

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-332048

(P2007-332048A)

(43) 公開日 平成19年12月27日(2007.12.27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/203 (2006.01)	A 6 1 K 31/203	4 C 2 0 6
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 1/02	
審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 14 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-163070 (P2006-163070)	(71) 出願人	504159235 国立大学法人 熊本大学 熊本県熊本市黒髪二丁目39番1号
(22) 出願日	平成18年6月13日 (2006.6.13)	(74) 代理人	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
		(72) 発明者	磯濱 洋一郎 熊本県熊本市大江3丁目8-33-603
		(72) 発明者	宮田 健 熊本県熊本市月出8-3-59
		(72) 発明者	久恒 昭哲 熊本県熊本市新屋敷1丁目14-40-1 411
		(72) 発明者	野村 城司 熊本県熊本市九品寺3丁目12-3-20 5
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 アクアポリン5の発現亢進剤

(57) 【要約】

【課題】口渇、ドライアイ、鼻腔乾燥に伴う出血、皮膚乾燥による掻痒感、気道乾燥による咳及び痰、又は肺水腫などのアクアポリン5の機能異常に起因する疾患の予防及び/又は治療のための医薬として有用なアクアポリン5の発現亢進剤を提供すること。

【解決手段】レチノイン酸又はその塩を有効成分として含む、アクアポリン5の発現亢進剤。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

レチノイン酸又はその塩を有効成分として含む、アクアポリン 5 の発現亢進剤。

【請求項 2】

レチノイン酸又はその塩を有効成分として含む、アクアポリン 5 の機能異常に起因する疾患の予防及び / 又は治療のための医薬。

【請求項 3】

アクアポリン 5 の機能異常に起因する疾患が、水分代謝異常を伴う疾患、又は呼吸不全を伴う疾患である、請求項 2 に記載の医薬。

【請求項 4】

アクアポリン 5 の機能異常に起因する疾患が、口渇、ドライアイ、鼻腔乾燥に伴う出血、皮膚乾燥による掻痒感、気道乾燥による咳及び痰、又は肺水腫である、請求項 2 又は 3 に記載の医薬。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アクアポリン 5 の発現亢進剤、並びにアクアポリン 5 の機能異常に起因する疾患の予防及び / 又は治療のための医薬に関する。

【背景技術】

【0002】

外分泌腺からの水分分泌の不足は、口渇、ドライアイ、鼻腔乾燥に伴う出血、皮膚乾燥による掻痒感など様々な症状を引き起こし、QOLの著しい低下を引き起こす。これらの症状は、シェーグレン症候群の患者の代表的な症状であるが、健常者にもしばしば見られる。これらの外分泌機能異常に対する現行の治療は、人工涙や人工唾液により目や口腔の乾燥を防ぐのが一般的であり、これらの乾燥症状との共存を前提としている。

20

【0003】

アクアポリン (aquaporin: 以下 AQP と略することがある) は、アグレにより 1992 年に発見された膜 6 回貫通蛋白で、細胞内の水分量を調節する水チャネルとして機能する重要な蛋白である。アクアポリンは細菌から哺乳類に至るまで普遍的に存在しており、これまでに哺乳類で、AQP0 から AQP12 まで 13 種類のアクアポリンが確認されている。

30

【0004】

一般に外分泌腺の上皮細胞は、電解質の細胞外放出によって受動的に水分を放出しているが、細胞膜上に水チャネルアクアポリン 5 (aquaporin-5; AQP5) をもち、これを通じて水の透過速度を高め、分泌の効率化を行っている。従って、AQP5 の機能を亢進する薬物あるいはその発現を促進する薬物には、種々の乾燥症状を緩和する作用が期待できる。しかし、AQP 類には一般的なイオンチャネル類のような開閉機構がないと考えられており、機能亢進薬は理論的に難しい。また、AQP5 の発現を亢進する薬物も今までに全く知られていなかった。

【0005】

AQP 類の機能調節剤の例としては、特許文献 1 に、アクアポリン 5 を発現した細胞及びアクアポリン 4 を発現した細胞では、水分吸収がマンガンイオンの添加により抑えられることが記載されており、マンガンイオンを含むアクアポリン機能調節剤が開示されている。しかしながら、特許文献 1 には、アクアポリン 5 の発現を亢進する物質については何ら記載がない。

40

【0006】

【特許文献 1】特開 2005 - 325047 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

50

本発明は、口渇、ドライアイ、鼻腔乾燥に伴う出血、皮膚乾燥による掻痒感、又は肺水腫などのアクアポリン5の機能異常に起因する疾患の予防及び/又は治療のための医薬として有用なアクアポリン5の発現亢進剤を提供することを解決すべき課題とした。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、AQP5遺伝子の5'-末端プロモーターの機能解析に関する研究を行い、本遺伝子の転写調節にはSp1転写因子が重要であることを見出した。そこで、Sp1転写因子の活性化に繋がると想定される種々の刺激によるAQP5発現に対する作用を調べ、ビタミンAの活性代謝物であるレチノイン酸が著明にAQP5の遺伝子およびタンパク質発現を促進することを見出した。AQP5は上記の外分泌腺細胞だけでなく、肺胞内腔の大部分を占める肺胞I型上皮細胞にも多く存在しており、肺胞内滲出液のクリアランスにも関与すると考えられている。また、本発明者らは、AQP5が水だけでなくCO₂ガスの透過性をも亢進させることをアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた実験により見出している(2002年11月第55回日本薬理学会西南部会プログラム・講演要旨集 p68)。すなわち、AQP5の発現亢進物質は、水分代謝異常だけでなく、呼吸すなわちガス交換の効率化により、呼吸不全治療薬としても有用である。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

10

【0009】

即ち、本発明によれば、レチノイン酸又はその塩を有効成分として含む、アクアポリン5の発現亢進剤が提供される。

【0010】

本発明の別の側面によれば、レチノイン酸又はその塩を有効成分として含む、アクアポリン5の機能異常に起因する疾患の予防及び/又は治療のための医薬が提供される。

20

【0011】

好ましくは、アクアポリン5の機能異常に起因する疾患は、水分代謝異常を伴う疾患、又は呼吸不全を伴う疾患である。

好ましくは、アクアポリン5の機能異常に起因する疾患は、口渇、ドライアイ、鼻腔乾燥に伴う出血、皮膚乾燥による掻痒感、気道乾燥による咳及び痰、又は肺水腫である。

【0012】

本発明のさらに別の側面によれば、アクアポリン5の発現を亢進する方法であってレチノイン酸又はその塩を細胞に接触させる方法；及び、アクアポリン5の機能異常に起因する疾患の予防及び/又は治療方法であってヒトを含む哺乳類動物に有効量のレチノイン酸又はその塩を投与する工程を含む方法が提供される。

30

【0013】

本発明のさらに別の側面によれば、アクアポリン5の発現亢進剤を製造するためのレチノイン酸又はその塩の使用、及びアクアポリン5の機能異常に起因する疾患の予防及び/又は治療のための医薬を製造するためのレチノイン酸又はその塩の使用が提供される。

【発明の効果】

【0014】

本発明によりアクアポリン5の発現亢進に用いるためのレチノイン酸又はその塩が提供される。レチノイン酸又はその塩を有効成分として含むアクアポリン5の機能異常に起因する疾患の予防及び/又は治療のための医薬は、口渇、ドライアイ、鼻腔乾燥に伴う出血、皮膚乾燥による掻痒感、気道乾燥による咳及び痰、又は肺水腫などの、アクアポリン5の機能異常に起因する疾患の予防及び/又は治療のための医薬として有用である。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

細胞膜の水分輸送を促進する水チャネルの一種であるaquaporin 5 (AQP5) は、唾液腺、涙腺、汗腺および気管支腺を始めとした種々の腺組織に存在し、水の外分泌の効率化に関わっている。また、肺胞内腔の大部分を覆う肺胞I型上皮細胞にも発現しており肺胞内の水分のクリアランスにも関わっていると考えられている。従って、AQP5の発現量を増加

50

させる薬物は、例えばシェーグレン症候群の患者に生じるドライアイ、口渇などの種々の乾燥症状を緩和し、気道の滋潤化により咳や痰を鎮め、また肺水腫の治療に有効と考えられるが、これまでにAQP5の発現促進物質は知られていない。

【0016】

本発明では、マウス肺胞上皮細胞株 (MLE-12) を用いて、AQP5発現に対するレチノイン酸の効果およびその作用機序の解明を行った。その結果、AQP5 mRNAおよびタンパク質量はともにレチノイン酸の濃度 (0.01~10 μ M) および時間 (6~48時間) 依存的に増加した。ラットAQP5 プロモーターを用いたレポータージーンアッセイでも、レチノイン酸はAQP5のプロモーター活性を著明に亢進し、本作用がAQP5の転写促進に基づくと考えられた。レチノイン酸のAQP5プロモーター活性化作用はpromoter DNA配列上のSp1/Sp3 binding element (SBE) の変異により消失したことや、EMSA法により調べたSp1転写因子のDNA結合能が増加したことから、レチノイン酸がSp1転写因子を介してAQP5の転写を促進すると考えられた。しかし、核内のSp1およびSp3転写因子の量には著明な作用は認められず、レチノイン酸はSp1の活性を調節すると推定された。さらに、マウスに10 mg/kgのレチノイン酸を1日1回、5日間、腹腔内投与し、肺ホモジネート中のAQP5量を測定すると、著明な増加が生じた。上記の結果より、レチノイン酸が上記の種々の乾燥症状や肺水腫に対する治療薬として有用であることが実証された。また、AQP5類は水分子の他にCO₂ガスの透過をも亢進させることから、レチノイン酸を用いることにより生体におけるガス分子の代謝調節を行うことも可能である。

10

【0017】

本発明によるアクアポリン5の発現亢進剤、及びアクアポリン5の機能異常に起因する疾患の予防及び/又は治療のための医薬は、レチノイン酸又はその塩を有効成分として含む。

20

【0018】

本発明で用いるレチノイン酸はどのような形態でもよく、例えば、遊離した酸の形態でもよいし、又は塩の形態でもよい (以下、レチノイン酸という場合には、遊離した酸の形態でもよいし、又は塩の形態の両方を包含するものとする)。塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、又は亜鉛塩等が挙げられる。

【0019】

レチノイン酸はアクアポリン5の発現亢進作用を有するため、アクアポリン5の機能異常に起因する疾患の予防及び/又は治療のための医薬の有効成分として有用である。アクアポリン5の機能異常とは、健全な組織内の細胞のアクアポリン5の状態とは異なる病態下の組織内細胞でのアクアポリン5の状態をいい、アクアポリン5の機能減退、細胞におけるアクアポリン5の数の減少などを含む。

30

【0020】

アクアポリン5の機能異常に起因する疾患の例としては、例えば、水分代謝異常を伴う疾患、又は呼吸不全を伴う疾患を挙げることができ、より具体的には、口渇、ドライアイ、鼻腔乾燥に伴う出血、皮膚乾燥による掻痒感、気道乾燥による咳及び痰、又は肺水腫などを挙げることができる。しかしながら、本発明の医薬は、これらの用途のみに限定されず、AQP5の発現する組織や器官の疾病治療を目的とする医薬組成物として、ヒト又は動物に投与することができる。

40

【0021】

本発明の医薬は、経口で投与してもよいし、非経口で投与してもよい。投与剤型としては、例えば、注射剤、点眼液や眼軟膏等の点眼剤、粉末剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、及び錠剤等を挙げることができる。

【0022】

本発明の医薬は、例えば、患部に直接注射で投与する場合は、注射剤の1成分として、レチノイン酸を溶解した薬剤であることが好ましい。レチノイン酸を投与する際の注射剤は、生理食塩水を主成分とし、必要に応じて他の水溶性の添加剤、薬液等を配合したもの

50

を用いることができる。添加剤としては、例えば、カリウム、マグネシウム等のアルカリ金属イオン、乳酸、各種アミノ酸、脂肪、グルコース、フラクトース、サッカロース等の糖質等の栄養剤、ビタミンA、B、C、D等のビタミン類リン酸イオン、塩素イオン、ホルモン剤、アルブミン等の血漿蛋白、及び、デキストリン、ヒドロキシエチルスターチ等の高分子多糖類等を挙げることができる。

【0023】

本発明の医薬を点眼剤として投与する場合には、リン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム等の緩衝化剤、塩化ナトリウム等の等張化剤、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油等の界面活性剤、クエン酸ナトリウム等の安定化剤、塩化ベンザルコニウム等の防腐剤を適宜用いて製剤化することができる。点眼剤のpHは特に限定されないが、pH4～8程度が好ましい。

10

【0024】

本発明の医薬を、固形剤として生体に投与する場合の固形剤としては、粉末剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、及び錠剤等を挙げることができる。このような固形剤の中では、嚥下しやすい錠剤やカプセル剤が好ましい。本発明の医薬を錠剤とする場合の賦形剤及び結合剤としてはオリゴ糖等の公知のものを使用することができる。錠剤の直径は2～10mm、厚さは1～5mmの範囲にあることが好ましい。レチノイン酸を含む予防及び/又は治療薬は、他の薬剤と混合されていてもよい。

【0025】

固形剤には通常用いられる種々の添加剤を配合することができる。このような添加剤としては、例えば、安定剤、界面活性剤、可塑剤、甘味剤、抗酸化剤、着香剤、着色剤、及び保存剤等を挙げることができる。

20

【0026】

上記固形剤において、レチノイン酸の濃度は固形剤100重量%に対して0.01重量%以上、好ましくは0.1～10重量%であることが好ましい。

【0027】

また、本発明の医薬は、噴霧薬として生体に投与することができる。すなわち、レチノイン酸の粉体、水分散微粒子、又は有機溶媒分散体を気体の圧力で微細化して、鼻、気管内に投与することができる。噴霧薬として用いることのできる分散体は、例えば、レチノイン酸を溶媒に溶解したものを、水溶性高分子もしくは界面活性剤を含有する水と混合、又は水中に高速ミキサー等で攪拌混合し、さらに超音波により分散処理した後、溶媒を蒸発除去する方法により製造することができる。

30

【0028】

このような水分散体の調製に用いることのできる水溶性高分子としては、例えば、ポリアミドアミン、ポリビニルアルコール、ポリリンゴ酸、ポリ(-ヒドロキシアルキル)アクリレート及びメタクリレート、水酸基含有モノマー単位を含むコポリマー、ポリ-L-グルタミン酸、ポリ-L-アスパラギン酸等の合成水溶性ポリマー、デキストラン、キトサン、ペクチン、ヒアロン酸、セルロース、スターチ、プルラン、イヌリン、ヘパリン等の天然水溶性ポリマー等を挙げることができる。

【0029】

水分散体製造においては、好ましくは水中に界面活性剤を添加する。このような界面活性剤としては、高級脂肪酸石鹸；アルキル硫酸エステル塩、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩、アシルN-メチルタウリン塩、アルキルエーテルリン酸エステル塩、N-アシルアミノ酸塩等のアニオン界面活性剤；塩化アルキルトリメチルアンモニウム、塩化ジアルキルジメチルアンモニウム、塩化ベンザルコニウム等のカチオン界面活性剤；アルキルジメチルアミノ酢酸ベタイン、アルキルアミドジメチルアミノ酢酸ベタイン、2-アルキル-N-カルボキシ-N-ヒドロキシイミダゾリニウムベタイン等の両性界面活性剤；及びポリオキシエチレン型、多価アルコールエステル型、エチレンオキシド・プロピレンオキシドブロック共重合体等の非イオン界面活性剤等を挙げることができる。

40

【0030】

50

レチノイン酸を含む水分散体には、通常用いられる種々の添加剤を配合することができる。このような添加剤としては、例えば、安定剤、界面活性剤、可塑剤、甘味剤、抗酸化剤、着香剤、着色剤、乳化剤、及び保存剤等を挙げることができる。噴霧薬におけるレチノイン酸の濃度は、0.01~1000 mg/Lの範囲とすることが好ましい。

【0031】

本発明の医薬は、外用薬として例えば、乳液状、クリーム状もしくはジェル状の軟膏、又は貼付剤として患部に供することができる。該外用薬では、レチノイン酸以外に、油性原料、界面活性剤、無機充填剤、増粘剤、紫外線吸収剤、酸化防止剤、防腐剤、栄養剤、色剤、香料、美白剤、血行促進剤、局所刺激剤、抗炎症剤、収斂剤、清涼剤、肌荒れ防止剤、制汗剤、ビタミン類、ホルモン類、又は抗ヒスタミン剤等の各種薬剤を用途に応じて適宜配合することができる。

10

【0032】

上記の油性原料としては、例えば、オリーブ油、ツバキ油、マカデミアナッツ油、ヒマシ油等の油脂類；カルナバロウ、キャンデリラロウ、ホホバ油、ミツロウ、ラノリン等のロウ類；流動パラフィン、パラフィン、ワセリン、セレシン、マイクロクリスタリンワックス、スクワラン等の炭化水素類；脂肪酸類；セチルアルコール、ステアリルアルコール、イソステアリルアルコール、2-オクチルドデカノール等の高級アルコール；ミリスチン酸イソプロピル、ミリスチン酸2-オクチルドデシル、2-エチルヘキサノール酸セチル、リンゴ酸ジイソステアリル等のエステル類；及びシリコーン油等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

20

【0033】

上記の界面活性剤としては、例えば、高級脂肪酸石鹸；アルキル硫酸エステル塩、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩、アシルN-メチルタウリン塩、アルキルエーテルリン酸エステル塩、N-アシルアミノ酸塩等のアニオン界面活性剤；塩化アルキルトリメチルアンモニウム、塩化ジアルキルジメチルアンモニウム、塩化ベンザルコニウム等のカチオン界面活性剤；アルキルジメチルアミノ酢酸ベタイン、アルキルアミドジメチルアミノ酢酸ベタイン、2-アルキル-N-カルボキシ-N-ヒドロキシイミダゾリニウムベタイン等の両性界面活性剤；及びポリオキシエチレン型、多価アルコールエステル型、エチレンオキシド・プロピレンオキシドブロック共重合体等の非イオン界面活性剤が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

30

【0034】

上記の無機充填剤は、粘度調整、及び感触改良等の目的のため配合され、例えば、タルク、マイカ又は二酸化チタン等を用いることができる。

【0035】

上記の増粘剤としては、例えば、カルボキシセルロース、エチルセルロース、可溶性デンプン、ポリビニルアルコール、キサンタンガム、カラギーナン、ゼラチン、及びポリアクリル酸エステル共重合体等を挙げることができる。

【0036】

上記の紫外線吸収剤としては、例えば、パラアミノ安息香酸及びその誘導体、ブチルメトキシベンゾイルメタン、パラメトキシケイ皮酸誘導体、サリチル酸誘導体、ベンゾフェノン誘導体、イミダゾリン誘導体等を挙げることができる。

40

【0037】

上記の酸化防止剤としては、例えば、ブチルヒドロキシアニソール(BHA)、ブチルヒドロキシトルエン(BHT)、及びノルジヒドログアヤレチック酸(NDGA)等が挙げられる。

【0038】

上記の防腐剤としては、例えば、安息香酸及びその塩、サリチル酸及びその塩、デヒドロ酢酸及びその塩、ヘキサクロロフェン、ホウ酸、レゾルシン、ジnkピリチオン、ヒノキチオール等を挙げることができる。

【0039】

50

上記の栄養剤としては、ビタミンA及びその誘導体、ビタミンB類、ビタミンE類、ビタミンD類、ビタミンH、パントテン酸等の各種ビタミンやアミノ酸等を挙げることができる。

【0040】

上記の美白剤としては、例えば、液状ラノリン、コガネバナ根抽出エキス、トリアジン誘導体等のアスコルビン酸及びその誘導体、甘草エキス、茶抽出物、トコフェノール及びその誘導体、トラネキサム酸及びその塩、アズレン、 α -ヒドロキシ酪酸等を挙げることができる。

【0041】

血行促進剤としては、例えばニコチン酸アミド、グリチルレチン酸及びその誘導体、サポニン類、トラネキサム酸、セファランジン、センブリエキス等を挙げることができる。

【0042】

上記の局所刺激剤としては、例えば、トウガラシチンキ、カンタリスチンキ、ニコチン酸ベンジルエステル等を挙げることができる。

【0043】

上記の抗炎症剤としては、例えば、グリチルリチン酸誘導体、アズレン、アミノカプロン酸、ヒドロコルチゾン等を挙げることができる。

【0044】

上記の収斂剤としては、例えば、酸化亜鉛、硫酸亜鉛、塩化アルミニウム、タンニン酸、及び没食子酸等を挙げることができる。上記の清涼剤としては、例えばメントール、カンフル等を挙げることができる。

【0045】

本発明の医薬の投与量及び投与回数は特に限定されず、予防及び/又は治療の目的、疾患の種類、患者の体重や年齢、疾患の重篤度などの条件に応じて、適宜選択することができる。一般的には、経口投与における成人一日あたりの投与量は有効成分であるレチノイン酸の重量として0.1~1000 mg程度であり、一日1回又は数回に分けて、あるいは数日ごとに投与することができる。該医薬を注射剤として用いる場合には、成人に対して有効成分質量として、一日0.1~1000 mgを連続投与又は間欠投与することが望ましい。

【0046】

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【実施例】

【0047】

(A) 実験材料および方法

(1) 実験材料

マウス肺胞上皮細胞株MLE-12細胞は米国細胞バンクAmerican Type Culture Collection (ATCC)より入手した。培養には、10% 牛胎仔血清 (FBS) および抗生物質 (penicillin 100 unit/mL, streptomycin 100 μ g/mL) を含む培地DMEMを用い、炭酸ガス培養器内に5% CO₂、37℃下に静置培養した。なお、本実施例で用いたレチノイン酸はSigma社より購入したretinoic acid (Cat#: R2625)を用いた。ICR系雄性マウス(6週齢)は、日本チャールズリバー社より購入し、25℃下、自由飲水、自由摂食にて飼育した。

【0048】

(2) Cell lysateの調整およびWestern blotting

細胞をRIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% Deoxycholate, 1% proteinase inhibitor cocktail)により可溶化し、遠心 (14,000 xg, 4℃, 10 min) した上清を試料とした。各サンプルは12%アクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、PVDF膜に転写、5% スキムミルクを含むPBSで室温、1時間ブロッキングを行った。その後、0.1% Tweenを含むPBS (0.1% tween-PBS)で洗浄し、一次抗体 (抗AQP5抗体, Alomon社; 4 μ g/mL, 8時間) および二次抗体 (抗ウサギ抗体; 室温, 1時間) を行い、ECL western blotting detection reagent (Amersham社) を用いて免疫複合体

を化学発光させ、バイオイメージングアナライザー (LAS1000, Fuji Film社) により検出した。

【 0 0 4 9 】

(3) 総細胞RNAの抽出および RT-PCR法によるmRNAの検出

細胞からのRNAの抽出には、Trizol試薬(Gibco BRL社)を用いた。抽出操作は、全て本試薬のマニュアルに準じ、得られたRNAの収量および純度は260 nmおよび280 nmのUV吸収により算出し、OD260/OD280比が1.8以上の高純度のものだけを用いた。抽出したRNA 1 μgを鋳型とし、RNA PCR KIT Ver.2 (Takara社)を用いて、逆転写およびDNA増幅しAQP5および内部標準としてのGAPDHを検出した。本キットに含まれるoligo-dT プライマーを用いて、42、60分間反応させRNAをDNA化し、下記に示すプライマーを用いたDNA増幅反応によってAQP5および内部標準としてのGAPDHを増幅した。得られたDNA断片は、1.5%アガロースゲル電気泳動をethidium bromide 染色により可視化した。

10

【 0 0 5 0 】

AQP5 Forward ; 5'-GGC CAC ATC AAT CCA GCC ATT-3' (配列番号 1)

AQP5 Reverse ; 5'-GGC TGG GTT CAT GGA ACA GCC-3' (配列番号 2)

GAPDH Forward ; 5'-CGG GAA GCT TGT GAT CAA TGG-3' (配列番号 3)

GAPDH Reverse ; 5'-GGC AGT GAT GGC ATG GAC TG-3' (配列番号 4)

【 0 0 5 1 】

(4) AQP5プロモーター活性の測定

AQP5プロモーターは、ラットのゲノムよりLA Taq polymerase (Takara社)を用いたPCRによりクローニングした-160/+69の229 bp断片を用いた。クローニングしたゲノムDNA断片をpGL2 basic ベクター (Promega社) のルシフェラーゼ配列の上流に挿入した。プロモーター上に存在する Sp1結合部位の点変異体は、Quick change II XL site-directed mutagenesis kit (Stratagene社)を用いて作成した。

20

【 0 0 5 2 】

作成した各プロモーターを含むルシフェラーゼベクターは、TransFast試薬 (Promega社)を用いて、MLE-1細胞に導入した。12well培養皿上で、70-80%コンフルエントまで成育したMLE-12細胞に、遺伝子導入試薬Transfast (Promega社)を用いて1 μg/wellのDNAを導入し、さらに48時間培養後に細胞を可溶化しルシフェラーゼアッセイに供した。ルシフェラーゼアッセイには、Dual luciferase assay kit (Promega社)を用い、上記のルシフェラーゼ遺伝子導入時に非特異的プロモーターをもつphRL-TK (Renilla ルシフェラーゼをコードする遺伝子)を同時に導入し、内部標準とした。AQP5プロモーター活性は、ルシフェラーゼ / Renilla ルシフェラーゼ比として現し、この比の上昇をもって活性化亢進と見なした。

30

【 0 0 5 3 】

(5) 核タンパク質の抽出およびElectrophoretic mobility shift assay (EMSA)

レチノイン酸処理したMLE-12細胞をPBSで洗浄し、遠心 (1000 X g for 5 min, at 4 ° C) にて集め、100 μ lの緩衝液 (10 mM HEPES-KOH (pH 7.9), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM dithiothreitol, 1 mM sodium orthovanadate, 30 mM β -glycerophosphate and 1 %v/v protease inhibitor cocktail (Sigma)) に懸濁した。これを凍結後氷上で10分間溶かし、6 μ lの10% Nonidet P-40を加えてvortex mixerを用いて30秒間激しく攪拌した。その後、遠心 (15000 X g for 15 s, at 4 ° C) して、沈渣として得られた核に50 μ lの緩衝液 (20 mM HEPES-KOH (pH 7.9), 1.5 mM MgCl₂, 0.42 M NaCl, 0.2 mM EDTA (pH 8.0), 25% glycerol, 0.5 mM dithiothreitol, 1 mM sodium orthovanadate, 30 mM β -glycerophosphate and 1%v/v protease inhibitor cocktail) を加え、再び30秒間激しく攪拌した。その後、遠心 (15000 X g for 15 s, at 4 ° C) により上清を回収し、核抽出物とした。

40

【 0 0 5 4 】

Sp1転写因子のEMSAには、[γ -³²P] ATPでラベルしたSp1結合配列を含む oligo DNAを用いた。10 μ g の核抽出物に2 μ g の poly(dI-dC) · (dI-dC) (Amersham Pharmacia Biote

50

ch)、非標識oligo DNAおよびSp1抗体 (Santa Cruz Biotechnology社) を加え、10分間氷上で前処理した後に、標識 oligo DNA (5×10^4 cpm) を含む緩衝液 (10 mM HEPES-KOH (pH 7.9), 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM dithiothreitol and 10% glycerol) を加えて、10分間室温で反応させた。その後、反応液を4%ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動に供し、放射標識されたバンドをイメージアナライザーBAS2000 (Fiji Film社) で可視化した。

【0055】

7匹のマウスのうち4匹に10 mg/kgのレチノイン酸を、他の3匹には対照として8 ml/kgの sesame oilを1日1回、5日間、腹腔内投与した。5日目の投与から6時間後に、マウスより肺を摘出し、ポリトロンホモジナイザーを用いてホモジナイズし、遠心後 (600 xg, 10 min) 上清を採取して、上記のWestern blottingに供した。Western blottingにより得られたAQP5のバンドは、バイオイメージングアナライザー (LAS1000, Fuji Film社) により解析、各バンドの濃さを定量化した。これを基に、レチノイン酸投与群と対照群の各平均値と標準誤差を求めるとともに、Student's T-test 法により有意差の有無を統計的に判定した。

【0056】

(B) 実験結果

(1) 肺上皮細胞株MLE-12のAQP5 mRNA発現量に対するレチノイン酸の作用(図1)

MLE-12細胞の培養液に、レチノイン酸 (10 μ M) を加え、その後、6、12、24および48時間培養しRNAを抽出、上記のRT-PCRによりAQP5 mRNAを検出した(図1のA)。レチノイン酸は時間依存的にAQP5のmRNA量を増加させた。なお、各試料間のRNAが一定であることをGAPDH mRNAを同時に増幅、検出することにより確認した。

【0057】

また、レチノイン酸 (0.01, 0.1, 1あるいは10 μ M) をMLE-12細胞の培養液に加え、24時間後のAQP5 mRNAをRT-PCR法により調べた(図1のB)。レチノイン酸は、濃度依存的にAQP5 mRNA量を増加させた。

【0058】

これらの結果より、レチノイン酸はAQP5のmRNA発現を促進することが実証された。

【0059】

(2) 肺上皮細胞株MLE-12のAQP5 タンパク質発現量に対するレチノイン酸の作用(図2)

MLE-12細胞の培養液に、レチノイン酸 (10 μ M) を加え、その後、6、12、24および48時間培養しcell lysate を調製、上記のWestern blot法によりAQP5タンパク質を検出した(図2のA)。レチノイン酸は時間依存的にAQP5のタンパク質量を増加させた。なお、抗体反応の陽性対照として、ラット唾液腺のホモジネートを同時に処理した(Lane P)。なお、各試料間のタンパク質量が一定であることを β -actinの抗体を用いて確認した(panel 下段)。

【0060】

レチノイン酸 (0.01, 0.1, 1あるいは10 μ M) をMLE-12細胞の培養液に加え、24時間後のAQP5 タンパク量をWestern blot法により調べた(図2のB)。レチノイン酸は、濃度依存的にAQP5 タンパク質量を増加させた。なお、各試料間のタンパク質量が一定であることを β -actinの抗体を用いて確認した(panel 下段)。

【0061】

これらの結果より、レチノイン酸はAQP5のタンパク質量を増加させることが実証された。

【0062】

(3) レチノイン酸によるAQP5プロモーターの活性化にはSp1結合モチーフが必要である(図3)

AQP5プロモーター (-160/+69) および本プロモーターに含まれる三ヶ所のSp1/Sp3転写因子結合部位を点変異させたプロモーター (mut1, mut2およびmut3) を用いたルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイを行った。ルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入したML

10

20

30

40

50

E-12細胞にレチノイン酸(10 μ M)を加え、48時間後に、ルシフェラーゼ活性を測定した(図3)。AQP5プロモーター上には、レチノイン酸受容体の特異的結合配列はないが、AQP5プロモーター活性を著明に亢進した(-160/+69の実験結果より)。従って、レチノイン酸は、AQP5の転写を亢進することが実証された。

【0063】

レチノイン酸のプロモーター活性亢進作用はmut1およびmut3では野生型と同様に認められたが、mut2では消失した。

【0064】

これらの結果より、mut2部位に結合する転写因子すなわちSp1またはSp3がレチノイン酸によるAQP5の転写亢進作用に関与すると推定された。

10

【0065】

(4)レチノイン酸はSp1およびSp3の核内発現量に著明な影響を与えない(図4)

レチノイン酸(10 μ M)で48時間処理したMLE-12細胞から、上記の方法により各抽出物を調製し、これを試料としてSp1およびSp3転写因子の量をWestern blot法により調べた(図4)。レチノイン酸は、これらの転写因子の発現量に著明な影響を与えなかった。

【0066】

(5)レチノイン酸はSp1のDNA結合を促進する(図5)

レチノイン酸(10 μ M)で48時間処理したMLE-12細胞から、上記の方法により各抽出物を調製し、これを試料としてSp1/Sp3の結合配列をもつoligo DNAプローブを用いたEMSAを行った(図5)。MLE-12細胞の核抽出物には、Sp1およびSP3と考えられる2本のバンド(Panel A, で示した)が検出された。このうち、高分子側の主要なバンドはSp1抗体の処理によって消失し、本プロモーターに結合する主要な転写因子がSp1であると考えられた。細胞をレチノイン酸(10 μ M)で48時間処理すると、Sp1に相当するバンドが著明に増加した。(4)の実験結果と併せて考えると、レチノイン酸は、Sp1転写因子の量を変えなく、DNA結合能を増加させたと考えられた。

20

【0067】

(6)レチノイン酸はin vivoでマウス肺のAQP5発現量を増加させる(図6)

レチノイン酸10 mg/kgを1日1回5日間投与したマウス肺のAQP5発現量を、上記の方法により、対照としてsesame oilを投与したマウスと比較検討した(図6)。対照群のAQP5発現量の平均値を100%として表すと、レチノイン酸を投与したマウス肺のAQP5発現量は約140%に増加した。この増加は、Student's T-testにより危険率0.0018をもって有意な変化と判定された。

30

【0068】

これらの結果より、レチノイン酸はin vivoでもAQP5発現を亢進することが実証された。

【図面の簡単な説明】

【0069】

【図1】図1は、肺上皮細胞株MLE-12のAQP5 mRNA発現量に対するレチノイン酸の作用を示す実験結果である。

【図2】図2は、肺上皮細胞株MLE-12のAQP5 タンパク質発現量に対するレチノイン酸の作用を示す実験結果である。

40

【図3】図3は、レチノイン酸によるAQP5プロモーターの活性化にはSp1結合モチーフが必要であることを示す実験結果である。

【図4】図4は、レチノイン酸はSp1およびSp3の核内発現量に著明な影響を与えないことを示す実験結果である。

【図5】図5は、レチノイン酸はSp1のDNA結合を促進することを示す実験結果である。

【図6】図6は、マウス肺のAQP5タンパク質発現量に対する腹腔内投与したレチノイン酸の作用を示す実験結果である。

【配列表フリーテキスト】

【0070】

50

[配列表]

SEQUENCE LISTING

<110> Kumamoto University

<120> An agent for increasing expression of aquaporinn-5

<130> A61423A

<160> 4

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 1

ggccacatca atccagccat t

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

20

<400> 2

ggctgggttc atggaacagc c

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 3

cggaagcctt gtgatcaatg g

21

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

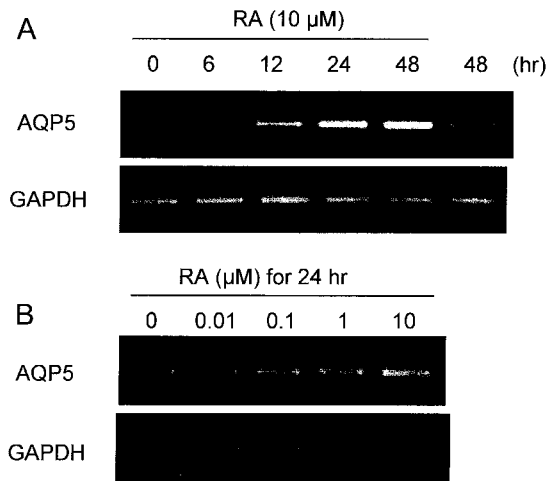
<400> 4

ggcagtgatg gcatggactg

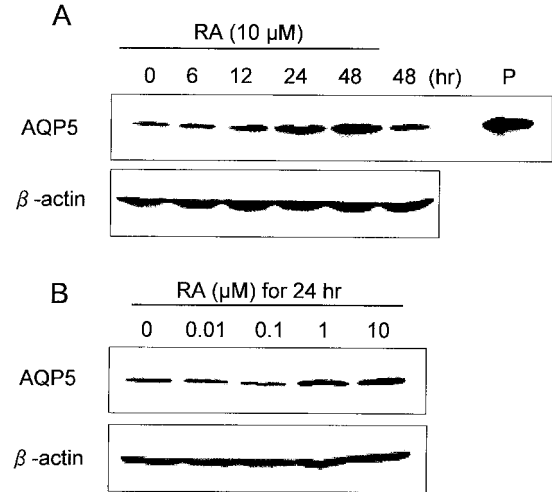
20

30

【 図 1 】



【 図 2 】

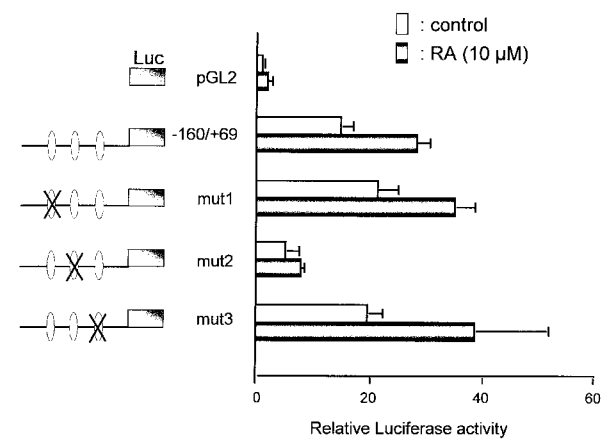


P: positive control
(rat salivary gland)

1. 肺上皮細胞株MLE-12のAQP5 mRNA発現量に対するレチノイン酸の作用

2. 肺上皮細胞株MLE-12のAQP5 タンパク質発現量に対するレチノイン酸の作用

【 図 3 】

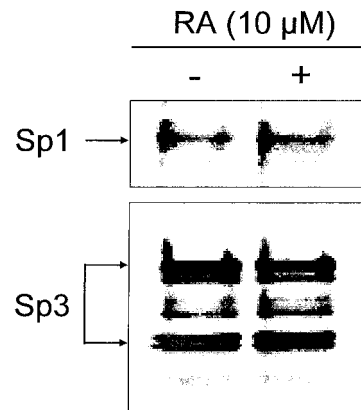


○: Sp1/Sp3 binding element (SBE)

X: mutated SBE

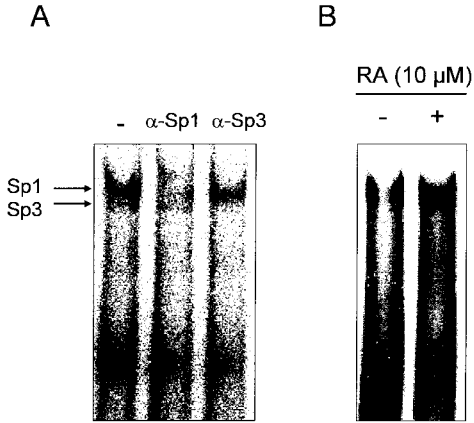
3. レチノイン酸によるAQP5プロモーターの活性化にはSp1結合モチーフが必要である。

【 図 4 】

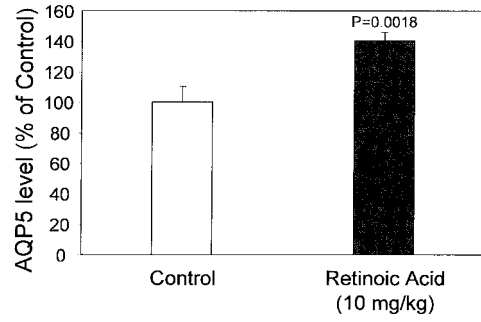


4. レチノイン酸はSp1およびSp3の核内発現量に著明な影響を与えない

【 図 5 】



【 図 6 】



6. マウス肺AQP5タンパク質発現量に対する腹腔内投与したレチノイン酸の作用.

5. レチノイン酸はSp1のDNA結合を促進する.

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 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02
A 6 1 P 11/02 (2006.01)	A 6 1 P 11/02
A 6 1 P 17/04 (2006.01)	A 6 1 P 17/04
A 6 1 P 11/10 (2006.01)	A 6 1 P 11/10
A 6 1 P 11/14 (2006.01)	A 6 1 P 11/14

Fターム(参考) 4C206 AA01 AA02 DA12 MA01 MA04 NA14 ZA33 ZA34 ZA59 ZA60
ZA62 ZA63 ZA67 ZA89 ZC21