

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

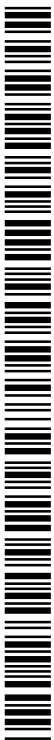
(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014年8月7日(07.08.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/119438 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 38/00 (2006.01) *A61P 11/00* (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01) *A61P 13/12* (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/051202
- (22) 国際出願日: 2014年1月22日(22.01.2014)
- (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 2013-014263 2013年1月29日(29.01.2013) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人大阪大学(OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 島村 宗尚(SHIMAMURA, Munehisa); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 中神 啓徳(NAKAGAMI, Hironori); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). オオサコ マリアナ キョウミ(OSAKO, Mariana Kiomy); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 森下 竜一(MORISHITA, Ryuichi); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 栗波 仁美(KURINAMI, Hitomi); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所(SAE-GUSA & PARTNERS); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka (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, 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, LT, 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, 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, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))



WO 2014/119438 A1

(54) Title: PROPHYLACTIC OR THERAPEUTIC DRUG FOR INFARCTION DISEASE

(54) 発明の名称: 梗塞性疾患の予防又は治療用医薬

(57) Abstract: Provided is a therapeutic drug for an infarction disease, in particular, a drug that is capable of exhibiting a therapeutic effect on the infarction disease even in the case where said drug is administered 3 hours or longer after the onset of regional ischemia. A prophylactic or therapeutic drug for an infarction disease, said drug containing an RANKL protein.

(57) 要約: 梗塞性疾患に対する治療用医薬を提供すること。特に、虚血部位の発生後3時間以上経過後に投与しても、梗塞性疾患に対して治療効果を発揮する医薬を提供すること。【解決手段】RANKLタンパク質を含有する梗塞性疾患の予防又は治療用医薬。

明 細 書

発明の名称： 梗塞性疾患の予防又は治療用医薬

技術分野

[0001] 本発明は、梗塞性疾患の予防又は治療用医薬に関する。

背景技術

[0002] 脳梗塞や心筋梗塞などの梗塞性疾患は、血管閉塞等により虚血部位が生じることに起因する。通常、虚血部位が生じることによりその周辺部位に酸素や栄養が行き届かなくなり、さらにこれと同時に或いはこれに伴って炎症反応やフリーラジカル生成が起こることにより、壊死部位が短期間に拡大していく。したがって、梗塞性疾患の治療には、虚血部位の発生後、比較的早期に有効な治療薬を投与することが極めて重要となる。

[0003] このような治療薬として、国際的に有効性が認められているものとしては、例えば血栓溶解薬（組織プラスミノゲンアクチベーター）が知られている。しかしながら、血栓溶解薬は、虚血部位の発生後3時間以内に投与される必要があるため、虚血部位の発生時刻が全く不明である患者や既に虚血部位の発生後3時間以上経過している患者に対しては用いることができない。そこで、虚血部位の発生後3時間以上経過した後に投与しても梗塞性疾患に対して効果を発揮する治療薬の開発が求められている。

[0004] RANKL (Receptor Activator of NF κ B Ligand) は破骨細胞を活性化することにより骨吸収を促進する因子としてよく知られている。一部において、RANKLが炎症性サイトカインを抑制するという報告があるものの（非特許文献1）、そもそもRANKLは、その名称が示すようにNF κ B（炎症性サイトカインであるIL-6やTNF α の発現を促進する機能を有する）を活性化する因子として発見されたものであるため、RANKLが実際に炎症反応を抑制して梗塞性疾患に対する治療効果を発揮するか否かは不明である。また、炎症反応を抑制するステロイド療法が梗塞性疾患に対して有効ではない実情に鑑みれば、単に炎症反応を抑制することが梗塞性疾患の治療に有効であるか否かも不明であるとい

える。

先行技術文献

非特許文献

- [0005] 非特許文献1 : The Journal of Immunology, 2006, 177: 3799-3805
非特許文献2 : The FASEB Journal, 2006, 20: 1162-1175
非特許文献3 : The Journal of Immunology, 2010, 184: 6910-6919
非特許文献4 : The Journal of Clinical Investigation, 2001, 108(7): 971-979

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明は、梗塞性疾患に対する予防又は治療用医薬を提供することを課題とする。特に、虚血部位の発生後3時間以上経過後に投与しても、梗塞性疾患に対して治療効果を発揮する医薬を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0007] 本発明者等は鋭意研究を進めた結果、RANKLタンパク質が、抗炎症性サイトカインの発現を亢進させるのみならず、壊死部位の拡大を抑制する作用を有するPPAR γ （非特許文献2）の発現をも亢進させることを見出した。そして、実際にRANKLタンパク質により壊死部位の拡大が抑制されることを見出した。さらに驚くべきことに、RANKLタンパク質は、虚血部位の発生後3時間以上経過後に投与しても、壊死部位の拡大を抑制できることを見出した。これらの知見に基づいてさらに研究を進めた結果、本発明が完成した。
- [0008] 即ち、本発明は、下記の態様を包含する。

- 項1. RANKLタンパク質を含有する梗塞性疾患の予防又は治療用医薬。
- 項2. 梗塞性疾患が梗塞である項1に記載の予防又は治療用医薬。
- 項3. 梗塞性疾患が脳梗塞、心筋梗塞、肺梗塞、腎梗塞、下肢急性動脈閉塞症、及びクモ膜下出血後の血管攣縮による脳梗塞からなる群より選択される少なくとも1種である項1又は2に記載の予防又は治療用医薬。

項4. RANKLタンパク質が下記(e)に記載するタンパク質及び下記(f)に記載するタンパク質からなる群より選択される少なくとも1種である項1~3のいずれかに記載の予防又は治療用医薬:

(e) 配列番号3又は4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

(f) 配列番号3又は4に示されるアミノ酸配列と85%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つRANKタンパク質結合活性を有するタンパク質。

項5. RANKLタンパク質が配列番号3又は4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質である項4に記載の予防又は治療用医薬。

項6. 皮下投与剤、経動脈投与剤、又は経静脈投与剤である項1~5のいずれかに記載の予防又は治療用医薬。

項7. 梗塞性疾患の予防又は治療における使用のための、RANKLタンパク質。

項8. 項1~6のいずれかに記載の予防又は治療用医薬を、梗塞性疾患患者若しくは梗塞性疾患を発症する可能性がある被検体に投与することを包含する、梗塞性疾患の予防又は治療方法。

項9. 梗塞性疾患の予防又は治療用医薬の製造におけるRANKLタンパク質の使用。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、梗塞性疾患に対する優れた予防又は治療用医薬を提供することができる。この予防又は治療用医薬は、虚血部位の発生後3時間以上経過後に投与しても、梗塞性疾患に対して治療効果を発揮できるので、より多くの患者に対して適用することができる。さらに、本発明の予防又は治療用医薬は、梗塞性疾患患部への直接投与でなくとも、皮下投与等により治療効果を発揮することができる。したがって、本発明の予防又は治療用医薬を用いることにより、梗塞性疾患の予防又は治療を簡便に行うことができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]RANKLタンパク質により炎症性サイトカインの発現が抑制されていることを示す。

[図2]RANKLタンパク質により抗炎症性サイトカインの発現が亢進しているこ

とを示す。

[図3]RANKLタンパク質によりPPAR γ の発現が亢進していることを示す。

[図4]LPSによる神経細胞死が、RANKLタンパク質によって抑制されていることを示す。

[図5]LPSによるサイトカインの産生が、RANKLタンパク質によって抑制されていることを示す。

[図6]LPSによる神経細胞死が、RANKLタンパク質によって抑制されていることを示す。

[図7]RANKLタンパク質の機能を亢進するOPGノックアウトにより梗塞が抑制されることを示す。

[図8]RANKLタンパク質の脳室内投与により梗塞が抑制されることを示す。

[図9]RANKLタンパク質を、虚血部位発生後3時間以上（4時間）経過後に投与しても、梗塞が抑制されることを示す。

[図10]RANKLタンパク質を、虚血部位発生後3時間以上（6時間）経過後に投与しても、梗塞が抑制されることを示す。

[図11]RANKLタンパク質を皮下投与しても梗塞が抑制されることを示す。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明は、RANKLタンパク質を含有する梗塞性疾患の予防又は治療用医薬に関する。

[0012] RANKLタンパク質は、RANK結合活性を有するタンパク質である限り特に限定されない。RANKLタンパク質としては、ヒト、サル、マウス、ラット、イヌ、ネコ、及びウサギ等の種々の哺乳類由来のRANKLタンパク質を採用することができる。また、RANKLタンパク質としては、全長型（膜貫通型）RANKLタンパク質であってもよいし、全長型RANKLタンパク質のN末端側領域が欠失している可溶性RANKLタンパク質であってもよい。さらに、RANKLタンパク質は、その他のアイソフォームであってもよい。

[0013] 具体的には、例えば、ヒト全長型RANKLタンパク質としては配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質が挙げられ、ヒト可溶性RANKLタンパ

ク質としては配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質が挙げられ、マウス全長型RANKLタンパク質としては配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質が挙げられ、マウス可溶型RANKLタンパク質としては配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質が挙げられ、ヒトRANKLタンパク質のアイソフォームとしては配列番号1のアミノ酸番号74~317のアミノ酸配列（配列番号5）からなるタンパク質（アイソフォーム2）や、配列番号1のアミノ酸番号48~317のアミノ酸配列（配列番号6）からなるタンパク質（アイソフォーム3）が挙げられる。

[0014] RANKLタンパク質として、

好ましくは、下記（a）に記載するタンパク質及び下記（b）に記載するタンパク質：

（a）配列番号1~6のいずれかに示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

（b）配列番号1~6のいずれかに示されるアミノ酸配列と85%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つRANKタンパク質結合活性を有するタンパク質

からなる群より選択される少なくとも1種が挙げられ、

より好ましくは、下記（c）に記載するタンパク質及び下記（d）に記載するタンパク質：

（c）配列番号1~4のいずれかに示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

（d）配列番号1~4のいずれかに示されるアミノ酸配列と85%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つRANKタンパク質結合活性を有するタンパク質

からなる群より選択される少なくとも1種が挙げられ、

よりさらに好ましくは、下記（e）に記載するタンパク質及び下記（f）に記載するタンパク質：

（e）配列番号3又は4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

（f）配列番号3又は4に示されるアミノ酸配列と85%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つRANKタンパク質結合活性を有するタンパク質

からなる群より選択される少なくとも1種が挙げられる。

[0015] 上記 (b)、(d)、及び (f) において、同一性は、好ましくは90%以上であり、より好ましくは95%以上であり、よりさらに好ましくは98%以上である。

[0016] 上記 (b) に記載するタンパク質の一例としては、例えば

(b') 配列番号1~6のいずれかに示されるアミノ酸配列に対して1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加、又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つRANKタンパク質結合活性を有するタンパク質が挙げられ、

上記 (d) に記載するタンパク質の一例としては、例えば

(d') 配列番号1~4のいずれかに示されるアミノ酸配列に対して1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加、又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つRANKタンパク質結合活性を有するタンパク質が挙げられ、

上記 (f) に記載するタンパク質の一例としては、例えば

(f') 配列番号3又は4に示されるアミノ酸配列に対して1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加、又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つRANKタンパク質結合活性を有するタンパク質が挙げられる。

[0017] 上記 (b')、(d')、及び (f') において、複数個とは、例えば2~25個であり、好ましくは2~15個であり、より好ましくは2~10個であり、よりさらに好ましくは2~5個であり、特に好ましくは2~3個である。

[0018] 上記 (b)、(d)、又は (f) に記載されるタンパク質において、配列番号1~6に示されるアミノ酸配列に対して置換、欠失、付加、又は挿入させる部位は、RANKタンパク質結合活性に影響を与えない部位を選択することが好ましい。RANKタンパク質結合活性に影響を与える部位は、例えば非特許文献3や非特許文献4に記載の情報に基づいて決定することができる。

[0019] RANKタンパク質結合活性は、例えば次のように判定することができる。活性測定対象のタンパク質をマクロファージ細胞（例えばRAW264.7細胞）に導入した場合に、コントロールタンパク質（例えばBSA）を導入した場合に比べて、抗炎症性サイトカイン（例えばIL-10）やPPAR γ の発現量が増加していた

場合は、該タンパク質がRANKタンパク質結合活性を有すると判定することができる。

[0020] 本発明において、梗塞性疾患とは、虚血部位が生じることに起因して、該虚血部位周辺の組織の壊死部位が拡大している状態又は拡大した状態を意味する。虚血部位が生じる原因としては、例えば、血栓や塞栓等が血管に詰まることにより生じる血管閉塞が挙げられる。血管閉塞の原因としては、例えば血栓や塞栓が血管に詰まることや、血管が狭窄することが挙げられる。

[0021] 具体的な梗塞性疾患としては、例えば、脳梗塞、心筋梗塞、肺梗塞、腎梗塞、下肢急性動脈閉塞症、クモ膜下出血後の血管攣縮による脳梗塞、脾臓における梗塞、肝臓における梗塞、腸管における梗塞、睾丸における梗塞、及び卵巣における梗塞等が挙げられ、好ましくは脳梗塞、心筋梗塞、肺梗塞、腎梗塞、下肢急性動脈閉塞症、クモ膜下出血後の血管攣縮による脳梗塞、脾臓における梗塞が挙げられ、より好ましくは脳梗塞及び心筋梗塞が挙げられ、よりさらに好ましくは脳梗塞が挙げられる。

[0022] 本発明において、梗塞性疾患の予防または治療とは、虚血部位発生の前後に本発明の医薬を投与することにより、虚血部位周辺に生じる壊死部位の拡大が抑制されることを意味する。

[0023] 本発明の予防又は治療用医薬は、RANKLタンパク質そのものであることもできるし、RANKLタンパク質以外の成分（以下、単に「添加剤」と表記することもある）を含む組成物であることができる。添加剤としては、薬学的に許容される成分であれば特に限定されるものではないが、例えば基剤、担体、溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、増粘剤、保湿剤、着色料、香料、及びキレート剤等が挙げられる。本発明の予防又は治療用医薬が添加剤を含む場合は、剤形に応じた慣用の方法に従って添加剤を用いることにより、本発明の予防又は治療用医薬を製造することができる。

[0024] 本発明の予防又は治療用医薬は、任意の剤形、例えば錠剤、丸剤、散剤、液剤、注射剤、懸濁剤、乳剤、粉末剤、顆粒剤、カプセル剤等であることが

できるが、好ましくは注射剤である。

[0025] 本発明の予防又は治療用医薬の投与対象は、梗塞性疾患患者若しくは梗塞性疾患を発症する可能性がある被検体である。梗塞性疾患患者とは、前述の梗塞性疾患を発症した患者である。梗塞性疾患を発症する可能性がある被検体とは、前述の梗塞性疾患の前兆症状が認められ、梗塞性疾患を発症する可能性があるとして診断された被検体である。

[0026] 本発明の予防又は治療用医薬の投与経路としては、例えば非経口投与が挙げられる。より具体的な投与経路としては、梗塞性疾患を発症している臓器への投与、皮下投与、経静脈投与、経動脈投与、皮内投与、筋肉内投与、骨内投与、心臓内投与、脳室内投与、クモ膜下投与、及び腹腔内投与が挙げられる。本発明の予防又は治療用医薬は、梗塞性疾患を発症している臓器に直接投与することによらず、例えば皮下投与、経静脈投与、経動脈投与、又は皮内投与することによって効果を発揮できる点で優れている。

[0027] 本発明の予防又は治療用医薬中の、RANKLタンパク質の含有量としては、梗塞性疾患に対する治療効果を発揮できる限りにおいて特に限定されない。例えば0.00001重量%以上、好ましくは0.0001~1重量%であることができる。

[0028] 本発明の予防又は治療用医薬の投与形態及び有効な投与量は、投与対象、投与経路、剤形、患者の状態、及び医師の判断などに左右されるものであり、限定はされないが、例えば、体重60 kgの成人に対して、1回当たり、1 ng~10 µgを投与することができる。なお、投与形態としては、虚血部位の発生後、複数回、例えば1~数十時間毎に投与することが好ましい。本発明の治療用医薬は、虚血部位の発生後3時間以上経過した後に第1回目の投与を行っても効果を発揮できる点で優れている。したがって、本発明の治療用医薬は、虚血部位の発生直後、1時間以上経過後、3時間以上経過後、4時間以上経過後、又は6時間以上経過後に第1回目の投与を行うように用いられることができる。

[0029] 本発明の予防又は治療用医薬は、梗塞性疾患の他の予防又は治療薬と併用してもよい。他の予防又は治療薬としては、例えば、アルテプラゼ、エダ

ラボン、ヘパリン、低分子ヘパリン、オザグレルナトリウム、アルガトロバン、アスピリン、ブラザキサ、ワルファリン、グリセロール、マンニトール、クロピドグレル、及びシロスタゾール等が挙げられる。他の予防又は治療用医薬は1種又は2種以上を組み併せて用いてもよい。

実施例

[0030] 以下に、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

[0031] 実施例1：RANKLタンパク質による炎症性サイトカインの発現抑制

マクロファージに対してRANKLタンパク質を作用させた後、マクロファージから分泌される炎症性サイトカインの発現量を測定した。具体的には次のように行った。

[0032] PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) を終濃度5 ng/mlになるように添加したRPMI培地 (+10%FBS) 中で、THP1細胞 (ヒト由来単球用細胞) を48時間培養することにより、THP1細胞をマクロファージに分化させた。THP1細胞が培養ディッシュに付着したことを確認した後、培地を、IFN γ タンパク質 (Peprotech, #315-05) (終濃度20 ng/ml)、RANKLタンパク質 (Recombinant Murin sRANKL Ligand (Cat No.315-11) : PEPROTECH社) (終濃度10 ng/ml) を含有するRPMI培地 (+4%FBS) に交換し、24時間培養した。その後、遊離脂肪酸の一種であるパルミチン酸を終濃度100 μ Mになるように培地に添加し、12時間培養した。培養後、THP1細胞からtotal RNAを抽出し、炎症性サイトカインであるTNF α 及びIL-6の発現量をrealtime RT-PCRで測定した。測定結果を図1に示す。

[0033] 図1中、「CT」は、IFN γ タンパク質、RANKLタンパク質、及び遊離脂肪酸のいずれも作用させていない群を示し、「FFA」は遊離脂肪酸を作用させたことを示し、「IFN」はIFN γ を作用させたことを示し、「RL」はRANKLタンパク質を作用させたことを示す (図2及び3の表記においても同様である)。

[0034] 図1より、マクロファージを活性化する機能を有する遊離脂肪酸、及び炎症性サイトカインの発現を誘導させる機能を有するIFN γ を作用させることに

よる炎症性サイトカイン (TNF α 及びIL-6) の発現量の増加 (CT及びFFAと、IFN+FFAとの比較) が、RANKLタンパク質をさらに作用させることにより抑制されることが示された (IFN+FFAとIFN+RL+FFAとの比較)。

[0035] 実施例2：RANKLタンパク質による抗炎症性サイトカインの発現亢進

マクロファージに対してRANKLタンパク質を作用させた後、マクロファージから分泌される抗炎症性サイトカインの発現量を測定した。具体的には次のように行った。

[0036] DMEM培地 (+10%FBS) 中でRAW細胞 (マウス由来マクロファージ様細胞) を48時間培養した。培地を、RANKLタンパク質 (終濃度10 ng/ml)、IFN γ タンパク質 (終濃度20 ng/ml)、IL-4タンパク質 (Peprotech, #214-14) (終濃度20 ng/ml) を含有するDMEM培地 (+4%FBS) に交換し、24時間培養した。培養後、RAW細胞からtotal RNAを抽出し、抗炎症性サイトカインであるIL-10の発現量をrealtime RT-PCRで測定した。測定結果を図2に示す。

[0037] 図2より、RANKLタンパク質を作用させることにより、抗炎症性サイトカイン (IL-10) の発現が亢進することが示された (CTとRLとの比較、IFNとIFN+RLとの比較、及びIL-4とIL-4+RLとの比較)。

[0038] 実施例3：RANKLタンパク質によるPPAR γ の発現亢進

マクロファージに対してRANKLタンパク質を作用させた後、マクロファージから分泌されるPPAR γ の発現量を測定した。具体的には次のように行った。

[0039] 実施例1と同様にTHP1細胞をマクロファージに分化させた後、培地を、IFN γ タンパク質 (終濃度20 ng/ml)、RANKLタンパク質 (終濃度10 ng/ml) を含有するRPMI培地 (+4%FBS) に交換し、24時間培養した。培養後、THP1細胞からtotal RNAを抽出し、PPAR γ の発現量をrealtime RT-PCRで測定した。測定結果を図3に示す。

[0040] 図3より、RANKLタンパク質を作用させたことにより、PPAR γ の発現量が亢進することが示された (CTとRLとの比較)。PPAR γ は、虚血部位の発生に伴う壊死部位の拡大を抑制することが知られている (非特許文献2)。このことから、RANKLが梗塞性疾患の治療に有用である可能性が見出された。

[0041] 実施例4：RANKLタンパク質の神経細胞保護効果（神経細胞－グリア細胞混合培養系）

炎症反応を惹起するリポ多糖（LPS）による神経細胞死が、LPSの添加前またはLPSと同時にRANKLを作用させることにより抑制されるか否かを調べた。具体的には次のように行った。

[0042] 受精後21日目（胎生21日目）のマウス胎児から神経組織（神経細胞及びグリア細胞の混合状態）を取り出し、Neurobasal培地（+B-27、+5%HS）で10日間培養した（RANKL非前処理群）。なお、RANKL前処理群として、培養9日目においてRANKLタンパク質を終濃度100 ng/mlになるように添加してさらに24時間培養した群も作成した。一方で、RANKL日前処理群として、BSAを終濃度100 μ g/mlになるように添加した群も作成した。その後、LPS（終濃度100 μ g/ml）、又はRANKLタンパク質（終濃度100 ng/ml）を含有するNeurobasal培地（+N2、+1%HS）に交換し、5日間培養した。培養後、神経細胞マーカーであるMAP2に対する抗体（Sigma-Aldrich, M4403）を用いて免疫染色し、培養ディッシュ上の染色面積の割合（残存神経細胞量を示す）を測定した。この測定結果を図4に示す。また、培養後の培地を回収し、該培地中のサイトカイン（TNF α 及びIL-6）の濃度をELISAによって測定した。この測定結果を図5に示す。

[0043] 図4中、「Normal」は、RANKL非前処理群であってLPS、BSA、及びRANKLタンパク質のいずれも作用させていない群を示し、「BSA」はBSA前処理群（RANKL非前処理群）であってLPSを作用させた群を示し、「RANKL」はRANKL前処理群であってLPSを作用させた群を示し、「RANKL simu」はRANKL非前処理群であってLPSと同時にRANKLを作用させた群を示す。

[0044] 図4より、LPSの添加前にRANKLを作用させた場合、及びLPSと同時にRANKLを作用させた場合の両方において、LPSによる神経細胞死が抑制されることが示された（BSAとRANKL又はRANKL simuとの比較）。

[0045] 図5中、「LPS -」はLPS未処理群であり、「LPS +」はLPS処理群である。また、「RANKL -」は、LPS処理前にRANKL前処理していない群であり、「R

ANKL 10」は10 ng/mlの濃度でRANKL前処理した群であって、「RANKL 100」は100 ng/mlの濃度でRANKL前処理した群である。

[0046] 図5より、LPSの添加前にRANKLを作用させた場合、LPSによるサイトカインの産生が抑制されることが示された。

[0047] 実施例5：RANKLタンパク質の神経細胞保護効果（神経細胞単独培養系）

LPSによって炎症反応が惹起されたマクロファージ培養培地中で神経細胞を培養することによる神経細胞死が、RANKLタンパク質を作用させることにより抑制されるか否かを調べた。具体的には次のように行った。

[0048] 実施例1と同様にTHP1細胞をマクロファージに分化させた後、培地を、RANKLタンパク質（終濃度10 ng/ml）を含有するNeurobasal培地（+N2、+1%HS）に交換し、24時間培養した。その後、LPSを終濃度10 ng/mlになるように添加して24時間培養し、培養後の培地（マクロファージ培養培地）を回収した。一方で、受精後（胎生）16～18日目のマウス胎児から海馬神経細胞を取り出し、Neurobasal培地（+B27、+5%HS）中で14日間培養した。その後、この培地を、マクロファージ培養培地に交換して24時間培養した。培養後、神経細胞マーカーであるMAP2に対する抗体を用いて免疫染色し、観察視野辺りの染色量の割合（残存神経細胞量を示す）を測定した。結果を図6に示す。

[0049] 図6中、「Normal」はマクロファージ培養培地を調製する際に、LPS及びRANKLタンパク質のいずれも作用させなかった群を示し、「LPS」は該調製の際にLPSのみを作用させた群を示し、「RANKL+LPS」は該調製の際にRANKL及びLPSの両方を作用させた群を示す。

[0050] 図6より、LPSによって炎症反応が惹起されたマクロファージ培養培地中で神経細胞を培養することによる神経細胞死が、RANKLタンパク質を作用させることにより抑制されることが示された（LPSとRANKL+LPSとの比較）。

[0051] 実施例6：OPGノックアウトによる壊死抑制

OPGタンパク質は、RANKLタンパク質（リガンド）のいわゆるおとり受容体として、RANKLタンパク質の真の受容体であるRANKタンパク質と拮抗する。RANKLタンパク質のOPGタンパク質に対する結合性は、RANKLタンパク質のRANKタ

ンパク質に対する結合性よりも高いため、OPGタンパク質によりRANKLタンパク質の機能が抑制される。したがって、OPGノックアウトされた状態においては、RANKLタンパク質の機能は亢進する。そこで、RANKLタンパク質が脳虚血後の壊死部位のサイズに与える影響を、OPGノックアウトマウスを用いて調べた。具体的には次のように行った。

[0052] 野生型マウス (C57BL6/J) 及びOPGノックアウトマウス (日本クレア) に対して、塞栓系を用いて人為的に脳虚血部位を発生させた。具体的には、右外頸動脈からナイロン糸を頭蓋内内頸動脈に挿入し右中大脳動脈を一過性に閉塞した。虚血部位発生から45分後に塞栓系を取り除き、血液を再灌流させた。虚血部位発生から3日後に脳を取り出し、bregmaから前後に1.4、0.7、及び0 mmの位置における、左脳部分及び右脳部分を含む脳切片を作成し、該切片をcresyl violetで染色した。cresyl violet染色部位の面積を脳梗塞面積 (壊死部位) とし、下記式により脳梗塞面積の割合を求めた。結果を図7に示す。

[0053] [数1]

$$\text{脳梗塞面積の割合} = \left(\left[\text{正常側脳面積} \right] - \left(\left[\text{脳梗塞側全面積} \right] - \left[\text{脳梗塞面積} \right] \right) / \text{正常側脳面積} \right) \times 100$$

図7より、RANKLタンパク質の機能が亢進しているOPGノックアウトマウス (OPG^{-/-}) では、野生型マウス (WT) に比べて、脳虚血後に生じる脳梗塞面積が小さいことが示された。このことは、RANKLタンパク質が壊死を抑制することを示唆する。

[0054] 実施例7：RANKLタンパク質の脳室内投与による壊死抑制 (虚血部位発生後3時間以内の投与)

RANKLタンパク質の脳室内投与が、脳虚血後の壊死部位のサイズに与える影響を調べた。具体的には次のように行った。

[0055] 野生型マウス (C57BL6/J) に対して、実施例6と同様に脳虚血部位を発生させた。虚血部位発生から70分後に、塞栓系を取り除き、血液を再灌流させた。虚血部位発生から75分後、24時間後、及び48時間後に、2 μ lのRANKLタン

パク質溶液 (2.5 ng/ μ lの濃度でRANKLタンパク質を含有する人工脳脊髄液 (aCSF)) を、注射により脳室内に投与した。虚血部位発生から72時間後に脳を取り出し、bregmaから0 mmの位置における、左脳部分及び右脳部分を含む脳切片を作成し、該切片をcresyl violetで染色した。該染色結果に基づいて、実施例6と同様に脳梗塞面積の割合を求めた。結果を図8に示す。

[0056] 図8より、RANKLタンパク質非投与群 (aCSF) に比べて、RANKLタンパク質投与群 (RANKL(75 min)) においては、脳虚血後に生じる脳梗塞面積が小さいことが示された。すなわち、RANKLタンパク質投与により壊死を抑制できることが示された。

[0057] 実施例8：RANKLタンパク質の脳質内投与による壊死抑制 (虚血部位発生後3時間以上経過後の投与)

虚血部位発生後3時間以上経過後にRANKLタンパク質を投与しても、壊死を抑制できるか否かを調べた。具体的には、RANKLタンパク質溶液の投与を、虚血部位発生から4時間後、24時間後、及び48時間後に行う以外は実施例7と同様に行った。結果を図9に示す。

[0058] 図9より、虚血部位発生後4時間経過後にRANKLタンパク質を投与しても、壊死を抑制できることが示された (aCSFとRANKL(4 hr)との比較)。

[0059] 実施例9：RANKLタンパク質の脳質内投与による壊死抑制 (虚血部位発生後3時間以上経過後の投与)

虚血部位発生後3時間以上経過後にRANKLタンパク質を投与しても、壊死を抑制できるか否かを調べた。具体的には、RANKLタンパク質溶液の投与を、虚血部位発生から6時間後、24時間後、及び48時間後に行う以外は実施例7と同様に行った。結果を図10に示す。

[0060] 図10より、虚血部位発生後6時間経過後にRANKLタンパク質を投与しても、壊死を抑制できることが示された (aCSFとRANKL(6 hr)との比較)。

[0061] 実施例10：RANKL皮下投与による壊死抑制 (虚血部位発生後3時間以上経過後の投与)

RANKLタンパク質の投与部位が皮下であっても、壊死を抑制できるか否かを

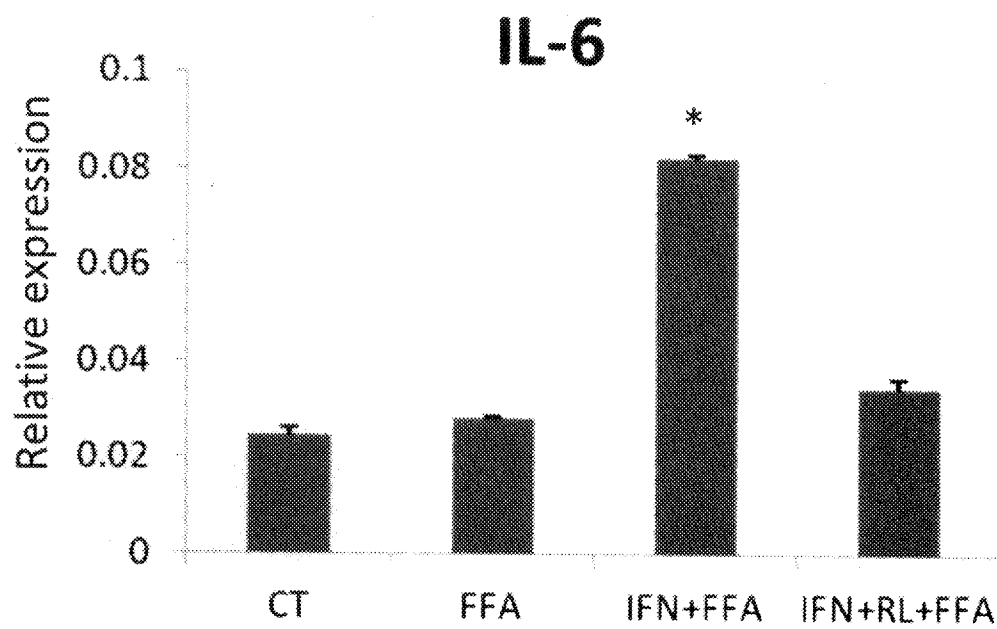
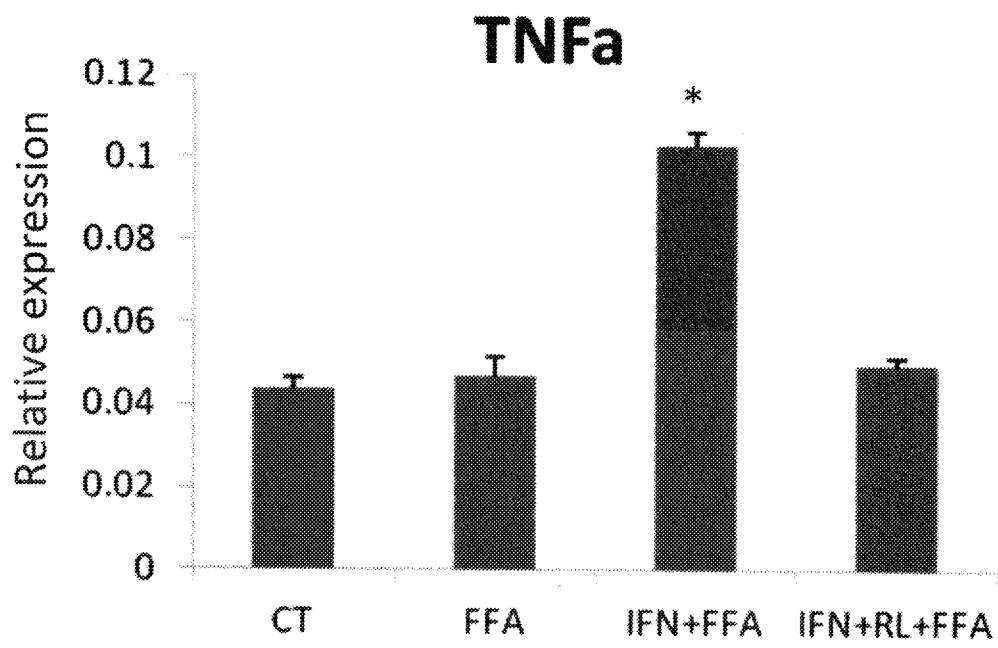
調べた。具体的には、虚血部位発生から4時間後、12時間後、24時間後、36時間後、48時間後、及び56時間後に、5 μ g/mlの濃度でRANKLタンパク質を含有するPBS 200 μ lを背部の一箇所の下に注射する以外は、実施例7と同様に行った。結果を図11に示す。

[0062] 図11より、RANKLを皮下投与しても、壊死を抑制できることが示された。

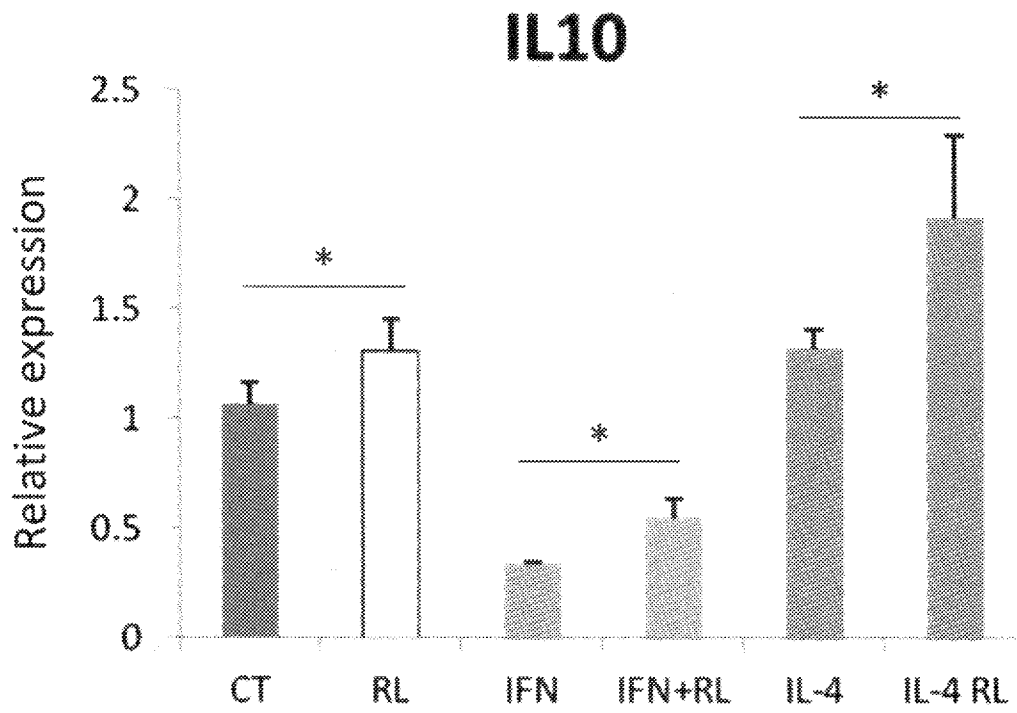
請求の範囲

- [請求項1] RANKLタンパク質を含有する梗塞性疾患の予防又は治療用医薬。
- [請求項2] 梗塞性疾患が梗塞である請求項1に記載の予防又は治療用医薬。
- [請求項3] 梗塞性疾患が脳梗塞、心筋梗塞、肺梗塞、腎梗塞、下肢急性動脈閉塞症、及びクモ膜下出血後の血管攣縮による脳梗塞からなる群より選択される少なくとも1種である請求項1又は2に記載の予防又は治療用医薬。
- [請求項4] RANKLタンパク質が下記(e)に記載するタンパク質及び下記(f)に記載するタンパク質からなる群より選択される少なくとも1種である請求項1～3のいずれかに記載の予防又は治療用医薬：
(e) 配列番号3又は4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、
(f) 配列番号3又は4に示されるアミノ酸配列と85%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つRANKタンパク質結合活性を有するタンパク質。
- [請求項5] RANKLタンパク質が配列番号3又は4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質である請求項4に記載の予防又は治療用医薬。
- [請求項6] 皮下投与剤、経動脈投与剤、又は経静脈投与剤である請求項1～5のいずれかに記載の予防又は治療用医薬。
- [請求項7] 梗塞性疾患の予防又は治療において使用されるための、RANKLタンパク質。
- [請求項8] 請求項1～6のいずれかに記載の予防又は治療用医薬を、梗塞性疾患患者若しくは梗塞性疾患を発症する可能性がある被検体に投与することを包含する、梗塞性疾患の予防又は治療方法。

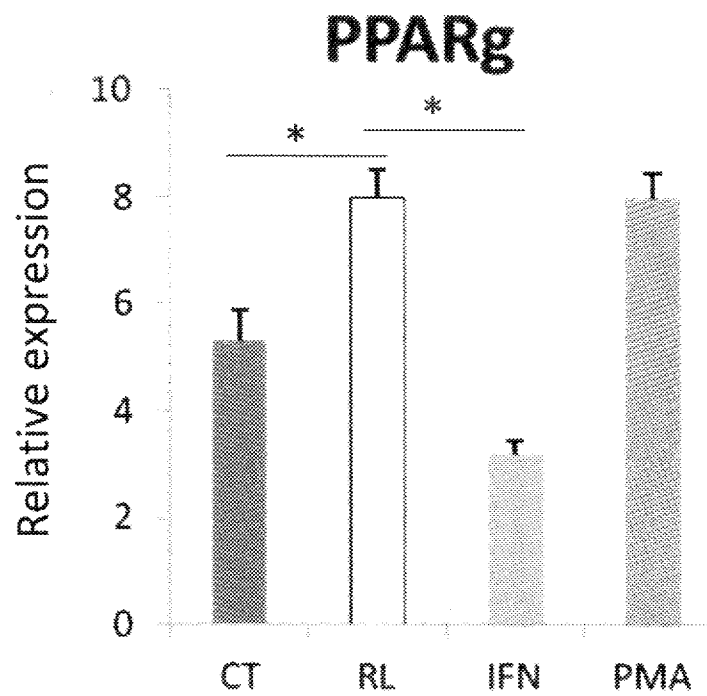
[図1]



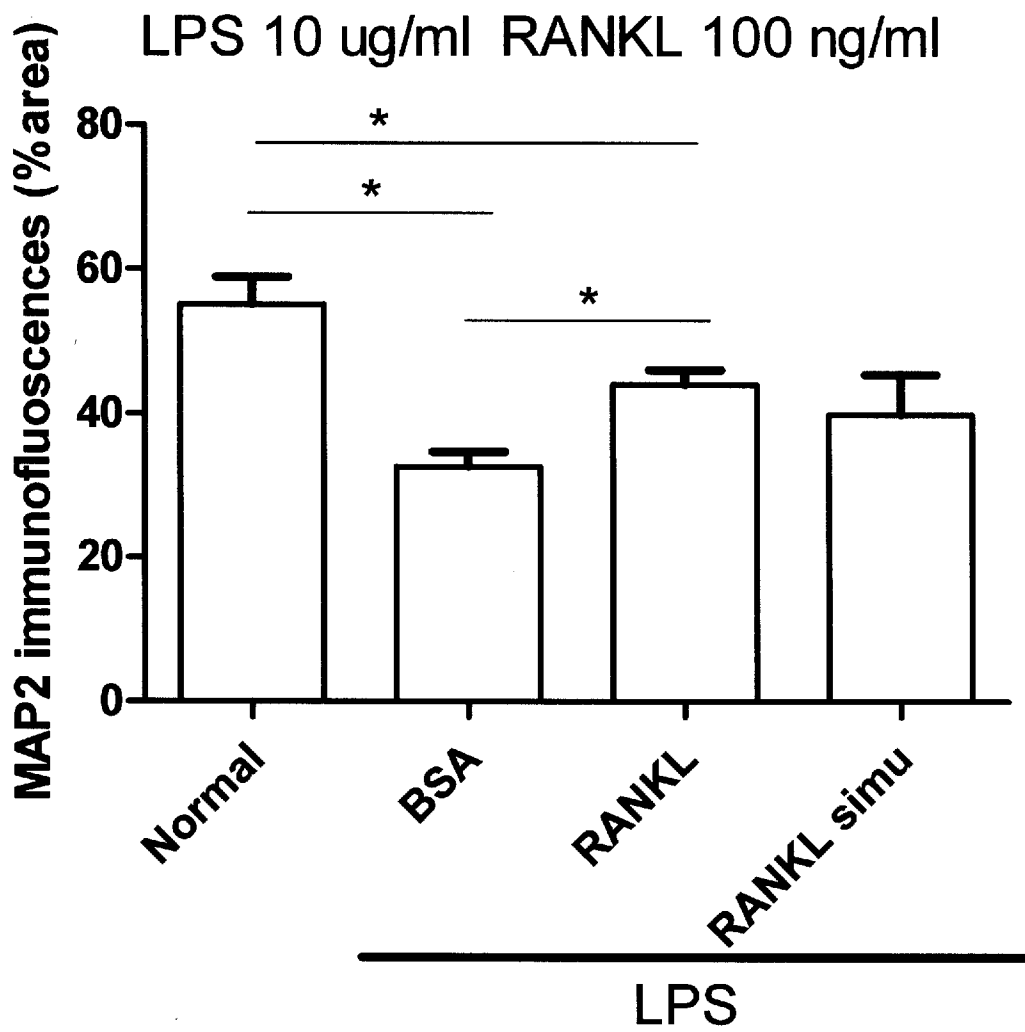
[図2]



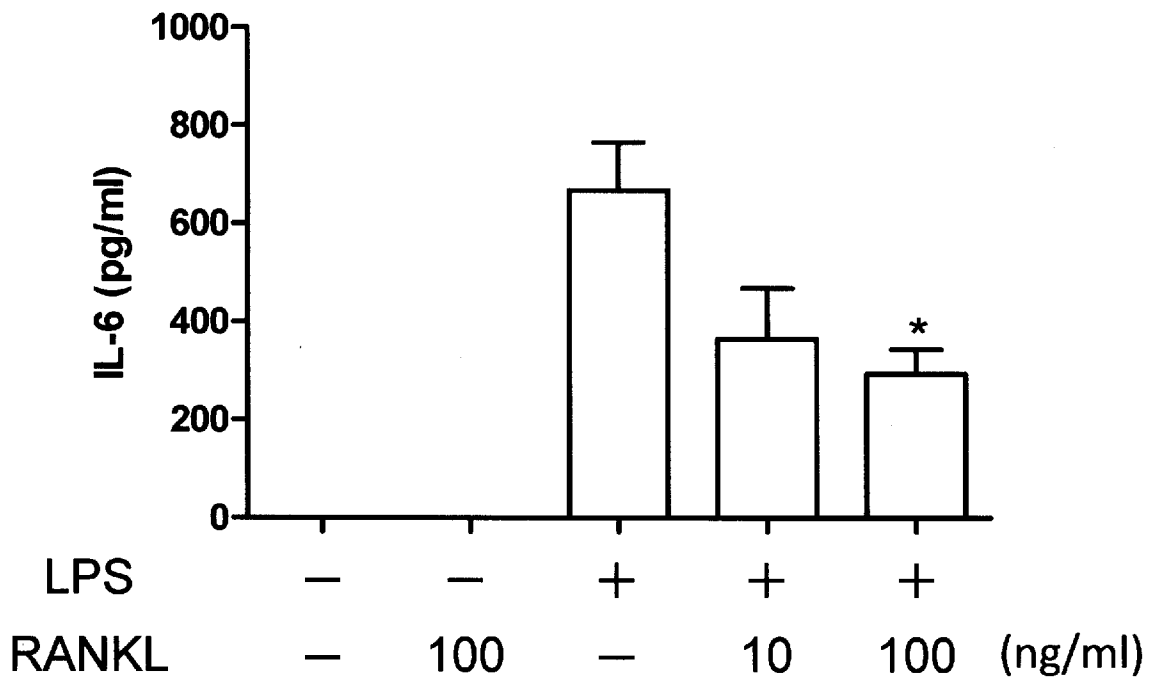
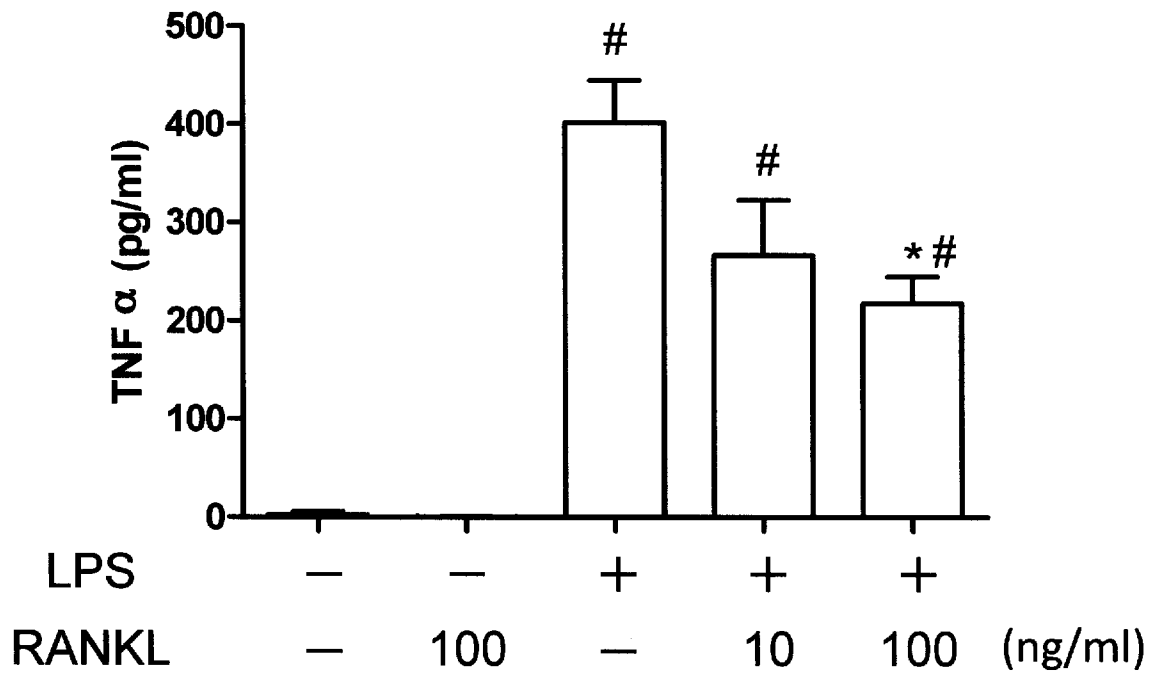
[図3]



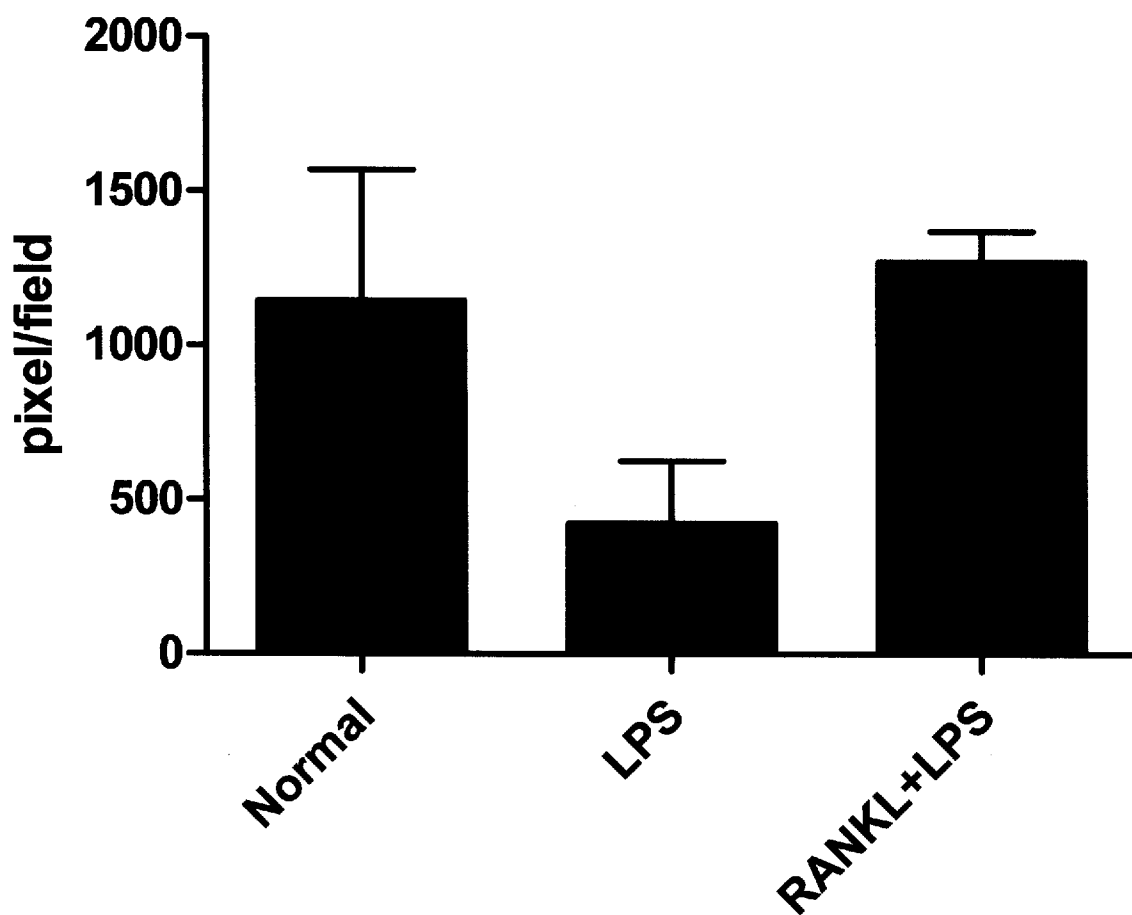
[図4]



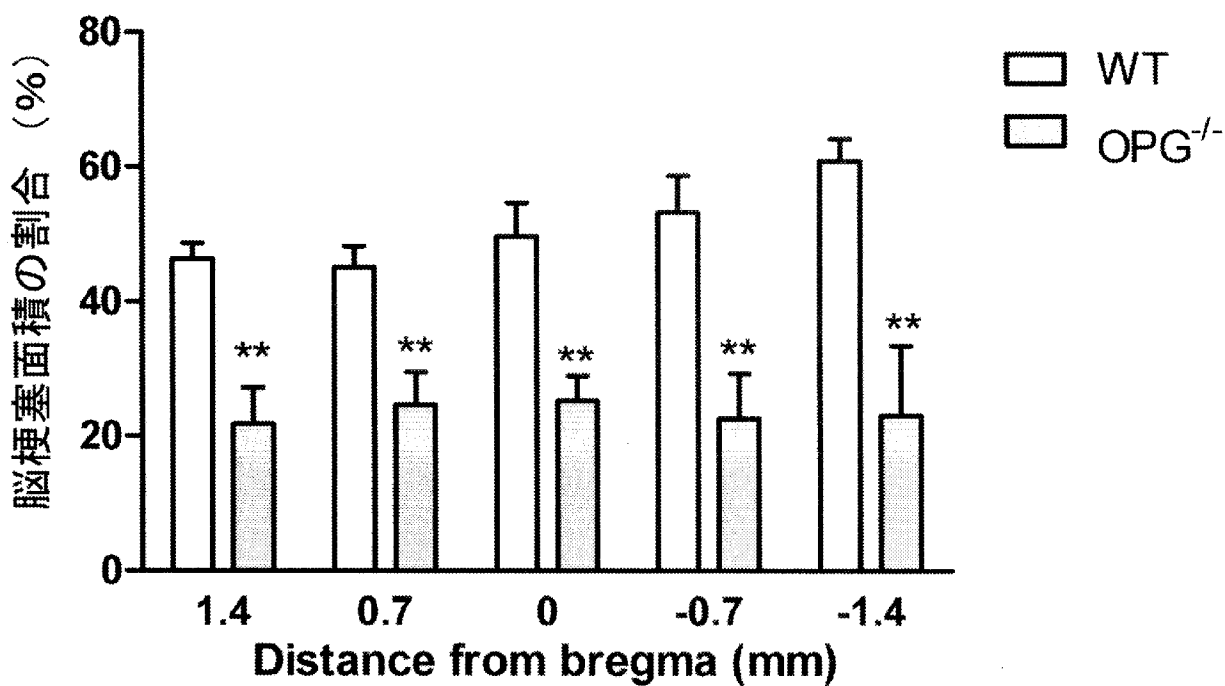
[図5]



[図6]

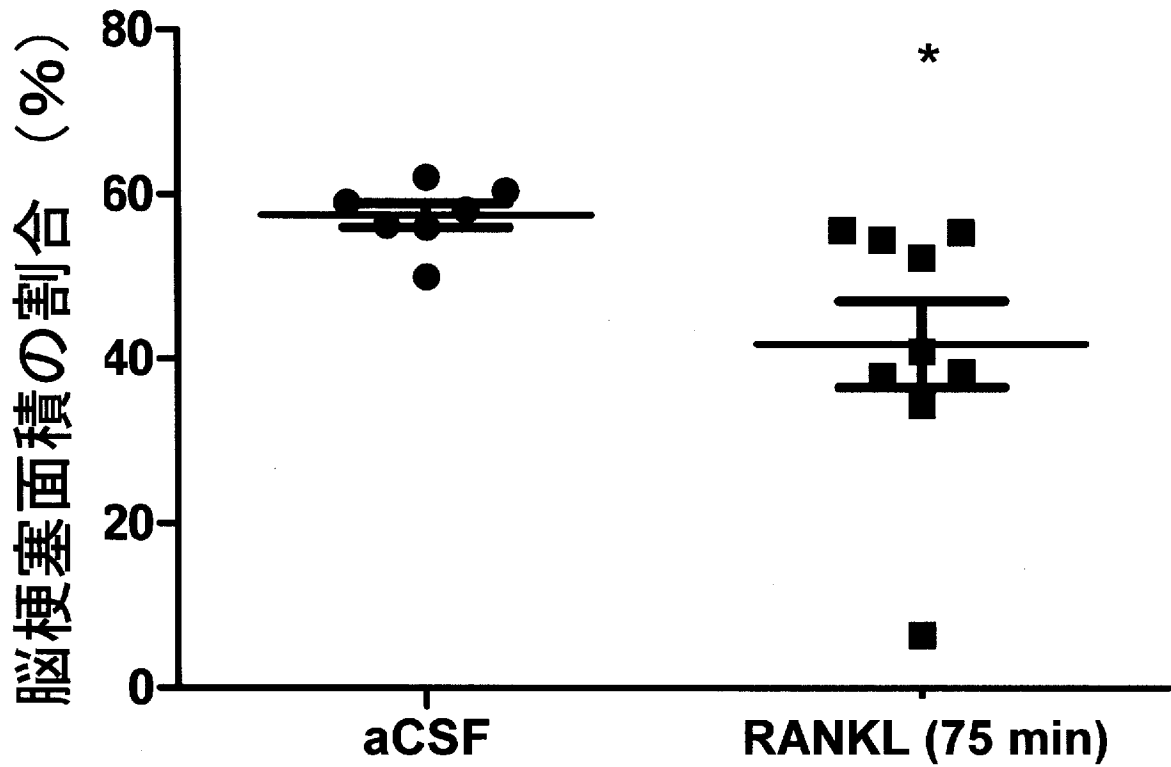


[図7]

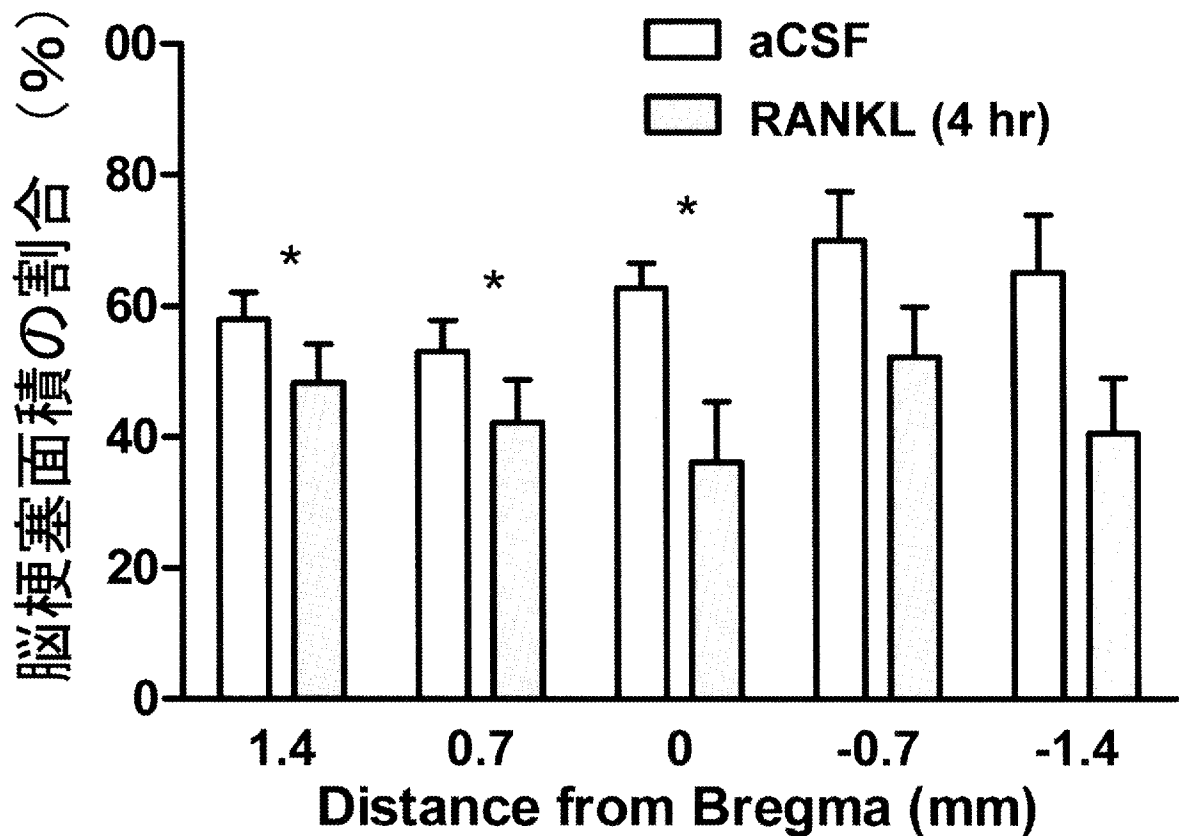


[図8]

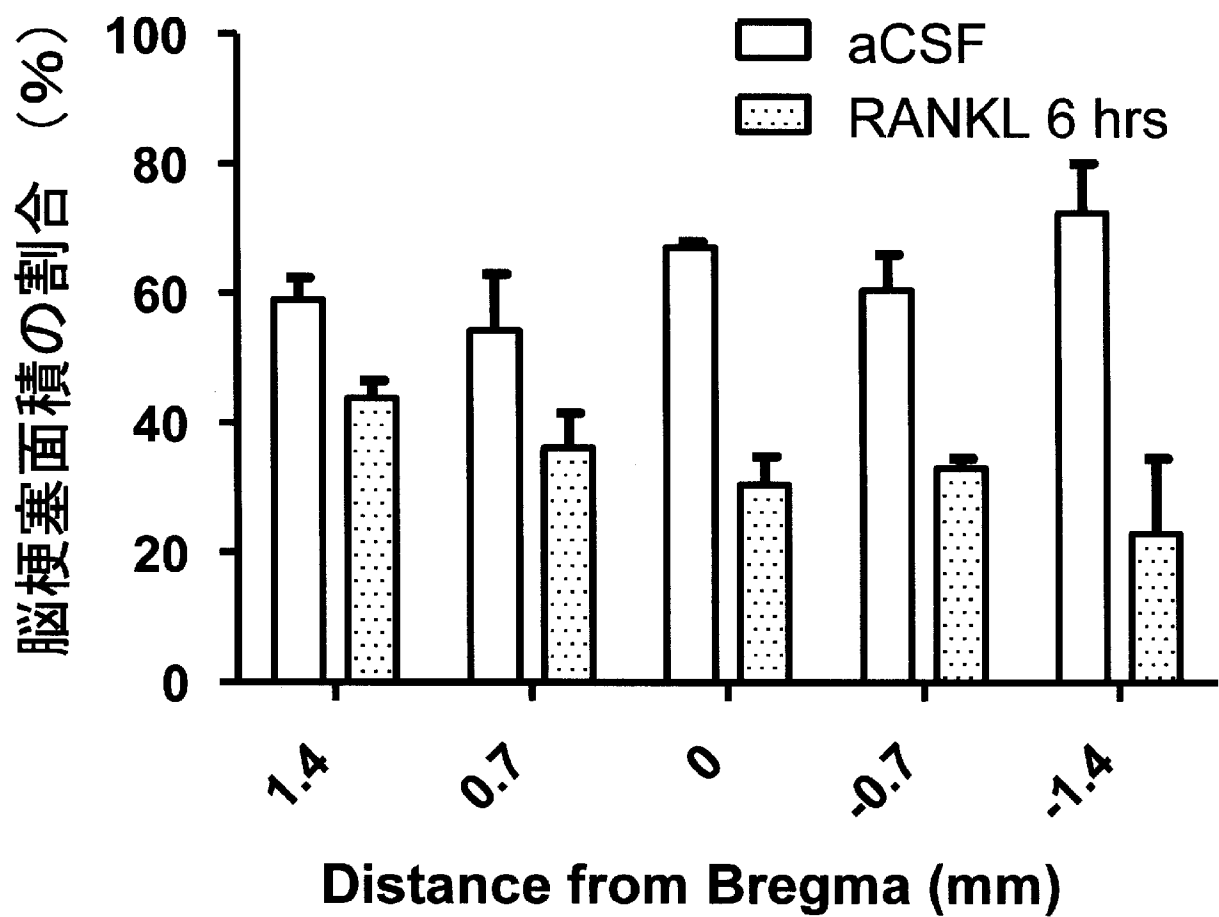
RANKL icv 2.5 ng/ μ l, icv (2 μ l)



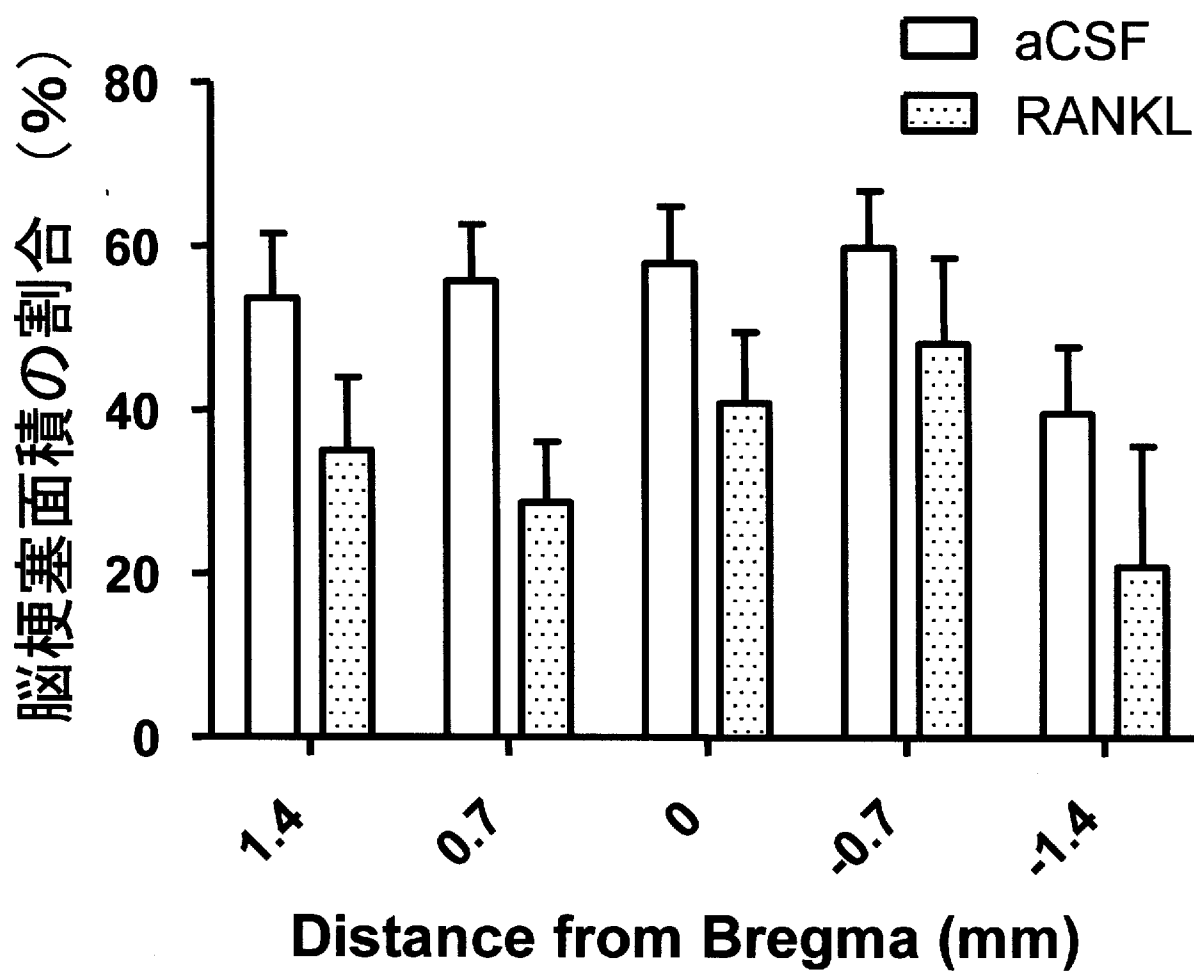
[図9]



[図10]



[図11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/051202

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K38/00(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P11/00(2006.01)i, A61P13/12(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)n

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)

A61K38/00, A61P9/00, A61P9/10, A61P11/00, A61P13/12, C07K14/47

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	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHAO,Z. et al, Effect of RANKL on transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells after cerebral ischemia in adult rats, Chin J Exp Surg, 2008, Vol.25, No.10, p.1289-1291, entire text, particularly, Abstract	1-7
X A	SAKAI,N. et al, Receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL) protects against hepatic ischemia/reperfusion injury in mice, Hepatology, 2012, Vol.55, No.3, p.888-97, entire text, particularly, Abstract	1,2,4-7 3
X Y	MARUYAMA,K. et al, Receptor activator of NF-κappa B ligand and osteoprotegerin regulate proinflammatory cytokine production in mice, J Immunol, 2006, Vol.177, No.6, p.3799-805, entire text, particularly, Abstract	7 1-6

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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 March, 2014 (24.03.14)

Date of mailing of the international search report
01 April, 2014 (01.04.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/051202

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	WO 2008/146753 A1 (Mitsubishi Tanabe Pharma Corp.), 04 December 2008 (04.12.2008), entire text; particularly, paragraphs [0003] to [0006] & US 2010/0179157 A1 & EP 2154135 A1 & CN 101679367 A & KR 10-2010-0022080 A	1-6 7
A	ZHAO, Yi. et al, Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma promotes neuroprotection by attenuation of neuronal cyclooxygenase-2 overexpression after focal cerebral ischemia in rats, The FASEB journal, 2006, Vol.20, p.1162-1175, entire text	1-7
P, X	SHIMAMURA, N. et al, "Nokosoku ni Okeru OPG/RANKL/RANK-kei no Kino Kaimei", Anti Aging Sci, 10 December 2013 (10.12.2013), vol.5, no.3, page 219, entire text	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/051202

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 involves "a diagnostic method practiced on the human body or animal body".
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.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K38/00(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P11/00(2006.01)i, A61P13/12(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)n

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. A61K38/00, A61P9/00, A61P9/10, A61P11/00, A61P13/12, C07K14/47

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	1971-2014年
日本国実用新案登録公報	1996-2014年
日本国登録実用新案公報	1994-2014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)

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	ZHAO, Z. et al, Effect of RANKL on transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells after cerebral ischemia in adult rats, Chin J Exp Surg, 2008, Vol.25, No.10, p.1289-1291 全文、特に、Abstract	1-7
X A	SAKAI, N. et al, Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) protects against hepatic ischemia/reperfusion injury in mice, Hepatology, 2012, Vol.55, No.3, p.888-97 全文、特に、Abstract	1, 2, 4-7 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

「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

24.03.2014

国際調査報告の発送日

01.04.2014

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)

関景輔

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

4U

3842

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
X Y	MARUYAMA, K. et al, Receptor activator of NF-kappa B ligand and osteoprotegerin regulate proinflammatory cytokine production in mice, J Immunol, 2006, Vol.177, No.6, p.3799-805 全文、特に、Abstract	7 1-6
Y A	WO 2008/146753 A1 (田辺三菱製薬株式会社) 2008.12.04, 全文、特に、段落[0003]-[0006] & US 2010/0179157 A1 & EP 2154135 A1 & CN 101679367 A & KR 10-2010-0022080 A	1-6 7
A	ZHAO, Yi. et al, Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma promotes neuroprotection by attenuation of neuronal cyclooxygenase-2 overexpression after focal cerebral ischemia in rats, The FASEB journal, 2006, Vol.20, p.1162-1175 全文	1-7
P, X	SHIMAMURA, N. et al, 脳梗塞における OPG/RANKL/RANK 系の機能解明, Anti Aging Sci, 2013.12.10, Vol.5, No.3, p.219 全文	1-7

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を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「人体又は動物の体の診断方法」を包含するものである。
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。