

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2012年3月1日(01.03.2012)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2012/026614 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/00 (2006.01)	A61P 17/02 (2006.01)
A61K 31/407 (2006.01)	A61P 19/02 (2006.01)
A61K 31/7004 (2006.01)	A61P 27/02 (2006.01)
A61P 1/02 (2006.01)	A61P 29/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)	A61P 35/04 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)	A61P 43/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2011/069677

(22) 国際出願日: 2011年8月24日(24.08.2011)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2010-187078 2010年8月24日(24.08.2010) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人宮崎大学(UNIVERSITY OF MIYAZAKI) [JP/JP]; 〒8892192 宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地 Miyazaki (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 鶴田 敏博 (TSURUDA, Toshihiro) [JP/JP]; 〒8891692 宮崎県宮

崎市清武町木原5200 国立大学法人宮崎大学医学部内 Miyazaki (JP). 北村 和雄(KITAMURA, Kazuo) [JP/JP]; 〒8891692 宮崎県宮崎市清武町木原5200 国立大学法人宮崎大学医学部内 Miyazaki (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号 神谷町MTビル19階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

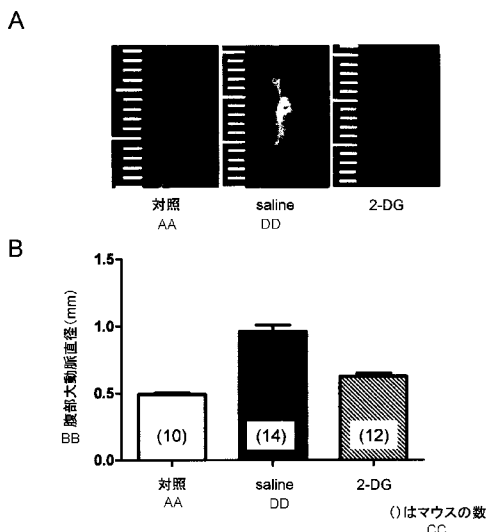
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア

[続葉有]

(54) Title: COMPOSITION SUPPRESSING MATRIX-METALLOPROTEINASE ACTIVITY

(54) 発明の名称: マトリックスメタロプロテアーゼ活性抑制組成物

図3



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a composition that has the effect of suppressing matrix-metalloproteinase activity. Specifically, the present invention pertains to a composition which suppresses matrix-metalloproteinase activity and contains, as an active ingredient, a glucose-metabolism inhibitor.

(57) 要約: 本発明は、マトリックスメタロプロテアーゼ活性抑制作用を有する組成物を提供することを目的とし、具体的には、解糖系糖代謝阻害剤を有効成分として含有するマトリックスメタロプロテアーゼ活性抑制組成物に関する。

AA Control  
 BB Abdominal aortic diameter (mm)  
 CC Figure in () is number of mice  
 DD Saline

WO 2012/026614 A1

(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ 添付公開書類:  
(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), OAPI  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). — 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

## 明 細 書

## 発明の名称

マトリックスメタロプロテアーゼ活性抑制組成物

## 技術分野

本発明は、例えばマトリックスメタロプロテアーゼ活性抑制作用を有する組成物に関する。

## 背景技術

腹部大動脈瘤は、動脈硬化を基盤とし、腹部大動脈が限局性に拡張する疾患である。腹部大動脈瘤は、60歳以上の男性に比較的多く、無症状のうちに発症及び進展し、破裂に至る。腹部大動脈瘤において、高血圧や喫煙が瘤拡大の促進因子と考えられているものの、詳細な発症及び進展機序は明らかではない。これまでのところ、ヒト腹部大動脈瘤壁では平滑筋細胞からなる中膜層が菲薄化ないしは消失していることが病理学的な特徴とされていることから、ヒト腹部大動脈瘤の進展は、平滑筋細胞数が減少することにより血管構築が保てなくなり次第に瘤が拡大すると考えられている。

従来において、腹部大動脈瘤に対して有効な薬物療法がないため、処置としては厳密な血圧コントロール下、定期的に超音波やCT検査で瘤径を測定し、増大傾向である場合には破裂死を予防すべく手術適応とする。しかしながら、腹部大動脈瘤の罹患年齢は高く、また他の疾患を合併する場合もあり、術後の合併症や日常生活の活動性の低下を考慮しなければならない。

このように、腹部大動脈瘤に対して、瘤径の拡大抑制を目指した内科的治療法の開発が望まれている。

一方、解糖系糖代謝阻害剤は、平滑筋細胞の増殖抑制作用を有することが知られている(特許文献1)。例えば、特許文献1は、2-デオキシグルコース等の解糖系糖代謝阻害剤が例えば、平滑筋細胞の異常増殖及び/又は移動を伴う創傷を含む創傷の治癒物質として有用であることを開示する。しかしながら、特許文献1に

は、解糖系糖代謝阻害剤が腹部大動脈瘤の進展に対して抑制作用を有することは開示されていない。

先行技術文献

特許文献

特許文献 1 特表平 08-511041 号公報

発明の概要

上記のように、従来において腹部大動脈瘤に対して有効な薬物療法がなく、瘤径の拡大抑制を目指した内科的治療法の開発が望まれている。

そこで、本発明は、上述した実情に鑑み、腹部大動脈瘤の進展の機序を探索し、且つ当該機序の抑制因子を同定すると共に、腹部大動脈瘤等の疾患の進展に対して抑制作用を有する治療剤を提供することを目的とする。

上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、ヒト腹部大動脈瘤壁で糖代謝が亢進しており、また瘤壁における糖代謝活性は、糖を細胞内へ取り込むのに必要なグルコーストランスポーターのタンパク質発現やマトリックス分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ(又はマトリックスメタロプロテイナーゼとも称される：以下、「MMP」と称する)-9 活性と関連していることを見出した。さらに、グルコーストランスポータータンパク質発現が最も強く亢進している細胞は、瘤壁に浸潤したマクロファージであることを見出した。

そこで、糖代謝又はグルコーストランスポーターの発現・機能を抑制することが可能な解糖系糖代謝阻害剤を培養マクロファージ細胞に投与したところ、MMP-9 活性が著明に抑制し、また解糖系糖代謝阻害剤の 1 つである 2-デオキシグルコースをマウス動脈瘤モデルに投与したところ、瘤形成が有意に抑制されることを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明は、以下を包含する。

- (1) 解糖系糖代謝阻害剤を有効成分として含有する MMP 活性抑制組成物。
- (2) 解糖系糖代謝阻害剤が 2-デオキシグルコース及びサイトカラシン並びにこれらの誘導体及び塩から成る群より選択される、(1) 記載の MMP 活性抑制組成物。

(3) MMP がマクロファージにおける MMP である、(1) 又は (2) 記載の MMP 活性抑制組成物。

(4) MMP が MMP-9 である、(1) ~ (3) のいずれか 1 記載の MMP 活性抑制組成物。

(5) (1) ~ (4) のいずれか 1 記載の MMP 活性抑制組成物を有効成分として含有する MMP 活性化関連疾患治療剤。

(6) MMP 活性化関連疾患が動脈硬化又は腹部大動脈瘤である、(5) 記載の MMP 活性化関連疾患治療剤。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2010-187078 号の明細書及び/又は図面に記載される内容を包含する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、(A) ヒト腹部大動脈瘤壁におけるグルコーストランスポーター (GLUT-3) のタンパク質発現と MMP-9 活性との相関関係を示すグラフ及び (B) ヒト腹部大動脈瘤壁における GLUT-3 の免疫活性がマクロファージに局在することを示す写真である。

図 2 は、(A) サイトカラシン、(B) フローレチン (Phloretin) 及び (C) 2-デオキシグルコースの投与による培養マクロファージにおける MMP-9 活性の減少を示すグラフ、並びに (D) 2-デオキシグルコースの投与によるヒト腹部大動脈瘤壁の培養における MMP-9 活性の減少を示すグラフである。

図 3 は、マウス動脈瘤モデル (塩化カルシウム塗布誘発性動脈瘤モデルマウス) における 2-デオキシグルコース投与による瘤形成抑制を示す (A) 写真及び (B) グラフである。

図 4 は、マウス動脈瘤モデル (アンジオテンシン II 誘発性アポリポプロテイン E 遺伝子改変マウス) における 2-デオキシグルコース投与による瘤形成抑制を示すグラフである。

図 5 は、2-デオキシグルコースの投与による培養マクロファージにおける催動脈硬化並びに動脈瘤関連遺伝子の発現の減少を示すグラフである。

図6は、2-デオキシグルコースの投与による培養マクロファージにおけるSIRT1遺伝子の発現の増加を示すグラフである。

発明を実施するための形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に係るMMP活性抑制組成物は、解糖系糖代謝阻害剤(インヒビター)を有効成分として含有するものである。例えば、本発明に係るMMP活性抑制組成物をMMP活性化関連疾患治療剤としてヒト等の動物に投与することによりMMP活性を抑制し、MMP活性化関連疾患を治療、予防又は緩和することができる。

MMPとしては、例えばマクロファージにおけるMMPが挙げられる。具体的なMMPとしては、例えばMMP-9が挙げられる。その他のMMPとしては、例えば血管壁を構成する内皮細胞、平滑筋細胞や線維芽細胞由来のMMP-1、MMP-2、MMP-9等が挙げられる。

ここで、「解糖系糖代謝阻害剤」とは、解糖系における糖代謝経路を阻害する物質を意味する。解糖系糖代謝阻害剤としては、例えばグルコーストランスポーター阻害剤である2-デオキシグルコース、サイトカラシン及びフローレチン並びにこれらの誘導体及び薬理上許容される塩が挙げられる。解糖系糖代謝阻害剤は、市販品であってよく、あるいは従来化学合成法等により製造されたものを使用することができる。

また、「MMP活性化」とは、MMPの前駆体酵素(プロエンザイムと呼ばれ、活性がない状態)のペプチドの一部が切断され、活性(例えば、コラーゲン分解活性)が発現することを意味する。

「MMP活性化関連疾患」とは、MMP活性化を病因の一つとする疾患を意味し、例えば動脈硬化及び腹部大動脈瘤等の大動脈瘤疾患が挙げられる。その他のMMP活性化関連疾患としては、例えばアテローム性動脈硬化症性斑離断、心筋梗塞、心不全、再狭窄、発作、歯周病、組織潰瘍、創傷、皮膚病、癌転移、腫瘍脈管形成、年齢による黄斑変性、繊維症、慢性関節リウマチ、変形性関節症、移動性炎症細胞に依る炎症性疾患、骨関節炎、リウマチ性関節炎、敗血症性関節炎、角膜潰瘍、蛋白尿、栄養障害型表皮水泡症、炎症性応答に導く症状、MMP活性による骨

減少症、顎関節症、神経系の脱髄疾患、腫瘍転移又は外傷性関節傷害に続く退行性軟骨損失、粥状硬化性斑破断に由来する冠状動脈血栓症、受胎制御等(日本国特許第 3277170 号及び第 3354941 号)が挙げられる。

さらに、「MMP 活性化関連疾患治療」とは、MMP 活性化関連疾患の症状を治療、予防又は緩和することを意味する。

本発明に係る MMP 活性抑制組成物において解糖系糖代謝阻害剤と組み合わせることができる医薬用成分としては、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤及び香料が挙げられる。

賦形剤としては、例えば、デンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類等が挙げられる。

結合剤としては、例えば、結晶セルロース、結晶セルロース・カルメロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート、カルメロースナトリウム、エチルセルロース、カルボキシメチルエチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、コムギデンプン、コメデンプン、トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、デキストリン、アルファ化デンプン、部分アルファ化デンプン、ヒドロキシプロピルスターチ、プルラン、ポリビニルピロリドン、アミノアルキルメタクリレートコポリマーE、アミノアルキルメタクリレートコポリマーRS、メタクリル酸コポリマーL、メタクリル酸コポリマー、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルアルコール、アラビアゴム、アラビアゴム末、寒天、ゼラチン、白色セラック、トラガント、精製白糖及びマクロゴールが挙げられる。

崩壊剤としては、例えば、結晶セルロース、メチルセルロース、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルメロース、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、クロスカルメロースナトリウム、コムギデンプン、コメデンプン、トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、部分アルファ化デンプン、ヒドロキシプロピルスターチ、カルボキシメチルスターチナトリウム及びトラガントが挙げられる。

界面活性剤としては、例えば、大豆レシチン、シヨ糖脂肪酸エステル、ステアリン酸ポリオキシル、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール、セスキオレイン酸ソルビタン、トリオレイン酸ソルビタン、モノステアリン酸ソルビタン、モノパルミチン酸ソルビタン、モノラウリン酸ソルビタン、ポリソルベート、モノステアリン酸グリセリン、ラウリル硫酸ナトリウム及びラウロマクロゴールが挙げられる。

滑沢剤としては、例えば、コムギデンプン、コメデンプン、トウモロコシデンプン、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、含水二酸化ケイ素、軽質無水ケイ酸、合成ケイ酸アルミニウム、乾燥水酸化アルミニウムゲル、タルク、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、リン酸水素カルシウム、無水リン酸水素カルシウム、シヨ糖脂肪酸エステル、ロウ類、水素添加植物油及びポリエチレングリコールが挙げられる。

流動性促進剤としては、例えば、含水二酸化ケイ素、軽質無水ケイ酸、乾燥水酸化アルミニウムゲル、合成ケイ酸アルミニウム及びケイ酸マグネシウムが挙げられる。

本発明に係る MMP 活性抑制組成物の剤形としては、特に限定されるものではないが、例えば、錠剤、粉剤、乳剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、液剤、シロップ剤、懸濁剤、エリキシル剤等の経口剤、又は注射剤、点滴剤、坐剤、吸入剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤、貼付剤、スプレー剤、軟膏剤等の非経口剤が挙げられる。

一方、本発明に係る MMP 活性抑制組成物における解糖系糖代謝阻害剤の含有量は、投与目的、投与経路、剤形等によって適宜変更し得るが、例えば 0.01mg 以上、好ましくは 0.1mg 以上であればよい。

本発明に係る MMP 活性抑制組成物の投与回数、投与量及び投与期間は、特に限定されるものではなく、例えば、患者の年齢、性別、体重又は症状の程度、あるいは投与方法などに応じて適宜決定することができる。投与回数は、例えば 1 日 1 回～3 回、好ましくは 1 日 1 回である。本発明に係る MMP 活性抑制組成物に含まれる有効成分の投与量は、例えば 1 日当たり 0.001mg/kg 体重以上、好ましくは 0.01mg/kg 体重以上であればよい。また、投与期間は、例えば 1～7 日間、好まし



くは1～2日間である。

本発明に係る MMP 活性抑制組成物の投与経路は、剤形や使用目的に応じて、適宜決定することができるが、例えば、経口投与、非経口投与(髄腔内投与、腹腔内投与、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、直腸内投与、鼻内投与、舌下投与等)等が挙げられる。

本発明に係る MMP 活性抑制組成物の MMP 活性抑制効果の評価としては、例えば *in vitro* において、MMP を発現する細胞(例えば、MMP-9 を発現するマクロファージ)を本発明に係る MMP 活性抑制組成物存在下及び不在下で培養し、当該培養物についてゼラチンザイモグラフィを用いて MMP 活性を評価する方法が挙げられる。本発明に係る MMP 活性抑制組成物不在下で培養した細胞(陰性対照)と比較して、本発明に係る MMP 活性抑制組成物存在下で培養した細胞において MMP 活性が有意に抑制された場合には、本発明に係る MMP 活性抑制組成物が良好に MMP 活性を抑制すると判断することができる。

一方、MMP 活性化関連疾患治療剤としての本発明に係る MMP 活性抑制組成物の薬理評価方法としては、例えば *in vitro* における MMP 活性化関連疾患に関連した細胞を使用した方法又は *in vivo* における MMP 活性化関連疾患モデル動物を使用した方法が挙げられる。例えば、腹部大動脈瘤動物モデルとして塩化カルシウム塗布誘発性又はアンジオテンシン II 誘発性アポリポプロテイン E 遺伝子改変マウスを使用することができる。さらにアポリポプロテイン E 遺伝子改変マウスを高脂肪食で飼育した動脈硬化モデルないしは動脈硬化巣(プラーク)不安定化モデルをも用いることができる。本発明に係る MMP 活性抑制組成物をマウス動脈瘤モデルに腹腔内投与する。次いで、本発明に係る MMP 活性抑制組成物を投与していないマウス動脈瘤モデル(陰性対照)と比較して、瘤形成が有意に抑制された場合には、本発明に係る MMP 活性抑制組成物が腹部大動脈瘤に有効であると判断することができる。動脈硬化モデル、プラーク不安定化モデルでは、オイルレッド O 染色にて動脈硬化範囲の減少ならびに組織切片にてプラーク被膜の菲薄化の軽減、MMP-9 活性の低下で治療効果を確認することができる。

また、以上に説明した本発明に係る MMP 活性抑制組成物に準じて、本発明は、ヒトや他の哺乳動物等の動物において MMP 活性を抑制するための医薬、又は MMP

活性化関連疾患を治療、予防若しくは緩和するための医薬の製造における解糖系糖代謝阻害剤の使用に関する。ここで、医薬における解糖系糖代謝阻害剤の含有量は、上述の本発明に係る MMP 活性抑制組成物における解糖系糖代謝阻害剤の含有量に準じたものとすることができる。

さらに、本発明は、MMP 活性の抑制を必要とする患者(ヒトや他の哺乳動物等の動物)に有効量の解糖系糖代謝阻害剤を投与することを含む、MMP 活性を抑制する方法、あるいは MMP 活性化関連疾患を有する又は有するリスクを有する患者(ヒトや他の哺乳動物等の動物)に有効量の解糖系糖代謝阻害剤を投与することを含む、MMP 活性化関連疾患を治療、予防又は緩和する方法に関する。ここで、当該有効量は、上述の本発明に係る MMP 活性抑制組成物に含まれる解糖系糖代謝阻害剤の投与量に準じたものとすることができる。

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

〔実施例 1〕 ヒト腹部大動脈瘤壁におけるグルコーストランスポーター (GLUT-3) の発現及びマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-9 活性の評価

本実施例では、ヒト腹部大動脈瘤壁における GLUT-3 タンパク質の発現と MMP-9 活性を評価した。

ヒト腹部大動脈瘤壁をホモゲナイズした後、得られたサンプルにおいてウエスタンブロットにより GLUT-3 タンパク質発現を評価し、またザイモグラムで MMP-9 活性を測定した。ウエスタンブロット分析では、10  $\mu$ g 定量の抽出タンパク質を SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、分離した。その後、メンブレンに転写・固定化してブロットを作製した。さらに、ブロットを抗 GLUT-3 抗体と 1 時間反応し、引き続き二次抗体と反応させた後、シグナルを検出した。一方、ザイモグラム分析では、ザイモグラムゲルプレート上に 5  $\mu$ g 定量の抽出タンパク質を電気泳動し、タンパク質を分離した。その後の方法は Invitrogen 社のキットの説明書に従った。24 時間、37°C での反応後、ザイモグラムゲルをクマッシー青溶液で一晩染色し、その後脱染色して酵素活性を検出した。

さらに、ヒト腹部大動脈瘤壁における GLUT-3 の免疫活性部位を免疫染色法により評価した。免疫染色では、凍結切片を用いて、抗 GLUT-3 抗体と抗 CD68 抗体を

一次抗体として用い、一晩、4°Cで反応させた。次いで、凍結切片を、フルオレセインイソチオシアネート及び Cy3-で蛍光標識された二次抗体とそれぞれ 30 分反応させた後にコンフォーカル顕微鏡 (Olympus IX71) で観察した。

結果を図 1 に示す。パネル A は、縦軸にザイモグラムによる MMP-9 活性 (OD) を表し、横軸に GLUT-3 タンパク質発現 (OD) を表したグラフである。パネル A において、「MMP-9 (L)」は、潜在型の MMP-9 活性を意味する。当該グラフから判るように、ヒト腹部大動脈瘤壁における MMP-9 活性と GLUT-3 タンパク質発現との間に正の相関を認めた ( $r=0.415$ ,  $p=0.013$ )。

一方、パネル B は、ヒト腹部大動脈瘤壁における GLUT-3 タンパク質の免疫染色の写真である。当該写真から判るように、GLUT-3 の免疫活性 (赤色) は CD68 陽性のマクロファージ (黄緑色) と一致した (黄色 (Merge))。

〔実施例 2〕 2-デオキシグルコース、サイトカラシン又はフローレチンの投与による培養マクロファージ又はヒト腹部大動脈瘤壁における MMP-9 活性抑制の評価

本実施例では、2-デオキシグルコース、サイトカラシン又はフローレチンの投与による培養マクロファージ又はヒト腹部大動脈瘤壁における MMP-9 活性抑制を評価した。なお、ザイモグラム分析は、実施例 1 と同様の方法で行った。

培養マクロファージとして、単球系細胞 (U937) を 10 nmol/L フォルボールエステル (PMA) で刺激してマクロファージへ分化させた。ザイモグラム分析によれば、当該マクロファージにおいて MMP-9 活性が著増した。

一方、グルコーストランスポーター阻害薬であるサイトカラシン又はフローレチンで U937 細胞を前処置し、次いで 10 nmol/L PMA で刺激した。また、2-デオキシグルコースで U937 細胞を前処置し、次いで 10 nmol/L PMA で刺激した。さらに、単離したヒト腹部大動脈瘤壁を 2-デオキシグルコースで処置した。

結果を図 2 に示す。パネル A~C は、それぞれサイトカラシン、フローレチン及び 2-デオキシグルコース (2-DG) の投与による培養マクロファージにおける MMP-9 活性を示す。パネル D は、2-デオキシグルコース (2-DG) の投与によるヒト腹部大動脈瘤における MMP-9 活性を示す。パネル A~D において、「MMP-9 (L)」は、潜在型の MMP-9 活性を意味し、「MMP-9 (A)」は、活性型の MMP-9 活性を意味する。また、パネル D において、「MMP-2 (L)」は、潜在型の MMP-2 活性を意味し、「MMP-2 (A)」

は、活性型の MMP-2 活性を意味する。さらに、パネル D において、「対照」は、2-DG を含まない水溶媒を意味する。

図 2 から判るように、グルコーストランスポーター阻害薬であるサイトカラシン(A)やフローレチン(B)で U937 細胞を前処置しておくこと、MMP-9 活性は減少した。さらに、同細胞に 2-デオキシグルコースを投与して細胞内の糖利用を阻害すると MMP-9 活性が減少した(C)。この 2-デオキシグルコースの MMP-9 抑制効果はヒト腹部大動脈瘤壁でも同様に観察された(D)。

〔実施例 3〕マウス動脈瘤モデルにおける 2-デオキシグルコース投与による瘤形成抑制効果の評価

本実施例では、マウス動脈瘤モデルにおける 2-デオキシグルコース投与による瘤形成抑制効果を評価した。

マウス動脈瘤モデルは、8 週齢 C57BL/6J 雄マウスの大動脈周囲に塩化カルシウムを投与し作製した。

マウス動脈瘤モデルに対して、2-デオキシグルコースを 100mg/kg 体重で、又は 1g/kg 体重/日で 28 日間にわたり、腹腔内投与した。28 日間後、腹部大動脈を取り出し、当該大動脈の直径を計測した。陰性対照として、塩化カルシウム塗布下で 2-デオキシグルコース(2-DG)を投与せず代わりに生理食塩水(Saline)を投与したマウス、及び対照として塩化カルシウムを塗布せずに塩化ナトリウムを塗布したマウスについても同様に腹部大動脈を取り出し、当該大動脈の直径を計測した。

結果を図 3 に示す。A パネルは、各群から取り出した腹部大動脈の代表的な写真である。パネル B は、各群における取り出した腹部大動脈の直径(mm)を示すグラフである。

図 3 から判るように、2-デオキシグルコースの投与により塩化カルシウム塗布による大動脈径の拡大が抑制されていることが分かる。

また、本実施例においては、マウス動脈瘤モデル群では平滑筋を含む中膜層が損傷しているのに対し、2-デオキシグルコース投与群では血管壁の構造が保たれており、細胞保護効果が確認された。

さらに、同様の手法により、マウス動脈瘤モデルであるアンジオテンシン II

誘発性アポリポプロテイン E 遺伝子改変マウスに対しても、2-デオキシグルコースの投与効果を検証した。

当該アンジオテンシン II 誘発性アポリポプロテイン E 遺伝子改変マウスは、12 週齢のアポリポプロテイン E 欠損マウスに昇圧性ペプチドであるアンジオテンシン II (1000 ng/kg/min) を浸透圧ポンプで 28 日間皮下投与することにより作製した。

浸透圧ポンプ植え込み後から、2-デオキシグルコースを 1g/kg 体重/日で 28 日間にわたり、腹腔内投与した(マウス数(n)=14)。28 日間投与後、腹部大動脈を取り出し、当該大動脈の直径を計測した。陰性対照として、上記マウスに 2-デオキシグルコース (2-DG) を投与せず代わりに生理食塩水 (Saline) を投与したマウス (マウス数(n)=14) についても同様に腹部大動脈を取り出し、当該大動脈の直径を計測した。

各群における取り出した腹部大動脈の直径(mm)を、図 4 に示す。

図 4 から判るように、本モデルにおいても、2-デオキシグルコースの投与により大動脈径の瘤形成が抑制されていることが分かる。

〔実施例 4〕 2-デオキシグルコースの投与による培養マクロファージにおける催動脈硬化・動脈瘤関連遺伝子の発現の評価

本実施例では、2-デオキシグルコースの投与による培養マクロファージにおける催動脈硬化・動脈瘤関連遺伝子の発現を、DNA マイクロアレイ (Agilent 社) により評価した。評価した催動脈硬化・動脈瘤関連遺伝子は、MMP-1 及び MMP-9、ケモカイン (CCL-2 及び CCL-8) 並びに炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$  及び IL-6) であった (Libby P., Inflammation in atherosclerosis. Nature. 2002, 420(6917):868-874 及び Tung WS, Lee JK, Thompson RW., Simultaneous analysis of 1176 gene products in normal human aorta and abdominal aortic aneurysms using a membrane-based complementary DNA expression array. J Vasc Surg. 2001, 34(1):143-150)。

単球系細胞 (U937) を 10 nmol/L フォルボールエステル (PMA) で刺激してマクロファージへ分化させた。一部の細胞は 2-デオキシグルコース (2-DG) で U937 細胞を前処置した後に、次いで 10 nmol/L PMA で刺激した。対照として、フォルボール

エステルも 2-デオキシグルコースも投与しなかった単球系細胞(U937)を用いた。刺激 24 時間後に細胞を採取して RNA を抽出し、さらに RNA より cDNA を作製してアレイを行った。アレイの結果は GeneSpring GX10 ソフトウェアで解析し、各細胞サンプル間における催動脈硬化・動脈瘤関連遺伝子の発現レベルを評価した。

各細胞サンプルにおける各催動脈硬化・動脈瘤関連遺伝子の発現レベルの結果を図 5 に示す。パネル A~F は、それぞれ各細胞サンプルにおける MMP-1、CCL-2、TNF- $\alpha$ 、MMP-9、CCL-8 及び IL-6 の mRNA レベルでの発現を示すグラフである。縦軸の数値は、遺伝子発現レベルである。横軸は、各細胞サンプルを示す。

図 5 から判るように、フォルボールエステル(PMA)は、各催動脈硬化・動脈瘤関連遺伝子の発現を上昇させた。一方、2-デオキシグルコースの投与により各催動脈硬化・動脈瘤関連遺伝子の発現が減少した。従って、2-デオキシグルコースは動脈硬化・動脈瘤抑制薬として有効である可能性がある。

〔実施例 5〕 2-デオキシグルコースの投与による培養マクロファージにおける SIRT1 遺伝子の発現の評価

本実施例では、2-デオキシグルコースの投与による培養マクロファージにおける SIRT1 遺伝子の発現を評価した。SIRT1 遺伝子は、細胞保護・長寿効果に関連する遺伝子ともいわれる遺伝子である (Brachmann CB, Sherman JM, Devine SE, Cameron EE, Pillus L, Boeke JD. The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes Dev.* 1995;9:2888-2902.)。また、遺伝子発現は、実施例 4 と同様に mRNA レベルで評価した。

単球系細胞(U937)の SIRT1 遺伝子を RNA 干渉法により発現を抑制すると、コントロール(対照)下において SIRT1 遺伝子の発現が抑制されることが確認された。また、単球系細胞(U937)を 10 nmol/L フォルボールエステル(PMA)で刺激してマクロファージへ分化させた場合においても、RNA 干渉法により SIRT1 遺伝子の発現が抑制されることが確認された (図 6 のパネル A)。なお、図 6 のパネル A 及び B において、「対照(RNA-)」は、siRNA を含まない、溶媒のみを加えたものを意味し、「対照 siRNA」は、スクランブル siRNA(標的 RNA(SIRT1 RNA)を抑制するための siRNA(SIRT1 siRNA)と同じヌクレオチド構成比を有し、どの遺伝子とも異なる遺

伝子配列から成る RNA)を意味する。

図 6 のパネル B には、同条件における、PMA 刺激により誘導されたマクロファージ中の MMP-9 遺伝子の発現を示す。これから分かるように、SIRT1 遺伝子の発現が抑制されると、MMP-9 遺伝子の発現が顕著に増加する。

一方、単球系細胞 (U937) をフォルボールエステル (PMA) で刺激してマクロファージへ分化させる際に、2-デオキシグルコース (2-DG) 2mg/mL を U937 細胞培養液に添加した。対照として、フォルボールエステルも 2-デオキシグルコースも投与しなかった単球系細胞 (U937)、及びフォルボールエステルのみ投与した単球系細胞 (U937) を用いた。刺激 24 時間後の SIRT1 遺伝子発現を比較した結果を図 6 のパネル C に示す。

図 6 のパネル C から判るように、2-デオキシグルコースの投与により SIRT1 遺伝子の発現が顕著に増加した。

これらの結果を総合して考察すると、2-デオキシグルコースは SIRT1 遺伝子の発現を誘導し、このことによっても、マクロファージ中の MMP-9 の活性を抑制することに有効である可能性がある。

#### 産業上の利用可能性

本発明によれば、MMP 活性を抑制でき、MMP 活性化関連疾患の治療、緩和及び予防に有効な組成物が提供される。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

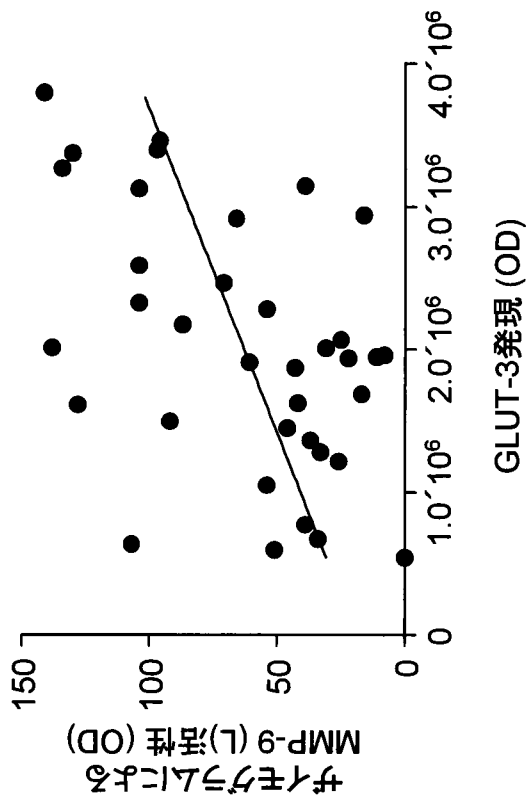
## 請求の範囲

1. 解糖系糖代謝阻害剤を有効成分として含有するマトリックスメタロプロテアーゼ活性抑制組成物。
2. 解糖系糖代謝阻害剤が 2-デオキシグルコース及びサイトカラシン並びにこれらの誘導体及び塩から成る群より選択される、請求項 1 記載のマトリックスメタロプロテアーゼ活性抑制組成物。
3. マトリックスメタロプロテアーゼがマクロファージにおけるマトリックスメタロプロテアーゼである、請求項 1 又は 2 記載のマトリックスメタロプロテアーゼ活性抑制組成物。
4. マトリックスメタロプロテアーゼがマトリックスメタロプロテアーゼ-9 である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項記載のマトリックスメタロプロテアーゼ活性抑制組成物。
5. 請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項記載のマトリックスメタロプロテアーゼ活性抑制組成物を有効成分として含有するマトリックスメタロプロテアーゼ活性化関連疾患治療剤。
6. マトリックスメタロプロテアーゼ活性化関連疾患が動脈硬化又は腹部大動脈瘤である、請求項 5 記載のマトリックスメタロプロテアーゼ活性化関連疾患治療剤。



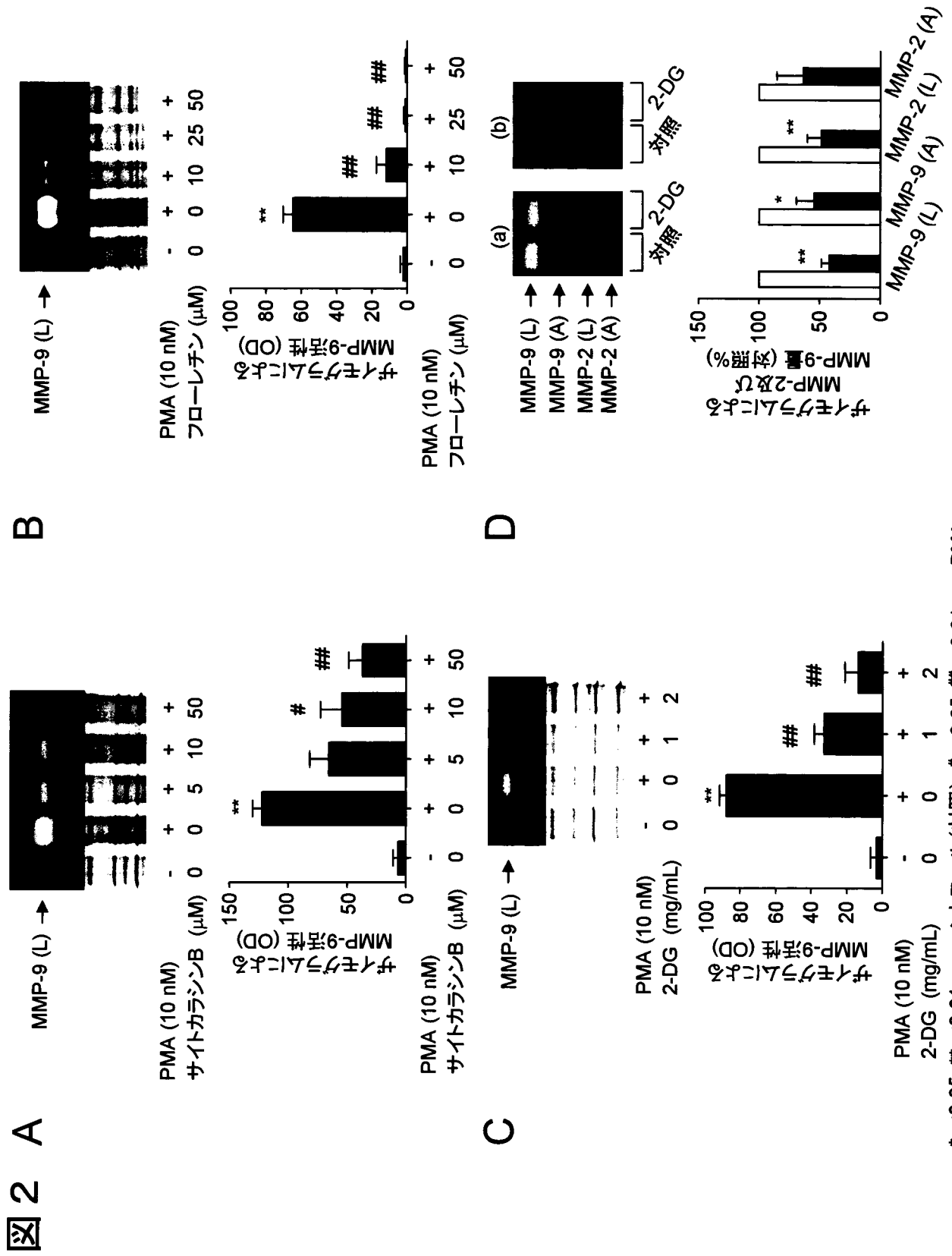
図 1

A



B





\*p<0.05, \*\*p<0.01, vs. コントロール(対照)、#p<0.05, ##p<0.01, vs. PMA

図 3

A



B

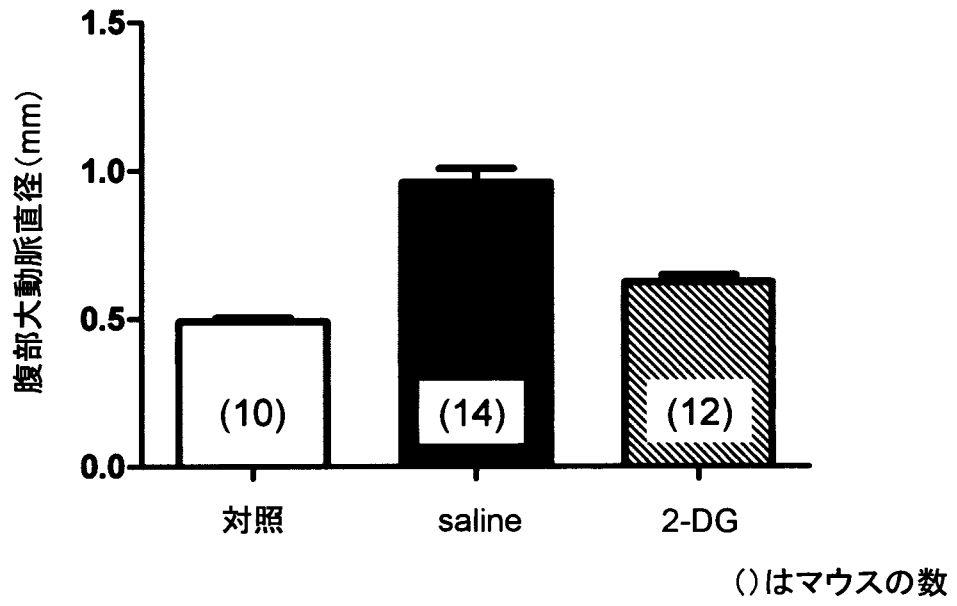


図 4

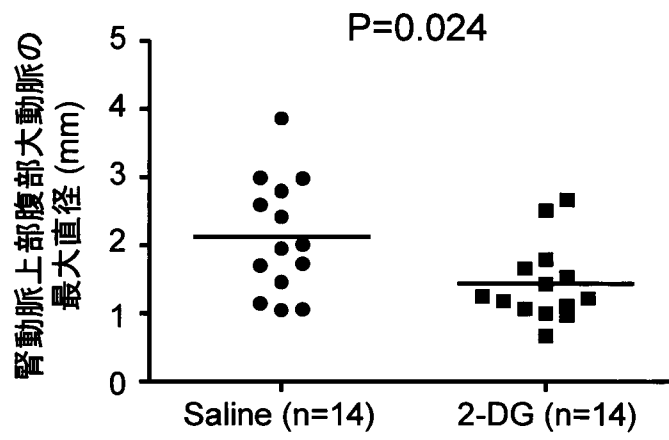
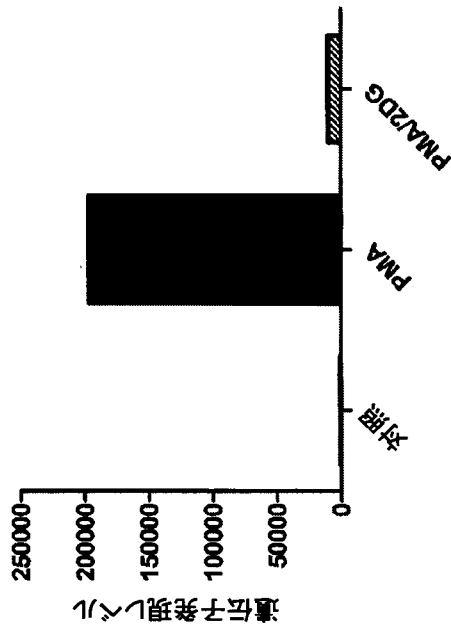


図5

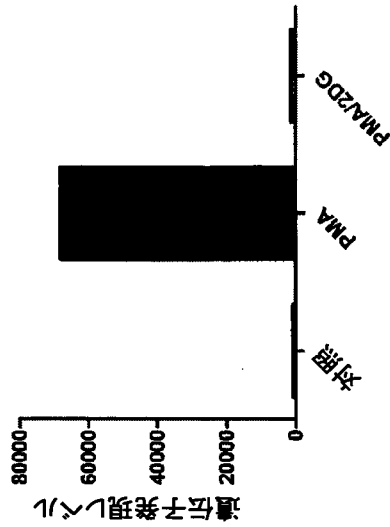
A

MMP-1 mRNA



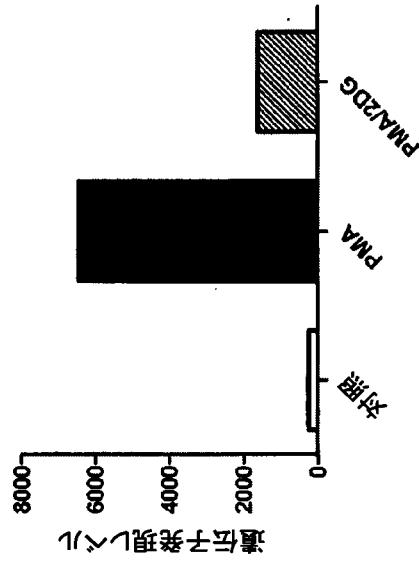
B

CCL-2 mRNA



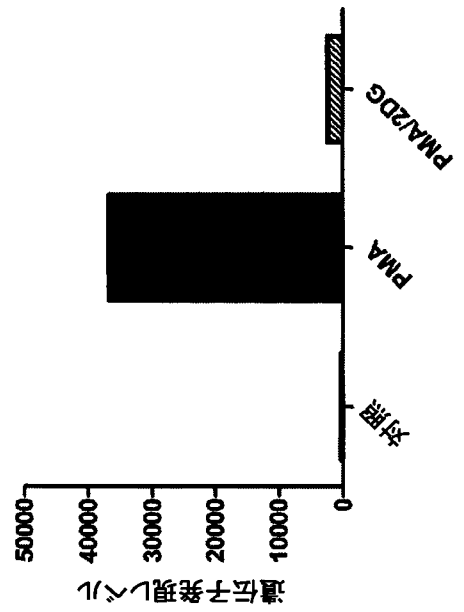
C

TNF- $\alpha$  mRNA



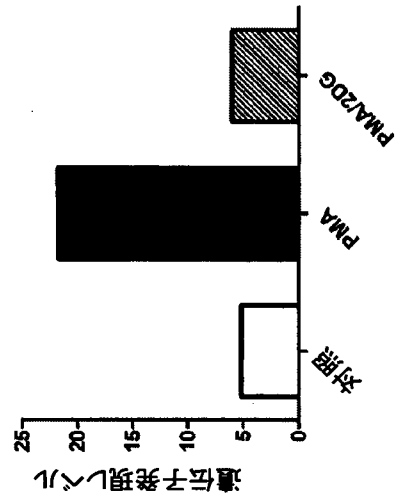
D

MMP-9 mRNA



E

CCL-8 mRNA



F

IL-6 mRNA

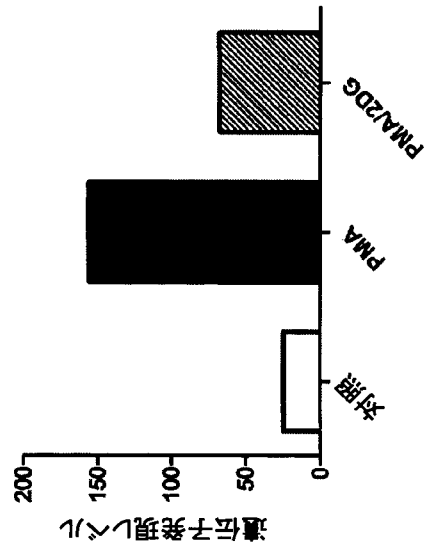
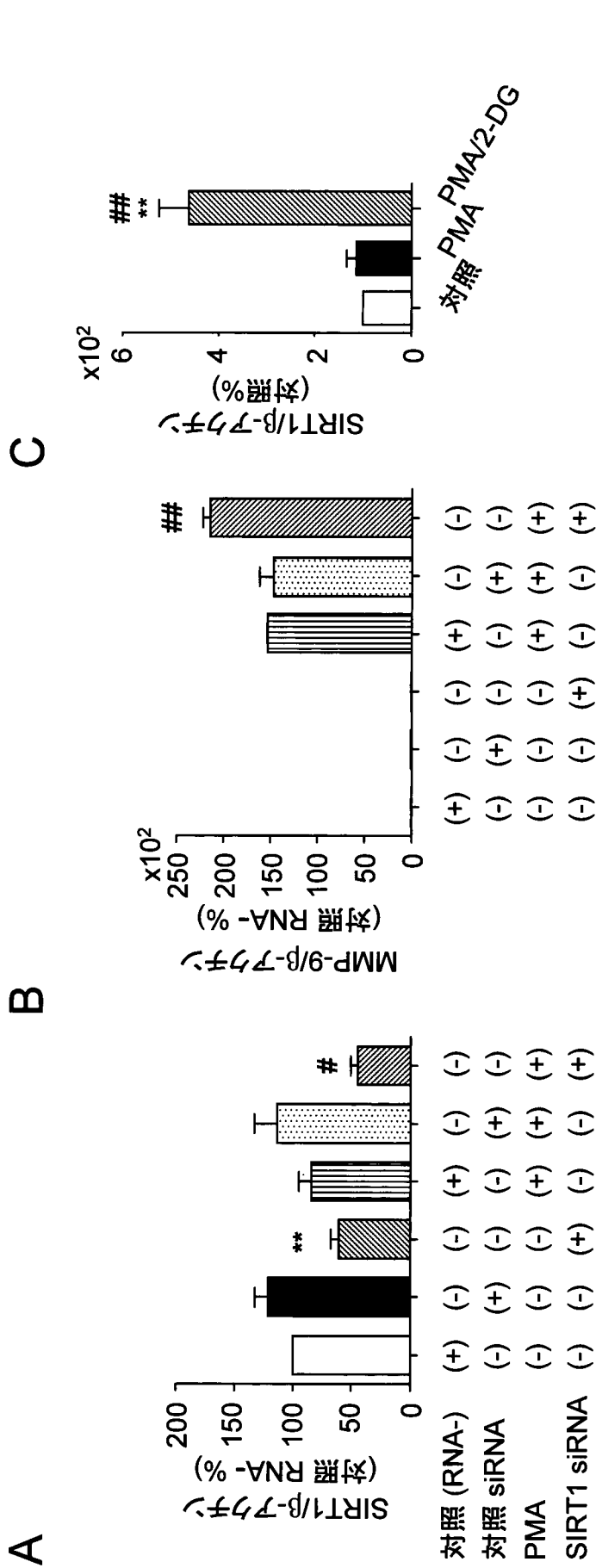


図6



\*\*p<0.01, vs. 対照 (RNA-); #p<0.05, ##P<0.01 vs. PMA刺激下

\*\*p<0.01 vs. 対照; ##p<0.01 vs. PMA

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/069677

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K45/00(2006.01)i, A61K31/407(2006.01)i, A61K31/7004(2006.01)i, A61P1/02(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P17/02(2006.01)i, A61P19/02(2006.01)i, A61P27/02(2006.01)i, A61P29/00(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, A61K31/407, A61K31/7004, A61P1/02, A61P9/00, A61P9/10, A61P17/02, A61P19/02, A61P27/02, A61P29/00, A61P35/04, 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	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	HARUYAMA T, et al., Regulation and Significance of Hepatocyte-Derived Matrix Metalloproteinases in Liver Remodeling, Biochem Biophys Res Commun, 2000.06.16, Vol.272, No. 3, 681-686	1-4 5, 6
X	Satoshi ITO et al., "Shuyo Saibo ni Okeru Glut1 to MMP2 no Hatsugen no Sokansei no Kento", The Journal of the Japan Diabetic Society, 15 April 2003 (15.04.2003), vol.46, Supplement 1, S.314	1, 3

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

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier 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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
25 November, 2011 (25.11.11)Date of mailing of the international search report  
06 December, 2011 (06.12.11)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/069677

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2008-543345 A (Ramtin AGAH), 04 December 2008 (04.12.2008), entire text & US 2009/0131314 A1 & EP 1901761 A & WO 2007/002534 A2 & CA 2613193 A & KR 10-2008-0039878 A & NO 20076603 A & CN 101267829 A & EA 200800123 A & AU 2006261911 B & IL 188310 D	5, 6
Y	Koichi YOSHIMURA et al., "Development of pharmacological therapy for aortic aneurysms", Igaku no Ayumi, 06 September 2008 (06.09.2008), vol.226, no.10, 836-842	5, 6
A	JP 8-511041 A (Trustees of the University of Pennsylvania), 19 November 1996 (19.11.1996), entire text & EP 697874 A & WO 1994/022455 A1 & AU 6553994 A & BR 9405858 A & CA 2159717 A	1-6
A	WO 2008/155918 A1 (The University of Tokyo), 24 December 2008 (24.12.2008), entire text & JP 2010-195684 A	1-6
A	JP 2007-152103 A (Cordis Corp.), 21 June 2007 (21.06.2007), entire text & US 2007/0129790 A1 & EP 1797907 A2 & CA 2568470 A	1-6



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2011/069677

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
(International Patent Classification (IPC))

A61P35/04(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

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

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, A61K31/407(2006.01)i, A61K31/7004(2006.01)i, A61P1/02(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P17/02(2006.01)i, A61P19/02(2006.01)i, A61P27/02(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P35/04(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, A61K31/407, A61K31/7004, A61P1/02, A61P9/00, A61P9/10, A61P17/02, A61P19/02, A61P27/02, A61P29/00, A61P35/04, 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

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2011年
日本国実用新案登録公報	1996-2011年
日本国登録実用新案公報	1994-2011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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

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	HARUYAMA T, et al., Regulation and Significance of Hepatocyte-Derived Matrix Metalloproteinases in Liver Remodeling, Biochem Biophys Res Commun, 2000.06.16, Vol.272, No. 3, 681-686	1-4 5, 6
X	伊藤 聡 他, 腫瘍細胞における Glut1 と MMP2 の発現の相関性の検討, 糖尿病, 2003.04.15, Vol. 46, Supplement 1, S.314	1, 3

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	の日の後に公表された文献
「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	「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
「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	「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
「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)	「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
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 25.11.2011	国際調査報告の発送日 06.12.2011
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 浅野 美奈 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

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	JP 2008-543345 A (ラムティン・アガー) 2008. 12. 04, 全文 & US 2009/0131314 A1 & EP 1901761 A & WO 2007/002534 A2 & CA 2613193 A & KR 10-2008-0039878 A & NO 20076603 A & CN 101267829 A & EA 200800123 A & AU 2006261911 B & IL 188310 D	5, 6
Y	吉村耕一 他, 大動脈瘤に対する薬物療法開発の最前線, 医学のあ ゆみ, 2008. 09. 06, Vol. 226, No. 10, 836-842	5, 6
A	JP 8-511041 A (ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバーシティー オブ ペンシルバニア) 1996. 11. 19, 全文 & EP 697874 A & WO 1994/022455 A1 & AU 6553994 A & BR 9405858 A & CA 2159717 A	1-6
A	WO 2008/155918 A1 (国立大学法人東京大学) 2008. 12. 24, 全文 & JP 2010-195684 A	1-6
A	JP 2007-152103 A (コーディス・コーポレーション) 2007. 06. 21, 全文 & US 2007/0129790 A1 & EP 1797907 A2 & CA 2568470 A	1-6