャパン株式会社（カタログ番号：10336022）から入手した。

・IL6-F：CACAAAGCGCCTTCGGTCCAGTT（配列番号1）

・IL6-R：TCTGCCAGTGCCTCTTTGCTGC（配列番号2）

・GAPDH-F：GAGTCAACGGATTTGGTTCGT（配列番号3）

・GAPDH-R：TTGATTTTGGAGGGATCTCG（配列番号4）

増幅されたDNA断片は1.5%アガロースゲル（ナカライテスク、カタログ番号：01149-76）で電気泳動し、エチジウムブロマイド（ナカライテスク、カタログ番号：14603-51）での染色により検出した。

・RT-PCRによるヒト角膜内皮細胞のIL-6発現量の定量は以下の方法で行った。ヒト角膜内皮細胞（n=3, passage 5）を10 μ M SB203580存在下で20日間培養後、RNeasy Mini（QIAGEN）でRNA抽出を行った。total RNA 277ngをRevertra Ace（Toyobo）で逆転写し、cDNA合成したものをテンプレートとし、PCRを行った。一本鎖cDNA合成の反応混合物1 μ lを含有するPCR溶液10 μ lを94

の初期温度にて1分間そして次に94にて1分間、54にて30秒間及び72にて30秒間、加熱した。この温度サイクルを30回反復した。

IL-6 sense primer：cacaagcgccttccagtt（配列番号1）

IL-6 antisense primer：tctgccagtgctctttgctgc（配列番号2）

・ELISA法（BrdU）：96ウェル培養プレートに、5,000個/ウェルの播種密度で播種し一晚培養した。その後、培地に5-プロモ-2'-デオキシウリジン（BrdU）を添加し、一晚培養した。培地を除去し、固定溶液（Amersham cell proliferation biotrak ELISA system, version 2）を加えて30分間室温でインキュベートした。次いで、固定溶液を除去し、ブロッキング溶液（Amersham cell proliferation biotrak ELISA system, version 2）を加えて30分間、室温で静置した。次いで、ブロッキング溶液を除去し、ペルオキシダーゼ結合抗BrdU抗体を添加し、室温で90分静置した。洗浄パフューで3回プレートを洗浄し、TMB（3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン）基質（Amersham cell proliferation biotrak ELISA system, version 2）を加えて5~30分間静置した。1M硫酸で反応を停止し、プレートリーダーで450nmにおける吸光度を測定した。結果は5回の測定の平均値 \pm 標準誤差として示した。

・ELISA法（IL-6）：ヒト角膜内皮細胞（n=3, passage 5）を10 μ M SB203580存在下で20日間培養後、新鮮培地に交換し、7日間後回収した培養上清中のIL-6タンパク質量をDuoSet ELISA human IL-6（R

10

20

30

40

50

& D Cat # D Y 2 0 6) のキットの説明書に従い、定量した。IL - 6 抗体 (2 . 0 μ g / m L) を平底プレート (n u n c) 上に 1 0 0 μ L / ウェルでリン酸緩衝食塩水 (P B S) 中で室温で一晩被覆した。プレートを P B S 、 0 . 0 5 % (v / v) T w e e n 2 0 (P B S / T w e e n) で洗浄し、そして 1 % の血清アルブミン (ナカライテスク) を補足した P B S / T w e e n (P T G) で 2 時間ブロッキングした。培養上清 0 . 1 m l を加え、室温で 2 時間インキュベーションした。洗浄後、ビオチン処理された抗 IL - 6 抗体を加え、2 時間、室温でインキュベートした。洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジンを加え、2 0 分インキュベーションした。プレートを洗浄し、そして結合したペルオキシダーゼを s u b s t r a t e s o l u t i o n (R & D S y s t e m s C a t # D Y 9 9 9) で検出した。呈色反応を 2 M H_2SO_4 で止め、そしてプレートを M u l t i m a x (P r o m e g a) で 4 5 0 n M で読み取った。

10

【 0 0 6 3 】

(実施例 1 : p 3 8 M A P キナーゼシグナル阻害によるサイクリン依存性キナーゼ阻害因子を抑制し角膜内皮細胞の細胞周期の移行)

本実施例では、p 3 8 M A P キナーゼシグナル阻害はサイクリン依存性キナーゼ阻害因子を抑制し角膜内皮細胞の細胞周期を移行させることを示す。

【 0 0 6 4 】

上述の調製例に倣い、シアトルアイバンクから輸入した研究用角膜より培養した角膜内皮細胞を培養して以下の検討に用いた。細胞培養用培地に p 3 8 M A P キナーゼ阻害薬である S B 2 0 3 5 8 0 (1 3 0 6 7 , C a y m a n) を添加して 2 0 日後にサイクリン依存性キナーゼ阻害因子である p 2 7 、 p 2 1 、 p 1 6 の発現をウエスタンブロッティング法にて検討した。p 2 7 、 p 2 1 、 p 1 6 は全て S B 2 0 3 5 8 0 を添加により抑制された (図 1 、 A ; 上から順に p 2 7 、 p 2 1 、 p 1 6 、 G A P D H を示す。左レーンはコントロール、中央は S B 2 0 3 5 8 0 1 0 μ M 、右レーンは S B 2 0 3 5 8 0 3 0 μ M を示す。) 。 p 2 7 、 p 2 1 、 p 1 6 は角膜内皮細胞の細胞増殖を負に制御するサイクリン依存性キナーゼ阻害因子であることが報告されている。

20

【 0 0 6 5 】

また、細胞周期の G 1 / S 期の移行に関わる分子として R b タンパク質のリン酸化、サイクリン D 1 および D 3 の発現をウエスタンブロッティング法にて検討した。結果を図 1 に示す。S B 2 0 3 5 8 0 を添加により 1 2 時間後、2 4 時間後それぞれでこれらの分子の発現が促進された (B ; 上から 2 段ずつ、p - p R b 、サイクリン D 1 、サイクリン D 3 、 G A P D H を示す。各 2 段において上側はコントロール、下側 S B 2 0 3 5 8 0 (1 0 μ M) による刺激を示す。左レーンは 1 2 時間、右レーンは 2 4 時間を示す。) 。また、S B 2 0 3 5 8 0 により p 3 8 M A P キナーゼシグナルの下流分子である A T F 2 のリン酸化が抑制されていることを刺激後 2 0 日後の時点のウエスタンブロッティング法にて確認した (C ; 上から p p 3 8 、 p - A T F 2 、 G A P D H を示す。左レーンからコントロール、中央は S B 2 0 3 5 8 0 1 0 μ M 、右レーンは S B 2 0 3 5 8 0 3 0 μ M を示す。) 。これらのことより p 3 8 M A P キナーゼシグナル阻害はサイクリン依存性キナーゼ阻害因子を抑制し角膜内皮細胞の細胞周期を移行させることが示された。このことは発明者らの知る限り角膜内皮細胞では初めてであるといえる。

30

40

【 0 0 6 6 】

(実施例 2 : p 3 8 M A P キナーゼ阻害薬による角膜内皮細胞の細胞増殖の促進)

本実施例では、p 3 8 M A P キナーゼ阻害薬による角膜内皮細胞の細胞増殖の促進を実証した。

【 0 0 6 7 】

培養したヒト角膜内皮細胞細胞を p 3 8 M A P キナーゼ阻害薬である S B 2 0 3 5 8 0 により刺激して 3 日後に細胞増殖のマーカである K i 6 7 (D a k o 、 M 7 2 4 0) にて本明細書にて上述の実験手法に基づき免疫染色を行った。手法は、上述のとおりである。

50

【0068】

結果を図2に示す。SB203580による刺激により有意に多くの細胞にKi67の発現を認めた(A, B)。また、同様に3日後に細胞増殖のマーカースとしてBrdUの取り込み量を指標にELISA法により検討したところ、SB203580による刺激により有意にBrdUの取り込みが促進された(C)。これらのことからp38MAPキナーゼシグナル阻害は角膜内皮細胞の細胞増殖を促進することが示された。

【0069】

(実施例3：ウサギの部分的角膜内皮障害モデルにおける、p38MAPキナーゼ阻害薬での角膜内皮の細胞増殖の促進)

本実施例では、ウサギの部分的角膜内皮障害モデルを用いてp38MAPキナーゼシグナル阻害が生体において角膜内皮の細胞増殖を促進するかどうかについて検討を行った。

10

【0070】

直径7mmのステンレス製チップを液体窒素に浸漬して冷却した後に、全身麻酔下の日本白色ウサギ(オリエンタルバイオサービスより入手)の角膜中央部に15秒間接触させ、中央部分の角膜内皮細胞を部分的に脱落させた。その後、10mMに調整したSB203580を1回50 μ lを1日4回、2日間点眼投与した。コントロールとして同様に部分的角膜内皮障害を作製した眼に基剤を点眼し、写真を撮影した。また、安楽死させて角膜を摘出してアリザリンレッドS(ナカライテスク、CI-58005)により角膜内皮の創傷範囲を染色し観察した。さらに、細胞増殖のマーカースであるKi67にて角膜組織の免疫染色を行った。免疫染色は上述の実施例等と同様の手法を用いた。

20

【0071】

結果を図3に示す。図3では左パネル写真右側に10mMに調整したSB203580を1回50 μ lを1日4回、2日間点眼投与した後の前眼部写真を示し、右上写真は全体像を示し、右下写真はアリザリン染色による角膜内皮創傷の範囲を示す。左側に、右上写真は全体像を示し、右下写真はアリザリン染色による角膜内皮創傷の範囲を示す。2日目に前眼部写真よりSB203580点眼群で角膜の透明性の回復が早いことを確認した。また、安楽死させて角膜を摘出してアリザリン染色により角膜内皮の創傷範囲を染色したところ、SB203580点眼群はコントロールより縮小していた。また、合計6眼ずつで検討を行ったところ、有意に創傷面積はSB203580点眼群において縮小しており、p38MAPキナーゼシグナル阻害は角膜内皮の創傷治癒を促進することが示された。

30

【0072】

さらに、細胞増殖のマーカースであるKi67にて角膜組織の免疫染色を行った結果を図4に示す。左写真では写真中左側はコントロールを示し、右側はSB203580点眼を行った個体の代表例(10mM)を示す。右グラフでは、Ki67陽性細胞の比率をコントロール(左)およびSB203580刺激(10mM)について示す。SB203580による刺激により有意に多くの細胞にKi67の発現を認めた。これらのことからp38MAPキナーゼシグナル阻害は生体においても角膜内皮細胞の細胞増殖を促進することが示された。

40

【0073】

(実施例4：p38MAPキナーゼ阻害薬による角膜内皮細胞密度低下の抑制)

本実施例では、p38MAPキナーゼシグナル阻害は培養環境で生じる細胞の肥大化による細胞密度低下を抑制することを示す。

【0074】

細胞培養によって細胞の肥大化および密度低下という生体同様の細胞老化様減少が生じる。そこでp38MAPキナーゼシグナル阻害により角膜内皮細胞密度低下という細胞老化様減少への影響を検討した。

【0075】

50

図5にその結果を示す。培養したヒト角膜内皮細胞細胞を p 3 8 M A P キナーゼ阻害薬である S B 2 0 3 5 8 0 を用いて各種濃度で刺激して 2 0 日後の位相差顕微鏡写真を示す（上パネル）。S B 2 0 3 5 8 0 の濃度依存的に培養による細胞密度低下は阻害され、細胞密度が上昇した（下パネル）。

【 0 0 7 6 】

以上から、p 3 8 M A P キナーゼ阻害薬による角膜内皮細胞密度低下の抑制が示された。

【 0 0 7 7 】

（実施例 5 : p 3 8 M A P キナーゼ阻害薬による角膜内皮細胞の機能であるポンプ機能、バリア機能を維持し密度低下を抑制する）

本実施例では、p 3 8 M A P キナーゼシグナル阻害はポンプ機能およびバリア機能を維持して培養による細胞密度低下を阻害するかどうかを確認した。培養したヒト角膜内皮細胞細胞を p 3 8 M A P キナーゼ阻害薬である S B 2 0 3 5 8 0 を用いて各種濃度で刺激して 2 0 日後に、角膜内皮細胞の機能であるポンプ機能、バリア機能についてそれぞれのマーカーとして $N a ^ + / K ^ + - A T P a s e$ および Z O - 1 による免疫染色を行った。

【 0 0 7 8 】

その結果を図 6 に示す。p 3 8 M A P キナーゼシグナル阻害により角膜内皮細胞は、全ての細胞において $N a ^ + / K ^ + - A T P a s e$ および Z O - 1 を発現しており正常な機能を維持し、角膜内皮細胞の肥大および細胞密度の低下を抑制していることが示された。このことは p 3 8 M A P キナーゼシグナル阻害が細胞機能を喪失したり、重層化したりせず、正常な細胞機能を維持しつつ細胞老化を抑制しているものと理解される。

【 0 0 7 9 】

以上から、p 3 8 M A P キナーゼ阻害薬による角膜内皮細胞の機能であるポンプ機能、バリア機能を維持し密度低下を抑制することが示された。

【 0 0 8 0 】

（実施例 6 : p 3 8 M A P キナーゼ阻害薬は角膜内皮細胞によるサイトカイン産生を抑制する）

本実施例では、p 3 8 M A P キナーゼシグナル阻害は角膜内皮細胞が産生するサイトカインを抑制するかどうかを確認した。

【 0 0 8 1 】

上述の実験手法に基づいて、36種類の抗体がプロットされたサイトカイン抗体アレイ（Proteome Profiler、# A R Y 0 0 5、R & D Systems）を用いてヒト角膜内皮培養液中のサイトカインの発現パターンを調べた。

【 0 0 8 2 】

その結果を図 7 に示す。図 7 に示されるように、S B 2 0 3 5 8 0 の有無に関わらず、G R O a , s I C A M - 1 , I L - 6 , I L - 8 , I L - 2 3 , M C P - 1 , M I F , S e r p i n E 1 のシグナルが検出された。S B 2 0 3 5 8 0 を添加した培養上清において s e r p i n E 1 以外のサイトカインは v e h i c l e と比較して減少していた。このことは角膜内皮細胞の培養環境により生じるサイトカイン産生を抑制することを示す。また、特に近年細胞老化により I L - 6 などのサイトカイン産生が増加し、老化に関与することが注目されているため I L - 6 の産生を抑制するかどうかについて P C R 法および E L I S A により検討した。結果を図 8 に示す。コントロールと比べて S B 2 0 3 5 8 0 を添加して培養することで、I L - 6 の産生が低下することを P C R 法（左）、E L I S A （右）により示された。E L I S A 法（I L - 6）および R T - P C R によるヒト角膜内皮細胞の I L - 6 発現量の定量は、上述した実験方法に記載のように行った。

【 0 0 8 3 】

以上から、p 3 8 M A P キナーゼ阻害薬は角膜内皮細胞によるサイトカイン産生を抑制することが示された。

【 0 0 8 4 】

（実施例 6 : p 3 8 M A P キナーゼ阻害薬による細胞死への影響の検討）

10

20

30

40

50

本実施例では、p38MAPキナーゼ阻害薬は角膜内皮の細胞死を抑制するかどうかを検討した。

p38MAPキナーゼシグナル阻害の細胞死への影響を検討するために、培養したヒト角膜内皮細胞を100J/m²の紫外線(UV)にて刺激して細胞死を誘導しSB203580(10μMで用いた。)の効果を検討した。検討は細胞数を計数することで行った。

【0085】

結果を図9に示す。位相差顕微鏡写真(左)はUV照射後12時間である。右は生細胞数のコントロールに対する割合で表記したUV照射後12時間後のグラフである。UV照射により生細胞数は低下するがSB203580により有意に増加する。このことよりp38MAPキナーゼシグナル阻害により角膜内皮細胞の細胞障害が抑制され細胞死が抑制されるものと理解される。

10

【0086】

(実施例7：p38MAPキナーゼ阻害薬によるアポトーシスへの影響の検討)

本実施例では、p38MAPキナーゼシグナル阻害が角膜内皮のUV刺激時のアポトーシスを抑制するかについて検討した。UV照射によるアポトーシスの実行分子であるカスパーゼ3およびPARPの切断による活性化が抑制されるかどうか、およびUV照射によるDNAの二本鎖切断により誘導されるリン酸化ヒストンH2AXの発現が抑制されるかどうかを、本明細書に上述した実験手法に従ってウェスタンブロットで確認した。ウェスタンブロットには、以下の抗体を用いた：抗カスパーゼ3抗体(9662、Cell Signaling)、抗PARP抗体(9542、Cell Signaling)、抗H2AX抗体(05-636、Millipore)、抗GAPDH抗体(2118、Cell Signaling)の条件は以下を用いた：100J/m²。p38MAPキナーゼシグナル阻害薬としては、SB203580を用い、その濃度は、10μMであった。

20

【0087】

結果を図10に示す。左はSB203580によりUV照射によるアポトーシスの実行分子であるカスパーゼ3およびPARPの切断による活性化が抑制されることを示す。右はSB203580によりUV照射によるDNAの二本鎖切断により誘導されるリン酸化ヒストンH2AXの発現が抑制されることを示す。これらのことよりp38MAPキナーゼシグナル阻害は角膜内皮細胞のアポトーシスを抑制することが示された。

30

【0088】

上述の実施例より、p38MAPキナーゼシグナル阻害は角膜内皮細胞の細胞増殖を促進し、細胞老化を抑制し、細胞死を抑制することから、角膜内皮障害の治療および進行予防のターゲットとなることが示された。例えば、本検討で用いたp38MAPキナーゼ阻害薬などの点眼投与、前房内投与、結膜下注射、全身投与などは治療薬としての開発の可能性を有するものである。

【0089】

(実施例8：種々のp38MAPK阻害剤での増殖の促進)

本実施例では、種々のp38MAPK阻害剤での増殖の促進を実証し、本発明の効果が特定のp38MAPK阻害剤に限局されるのではなく、p38MAPK阻害剤全般にみられる効果であることを実証した。本実施例では、いずれも、p38MAPKに特異的に阻害作用を有するとされている試薬を用いて、本発明の効果が、他のキナーゼの阻害に起因するのではなく、p38MAPKの阻害に起因することを実証した。

40

【0090】

(試薬)

使用した薬剤は以下のとおりである。

(1)SB203580(4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-5-(4-ピリジル)-1H-イミダゾール)(Cayman、カタログ番号：13067)：SB203580は、MAPKの特異的(選択的)阻害剤であるこ

50

とが知られている (Biochem Biophys Res Commun. 1999 Oct 5; 263(3): 825-31.)。したがって、SB203580での実験結果は、MAPKの阻害によるものと特定することができる。

(2) Semapimod (N, N'-ビス[3, 5-ビス[1-[2-(アミノイミノメチル)ヒドラゾノ]エチル]フェニル]デカンジアミド) (CNI-1493; Med Koo Biosciences、カタログ番号: 202590): Semapimod は、MAPKの良好な阻害剤であることが知られている (Gastroenterology. 2002 Jan; 122(1): 7-14.; Transplant Proc. 1998 Mar; 30(2): 409-10.; Auton Neurosci. 2000 Dec 20; 85(1-3): 141-7.; Gastroenterology. 2009 Feb; 136(2): 619-29. doi: 10.1053/j.gastro.2008.10.017. Epub 2008 Oct 9.)。 10

(3) BIRB796 (Doramapimod; N-[3-tert-ブチル-1-(4-メチルフェニル)ピラゾール-5-イル]-N'-[4-(2-モルホリノエトキシ)-1-ナフチル]ウレア) (Selleck Chemicals、カタログ番号: S1574): BIRB796は、MAPKの特異的(選択的)阻害剤であることが知られている (Nat Struct Biol. 2002 Apr; 9(4): 268-72.)。したがって、BIRB796での実験結果は、MAPKの阻害によるものと特定することができる。

(4) PH-797804 (3-(3-プロモ-4-(2, 4-ジフルオロベンジル)オキシ)-6-メチル-2-オキソピリジン-1(2H)-イル)-N, 4-ジメチルベンズアミド) (Selleck Chemicals、カタログ番号: S2726): PH-797804はMAPKの特異的(選択的)阻害剤であることが知られている (Bioorg Med Chem Lett. 2011 Jul 1; 21(13): 4066-71. doi: 10.1016/j.bmcl.2011.04.121. Epub 2011 May 11.)。したがって、PH-797804での実験結果は、MAPKの阻害によるものと特定することができる。

(5) VX-702 (1-(カルバモイル-6-(2, 4-ジフルオロフェニル)ピリジン-2-イル)-1-(2, 6-ジフルオロフェニル)尿素) (Selleck Chemicals、カタログ番号: S6005): VX-702は、MAPKの特異的(選択的)阻害剤であることが知られている (Curr Opin Investig Drugs. 2006 Nov; 7(11): 1020-5.)。したがって、VX-702での実験結果は、MAPKの阻害によるものと特定することができる。

(6) LY2228820 (ラルิเมチニブ (ralimetinib); 5-(2-(tert-ブチル)-5-(4-フルオロフェニル)-1H-イミダゾール-4-イル)-3-ネオペンチル-3H-イミダゾ[4, 5-b]ピリジン-2-アミン) (Selleck Chemicals、カタログ番号: S1494): LY2228820は、MAPKの強力な特異的(選択的)阻害剤であることが知られている (Br J Haematol. 2008 May; 141(5): 598-606. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07044.x. Epub 2008 Apr 7.; Mol Cancer Ther. 2014 Feb; 13(2): 364-74. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0513. Epub 2013 Dec 19.; Biol Chem. 2013 Mar 1; 288(9): 6743-53. doi: 10.1074/jbc.M112.425553. Epub 2013 Jan 18.)。したがって、LY2228820での実験結果は、MAPKの阻害によるものと特定することができる。

(7) TAK-715 (2-ベンズアミド-4-[2-エチル-4-(3-メチルフェニル)チアゾール-5-イル]ピリジン) (Selleck Chemicals、カタログ番号: S2928): TAK-715は、MAPKの強力な特異的(選択的)阻害剤であることが知られている (J Med Chem. 2005 Sep 22; 48(19 40

10

20

30

40

50

) : 5966 - 79.)。したがって、TAK-715での実験結果は、MAPKの阻害によるものと特定することができる。

【0091】

(1) SB203580 (4 - (4 - フルオロフェニル) - 2 - (4 - メチルスルフィニルフェニル) - 5 - (4 - ピリジル) - 1H - イミダゾール)

カニクイザルの角膜内皮細胞(日精バイリス)を培養中の培養皿から培地を除去し、事前に37 に温めておいたリン酸緩衝液(ナカライテスク、14249 - 95)を添加し、洗浄を行った。この作業を2回繰り返した。リン酸緩衝液除去後、0.05% Trypsin - EDTA (ナカライテスク、35554 - 64)を添加し、37 (5% CO₂)で10分インキュベートした。その後、DMEM (ナカライテスク、08456 - 94) + 10% FBS (Biowest、S1820 - 500) + 1% ペニシリン/ストレプトマイシン (P/S、ナカライテスク、26252 - 94)で懸濁し、1200 rpmで3分間遠心することで細胞を回収した。

10

96ウェルプレートはFNC coating mix (50 ml (AES - 0407)、ATHENA、カタログ番号: 0407)で処理した。コーティングした96ウェルプレートにサル角膜内皮細胞(ロット: 20120404 - 3L - P8)を1ウェル当たり5000個の割合で播種し、37 (5% CO₂)で30時間培養した。30時間後、培地を除去し、無血清培地: DMEM + 1% P/Sに変更し、18時間培養した。18時間後、DMEM + 10% FBS + 1% P/Sの培地にDMSOで溶解した最終濃度0.3、1、3、10、30、100 μmol/lとなるようにSB203580 (Cayman、カタログ番号: 13067)を添加して24時間培養した。コントロールはDMSOを添加した。さらに24時間後、DMEM + 10% FBS + 1% P/Sの培地にBrdU labeling reagent (Amersham Cell Proliferation Biotrak ELISA System, Version 2, GE Healthbare、カタログ番号: RPN250)を1:1000の割合で添加し、最終濃度0.3、1、3、10、30、100 μmol/lとなるようにSB203580を添加して24時間培養した。コントロールはDMSOを添加した。24時間後、Amersham Cell Proliferation Biotrak ELISA System, Version 2 (GE Healthbare、カタログ番号: RPN250)にてBrdU ELISAを実施し、450 nmの吸光度を測定した。* P < 0.01, Dunnet 検定 n = 5。

20

30

【0092】

(2) Semapimod (N, N' - ビス[3, 5 - ビス[1 - [2 - (アミノイミノメチル)ヒドラゾノ]エチル]フェニル]デカンジアミド)

(1)と同様に、カニクイザルの角膜内皮細胞を培養中の培養皿から培地を除去し、事前に37 に温めておいたリン酸緩衝液を添加し、洗浄を行った。この作業を2回繰り返した。リン酸緩衝液除去後、0.05% Trypsin - EDTA (ナカライテスク、35554 - 64)を添加し、37 (5% CO₂)で10分インキュベートした。その後、DMEM (ナカライテスク、08456 - 94) + 10% FBS (Biowest、S1820 - 500) + 1% ペニシリン/ストレプトマイシン (ナカライテスク、カタログ番号: 26252 - 94)で懸濁し、1200 rpmで3分間遠心することで細胞を回収した。

40

96ウェルプレートはFNC coating mix (50 ml (AES - 0407)、ATHENA、カタログ番号: 0407)で処理した。コーティングした96ウェルプレートにサル角膜内皮細胞(ロット: 20120404 - 3L - P8)を1ウェル当たり5000個の割合で播種し、37 (5% CO₂)で30時間培養した。30時間後、培地を除去し、無血清培地: DMEM + 1% P/Sに変更し、18時間培養した。18時間後、DMEM + 10% FBS + 1% P/Sの培地にDMSOで溶解した最終濃度0.1、0.3、1、3、10 μmol/lとなるようにSemapimod HCl (MedKoo Biosciences、カタログ番号: 202590、ロット番号: SMC

50

20120918)を添加して24時間培養した。コントロールはDMSOを添加した。さらに24時間後、DMEM+10%FBS+1%P/Sの培地にBrdU labeling reagent (Amersham Cell Proliferation Biotrak ELISA System, Version 2, GE Healthbare、カタログ番号:RPN250)を1:1000の割合で添加し、最終濃度0.1、0.3、1、3、10 $\mu\text{mol/l}$ となるようにSemapimod HClを添加して24時間培養した。コントロールはDMSOを添加した。24時間後、Amersham Cell Proliferation Biotrak ELISA System, Version 2 (GE Healthbare、カタログ番号:RPN250)にてBrdU ELISAを実施し、450nmの吸光度を測定した。

10

【0093】

(3) BIRB796 (Doramapimod; N-[3-tert-ブチル-1-(4-メチルフェニル)ピラゾール-5-イル]-N'-[4-(2-モルホリノエトキシ)-1-ナフチル]ウレア)

(1)と同様に、カニクイザルの角膜内皮細胞を培養中の培養皿から培地を除去し、事前に37に温めておいたPBS(-)を添加し、洗浄を行った。この作業を2回繰り返した。PBS(-)除去後、0.05% Trypsin-EDTA (ナカライテスク、35554-64)を添加し、37(5% CO₂)で10分インキュベートした。その後、DMEM (ナカライテスク、08456-94)+10%FBS (Biowest、S1820-500)+1%ペニシリン/ストレプトマイシン (ナカライテスク、カタログ番号:26252-94)で懸濁し、1200rpmで3分間遠心することで細胞を回収した。

20

96ウェルプレートはFNC coating mix (50ml (AES-0407)、ATHENA、カタログ番号:0407)で処理した。コーティングした96ウェルプレートにサル角膜内皮細胞(ロット:20120404-3L-P9)を1ウェル当たり5000個の割合で播種し、37(5% CO₂)で30時間培養した。30時間後、培地を除去し、無血清培地:DMEM+1%P/Sに変更し、18時間培養した。18時間後、DMEM+10%FBS+1%P/Sの培地にDMSOで溶解した最終濃度0.1、0.3、1、3、10、30、100 $\mu\text{mol/l}$ となるようにBIRB796 (Doramapimod) (Selleck Chemicals、カタログ番号:S1574、ロット番号:S157402)を添加して24時間培養した。コントロールはDMSOを添加した。さらに24時間後、DMEM+10%FBS+1%P/Sの培地にBrdU labeling reagent (Amersham Cell Proliferation Biotrak ELISA System, Version 2, GE Healthbare、カタログ番号:RPN250)を1:1000の割合で添加し、最終濃度0.1、0.3、1、3、10、30、100 $\mu\text{mol/l}$ となるようにBIRB796 (Doramapimod)を添加して24時間培養した。コントロールはDMSOを添加した。24時間後、Amersham Cell Proliferation Biotrak ELISA System, Version 2 (GE Healthbare、カタログ番号:RPN250)にてBrdU ELISAを実施し、450nmの吸光度を測定した。

30

40

【0094】

(4) PH-797804 (3-(3-プロモ-4-(2,4-ジフルオロベンジル)オキシ)-6-メチル-2-オキソピリジン-1(2H)-イル)-N,4-ジメチルベンズアミド)

(1)と同様に、カニクイザルの角膜内皮細胞を培養中の培養皿から培地を除去し、事前に37に温めておいたPBS(-)を添加し、洗浄を行った。この作業を2回繰り返した。PBS(-)除去後、0.05% Trypsin-EDTA (ナカライテスク、35554-64)を添加し、37(5% CO₂)で10分インキュベートした。その後、DMEM (ナカライテスク、08456-94)+10%FBS (Biowest

50

、S1820-500) + 1% ペニシリン/ストレプトマイシン (ナカライテスク、カタログ番号: 26252-94) で懸濁し、1200 rpm で3分間遠心することで細胞を回収した。

96ウェルプレートはFNC coating mix (50 ml (AES-0407)、ATHENA、カタログ番号: 0407) で処理した。コーティングした96ウェルプレートにサル角膜内皮細胞 (ロット: 20120404-3L-P9) を1ウェル当たり5000個の割合で播種し、37 (5% CO₂) で30時間培養した。30時間後、培地を除去し、無血清培地: DMEM + 1% P/Sに変更し、18時間培養した。18時間後、DMEM + 10% FBS + 1% P/Sの培地にDMSOで溶解した最終濃度0.1、0.3、1、3、10、30 μmol/lとなるようにPH-797804 (Selleck Chemicals、カタログ番号: S2726、ロット番号: 01) を添加して24時間培養した。コントロールはDMSOを添加した。さらに24時間後、DMEM + 10% FBS + 1% P/Sの培地にBrdU labeling reagent (Amersham Cell Proliferation Biotrak ELISA System, Version 2、GE Healthbare、カタログ番号: RPN250) を1:1000の割合で添加し、最終濃度0.1、0.3、1、3、10、30 μmol/lとなるようにPH-797804を24時間培養した。コントロールはDMSOを添加した。24時間後、Amersham Cell Proliferation Biotrak ELISA System, Version 2 (GE Healthbare、カタログ番号: RPN250) にてBrdU ELISAを実施し、450 nmの吸光度を測定した。

【0095】

(5) VX-702 (1-(カルバモイル-6-(2,4-ジフルオロフェニル)ピリジン-2-イル)-1-(2,6-ジフルオロフェニル)尿素(2-(2,4-ジフルオロフェニル)-6-(1-(2,6-ジフルオロフェニル)ウレイド)ニコチンアミド))

(1)と同様に、カニクイザルの角膜内皮細胞を培養中の培養皿から培地を除去し、事前に37 に温めておいたPBS(-)を添加し、洗浄を行った。この作業を2回繰り返した。PBS(-)除去後、0.05% Trypsin-EDTA (ナカライテスク、35554-64) を添加し、37 (5% CO₂) で10分インキュベートした。その後、DMEM (ナカライテスク、08456-94) + 10% FBS (Biowest、S1820-500) + 1% ペニシリン/ストレプトマイシン (ナカライテスク、カタログ番号: 26252-94) で懸濁し、1200 rpm で3分間遠心することで細胞を回収した。

96ウェルプレートはFNC coating mix (50 ml (AES-0407)、ATHENA、カタログ番号: 0407) で処理した。コーティングした96ウェルプレートにサル角膜内皮細胞 (ロット: 20120404-3L-P9) を1ウェル当たり5000個の割合で播種し、37 (5% CO₂) で30時間培養した。30時間後、培地を除去し、無血清培地: DMEM + 1% P/Sに変更し、18時間培養した。18時間後、DMEM + 10% FBS + 1% P/Sの培地にDMSOで溶解した最終濃度0.1、0.3、1、3、10、30、100 μmol/lとなるようにVX-702 (Selleck Chemicals、カタログ番号: S6005、ロット番号: 02) を添加して24時間培養した。コントロールはDMSOを添加した。さらに24時間後、DMEM + 10% FBS + 1% P/Sの培地にBrdU labeling reagent (Amersham Cell Proliferation Biotrak ELISA System, Version 2、GE Healthbare、カタログ番号: RPN250) を1:1000の割合で添加し、最終濃度0.1、0.3、1、3、10、30、100 μmol/lとなるようにVX-702を添加して24時間培養した。コントロールはDMSOを添加した。24時間後、Amersham Cell Proliferation Biotrak ELISA System, Version 2 (GE Healthbare、カタログ番号: RPN250) にてBrdU ELISA

を実施し、450 nmの吸光度を測定した。

【0096】

(6) LY2228820 (ラルิเมチニブ (ralimetinib); 5-(2-(tert-ブチル)-5-(4-フルオロフェニル)-1H-イミダゾール-4-イル)-3-ネオペンチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-2-アミン)

(1)と同様に、カニクイザルの角膜内皮細胞を培養中の培養皿から培地を除去し、事前に37 に温めておいたPBS(-)を添加し、洗浄を行った。この作業を2回繰り返した。PBS(-)除去後、0.05% Trypsin-EDTA(ナカライテスク、35554-64)を添加し、37 (5% CO₂)で10分インキュベートした。その後、DMEM(ナカライテスク、08456-94)+10%FBS(Biowest、S1820-500)+1%ペニシリン/ストレプトマイシン(ナカライテスク、カタログ番号:26252-94)で懸濁し、1200rpmで3分間遠心することで細胞を回収した。

10

96ウェルプレートはFNC coating mix(50ml(AES-0407)、ATHENA、カタログ番号:0407)で処理した。コーティングした96ウェルプレートにサル角膜内皮細胞(ロット:20120404-3L-P9)を1ウェル当たり5000個の割合で播種し、37 (5% CO₂)で30時間培養した。30時間後、培地を除去し、無血清培地:DMEM+1%P/Sに変更し、18時間培養した。18時間後、DMEM+10%FBS+1%P/Sの培地にDMSOで溶解した最終濃度0.1、0.3、1、3、10、30 μmol/lとなるようにLY2228820(Selleck Chemicals、カタログ番号:S1494、ロット番号:01)を添加して24時間培養した。コントロールはDMSOを添加した。さらに24時間後、DMEM+10%FBS+1%P/Sの培地にBrdU labeling reagent(Amersham Cell Proliferation Biotrak ELISA System, Version 2, GE Healthcare、カタログ番号:RPN250)を1:1000の割合で添加し、最終濃度0.1、0.3、1、3、10、30 μmol/lとなるようにLY2228820を添加して24時間培養した。コントロールはDMSOを添加した。24時間後、Amersham Cell Proliferation Biotrak ELISA System, Version 2(GE Healthcare、カタログ番号:RPN250)にてBrdU ELISAを実施し、450 nmの吸光度を測定した。

20

30

【0097】

(7) TAK-715 (2-ベンズアミド-4-[2-エチル-4-(3-メチルフェニル)チアゾール-5-イル]ピリジン)

(1)と同様に、カニクイザルの角膜内皮細胞を培養中の培養皿から培地を除去し、事前に37 に温めておいたPBS(-)を添加し、洗浄を行った。この作業を2回繰り返した。PBS(-)除去後、0.05% Trypsin-EDTA(ナカライテスク、35554-64)を添加し、37 (5% CO₂)で10分インキュベートした。その後、DMEM(ナカライテスク、08456-94)+10%FBS(Biowest、S1820-500)+1%ペニシリン/ストレプトマイシン(ナカライテスク、カタログ番号:26252-94)で懸濁し、1200rpmで3分間遠心することで細胞を回収した。

40

96ウェルプレートはFNC coating mix(50ml(AES-0407)、ATHENA、カタログ番号:0407)で処理した。コーティングした96ウェルプレートにサル角膜内皮細胞(ロット:20120404-3L-P9)を1ウェル当たり5000個の割合で播種し、37 (5% CO₂)で30時間培養した。30時間後、培地を除去し、無血清培地:DMEM+1%P/Sに変更し、18時間培養した。18時間後、DMEM+10%FBS+1%P/Sの培地にDMSOで溶解した最終濃度0.1、0.3、1、3、10、100 μmol/lとなるようにTAK-715(Selleck Chemicals、カタログ番号:S2928、ロット番号:01)を添加し

50

て24時間培養した。コントロールはDMSOを添加した。さらに24時間後、DMEM + 10% FBS + 1% P/Sの培地にBrdU labeling reagent (Amersham Cell Proliferation Biotrak ELISA System, Version 2, GE Healthbare、カタログ番号: RPN250)を1:1000の割合で添加し、最終濃度0.1、0.3、1、3、10、100 $\mu\text{mol/l}$ となるようにTAK-715を添加して24時間培養した。コントロールはDMSOを添加した。24時間後、Amersham Cell Proliferation Biotrak ELISA System, Version 2 (GE Healthbare、カタログ番号: RPN250)にてBrdU ELISAを実施し、450nmの吸光度を測定した。

10

【0098】

(実施例9:種々の動物種における効果)

本実施例では、サルのみならずヒトでも、種々のp38MAPK阻害剤での増殖の促進がみられることを実証し、本発明の効果が特定の動物種に限局されるのではなく、ヒトを含む広い動物種にみられる効果であることを実証した。本実施例では、いずれも、実施例8で用いた試薬を用いた。

【0099】

(1)サル

カニクイザルの角膜内皮細胞を培養中の培養皿から培地を除去し、事前に37℃に温めておいたPBS(-)を添加し、洗浄を行った。この作業を2回繰り返した。PBS(-)除去後、0.05% Trypsin-EDTA(ナカライテスク、35554-64)を添加し、37℃(5% CO₂)で10分インキュベートした。その後、DMEM(ナカライテスク、08456-94)+10% FBS(Biowest、S1820-500)+1%ペニシリン/ストレプトマイシン(ナカライテスク、カタログ番号:26252-94)で懸濁し、1200rpmで3分間遠心することで細胞を回収した。

20

【0100】

96ウェルプレートはFNC coating mix(50ml(AES-0407)、ATHENA、カタログ番号:0407)で処理した。コーティングした96ウェルプレートにサル角膜内皮細胞(ロット:20120404-3L-P9)を1ウェル当たり3000個の割合で播種し、37℃(5% CO₂)で30時間培養した。30時間後、培地を除去し、無血清培地:DMEM+1% P/Sに変更し、18時間培養した。18時間後、DMEM+10% FBS+1% P/Sの培地にDMSOで溶解した、最終濃度10 $\mu\text{mol/l}$ となるようにSB203580(Cayman、カタログ番号:13067)、最終濃度1 $\mu\text{mol/l}$ となるようにSemapimod HCl(MedKoo Biosciences、カタログ番号:202590、ロット番号:SMC20120918)、最終濃度3 $\mu\text{mol/l}$ となるようにBIRB796(Doramapimod)(Selleck Chemicals、カタログ番号:S1574、ロット番号:S157402)、最終濃度1 $\mu\text{mol/l}$ となるようにPH-797804(Selleck Chemicals、カタログ番号:S2726、ロット番号:01)、最終濃度3 $\mu\text{mol/l}$ となるようにVX-702(Selleck Chemicals、カタログ番号:S6005、ロット番号:02)、最終濃度3 $\mu\text{mol/l}$ となるようにLY2228820(Selleck Chemicals、カタログ番号:S1494、ロット番号:01)、最終濃度3 $\mu\text{mol/l}$ となるようにTAK-715(Selleck Chemicals、カタログ番号:S2928、ロット番号:01)を添加して24時間培養した。コントロールはDMSOを添加した。さらに24時間後、DMEM + 10% FBS + 1% P/Sの培地にBrdU labeling reagent (Amersham Cell Proliferation Biotrak ELISA System, Version 2, GE Healthbare、カタログ番号: RPN250)を1:1000の割合で添加し、最終濃度10 $\mu\text{mol/l}$ SB203580、最終濃度1 $\mu\text{mol/l}$ Semapimod HCl、最終濃度3 $\mu\text{mol/l}$

30

40

50

BIRB796 3 μ M、最終濃度1 μ mol/l PH-797804、最終濃度3 μ mol/l VX-702、最終濃度3 μ mol/l LY2228820、最終濃度3 μ mol/l TAK-715を添加して24時間培養した。コントロールはDMSOを添加した。24時間後、Amersham Cell Proliferation Biotrak ELISA System, Version 2 (GE Healthbare、カタログ番号：RPN250)にてBrdU ELISAを実施し、450nmの吸光度を測定した。

【0101】

(2) ヒト

ヒト角膜内皮細胞を培養中の培養皿から培地を除去し、事前に37℃に温めておいたPBS(-)を添加し、洗浄を行った。この作業を2回繰り返した。PBS(-)除去後、TrypLE Select(x10)(GIBCO、A12177-01)を添加し、37℃(5% CO₂)で10分インキュベートした。その後、Opti-MEM(GIBCO、31985-070)で懸濁し、1200rpmで3分間遠心することで細胞を回収した。

【0102】

96ウェルプレートはFNC coating mix(50ml(AES-0407)、ATHENA、カタログ番号：0407)で処理した。コーティングした96ウェルプレートにヒト角膜内皮細胞(ロット：C1642-P8)を1ウェル当たり3000個の割合でヒト用Condition Medium培地にて播種し、37℃(5% CO₂)で30時間培養した。30時間後、培地を除去し、無血清培地：Opti-MEM+1%P/Sに変更し、18時間培養した。18時間後、ヒト用Condition Medium培地にDMSOで溶解した、最終濃度10 μ mol/lとなるようにSB203580(Cayman、カタログ番号：13067)、最終濃度1 μ mol/lとなるようにSemapimodHCl(MedKoo Biosciences、カタログ番号：202590、ロット番号：SMC20120918)、最終濃度3 μ mol/lとなるようにBIRB796(Doramapimod)(Selleck Chemicals、カタログ番号：S1574、ロット番号：S157402)、最終濃度1 μ mol/lとなるようにPH-797804(Selleck Chemicals、カタログ番号：S2726、ロット番号：01)、最終濃度3 μ mol/lとなるようにVX-702(Selleck Chemicals、カタログ番号：S6005、ロット番号：02)、最終濃度3 μ mol/lとなるようにLY2228820(Selleck Chemicals、カタログ番号：S1494、ロット番号：01)、最終濃度3 μ mol/lとなるようにTAK-715(Selleck Chemicals、カタログ番号：S2928、ロット番号：01)を添加して24時間培養した。コントロールはDMSOを添加した。さらに24時間後、DMEM+10%FBS+1%P/Sの培地にBrdU labeling reagent(Amersham Cell Proliferation Biotrak ELISA System, Version 2, GE Healthbare、カタログ番号：RPN250)を1:1000の割合で添加し、最終濃度10 μ mol/l SB203580、最終濃度1 μ mol/l Semapimod HCl、最終濃度3 μ mol/l BIRB796 3 μ M、最終濃度1 μ mol/l PH-797804、最終濃度3 μ mol/l VX-702、最終濃度3 μ mol/l LY2228820、最終濃度3 μ mol/l TAK-715を添加して24時間培養した。コントロールはDMSOを添加した。24時間後、Amersham Cell Proliferation Biotrak ELISA System, Version 2 (GE Healthbare、カタログ番号：RPN250)にてBrdU ELISAを実施し、450nmの吸光度を測定した。

【0103】

— (実施例10：p38MAPKの活性化はアポトーシスを誘導する)

本実施例では、p38MAPKの活性化がアポトーシスを誘導することを実証した。

10

20

30

40

50

(材料および方法)

培養サル角膜内皮細胞をFNC Coating Mixをコートした12well plateに 1×10^5 個播種し、37℃で5%CO₂の条件下にてコンフルエントに到達するまで約5日間培養した。使用した培地はDulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco, 12320-032)、10% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin (nacalai tesque, 26252-94)であった。

次に、馴化処理としてZ-VAD(OMe)-FMK (和光純薬工業(株), 269-02071)を10μMの濃度で添加し37℃で5%CO₂の条件下にて16時間インキュベートした。なお、Control群、anisomycin群には試薬の溶媒であるジメチルスルホキシド(DMSO) (Dimethyl Sulfoxide, Sterile-filtered; nacalai tesque, 13408-64)を添加した。使用した培地はGibco DMEM, 1% P/Sであった。その後、細胞上澄を除去し、anisomycin群、anisomycin+Z-VAD-FMK群にアニソマイシン(anisomycin; 和光純薬工業(株), 017-16861)を10μMの濃度で添加した。anisomycin+Z-VAD-FMK群には、アニソマイシンと共に10μMのZ-VADを添加した。Z-VAD-FMKを添加しない群に関してはDMSOを添加した。その後、9時間まで培養を行った。位相差顕微鏡下で細胞形態を観察した。9時間後の写真を撮影した。

9時間後、細胞のタンパクを回収し、タンパクの発現量の比較をwestern Blot法により行った。抗体は抗Caspase 3抗体 (cell signaling, 9662S)、抗p38MAPK抗体 (cell signaling, #9212)、抗pp38MAPK抗体 (cell signaling, #4631S)を使用した。また内部標準として抗GAPDH抗体 (MBL, 3H12)を使用した。

【0104】

(結果)

結果を図20に示す。p38の活性化作用を有するアニソマイシンによりp38のリン酸化を認め、さらにカスパーゼ3の切断による活性化を認める。カスパーゼ3の活性化はカスパーゼ阻害剤であるZ-VAD-FMKにより抑制された。以上よりp38の活性化はアポトーシスを引き起こすことが示された。p38MAPKの活性化が角膜内皮のアポトーシスを誘導することを実証されたため、この事実からも、本発明のp38MAPK阻害剤が、角膜内皮の細胞増殖促進または細胞障害抑制を生じさせ、角膜内皮治療薬として用いられることが実証された。

【0105】

(実施例11:サル角膜内皮部分的障害モデルにおけるp38MAPK阻害薬点眼投与試験)

2頭カニクイザル(滋賀医科大学より購入)の両眼に直径7mmのステンレス製の棒を液体窒素で冷却した後に、角膜に接触させて、角膜内皮を約直径7mm脱落させて、部分的障害モデルを作製した。

その後、右眼にはSB203580 (3mM)を50μl、1日4回点眼した。同様に左眼にはコントロールとして基剤であるリン酸緩衝液を点眼した。

このようにしてサルモデルを作製し、以下の実験に用いた。

【0106】

(実施例12:SB203580点眼は霊長類の角膜内皮の増殖を促進する)

本実施例では、SB203580点眼が霊長類の角膜内皮の増殖を促進することを実証した。

【0107】

(材料および方法)

(免疫染色による発現観察)

免疫染色によりSB203580点眼後に細胞増殖に関連するKi-67の発現が亢進

10

20

30

40

50

されていることを確認した。免疫染色の手法は、上記調製例2に準じ、抗体については、Ki-67に対する抗体に変更して実験を行った。

【0108】

・Ki-67に対する抗体：(M7240、Dako)

【0109】

手短には以下のとおりに行った。

組織染色検査のために、培養した細胞を4%ホルムアルデヒドで10分間室温(RT)で固定し、1%ウシ血清アルブミン(BSA)とともに60分間インキュベートした。Ki-67に対する抗体を1:200希釈を用いて実施した。二次抗体には、Alexa Fluor(登録商標)488標識ヤギ抗マウスIgG(Life Technologies)の1:1000希釈を使用した。次いで、細胞の核をDAPI(Cell stain DAPI Solution; Dojindo, Kumamoto, Japan)で染色した。次いで、スライドを蛍光顕微鏡(オールインワン蛍光顕微鏡; KEYENCE, Osaka, JAPAN)で観察した。

10

右眼、左眼それぞれ5視野ずつ写真撮影を行い、Ki67の陽性細胞率について解析した。

【0110】

(結果)

結果を図21および図22に示す。

図21は、SB203580点眼は霊長類の角膜内皮の増殖を促進することを示す写真である。図22は、SB203580点眼は霊長類の角膜内皮の増殖を促進することを示す計数結果である。示されるように、SB203580を点眼した眼ではKi67の陽性細胞を多く認めた。また、図23に示されるように、Ki67の陽性細胞率について解析したところ、SB203580を点眼した眼ではKi67の陽性細胞を有意に多く認めた。2頭のサルともに同じ傾向であることを確認した。これらの結果より、霊長類一般においてもp38MAPK阻害剤は点眼薬などとして投与することで角膜内皮に作用し、角膜内皮細胞の増殖を促進することが示された。

20

【0111】

(実施例13: p38MAPK阻害薬は培養角膜内皮細胞の細胞死を抑制する)

培養サル角膜内皮細胞のアポトーシスに対するp38MAPK阻害薬の効果の検討
培養サル角膜内皮細胞をFNC Coating Mixをコートした12well plateに 1×10^5 個播種し、37℃で5%CO₂の条件下にてコンフルエントに到達するまで約5日間培養した。

30

培地: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, 12320-032), 10% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin (nacalaitesque, 26252-94)

【0112】

次に、各阻害薬を上記の表の濃度で添加し37℃で5%CO₂の条件下にて16時間インキュベートした。なお、Control群、UV群には各試薬の溶媒であるDimethyl Sulfoxide, Sterile-filtered (nacalaitesque, 13408-64) MSOを添加した。培地としては、Gibco DMEM, 1% P/S (ペニシリン/ストレプトマイシン)を使用した。

40

その後、細胞上澄を除去し、細胞にUV (100 J/m²)を照射した。照射後、各阻害剤入りの培地を再度細胞に添加し、9時間培養を行った。位相差顕微鏡下で細胞形態及びアポトーシスを観察した。

【0113】

(結果)

結果を図23に示す。いずれのp38MAPK阻害薬についても示されるように、p38MAPK阻害薬は培養角膜内皮細胞の細胞死を抑制することが示された。

【0114】

50

(実施例14：p38MAPK阻害薬は培養角膜内皮細胞のアポトーシスを抑制する)

九時間培養後の細胞をMEBCYT O - A p o p t o s i s K i t (A n n e x i n V - F I T C K i t) (メーカー：MBL, Code：4700)を用い、37で20分間染色した。その後、95%酢酸エタノールで10分間固定した。固定後、DAP I S o l u t i o n (メーカー：DOJINDO, Code：GA098)で30分間染色し、共焦点顕微鏡で観察した。

【0115】

(結果)

結果を図24に示す。いずれのp38MAPK阻害薬についても示されるように、p38MAPK阻害薬は培養角膜内皮細胞の細胞死を抑制することが示された。

10

【0116】

(実施例15：p38MAPK阻害薬は角膜内皮のアポトーシスを抑制する)

次に、本実施例では、p38MAPK阻害薬は角膜内皮のアポトーシスを抑制することを実証した。

【0117】

(材料および方法)

安楽死後0-24時間のウサギ眼球を実験に用いた。実体顕微鏡下で角膜輪部に沿ってスプリング剪刀を用いて強膜を切除し、水晶体、虹彩を取り除き強角膜片を作製した。強角膜片を4分割し、Control群およびSB203580類似薬添加群とした。角膜の分割後、Control群はDMSOを添加したOptisol-GS(登録商標)(Bausch&Lomb)(Lot.W0006098)、SB203580類似薬添加群では各試薬を添加したOptisol-GS(登録商標)にて2時間のpretreatmentを遮光下にて行った。PBS(-)にて角膜を2回洗浄後、角膜内皮細胞にUV100J/m²を照射し、再び遮光下にて24時間4で保存した。保存液にはControl群にはDMSO、各SB203580類似薬添加群には各試薬を添加したOptisol-GS(登録商標)を用いた。強角膜片をPBS(-)で洗浄し、MEBCYT O - A p o p t o s i s k i t (A n n e x i n V - F I T C k i t) (M B L) (Lot . 0 2 7 F A) を 用 い A n n e x i n V お よ び D A P I の 染 色 し た 。 そ の 後 - 3 0 に 氷 冷 し た 9 5 % エ タ ノ ール に 3 0 分 浸 し 固 定 し た 。 エ タ ノ ール 成 分 を 除 去 す る た め 、 5 分 毎 に P B S (-) を 交 換 し 、 3 回 洗 浄 し た 。 そ の 後 退 色 防 止 剤 を 加 え 封 入 し た 、 共 焦 点 顕 微 鏡 で A n n e x i n V お よ び 核 の 観 察 を 蛍 光 観 察 に よ り 行 っ た 。

20

30

【0118】

次に、上記ウサギ角膜組織におけるAnneexin V陽性細胞率を計測した。*p<0.05。(Dunnett検定)。

【0119】

(結果)

Anneexin Vおよび核を観察した蛍光観察結果を図25に示す。いずれのp38MAPK阻害薬についても示されるように、p38MAPK阻害薬は角膜内皮のアポトーシスを抑制することが示された。また、Anneexin V陽性細胞率を計測した結果を図26に示す。UVを照射したコントロールと比較して全てのp38MAPK阻害剤により有意にAnneexin V陽性細胞率が減少した。以上から、p38MAPK阻害薬は角膜内皮のアポトーシスを抑制する効果を有することが実証された。

40

【0120】

(実施例16：p38MAPキナーゼ阻害薬の他の投与形態の例)

本実施例では、p38MAPキナーゼ阻害薬であるSB203580を用いて、前房内投与、結膜下注射、徐放剤に薬剤を含有させて前房内、結膜下注射などが可能であるか確認する。これらは以下のとおりのプロトコルで行う。

【0121】

前房内投与：以下のように調製した製剤を前房内に常法にて注射する。

投与する薬剤の調製例：

50

生理的食塩水や精製水などに薬剤（例えば、SB203580）を希釈して調製する。

【0122】

結膜下注射：以下のように調製した製剤を前房内に常法にて注射する。

投与する薬剤の調製例：

生理的食塩水や精製水などに薬剤（例えば、SB203580）を希釈して調製する。

【0123】

徐放剤での前房内投与：

ゼラチン、ポリ乳酸などの担体を用いた徐放剤に薬剤（例えば、SB203580）を含浸させて前房内に注入する。

【0124】

徐放剤での結膜下投与：

ゼラチン、ポリ乳酸などの担体を用いた徐放剤に薬剤（例えば、SB203580）を含浸させて結膜下に注入する。

【0125】

これらの投与方法でも、上記実施例と同様に角膜内皮障害の治療および進行予防が達成されることが期待される。

【0126】

（実施例17：製剤例としての点眼薬）

各濃度の被験物質の組成を以下に示す。

【0127】

SB203580（CALBIOCHEM、カタログ番号：559389等から入手可能）またはSB203580塩酸塩（和光純薬（193-15611）等から入手可能）または他のp38MAPキナーゼ阻害薬：0.003g、0.01g、0.03g、0.05gまたは0.1g（脱塩酸体としての用量）

塩化ナトリウム 0.85g

リン酸二水素ナトリウム二水和物 0.1g

ベンザルコニウム塩化物 0.005g

水酸化ナトリウム 適量

精製水 適量

全量100mg（pH7.0）。

【0128】

点眼剤は、基剤で希釈することもできる。

【0129】

基材の組成の代表例は以下のとおりであるが適宜変更することができる。

【0130】

塩化ナトリウム 0.85g

リン酸二水素ナトリウム二水和物 0.1g

ベンザルコニウム塩化物 0.005g

水酸化ナトリウム 適量

精製水 適量

全量100mg（pH7.0）。

【0131】

以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。本件は、日本国出願特願2013-235768に対して優先権を主張するものである。

【産業上の利用可能性】

【0132】

10

20

30

40

50

細胞増殖を必要とする角膜内皮障害の治療または予防薬が提供され、特に、角膜内皮創傷の治療または予防技術が提供された。このような技術に基づく製剤等に関連する技術に関与する産業（製薬等）において利用可能な技術が提供される。

【配列表フリーテキスト】

【 0 1 3 3 】

配列番号 1 : I L 6 - F : C A C A A G C G C C T T C G G T C C A G T T

配列番号 2 : I L 6 - R : T C T G C C A G T G C C T C T T T G C T G C

配列番号 3 : G A P D H - F : G A G T C A A C G G A T T T G G T C G T

配列番号 4 : G A P D H - R : T T G A T T T T G G A G G G A T C T C G

[配列表]

SEQUENCE LISTING

<110> THE DOSHISHA
 <120> Corneal Endothelial Therapeutics by promoting cell growth or
 inhibiting cell disorder
 <130> DU001PCT
 <150> JP 2013-235768
 <151> 2013-11-14 10
 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> IL6-F primer 20
 <400> 1
 cacaagcgcc ttcggtccag tt 22
 <210> 2
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> IL6-R primer 30
 <400> 2
 tctgccagtg cctctttgct gc 22
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> GAPDH-F 40
 <400> 3
 gagtcaacgg attggtcgt 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> GAPDH-R

<400> 4
ttgattttgg agggatctcg

20

10

【 図 8 】

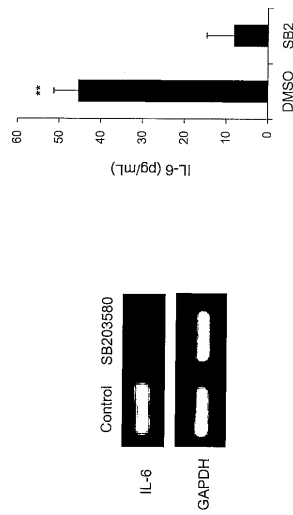


Fig. 8

【 図 1 1 】

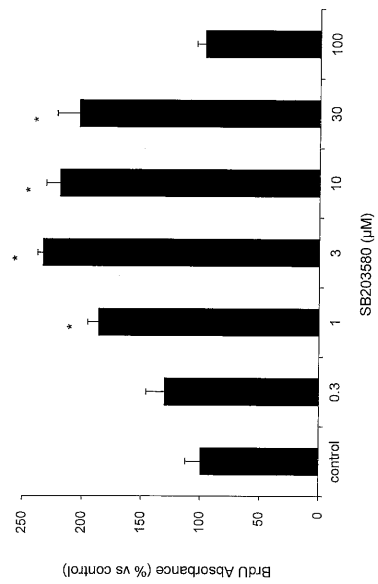


Fig. 11

【 図 1 2 】

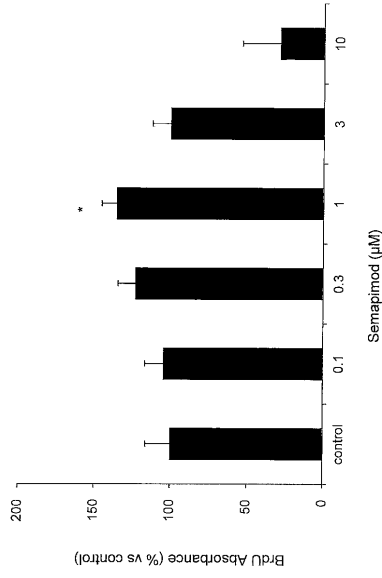


Fig. 12

【 図 1 3 】

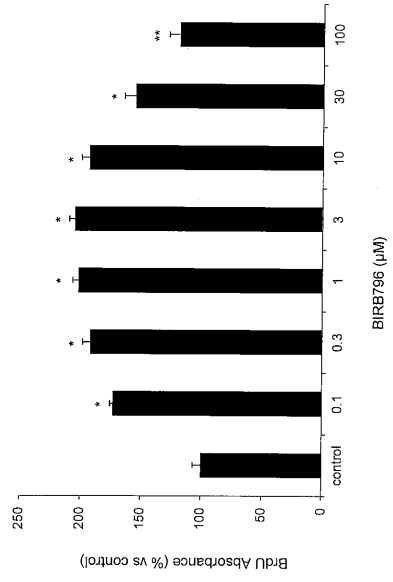


Fig. 13

【 図 1 4 】

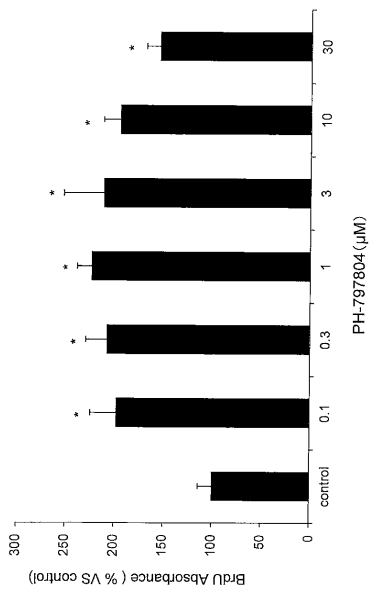


Fig. 14

【 図 1 5 】

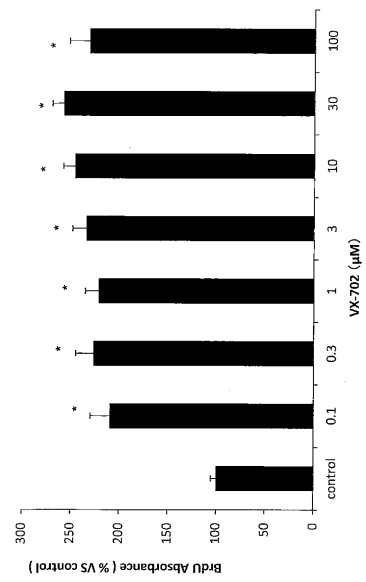


Fig. 15

【 図 1 6 】

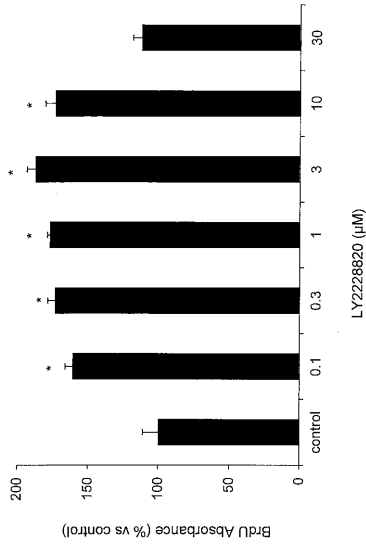


Fig. 16

【 図 1 7 】

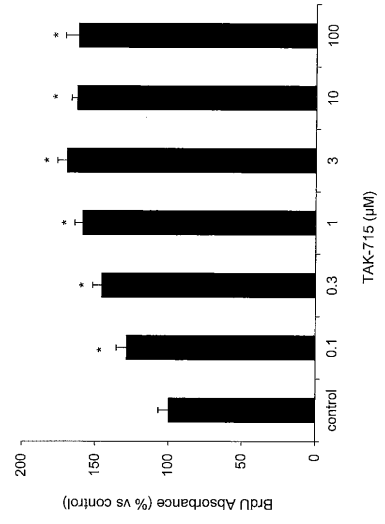


Fig. 17

【 図 1 8 】

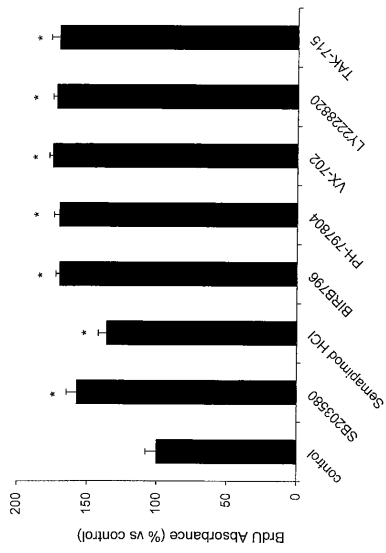


Fig. 18

【 図 1 9 】

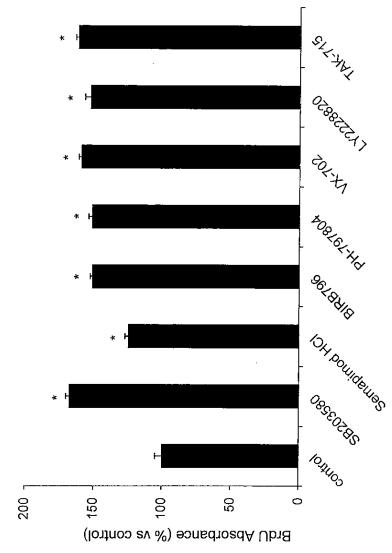


Fig. 19

【 図 2 2 】

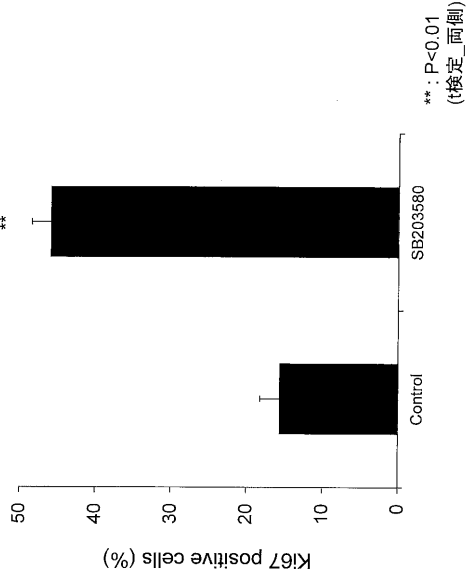


Fig. 22

【 図 2 6 】

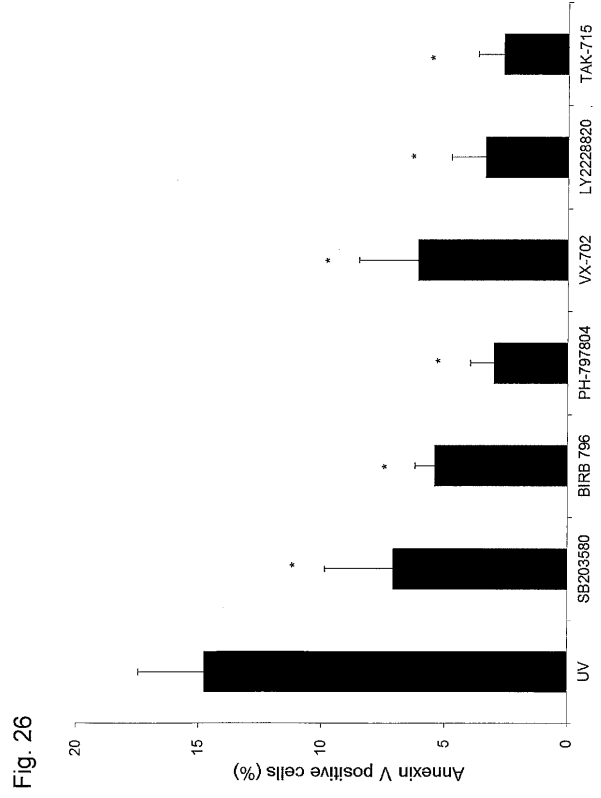


Fig. 26

【 図 1 】

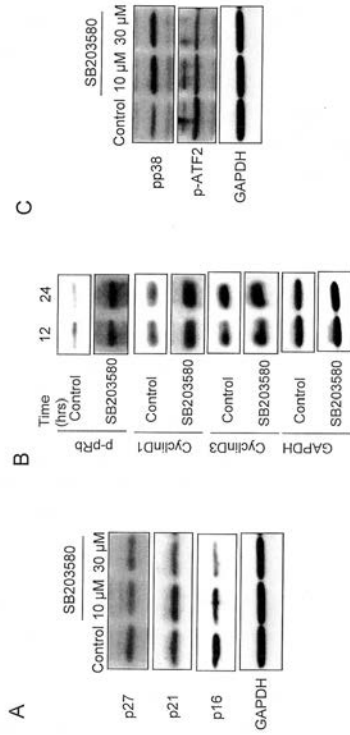


Fig. 1

【 図 2 】

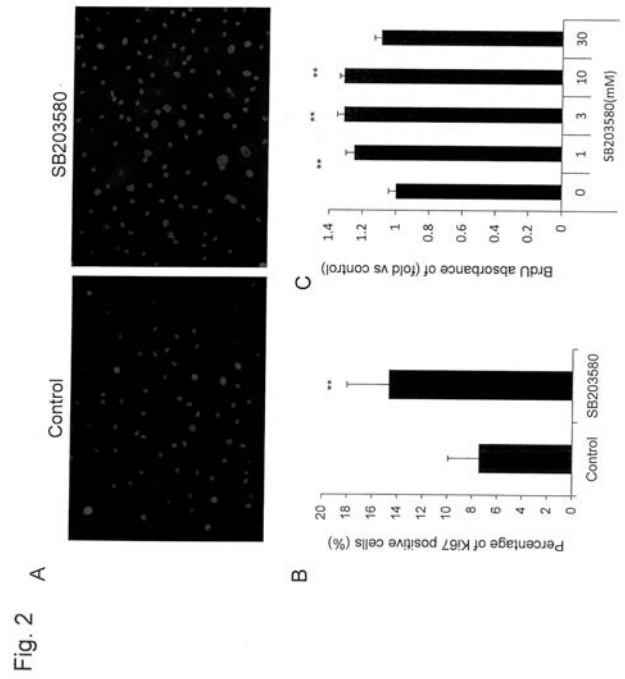
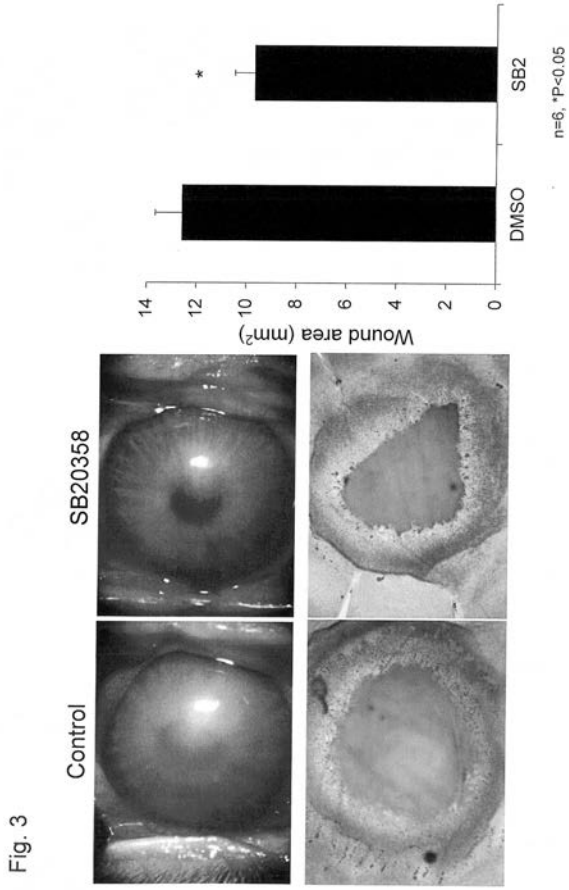
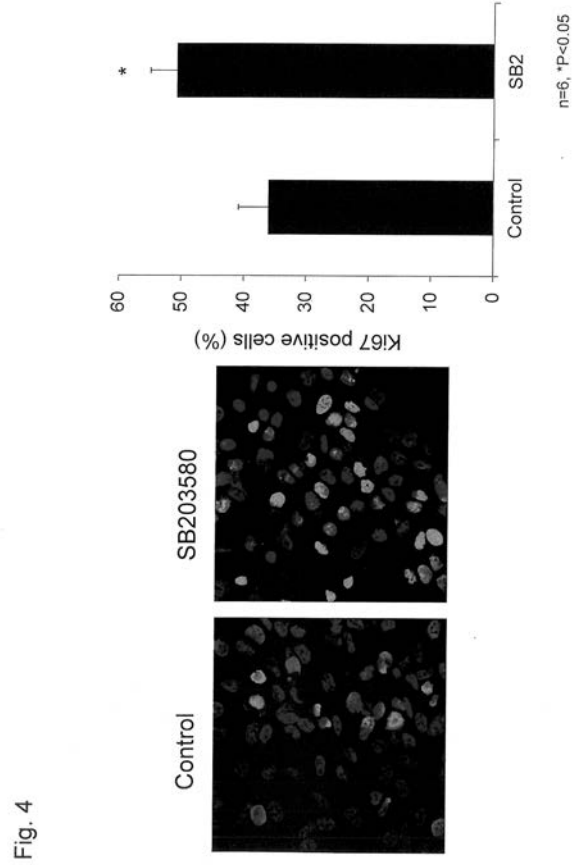


Fig. 2

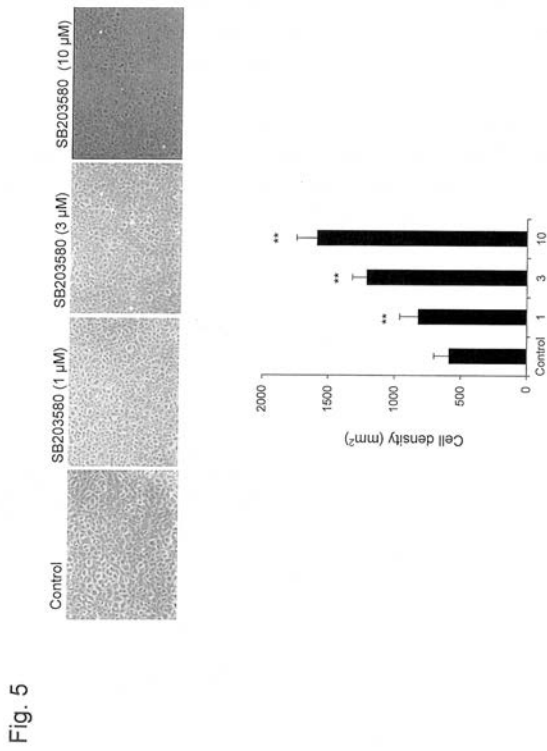
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】

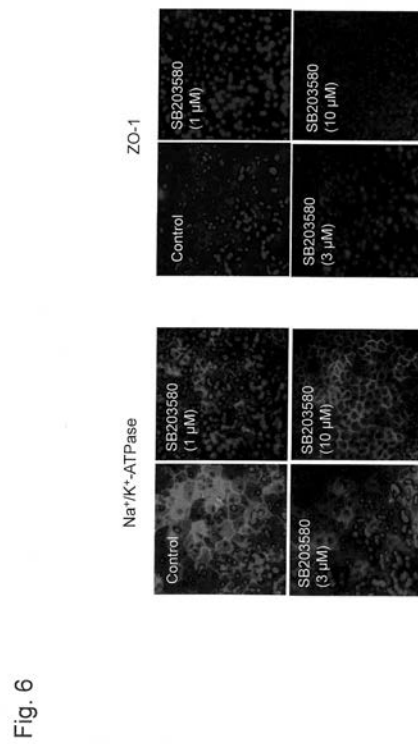


Fig. 5

Fig. 6

【 7 】

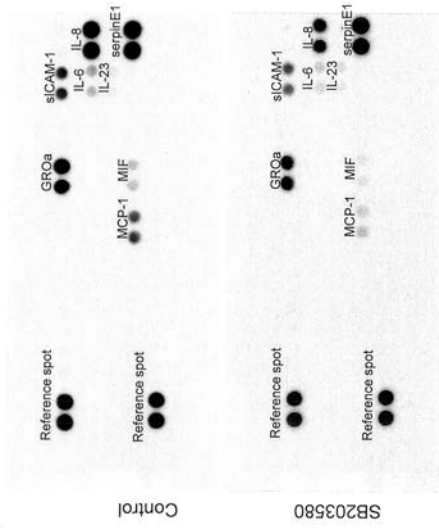


Fig. 7

【 9 】

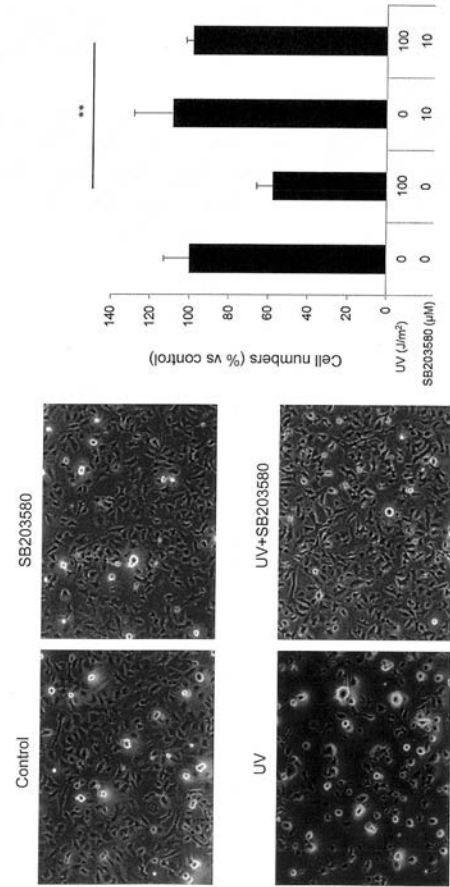


Fig. 9

【 10 】

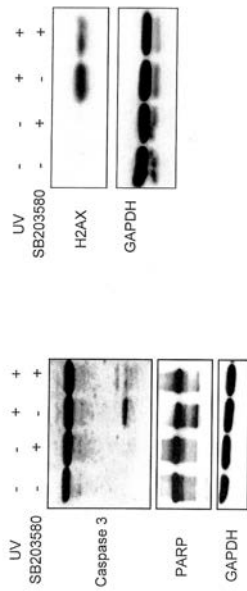


Fig. 10

【 20 】

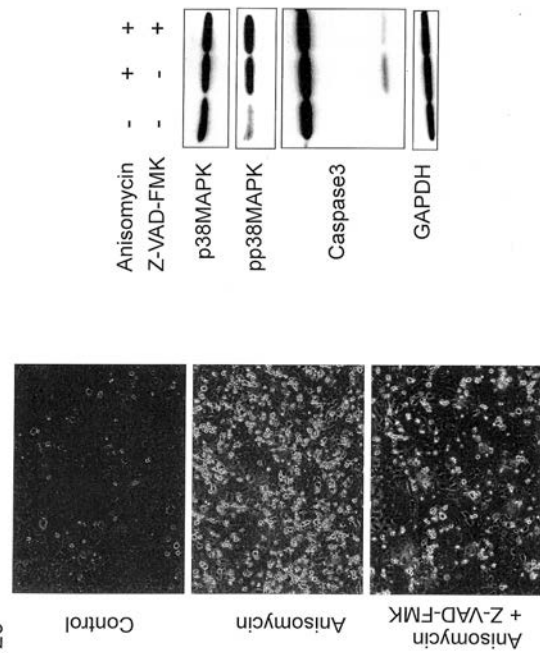


Fig. 20

【 図 2 1 】

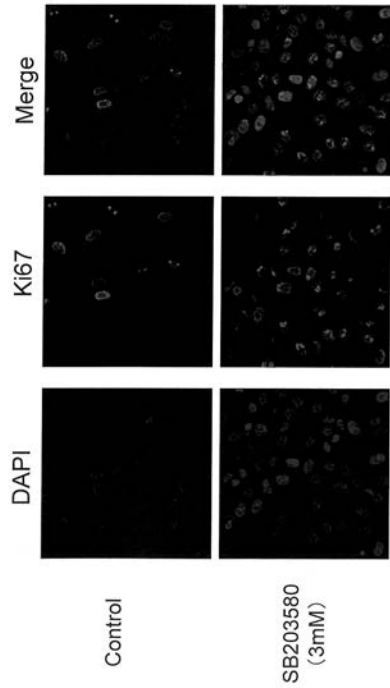


Fig. 21

【 図 2 3 】

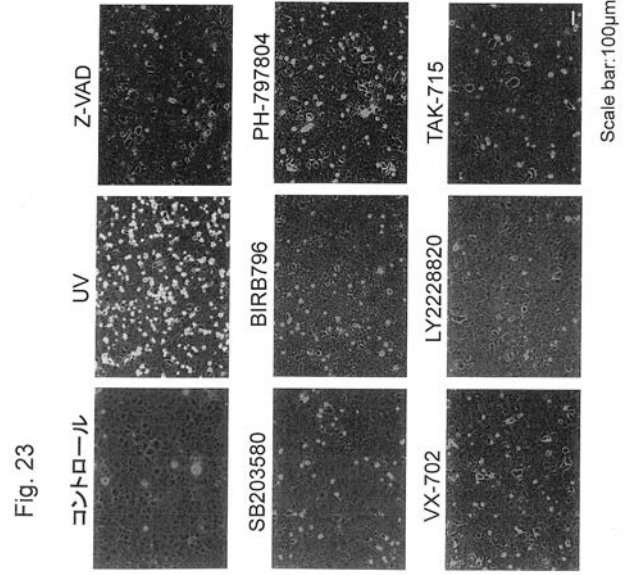


Fig. 23

【 図 2 4 】

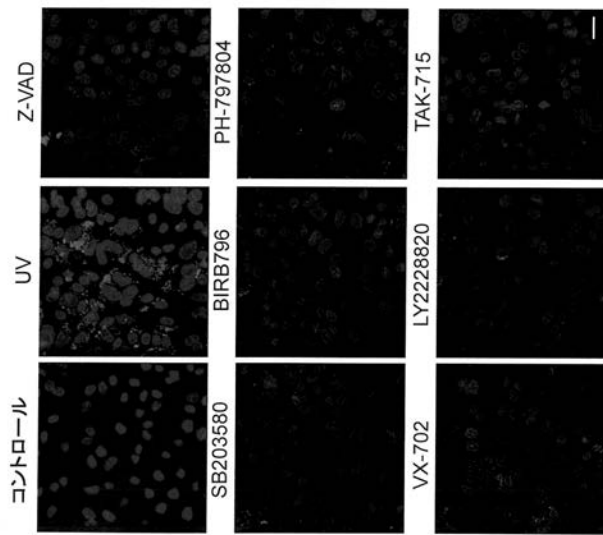


Fig. 24

【 図 2 5 】

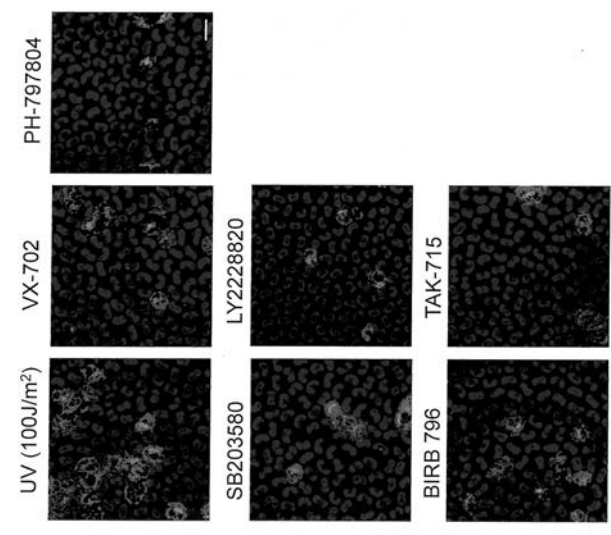


Fig. 25

【手続補正書】

【提出日】平成27年4月20日(2015.4.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

p 3 8 M A P キナーゼ阻害薬を含む、角膜内皮の創傷治癒を必要とする角膜内皮疾患、障害または状態の治療または予防薬であって、該治療または予防薬は、点眼剤である、治療または予防薬。

【請求項2】

前記角膜内皮疾患、障害または状態は、フックス角膜内皮ジストロフィ、角膜移植後の持続する角膜内皮密度減少、外傷、眼科手術、加齢、および角膜内皮炎に関連する障害からなる群より選択される少なくとも1つである、請求項1に記載の治療または予防薬。

【請求項3】

前記 p 3 8 M A P キナーゼ阻害薬は水溶性である、請求項1に記載の治療または予防薬。

【請求項4】

前記 p 3 8 M A P キナーゼ阻害薬は、4 - (4 - フルオロフェニル) - 2 - (4 - ヒドロキシフェニル) - 5 - (4 - ピリジル) - 1 H - イミダゾール (S B - 2 0 2 1 9 0)、trans - 4 - [4 - (4 - フルオロフェニル) - 5 - (2 - メトキシ - 4 - ピリミジン) - 1 H - イミダゾール - 1 - イル] シクロヘキサノール (S B - 2 3 9 0 6 3)、4 - (4 - フルオロフェニル) - 2 - (4 - メチルスルフィニルフェニル) - 5 - (4 - ピリジル) - 1 H - イミダゾール (S B - 2 0 3 5 8 0)、4 - (4 - フルオロフェニル) - 5 - (2 - メトキシピリミジン - 4 - イル) - 1 - (ピペリジン - 4 - イル) イミダゾール (S B - 2 4 2 2 3 5)、4 - (4 - フルオロフェニル) - 2 - (4 - ヒドロキシ - 1 - プチニル) - 1 - (3 - フェニルプロピル) - 5 - (4 - ピリジル) イミダゾール (R W J - 6 7 6 5 7)、4 - (4 - フルオロフェニル) - 1 - (ピペリジン - 4 - イル) - 5 - (4 - ピリジル) イミダゾール (H E P - 6 8 9)、(S) - 2 - (2 - アミノ - 3 - フェニルプロピルアミノ) - 1 - メチル - 5 - (2 - ナフチル) - 4 - (4 - ピリジル) ピリミジン - 6 - オン (A M G - 5 4 8)、2 - クロロ - 4 - (4 - フルオロ - 2 - メチルアニリノ) - 2' - メチルベンゾフェノン (E O - 1 6 0 6)、3 - (4 - クロロフェニル) - 5 - (1 - ヒドロキシアセチルピペリジン - 4 - イル) - 4 - (ピリミジン - 4 - イル) ピラゾール (S D - 0 6)、5 - (2, 6 - ジクロロフェニル) - 2 - (2, 4 - ジフルオロフェニルチオ) ピリミド [3, 4 - b] ピリダジン - 6 - オン (V X - 7 4 5)、4 - アセチルアミノ - N - tert - ブチルベンズアミド (C P I - 1 1 8 9)、N - [3 - tert - ブチル - 1 - (4 - メチルフェニル) ピラゾール - 5 - イル] - N' - [4 - (2 - モルホリノエトキシ) - 1 - ナフチル] ウレア (ドラマピモド (D o r a m a p i m o d (B I R B 7 9 6))、2 - ベンズアミド - 4 - [2 - エチル - 4 - (3 - メチルフェニル) チアゾール - 5 - イル] ピリジン (T A K - 7 1 5)、タルマピモド (T a l m a p i m o d ; S C I O - 4 6 9)、1 - (カルバモイル - 6 - (2, 4 - ジフルオロフェニル) ピリジン - 2 - イル) - 1 - (2, 6 - ジフルオロフェニル) 尿素 (V X - 7 0 2 ; 2 - (2, 4 - ジフルオロフェニル) - 6 - (1 - (2, 6 - ジフルオロフェニル) ウレイド) ニコチンアミド)、ジルマピモド (d i l m a p i m o d ; G S K - 6 8 1 3 2 3)、4 - (5 - (シクロプロピルカルバモイル) - 2 - メチルフェニルアミノ) - 5 - メチル - N - プロピルピロロ (1, 2 - f) (1, 2, 4) トリアジン - 6 - カルボキサミド (P S - 5 4 0 4 4 6)、抗 F G F - 7 抗体 (S C - 8 0 0 3 6)、A V E - 9 9 4 0、[5 - アミノ - 1 - (4 - フルオロフェニル) - 1 H - ピラゾール - 4 - イル] [3 - (3 - アミノ - 2 - ヒドロキシプロボキシ) フェニル] メタノン

(RO-320-1195)、1-(1,3-ジヒドロキシプロプ-2-イル)-4-(4-フルオロフェニル)-5-[2-フェノキシピリミジン-4-イル]イミダゾール(SB-281832)、2-[5-(4-[4-フルオロフェニル]メチル)ピペリジン-1-イル}カルボニル)-6-メトキシ-1-メチル-1H-インドル-3-イル]-N,N'-ジメチル-2-オキソアセトアミド(SCIO-323)、2(5-tert-ブチル-2-m-トリル-2H-ピラゾル-3-イル)-2-ヒドロキシイミド-N-[4-(2-モルホリン-4-イル-エトキシ)-ナフタレン-1-イル]-アセトアミド(KC-706)、N,N'-ビス[3,5-ビス[1-(2-アミジノヒドラゾノ)エチル]フェニル]デカンジアミド、N,N'-ビス[3,5-ビス[1-[2-(アミノイミノメチル)ヒドラゾノ]エチル]フェニル]デカンジアミド(セマピモド(Semapimod))、および3-(3-プロモ-4-(2,4-ジフルオロベンジル)オキシ)-6-メチル-2-オキソピリジン-1(2H)-イル)-N,4-ジメチルベンズアミド(PH-797804)、および5-(2-(tert-ブチル)-5-(4-フルオロフェニル)-1H-イミダゾール-4-イル)-3-ネオペンチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-2-アミン(LY2228820)からなる群より選択される少なくとも1つを含む、請求項1に記載の治療または予防薬。

【請求項5】

前記p38MAPキナーゼ阻害薬は4-[4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-1H-イミダゾール-5-イル]ピリジン)(SB203580)またはその塩を含む、請求項1に記載の治療または予防薬。

【請求項6】

前記p38MAPキナーゼ阻害薬は4-[4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-1H-イミダゾール-5-イル]ピリジン)(SB203580)塩酸塩を含む、請求項1に記載の治療または予防薬。

【請求項7】

(削除)

【請求項8】

(削除)

【請求項9】

p38MAPキナーゼ阻害薬を含む、角膜内皮の創傷を治癒させるための治療または予防薬であって、該治療または予防薬は、点眼剤である、治療または予防薬。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2014/080831
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K45/00(2006.01)i, A61K31/4439(2006.01)i, A61P27/02(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i 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) A61K45/00, A61K31/4439, A61P27/02, A61P43/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), WPI		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2013/100208 A1 (Kyoto Prefectural Public University Corp. et al.), 04 July 2013 (04.07.2013), particularly, claims 1, 10 to 15 & EP 2799537 A1	7 1-6
X Y	SHIVANNA M. et al, Barrier dysfunction of the corneal endothelium in response to TNF-alpha: role of p38 MAP kinase., IOVS, 2010, Vol. 51, No. 3, p. 1575-1582 particularly, abstract, page 1575, right column, 3rd paragraph, page 1577, right column, lines 17 to 21	7 1-6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 application or patent 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 09 January 2015 (09.01.15)		Date of mailing of the international search report 10 February 2015 (10.02.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/080831

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2006/092894 A1 (Shiro AMANO et al.), 08 September 2006 (08.09.2006), particularly, paragraphs [0008], [0010], [0011] & JP 2006-187281 A & US 2009/0232772 A1 & EP 1835023 A1	1-6
X A	JP 2009-542816 A (Glaxo Group Ltd.), 03 December 2009 (03.12.2009), & US 2010/0144755 A1 & EP 2034838 A1 & WO 2007/147103 A2	7 1-6
P,X P,A	RAJASHEKHAR G. et al, Role of MMP-9 in the breakdown of barrier integrity of the corneal endothelium in response to TNF- α ., Experimental Eye Research ,Mar.2014, Vol.122,p.77-85	7 1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/080831

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 8
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 8 pertains to a method for treatment of the human body or animal body by surgery or therapy and thus relates to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 8 0 8 3 1									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K45/00(2006.01)i, A61K31/4439(2006.01)i, A61P27/02(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i											
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. A61K45/00, A61K31/4439, A61P27/02, A61P43/00											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2015年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2015年	日本国実用新案登録公報	1996-2015年	日本国登録実用新案公報	1994-2015年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2015年										
日本国実用新案登録公報	1996-2015年										
日本国登録実用新案公報	1994-2015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) Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), WPI											
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 請求項の番号									
X Y	WO 2013/100208 A1 (京都府公立大学法人他) 2013.07.04 特に特許請求の範囲請求項1、10-15 & EP 2799537 A1	7 1-6									
X Y	SHIVANNA M. et al, Barrier dysfunction of the corneal endothelium in response to TNF-alpha: role of p38 MAP kinase., IOVS, 2010, Vol. 51, No. 3, p. 1575-1582 特に要約、第1575頁右欄第3 パラグラフ、第1577頁右欄第17~21行	7 1-6									
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 09.01.2015		国際調査報告の発送日 10.02.2015									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 六笠 紀子 電話番号 03-3581-1101 内線 3439	4U 9735								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2014/080831
C (続き) . 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 請求項の番号
Y	WO 2006/092894 A1 (天野史郎他) 2006.09.08 特に段落 [0008]、[0010]、[0011] & JP 2006-187281 A & US 2009/0232772 A1 & EP 1835023 A1	1-6
X A	JP 2009-542816 A (グラクソ グループ リミテッド) 2009.12.03, & US 2010/0144755 A1 & EP 2034838 A1 & WO 2007/147103 A2	7 1-6
P,X P,A	RAJASHEKHAR G. et al, Role of MMP-9 in the breakdown of barrier integrity of the corneal endothelium in response to TNF- α ., Experimental Eye Research , Mar. 2014, Vol. 122, p. 77-85	7 1-6

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 8 0 8 3 1

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 8 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、請求項 8 は手術又は治療による人体又は動物の体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査することを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K 31/437 (2006.01)	A 6 1 K	31/437		
A 6 1 K 31/15 (2006.01)	A 6 1 K	31/15		
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02	Z N A	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72) 発明者 奥村 直毅
京都府京田辺市多々羅都谷 1 - 3 同志社大学内

(72) 発明者 木下 茂
大阪府大阪市阿倍野区北畠 1 - 3 - 1 1

F ターム (参考) 4C084 AA17 NA14 ZA332 ZC202
4C086 AA01 AA02 BC17 BC19 BC38 BC73 BC82 CB05 GA07 GA08
GA10 GA12 MA01 MA04 NA14 ZA33 ZC20
4C206 AA01 AA02 HA05 MA01 MA04 MA14 MA17 NA14 ZA33 ZC20

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。