

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5545211号
(P5545211)

(45) 発行日 平成26年7月9日(2014.7.9)

(24) 登録日 平成26年5月23日(2014.5.23)

(51) Int.Cl.		F I		
C 1 2 N	15/113	(2010.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A G
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 P	25/04	(2006.01)	A 6 1 P	25/04
A 6 1 K	31/713	(2006.01)	A 6 1 K	31/713

請求項の数 7 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2010-514435 (P2010-514435)	(73) 特許権者	504147243 国立大学法人 岡山大学 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号
(86) (22) 出願日	平成21年5月14日 (2009.5.14)	(74) 代理人	110000338 特許業務法人HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK
(86) 国際出願番号	PCT/JP2009/058996	(72) 発明者	板野 義太郎 日本国岡山県岡山市北区鹿田町二丁目5番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内
(87) 国際公開番号	W02009/145067	(72) 発明者	松岡 義和 日本国岡山県岡山市北区鹿田町二丁目5番1号 国立大学法人岡山大学岡山大学病院内
(87) 国際公開日	平成21年12月3日 (2009.12.3)		
審査請求日	平成24年5月10日 (2012.5.10)		
(31) 優先権主張番号	特願2008-136880 (P2008-136880)		
(32) 優先日	平成20年5月26日 (2008.5.26)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 疼痛の治療剤およびその利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の(a)~(g)のいずれか1つの塩基配列からなる、ポリヌクレオチド:

- (a) 配列番号18に示される、塩基配列;
- (b) 配列番号18に示される塩基配列の部分配列でありかつ配列番号13、15および16に示される塩基配列の少なくとも1つを含んでいる、塩基配列;
- (c) 配列番号19に示される、塩基配列;
- (d) 配列番号19に示される塩基配列の部分配列でありかつ配列番号21~23に示される塩基配列の少なくとも1つを含んでいる、塩基配列;
- (e) 配列番号20に示される、塩基配列;
- (f) 配列番号20に示される塩基配列の部分配列でありかつ配列番号24~26に示される塩基配列の少なくとも1つを含んでいる、塩基配列; ならびに
- (g) 配列番号13、15、16、21~26のいずれか1つに示される塩基配列。

【請求項2】

以下の(I)~(VI)のいずれかである、ポリヌクレオチド:

- (I) 配列番号18に示される塩基配列に対して1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されている塩基配列またはその部分配列からなり、配列番号13、15および16に示される塩基配列の少なくとも1つを含んでいる、ポリヌクレオチド;
- (II) 配列番号18に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るポリヌクレオチドであって、配列番号13

10

20

、 15 および 16 に示される塩基配列の少なくとも 1 つを含んでいる、ポリヌクレオチド ;

(I I I) 配列番号 19 に示される塩基配列に対して 1 もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されている塩基配列またはその部分配列からなり、配列番号 21 ~ 23 に示される塩基配列の少なくとも 1 つを含んでいる、ポリヌクレオチド ;

(I V) 配列番号 19 に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドにストリンジентな条件下でハイブリダイズし得るポリヌクレオチドであって、配列番号 21 ~ 23 に示される塩基配列の少なくとも 1 つを含んでいる、ポリヌクレオチド ;

(V) 配列番号 20 に示される塩基配列に対して 1 もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されている塩基配列またはその部分配列からなり、配列番号 24 ~ 26 に示される塩基配列の少なくとも 1 つを含んでいる、ポリヌクレオチド ; ならびに

(V I) 配列番号 20 に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドにストリンジентな条件下でハイブリダイズし得るポリヌクレオチドであって、配列番号 24 ~ 26 に示される塩基配列の少なくとも 1 つを含んでいる、ポリヌクレオチド

ただし、以下の (V I I) ~ (I X) のいずれかであるポリヌクレオチドを除く :

(V I I) 以下の塩基配列からなるポリヌクレオチド :

ggatcctccc ctccctagcct atacctcttc gctcagagat ctagggctcg cagggcggac cttagctgcac aca
gaggctg ttaactctca ttgagaagc cataagccat tagagcaaac gcagtcataa ctccattcaa ctcaag
ccgc ttgagagctt ggcttacacc ggttcctgtg ggcaactagt ggctcgcccg ggtgcctctc gcttagtca
t cagtccttaa gaggaagagg gaaagtgtg gggctgatgc gctcttcgat tcacgcagtt gttccctaga a
caagtcact cctgctccat caccctccc cccccattt gatcatcact cagcaccacg tccgctggag accc
ttagtc atggtagggg aggggcacga acttttctaa gaagtttctt tttaccaag ggagtcacag tgagttg
gtc acgtaactgg cttagagagg ctgccctggc cccctcccc cgccccctcc ccccgcccc tcgctgctgcg
cttttctggt attcttatta aagcggtagc cggctgggtg aggaaagcaa caagttcccc agcgggtctc cc
gccctagc ctgacaaggc gaagcttttc ttacctggcg acagggaaat ctcttagacc gagctcatct ttgcc
acagc cccaggtgtg acctgagcag tgggcaaagg agcggcgtgc aaattggatt atttgtatgg gggtagtc
tg aaactccctc acttttctg ggaacttttt gtgctagggc gcagtgacag gcgttgagaa agctgcttca
ggaacgccc gctatatagc agggcagttg gacagtcatt ggtaacctcg ctattcatt agaatcacgt aag
aactcaa agggaaacgt gtctctcaga atgagggcgt ttgcgtaa atctatagttt ttcaacatcg atgcca
gttg ctttgtcttc tgtaatcgcc aaggtggatg agagtgaag cttgcgatat tgctttgggt tattagatt
c ataagtcaca ccaagtgtg ggcgatccac tgagcaaagc caacttctca catgatgact tcaacaaga c
acattacct tccagcatct gttggggaga cgagatttta agacactgag tctccaggac agcaaagcca caat
ggtgag tagcaataaa cctgcattha taattgaaaa aaaatcttga catgttgctt aacaacaggc atatcac
ggc tcttcttagc acttcacacg ccaaagaaca gcagctattc aggccagggg atcgggttta cccactgcaa
ctttaattgg aatcatttga gatttaatac agcagcatga tactggcgtg gaacaaactt gggactggag gg
ggtgtta tactggcttt tcaaagctga tgcttgtctg acaaccgtct tgtattgcat tctttgcttt actgt
atggt gtgtgagcat attgtatgat ttatatgtgg gcatataatt gacatccgca aggggggttaa tttcaatc
ta aaaacattaa tgttcttaga gtttggggct aggggttga gagggtaaga gtggagtaga gactaagagt
ttaggtgagg ataggggtg agttagggg agagaggaat aagtcagaag tgcctatcta taatgaaatg ggt
aatgctc tcatacatgg aaagggtctc atcaacatgt gtacaactat taacaggatg gctttggcaa agccat
ccgc acgtgacaaa acgtaaggaa gtggaagaaa ccgtctagag caatatcaag taccattaa ttagagaat
a ttttttaac ctttctctc tgctgcgccg ggtgtgtgat ccgggcgagc agagtccatt cagcacctg g
acagagcca gcggatttgt ccgaggtggt agtacttcat ccaggtattc ttttctcgc tgcagcca accc
ggtgtc gcccttaaaa agcgtctttt ccgaggttcg gctcactg agatcggggc tggagagaga gtcagat
ttt ggagcggagc gtttgagag ccagccccag ttgggtcccc tcattgagct cgctgaagtt ggcttctag
cgggttaggc tggaaatagac tcttggcaag ctccgggttg gtatactggg ttaactttgg gaaatgcaag tg
tttatctc caggatctag ccaccgggt ggtgtaagcc gaaagaagg taagcaccgg ggcggggacc ctgca
tcccc aattcttgag ctattttgat actcgaatct ccggaaagga cgcgtagtgg agcggaggaa gtggaggg
ag agcctgagaa atggttgttt ctgggtattt gtctagaaat ttaagacctt ggtgagaacc tggggcaaat
cgaggttggg gaagctcaag ctt ;

10

20

30

40

50

(V I I I) 以下の塩基配列からなるポリヌクレオチド :

ggatcctccc ctccctagcct atacctcttc gctcagagat ctagggctcg cagggcggac ctagctgcac aca
gaggctg ttaactctca ttgagaagc cataagccat tagagcaaac gcagtcataa cticattca ctcaag
ccgc ttgagagctt ggcttacacc ggctcctgtg ggcaactagt ggctcgcccg ggtgcctctc gcctagtca
t cagtccttaa gaggaaaagg gaaagtgtg gggctgatgc gctcttcgat tcacgcagtt gttccctaga a
caagtcact cctgctccat caccctccc cccccattt gatcatcact cagcaccacg tccgctggag accc
ttagtc atggtggggg aggggcacga acttttctaa gaagtttctt tttaccaag ggagtcacag tgagttg
gtc acgtaactgg ctcaagagag ctgccctggc cccctcccc cgccccctcc ccccgcccc tcgctgctgc
ctttctgggt attcttatta aagcggtagc cggctggtgc aggaaagcaa caagttcccc agcgggtctc cc
gccctagc ctgacaaggc gaagcttttc ttacctggcg acagggaaat ctctgagcc gagctc ; および

10

(I X) 以下の塩基配列からなるポリヌクレオチド。

ggatcctccc ctccctagcct atacctcttc gctcagagat ctagggctcg cagggcggac ctagctgcac aca
gaggctg ttaactctca ttgagaagc cataagccat tagagcaaac gcagtcataa cticattca ctcaag
ccgc ttgagagctt ggcttacacc ggctcctgtg ggcaactagt ggctcgcccg ggtgcctctc gcctagtca
t cagtccttaa gaggaaaagg gaaagtgtg gggctgatgc gctcttcgat tcacgcagtt gttccctaga a
caagtcact cctgctccat caccctccc cccccattt gatcatcact cagcaccacg tccgctggag accc
ttagtc atggtggggg aggggcacga acttttctaa gaagtttctt tttaccaag ggagtcacag tgagttg
gtc acgtaactgg ctcaagagag ctgccctggc cccctcccc cgccccctcc ccccgcccc tcgctgctgc
ctttctgggt attcttatta aagcggtagc cggctggtgc aggaaagcaa caagttcccc agcgggtctc cc
gccctagc ctgacaaggc gaagcttttc ttacctggcg acagggaaat ctctgagcc gagctcatct ttgcc
acagc cccaggtgtg acctgagcag tgggcaaagg agcggcgtgc aaattggatt atttgtatgg gggactc
tg aaactccctc acttttctg ggaacttttt gtgctagggc gcagtgacag gcgttgagaa agctgcttca
ggaaacgccc gctatatagc agggcagttg gacagtcatt ggtaacctcg ctattcatt agaatcacgt aag
aactcaa agggaaacgt gtctctcaga atgagggcgt ttgcgtaa atctatagttt ttcaacatcg atgcca
gttg ctttgtcttc tgtaatcgcc aaggtggatg agagtgaag ctt

20

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチドと、該ポリヌクレオチドと対合するポリヌクレオチドとを含む、二本鎖ポリヌクレオチド。

【請求項 4】

請求項 1 もしくは 2 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 3 に記載の二本鎖ポリヌクレオチドを含有している、疼痛の治療剤。

30

【請求項 5】

発症前の疼痛を予防するための、請求項 4 に記載の治療剤。

【請求項 6】

発症後の疼痛を予防するための、請求項 4 に記載の治療剤。

【請求項 7】

請求項 1 もしくは 2 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 3 に記載の二本鎖ポリヌクレオチドを備えている、疼痛の治療用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、疼痛を治療するための技術に関するものであり、より詳細には、疼痛の治療に使用し得るポリヌクレオチドおよびその利用に関するものである。

【背景技術】

【0002】

痛みは持続期間によって、急性疼痛と慢性疼痛に分類される。急性疼痛は組織障害に伴う痛みでその持続期間は限られる。慢性疼痛は組織障害の治癒後にも続き、はっきりとした器質的原因を有さないことが多い。慢性疼痛における急性増悪期の痛みは急性疼痛と類似しており、内因性発痛物質が深く関わると考えられている。慢性疼痛として、交通事故または手術後の後遺症、末期癌または糖尿病などの堪え難い慢性的な痛みが挙げられる。

50

また、痛みは原因によって、侵害受容性疼痛、神経因性疼痛、心因性疼痛に分類される。これらの独立した痛みは時間の経過とともに徐々に融合し、分類が困難な慢性の難治性疼痛となる。

【0003】

神経因性疼痛 (neuropathic pain) は1994年のIASP (International Association for the Study of Pain) の慢性痛分類において、末梢神経および中枢神経の障害または機能異常による難治性の痛みであると定義されている。神経因性疼痛は、末梢神経および中枢神経系の圧迫、変性、損傷に起因しているが、単一の病理学的プロセスでは説明し得ない複雑な症候群から成り立っており、その発生機序はまだ解明されていない。よって、神経因性疼痛に関する治療効果に基づく指針も、一部を除いて有効性が保障されていない。

10

【0004】

神経因性疼痛は、創傷などによる初期の痛み (急性痛) とは異なり、創傷が治癒した後新たに発生する痛みである。神経因性疼痛としては、通常であれば痛みを引き起こさない程度の刺激によっても激しい痛みを誘発する症状 (「アロディニア」とよばれる。) が知られている。急性痛に対して有効な非ステロイド系消炎鎮痛剤および麻薬系鎮痛薬などは、神経因性疼痛には効果を示さず、神経因性疼痛に対する決定的な治療法は未だ知られていない。神経因性疼痛を抑制することができれば、臨床面において患者の肉体的苦痛の緩和およびQOLの向上をもたらすことが可能となる。

【0005】

末梢に加えた痛みは、後根神経節 (dorsal root ganglion: DRG) に存在する知覚神経 (一次ニューロン) を通じて脊髄後角に伝達され、脊髄後角I層およびII層に存在する二次ニューロンにシナプスを介して伝えられ、二次ニューロンはその信号を中枢 (脳) に伝達する。末梢からの知覚信号は、その大部分が第4、第5DRGを経て脊髄後角に伝えられるので、本発明者らはラットの脊髄第5腰神経のDRG末梢側を結紮した慢性疼痛モデル、および、アレルギー反応を引き起こす結核菌の死菌 (Complete Freund's Adjuvant: CFA) をラットの足底に注射した急性疼痛モデルを作製し、DRGでのイベントを詳細に解析した。その結果、CFA刺激によって、シナプス伝達を補完および増強する役割を担っている脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor: BDNF) のmRNAの発現量が増加していること、特にエクソン1バリエーションが顕著に増加している

20

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】 Kobayashi et al., Brain Res. 1206, 13-19 (2008)

【非特許文献2】 Aid et al., J. Neurosci. Res. 85, 525-535 (2007)

【非特許文献3】 Yang et al., Cancer Res. 65, 219-225 (2005)

【発明の概要】

【0007】

しかしながら、刺激の結果として、BDNFのエクソン1バリエーションの発現量の増加が導かれることは示されたものの、疼痛の発生機序および疼痛を抑制するための技術は未だ不明である。

40

【0008】

本発明は、上記の問題点に鑑みてなされたものであり、その目的は、疼痛を抑制するための技術を提供することにある。

【0009】

BDNFは脊髄での痛みの伝達を増強する働きを有している可能性があることから、この発現を抑制すれば痛みを抑え得るかもしれない。すなわち、一次ニューロンで合成されるBDNFを抑えることができれば末梢にて加えた痛みが軽減されるかもしれない。しかし、全身性にBDNFを抑制してしまうと、中枢における記憶、学習能力が低下し、全て

50

の神経活動に支障をきたし、ひいては神経変性疾患を引き起こしてしまうと考えられる。よって、全身性のBDNF抑制を引き起こすことなく、一次ニューロンでのBDNF合成を抑制する技術が求められる。しかし、末梢でのBDNFの発現を抑制した技術はこれまでに知られていない。

【0010】

本発明者らはBDNFの遺伝子構造に注目した。BDNFの詳細な遺伝子構造は2007年にタリン大学のTimmuskらのグループによって明らかにされており、8つのイントロンを挟んで9つのエクソンから成り立っている（非特許文献2参照）。タンパク質をコードする翻訳領域は主にエクソン9であり、異なる転写制御を受けて異なるバリエーションを発現すると考えられている。バリエーションは組織、細胞特異的に発現しているため、痛みを伝える神経に特異的なバリエーションが存在すれば、そのバリエーションだけを抑制することにより、副作用を軽減しつつ痛みを軽減し得ると考えた。

10

【0011】

本発明者らはさらに、ラットの脊髄第5腰神経DRGの末梢側を結紮した慢性痛モデルを用いて、末梢の神経組織であるDRGにおいて結紮刺激に強く反応して発現が増加するのはエクソン1バリエーションであることを見出した（非特許文献1参照）。

【0012】

これまでに得られた自身の成果を基に、本発明者らは鋭利努力を重ねた結果、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明に係るポリヌクレオチドは、以下の(a)~(g)のいずれか1つの塩基配列からなるポリヌクレオチドであることを特徴としている：(a)配列番号18に示される、塩基配列；(b)配列番号18に示される塩基配列の部分配列でありかつ配列番号13、15および16に示される塩基配列の少なくとも1つを含んでいる、塩基配列；(c)配列番号19に示される、塩基配列；(d)配列番号19に示される塩基配列の部分配列でありかつ配列番号21~23に示される塩基配列の少なくとも1つを含んでいる、塩基配列；(e)配列番号20に示される、塩基配列；(f)配列番号20に示される塩基配列の部分配列でありかつ配列番号24~26に示される塩基配列の少なくとも1つを含んでいる、塩基配列；ならびに(g)配列番号13、15、16、21~26のいずれか1つに示される塩基配列。

20

【0013】

本発明に係るポリヌクレオチドはまた、以下の(I)~(VI)のいずれかであることを特徴としている：(I)配列番号18に示される塩基配列に対して1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されている塩基配列またはその部分配列からなり、配列番号13、15および16に示される塩基配列の少なくとも1つを含んでいる、ポリヌクレオチド；(II)配列番号18に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るポリヌクレオチドであって、配列番号13、15および16に示される塩基配列の少なくとも1つを含んでいる、ポリヌクレオチド；(III)配列番号19に示される塩基配列に対して1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されている塩基配列またはその部分配列からなり、配列番号21~23に示される塩基配列の少なくとも1つを含んでいる、ポリヌクレオチド；(IV)配列番号19に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るポリヌクレオチドであって、配列番号21~23に示される塩基配列の少なくとも1つを含んでいる、ポリヌクレオチド；(V)配列番号20に示される塩基配列に対して1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されている塩基配列またはその部分配列からなり、配列番号24~26に示される塩基配列の少なくとも1つを含んでいる、ポリヌクレオチド；ならびに(VI)配列番号20に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るポリヌクレオチドであって、配列番号24~26に示される塩基配列の少なくとも1つを含んでいる、ポリヌクレオチド。

30

40

【0014】

本発明に係る二本鎖ポリヌクレオチドは、上記ポリヌクレオチドと、該ポリヌクレオチ

50

ドと対合するポリヌクレオチドとを含むことを特徴としている。

【0015】

本発明に係る治療剤は、疼痛を治療するために、上記ポリヌクレオチドまたは二本鎖ポリヌクレオチドを含有していることを特徴としている。本発明において、疼痛の治療は、発症前に予防的に行われるものであっても発症後に治療的に行われるものであってもよい。

【0016】

本発明に係る治療用キットは、疼痛を治療するために、上記ポリヌクレオチドまたは二本鎖ポリヌクレオチドを備えていることを特徴としている。本発明において、疼痛の治療は、発症前に予防的に行われるものであっても発症後に治療的に行われるものであってもよい。

10

【0017】

本発明に係る治療方法は、疼痛を治療するために、上記ポリヌクレオチドまたは二本鎖ポリヌクレオチドを被験体に投与する工程を包含することを特徴としている。本発明において、疼痛の治療は、発症前に予防的に行われるものであっても発症後に治療的に行われるものであってもよい。

【0018】

本発明を用いれば、BDNFのエクソン1バリエーションの発現を抑制し得る。さらに、本発明を用いれば、疼痛を抑制し得る。

【0019】

本発明の他の目的、特徴、および優れた点は、以下に示す記載によって十分分かるであろう。また、本発明の利点は、添付図面を参照した次の説明によって明白になるであろう。

20

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】BDNF遺伝子の構造および構築したレポータープラスミドの概略を示す図である。

【図2】構築したレポータープラスミドを用いて調べたプロモーター活性を示す図である。

。

【図3】合成した二本鎖ポリヌクレオチドの配列を示す図である。

30

【図4】合成した二本鎖ポリヌクレオチドを用いて調べたプロモーター活性を示す図である。

【図5】本発明に係るポリヌクレオチドを用いる治療レジメンの概略を示す図である。

【図6】本発明に係るポリヌクレオチドによるBDNFのエクソン1バリエーションの発現抑制効果を示す図である。

【図7】本発明に係るポリヌクレオチドを用いる治療レジメンの概略を示す図である。

【図8】本発明に係るポリヌクレオチドによる疼痛抑制効果を示す図である。

【図9】本発明に係るポリヌクレオチドによる慢性疼痛抑制効果を示す図である。

【図10】本発明に係るポリヌクレオチドによる慢性疼痛抑制効果を示す図である。

【図11】本発明に係るポリヌクレオチドによる慢性疼痛抑制効果を示す図である。

40

【図12】本発明に係るBDNFプロモーター領域の二本鎖ポリヌクレオチドの配列を示す図である。

【図13】本発明に係る二本鎖ポリヌクレオチドを用いて調べたプロモーター活性を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0021】

〔1〕機能性ポリヌクレオチド

本発明者らは、実施例にて後述するように、BDNFのエクソン1のプロモーター領域3種を取得した後、S3-A52と称した領域（配列番号1および4）がその全体にわたってプロモーター活性を有していること、特にS3-S4領域（配列番号18、20）が

50

強いプロモーター活性を有していることを見出した。さらに、S3 - S4領域の中でも、C領域、E領域およびF領域（配列番号13、15、16、24～26）は、BDNFのエクソン1バリエーションの発現を抑制し得、かつ疼痛を抑制し得るDNAを提供し得た。

【0022】

本発明は、疼痛を治療するための機能性ポリヌクレオチドを提供する。本発明に係る機能性ポリヌクレオチドは、BDNFのエクソン1バリエーションの発現を抑制し得る。また、本発明に係る機能性ポリヌクレオチドを用いて作製したDNAによって、疼痛抑制効果が実証された。

【0023】

本明細書中で使用される場合、「機能性ポリヌクレオチド」は「BDNFのエクソン1バリエーションに特異的なポリヌクレオチド」が意図される。本発明に係る機能性ポリヌクレオチドは、後述するポリヌクレオチド（第1のポリヌクレオチド）と、該ポリヌクレオチドと対合する第2のポリヌクレオチドとからなる二本鎖ポリヌクレオチドであることが好ましいが、第1のポリヌクレオチドまたは第2のポリヌクレオチドだけであってもよい。また、生体内で分解されにくい態様にて第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドとを含んでいてもよい。このような態様は、当該分野において公知である。さらに、第1のポリヌクレオチドおよび/または第2のポリヌクレオチドが挿入されたベクターとして提供されてもよい。

【0024】

本明細書中で使用される場合、用語「ポリヌクレオチド」は、「遺伝子」、「核酸」または「核酸分子」と交換可能に使用され、ヌクレオチドの重合体が意図される。本明細書中で使用される場合、用語「塩基配列」は、「核酸配列」または「ヌクレオチド配列」と交換可能に使用され、デオキシリボヌクレオチド（A、G、CおよびTと省略される。）またはリボヌクレオチド（A、G、CおよびUと省略される。）の配列として示される。

【0025】

ポリヌクレオチドは、短いものはジヌクレオチド（二量体）、トリヌクレオチド（三量体）といわれ、長いものは30マーまたは100マーというように重合しているヌクレオチドの数で表される。本発明に係るポリヌクレオチドは、より長いポリヌクレオチドのフラグメントとして生成されても、化学合成されてもよい。

【0026】

本発明に係る機能性ポリヌクレオチドは、RNA（例えば、mRNA、siRNA、RNAi、microRNA）の形態、またはDNAの形態（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）で存在し得る。DNAまたはRNAは、一本鎖または二本鎖であり得る。DNAまたはRNAは、コード鎖（センス鎖としても知られる）であり得るか、または、非コード鎖（アンチセンス鎖としても知られる）であり得る。

【0027】

本発明に係る機能性ポリヌクレオチドは、当該分野において公知の任意の手法に従って容易に作製され得、例えば、化学合成されても、組換え発現されてもよい。また、このような機能性ポリヌクレオチドは生体内での分解抑制のため、または、生体内での安定性を促進するために化学修飾されてもよい。

【0028】

本発明に係る機能性ポリヌクレオチドは、20～300塩基長であることが好ましく、25～200塩基長であることがより好ましく、30～100塩基長であることがさらに好ましい。本発明に係る機能性ポリヌクレオチドが二本鎖である場合、二本鎖を形成する一对のポリヌクレオチドは完全に対合している必要はなく、ミスマッチなどの不對部分が存在してもよい。また、二本鎖ポリヌクレオチドは、その末端部分が突出していてもよく、突出している場合は、機能性ポリヌクレオチドとしての機能を阻害しない程度の塩基数であれば特に限定されない。また、本発明に係る機能性ポリヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖のDNAまたはRNAであり得、BDNFのエクソン1バリエーションの発現を特異的に阻害し得るポリヌクレオチドであれば、DNA鎖とRNA鎖による二本鎖

10

20

30

40

50

、またはDNAとRNAの混在型ポリヌクレオチドでもよい。

【0029】

1つの局面において、第1のポリヌクレオチドは、(i) 配列番号18に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド、であることを特徴としている。他の局面において、第1のポリヌクレオチドは、(ii) 配列番号13、15および16の少なくともいずれか1つに示される塩基配列からなるポリヌクレオチド、であることを特徴としている。

【0030】

また、S3-S4領域からなるポリヌクレオチドの効果を、C領域、E領域およびF領域からなるポリヌクレオチドが維持していることから、S3-S4領域からなるポリヌクレオチドのフラグメント(部分断片)であってもC領域、E領域およびF領域の少なくともいずれか1つの塩基配列を含むものもまた、本発明の範囲内に含まれ得ることを、本明細書を読んだ当業者は容易に理解する。すなわち、第1のポリヌクレオチドは、(iii) 配列番号18に示される塩基配列の部分配列でありかつ配列番号13、15および16に示される塩基配列の少なくとも1つを含んでいる塩基配列からなるポリヌクレオチド、でもあり得る。

【0031】

さらに、S3-S4領域からなるポリヌクレオチドにおいて、C領域、E領域およびF領域の少なくともいずれか1つの塩基配列が保持されていれば、それ以外の領域の塩基配列が多少異なってもよいことを、本明細書を読んだ当業者は容易に理解する。すなわち、第1のポリヌクレオチドは、(iv) 配列番号18に示される塩基配列に対して1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されている塩基配列またはその部分配列からなり、配列番号13、15および16に示される塩基配列の少なくとも1つを含んでいるポリヌクレオチド、あるいは、(v) 配列番号18に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るポリヌクレオチドであって、配列番号13、15および16に示される塩基配列の少なくとも1つを含んでいるポリヌクレオチドであり得る。

【0032】

BDNFのエクソン1のプロモーター領域は、ラット、ヒトおよびマウスの間で高度に保存されている。上述したS3-AS2と称した領域、S3-S4領域、ならびにC領域、E領域およびF領域について、ヒトにおいてもラットと同様の効果が示されている。すなわち、1つの局面において、第1のポリヌクレオチドは、(i)' 配列番号20に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド、であることを特徴としている。他の局面において、第1のポリヌクレオチドは、(ii)' 配列番号24~26の少なくともいずれか1つに示される塩基配列からなるポリヌクレオチド、であることを特徴としている。なおさらに、第1のポリヌクレオチドは、(iii)' 配列番号20に示される塩基配列の部分配列でありかつ配列番号24~26に示される塩基配列の少なくとも1つを含んでいる塩基配列からなるポリヌクレオチド、でもあり得、(iv)' 配列番号20に示される塩基配列に対して1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されている塩基配列またはその部分配列からなり、配列番号24~26に示される塩基配列の少なくとも1つを含んでいるポリヌクレオチド、あるいは、(v)' 配列番号20に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るポリヌクレオチドであって、配列番号24~26に示される塩基配列の少なくとも1つを含んでいるポリヌクレオチドであり得る。

【0033】

また、マウスにおいても同様の効果が期待できる。1つの局面において、第1のポリヌクレオチドは、(i)'' 配列番号19に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド、であることを特徴としている。他の局面において、第1のポリヌクレオチドは、(ii)'' 配列番号21~23の少なくともいずれか1つに示される塩基配列からなるポリヌクレオチド、であることを特徴としている。なおさらに、第1のポリヌクレオチドは、(iii)'' 配列番号19に示される塩基配列の部分配列でありかつ配列番号21~23に示される塩基配

10

20

30

40

50

列の少なくとも1つを含んでいる塩基配列からなるポリヌクレオチド、でもあり得、(iv) ' ' 配列番号19に示される塩基配列に対して1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されている塩基配列またはその部分配列からなり、配列番号21~23に示される塩基配列の少なくとも1つを含んでいるポリヌクレオチド、あるいは、(v) ' ' 配列番号19に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るポリヌクレオチドであって、配列番号21~23に示される塩基配列の少なくとも1つを含んでいるポリヌクレオチド、であり得る。

【0034】

実施例にて後述するように、C領域、E領域およびF領域(配列番号13、15、16)は、BDNFのエクソン1バリエーションの発現を抑制し得、かつ疼痛を抑制し得るDNAを提供し得た。疼痛を抑制し得るC領域、E領域およびF領域からなるポリヌクレオチドがエクソン1バリエーションの発現を抑制し得る効果を維持していることと同様に、S3-AS4、S4-AS5、S5-AS2領域からなるポリヌクレオチドのフラグメント(部分断片)であってもエクソン1バリエーションの発現を抑制し得る効果を維持していること(実施例にて後述)より、S3-AS4、S4-AS5、S5-AS2領域からなるポリヌクレオチドのフラグメントも本発明の範囲内に含まれ得ることを、本明細書を読んだ当業者は容易に理解する。

10

【0035】

本発明に係る機能性ポリヌクレオチドは、上記構成を有することにより、BDNFのエクソン1バリエーション以外のバリエーションの発現を阻害することなく、BDNFのエクソン1バリエーションの発現を特異的に阻害し得るDNAまたはRNAを提供することができる。

20

【0036】

ハイブリダイゼーションは、Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1989)に記載されている方法のような周知の方法に従って行われ得る。通常、温度が高いほど、塩濃度が低いほどストリンジェンシーは高くなり(ハイブリダイズし難くなる)、より相同なポリヌクレオチドを取得することができる。適切なハイブリダイゼーション温度は、塩基配列やその塩基配列の長さによって異なり、例えば、アミノ酸6個をコードする18塩基からなるDNAフラグメントをプローブとして用いる場合、50以下の温度が好ましい。

30

【0037】

本明細書中で使用される場合、用語「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は、ハイブリダイゼーション溶液(50%ホルムアミド、5xSSC(150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH7.6)、5xデンハート液、10%硫酸デキストラン、および20µg/mlの変性剪断サケ精子DNAを含む)中にて42で一晩インキュベーションした後、約65にて0.1xSSC中でフィルタを洗浄することが意図される。ポリヌクレオチドの「一部」にハイブリダイズするポリヌクレオチドによって、参照のポリヌクレオチドの少なくとも約15ヌクレオチド(nt)、そしてより好ましくは少なくとも約20nt、さらにより好ましくは少なくとも約30nt、そしてさらにより好ましくは約30ntより長いポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチド(DNAまたはRNAのいずれか)が意図される。このようなポリヌクレオチドの「一部」にハイブリダイズするポリヌクレオチドは、検出用プローブとしても有用である。

40

【0038】**〔II〕疼痛の治療**

本発明は、疼痛を治療する技術を提供する。より詳細には、本発明は、上述した機能性ポリヌクレオチドを含有している、疼痛の治療剤を提供する。また、本発明は、上述した機能性ポリヌクレオチドを備えている、疼痛の治療用キットを提供する。さらに、本発明は、上述した機能性ポリヌクレオチドを被験体に投与する工程を包含する、疼痛の治療方法を提供する。本明細書中で使用される場合、用語「治療」は、症状の軽減または排除が

50

意図され、予防的（発症前）または治療的（発症後）に行われ得るもののいずれもが包含される。

【0039】

本発明を用いて治療する対象は、疼痛を発症する疾患であれば特に限定されないが、好ましくは、神経因性疼痛あるいはCRPS（complex regional pain syndrome：複合性局所痛症候群）などに分類される、PHN（Post-Herpetic Neuralgia：带状疱疹後神経痛）、三叉神経痛、カウザルギー視床痛、糖尿病性ニューロパチーや、さらに慢性疼痛の側面を有する癌性疼痛、整形外科的慢性痛（脊柱管狭窄症、変形性脊椎症、頸肩腕痛など）や手術後痛など難治性の疼痛疾患であり得る。投与部位もまた特に限定されないが、好ましくは、脊髄クモ膜下投与あるいは後根神経節直接注入であり得る。

10

【0040】

本発明に係る治療剤は、上述した機能性ポリヌクレオチドを活性成分として含有している組成物であり、その目的、成分などに応じて、緩衝液および/または補助剤などの当業者に公知の任意の成分を含有している。また、本発明に係る治療用キットは、上述した機能性ポリヌクレオチドを、主要コンポーネントとして備えているキットであり、その目的、成分などに応じて、緩衝液および/または補助剤などの当業者に公知の任意の成分をさらなるコンポーネントとして備えている。本明細書中で使用される場合、「組成物」は一物質中に複数の成分が含有されている態様が意図され、このような複数の成分が個々の物質として分離して提供される場合は、「キット」として認定され得る。用語「キット」は、特定の材料を内包する容器（例えば、ボトル、プレート、チューブ、ディッシュなど）を備えた包装が意図される。好ましくは該材料を使用するための指示書を備える。本明細書中においてキットの局面において使用される場合、「備えている」は、キットを構成する個々の容器のいずれかの中に内包されている状態が意図される。また、本発明に係るキットは、一組成物中の成分を別々に備えているキットであっても、複数の組成物を備えているキットであってもよい。

20

【0041】

一般的な治療剤の投与方法としては、局所投与および全身投与の二通りが考えられる。しかし、疼痛治療のためにBDNFを抑制しようと試みても、全身のBDNFを全て抑制することによる副作用が生じる可能性は高いと思われる。したがって、通常容易に想定されえるBDNF抑制技術を疼痛治療に適用する場合、抑制されるBDNFの範囲を限定する必要がある。本発明に係る治療剤を用いれば、以下の(1)～(2)に示すとおり、いずれの投与方法も可能である：

30

(1) ヒトのDRGは直径1cm程度であるので、DRGへの局所投与により機能性ポリヌクレオチドの直接導入を容易に行い得る。また、病的な痛みを伝えている神経の近傍にカテーテルを挿入し、本発明に係る治療剤を長期にわたって持続的に投与することも可能である。

(2) BDNFバリエーションの発現は、組織特異的または細胞特異的な発現機構によって制御されている。また、BDNFは神経細胞特異的であるので、神経細胞以外の細胞に対して本発明に係る治療剤は無害であると考えられ、痛みの刺激がない場合の神経細胞内ではBDNFの発現は非常に低いので本発明に係る治療剤が他のバリエーションの発現に影響を与える可能性は低いと考えられる。よって、本発明に係る機能性ポリヌクレオチドを全身投与しても、疼痛を発症している標的組織のみでのノックダウンが可能となると考えられる。

40

【0042】

本発明に係る治療剤の導入方法としては、ポリヌクレオチド溶液として導入する方法、transfection試薬を用いて導入する方法、ウイルス（例えば、ヘルペスウイルス、アデノウイルスなど）を用いて導入する方法が挙げられるがこれらに限定されない。

【0043】

本発明は上述した各実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせ

50

得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

【0044】

また、本明細書中に記載された学術文献および特許文献の全てが、本明細書中において参考として援用される。

【実施例】

【0045】

〔実施例1：転写調節領域の同定〕

ヒト、ラット、マウスのBDNFエクソン1上流の塩基配列をアライメントして、相同性が保存されている場所を見出した。ヒト、ラット、マウス間で共通する領域にプライマーS3、S4、S5、AS2（配列番号7～10）を設定し、ヒトおよびラットのBDNFエクソン1のプロモーター領域をPCRで増幅した後、長さの異なる3種のプロモーター領域を取得した（配列番号1；ヒトS3-AS2、配列番号2；ヒトS4-AS2、配列番号3；ヒトS5-AS2、配列番号4；ラットS3-AS2、配列番号5；ラットS4-AS2、配列番号6；ラットS5-AS2）。シーケンス解析により得られたプロモーター領域の塩基配列に変異がないことを確認した。各プロモーターをホタルルシフェラーゼレポータープラスミドpGL4.14（Promega社）に挿入した（図1）。各プロモーターを有しているホタルルシフェラーゼレポータープラスミド（0.18μg）と、導入効率補正用のウミシタケルシフェラーゼレポータープラスミドpTK-hRG（0.02μg）を、トランスフェクション試薬Effectene（QIAGEN社）を用いてラットグリオーマ細胞株C6細胞に導入した。コントロールとして、プロモーターを有していないpGL4.14ベクターを用いた。導入72時間後にDual-Luciferaseアッセイ（Promega社）を行った。各プロモーターのホタルルシフェラーゼ活性値を、インターナルコントロールであるウミシタケルシフェラーゼ活性値で除することにより、トランスフェクション時の細胞導入効率を補正した。少なくともS3とS4の間に強いプロモーター活性を有していることが示された（図2）。

【0046】

〔実施例2：二本鎖ポリヌクレオチドによる、転写調節領域の転写能の抑制効果〕

ラットBDNFエクソン1のプロモーター領域S3とS4との間（ラットS3-S4領域：配列番号18）を、オーバーラップする7つのフラグメント（断片A～G：それぞれ配列番号11～17）に分けて、それぞれのセンス鎖DNAおよびアンチセンス鎖DNAを合成した（図3）。各断片のセンス鎖とアンチセンス鎖とを混合し150mM NaCl中にて70℃から自然冷却することにより二本鎖DNAを作製した。各二本鎖DNA断片（A～G）50nM存在下にて、ヒトS3-AS2およびラットS3-AS2を有しているホタルルシフェラーゼレポータープラスミドpGL4.14（0.18μg）、およびウミシタケルシフェラーゼレポータープラスミドpTK-hRG（0.02μg）を、ラットグリオーマ細胞株C6細胞に同条件にて導入し、導入24時間後にDual-Luciferaseアッセイを行った（図4）。その結果、A～GのすべてのDNA断片に転写抑制能があることが判明した。特にDNA断片C、E、Fには、プロモーターS3-AS2領域の転写活性を強く抑制する能力があることを確認した。マウスおよびヒトのBDNFエクソン1のプロモーター領域S3とS4との間の塩基配列を、それぞれ配列番号19および20に示す。また、上記C、E、Fに対応するマウスの塩基配列を配列番号21～23に、ヒトの塩基配列を配列番号24～26に示す。

【0047】

〔実施例3：機能性ポリヌクレオチドの大量調製〕

上記3種類のDNA断片C、E、Fを使用した。いずれも35塩基対の二本鎖DNAである。

【0048】

まずpCRII-TOPOプラスミドをEcoRV制限酵素部位で平滑末端に切り開き、5'リン酸化した各DNA断片の二本鎖DNAをDNA ligaseを用いて挿入した。このDNA断片はpCRII-TOPOプラスミド内のM13プライマー（FWおよびRV）の結合部位間

に存在するので、このプラスミドを鋳型として、M13プライマー（FWおよびRV）を使用し、上記DNA断片の配列を含む計261塩基対の部分をPCRで増幅した。

【0049】

増幅したPCR産物を、精製、濃縮し、DNA濃度を17.4 pM（3 μg / μL）に調整した。さらに、調製したDNA断片C、E、Fを等量ずつ混合し、それぞれを5.8 pM（1 μg / μL）の濃度で含む溶液を作製した。この混合溶液は、全DNA濃度が17.4 pM（3 μg / μL）である。対照DNA断片は、DNA断片C、E、Fの配列を含まないpCRII-TOPOプラスミドを鋳型として、M13プライマーを使用し、プライマー間の計225塩基対の部分をPCRで増幅した。得られたPCR産物を、精製、濃縮し、DNA濃度を17.4 pM（2.6 μg / μL）に調整し、対照DNAとして使用した。

10

【0050】

〔実施例4：機能性ポリヌクレオチド投与実験1〕

クモ膜下に投与したDNA断片がBDNFのエクソン1バリエーションの発現を抑制しているか否かを確認するために、無処置のラット（6週齢の雄性SDラット）に対して、カテーテルの先端が第4腰神経DRG付近に届くように挿入した。カテーテルの他端を、皮下を通して後頭部から体外に出した。挿入手術に伴う疼痛、炎症を避けるため、次の処置までには約1週間間隔を開けた（カテーテル挿入から7日後を0日目とした（図5））。

【0051】

DNA断片C、E、Fの溶液またはDNA断片C、E、Fの配列を含まない対照DNA溶液（各17.4 pM）を、各3匹のラットのクモ膜下に、12時間前および0時間の時点で、20 μLずつ注入した。

20

【0052】

2回目の投与（すなわち0時間）の36時間後にラット第4腰神経DRGを摘出し、BDNF遺伝子のエクソン1バリエーションの発現量をRT-PCRにて解析した。BDNF遺伝子の転写産物量はGAPDH遺伝子の発現を内部標準として補正した。具体的には、組織からのRNA抽出を、RNeasy Lipid Tissue Mini Kit（QIAGEN社）を用いて行った。1個のDRGから得られる全RNA（3～5 μg）をReady-To-Go T-Primed First-Strand Kit（Amersham社）を用いて逆転写した。得られたcDNAを1/10に希釈してBDNFの各エクソンの定量に用いた。また、内部標準用のGAPDH mRNAまたはアクチン mRNAの定量にはさらに1/10希釈して用いた。PCR断片をpCRII-TOPOベクターに組み込んだものを用いて、予め塩基配列を確認し、定量用の検量線を作成した。定量PCR装置にはLightCycler（Roche社）を使用し、プライマー、反応液およびPCRのプログラムを表1～3のように設定した。定量PCR用のSYBR Green I溶液にはタカラ製を用いた。反応液中にテンプレートを含まないものをネガティブコントロールに用いた。

30

【0053】

【表 1】
プライマー:

	Accession. No.	Forward primers (5' -3')	Reverse primers (5' -3')	Size (bp)
BDNF 1-9	EF125675	tgttggggagagagat	cgtggacgtttgcttcttc	159
BDNF 2A-9	EF125676	tacttcatccagttccaccag	caagttgccttgtccgt	129
BDNF 2B-9	EF125677	aagctccggttccaccag	tgcttcttcatggcg	102
BDNF 2C-9	EF125678	gtggtgtaagccgaaaga	cgtggacgtttgcttcttc	124
BDNF 3-9	EF125686	ctgagactgcgtccactc	gtggacgtttgcttcttca	152
BDNF 4-9	EF125679	gagcagctgccttgatgtt	gtggacgtttgcttcttca	148
BDNF 5-9	EF125687	accccgcacactctgtgta	acagctgggtaggccaagt	204
BDNF 6-9	EF125680	gatccgagagcttgtgtgg	gtggacgtttgcttcttca	130
BDNF 8-9	EF125689	cagtggagctgaacaaacga	gccttcatgcaaccgaagta	117
BDNF 9A-9	EF125690	gtctctgcttcttccaca	cgtggacgtttgcttcttc	124
Total BDNF	NM_012513	gcggcagataaaaagactgc	gcagccttcttctgtgtaac	141
GAPDH	NM_017008	gacaactttggcatcgtgga	atgcaggatgatgttctgg	133
Actin	NM_031144	ctaaggccaaccgtgaaaag	accctcatagatgggcacag	170

10

20

30

【 0 0 5 4 】

【表 2】

反応液:

試薬	容量	negative control (*)	終濃度
SYBR Premix Takara (2×)	10.0 μL	10.0 μL	1×
Primer pair (5 μM/5 μM)	0.8 μL	0.8 μL	0.2 μM
Template (×1/10~1/100)	5.0 μL	—	
H ₂ O	4.2 μL	9.2 μL	
	20.0 μL	20.0 μL	

* negative control : プライマーごとに鋳型DNAだけを除いた反応液

【 0 0 5 5 】

【表 3】

プログラム:

Stage	温度	時間	°C/秒	取得モード	cycle
1 : 初期変性	95°C	10秒	20°C/秒		1
2 : PCR反応	95°C	5秒	"		45
	60°C	20秒	"	1回	
3 : 融解曲線	95°C	0秒	"		1
	65°C	15秒	"		
	95°C	0秒	0.1°C/秒	連続	
4 : 冷却	40°C	30秒	20°C/秒		1

【 0 0 5 6 】

図 6 に示すように、DNA 断片 C、E、F の投与群は対照 DNA 投与群に比べ、エクソン 1 バリエントの mRNA 量が有意に減少していた。このことは、DRG への DNA 断片 C、E、F の導入が、BDNF のエクソン 1 バリエントの発現を有効に抑制することを示している。

【 0 0 5 7 】

〔実施例 5 : 機能性ポリヌクレオチド投与実験 2〕

実施例 4 において、上記 DNA 断片によって DRG の BDNF エクソン 1 バリエントの発現が抑制されることが判明したので、上記 DNA 断片が炎症による痛みを抑制し得るかどうかを確かめた。カテーテル挿入から 9 日後、炎症性疼痛誘導物質である完全フロイントアジュバント (CFA) 100 μL を、左後肢足底に皮下注射し、実施例 4 と同様に行った (図 7)。

【 0 0 5 8 】

DNA断片C、E、Fを混合した溶液(17.4 pM; DNA断片C、E、Fをそれぞれ5.8 pM含む。)または対照DNA溶液(17.4 pM)を用いた。CFA皮下注射の2日前、1日前、CFA注射直前に、348 pmol(20 μL)の溶液をクモ膜下に注入した。混合溶液導入群、対照DNA溶液導入群には各5匹のラットを使用した。

【0059】

DNA断片投与直前からCFA注射5日後まで、ラットの疼痛行動評価を毎日行った。疼痛行動は、機械的刺激に対する疼痛閾値(50%反応域値)により評価した。具体的には、ラットを10×20cm四方の壁に囲まれた金網の上ののせ、安静になるまで30分以上放置した。金網の下から、太さの違う5種類のナイロンフィラメント(von Freyフィラメント)を、細いものから順に後肢足底の中心にそっと押し当て、刺激による逃避行動の有無を観察した。逃避行動を示す閾値をChaplanらの方法により求めた。閾値はフィラメントの堅さをグラムで表示しており、数値が低いほど痛みにも敏感に反応することを示している。

10

【0060】

図8に示すように、DNA断片投与群は対照DNA投与群に比べ、疼痛を有意に抑制していた。特に、刺激3日後および4日後においては、DNA断片の効果が顕著に観察された。この実験より、DNA断片C、E、Fが疼痛抑制効果を有すること、および、事前に投与していても疼痛抑制効果を発揮できることが明らかになった。

【0061】

〔実施例6：機能性ポリヌクレオチド投与実験3〕

20

ラットの脊髄第5腰神経DRGの末梢側を結紮して慢性疼痛モデルを作成すると同時に、カテーテルの先端を第4腰神経DRG付近に留置した。実施例4に準じてカテーテルの他端は皮下を通して後頭部から体外に出した。

【0062】

DNA断片C、E、Fを混合した溶液(17.4 pM)(DNA断片C、E、F各々5.8 pMを含む)または対照DNA溶液(17.4 pM)を用いた。神経結紮による痛覚過敏の成立を確認した後、5日目、6日目、7日目に混合溶液をクモ膜下に注入した。

【0063】

ラットの疼痛行動観察は、慢性疼痛モデル作成直前から7日目の3回目(最終)投与後もさらに1週間にわたって行った。方法は実施例5と同様である。

30

【0064】

図9には典型的な実施例を挙げた。Day 0のデータは手術直前の行動評価を示す。図9の(a)に示すように、このラットではDNA断片投与により患側の反応は、健側(非侵襲側)の反応の約80%まで回復(7日目から10日目)しており、DNA断片の効果が顕著に現れていることが明らかとなった。図9の(b)では、(a)に示すDNA断片投与ラットと別の対照DNA投与ラットの患側同士を比較した結果であるが、対照DNA投与ラットでは疼痛抑制は見られなかった。実施例を増やして得た結果を図10に示す。上記の例を含むDNA断片投与ラット4匹、コントロール投与ラット3匹である。図10に示すように、DNA断片投与ラットは対照DNA投与ラットに比べ、有意に疼痛が抑制されていることが明らかになった。グラフを見やすくするために痛みを感じている患側足のみを図11に示す。この実験により、DNA断片C、E、Fは慢性疼痛の抑制効果を有すること、およびDNA断片投与は健側の行動評価に対してはなんら影響をおよぼさないこと、さらに疼痛発症後に投与しても疼痛抑制効果を発揮できることが明らかになり、人での臨床応用に大きな期待が持てる。

40

【0065】

〔実施例7：BDNFエクソン1プロモーター領域の広範囲の、機能性ポリヌクレオチドによる転写能の抑制効果〕

以上の実験によりDNA断片C、E、Fは慢性疼痛の抑制効果を有することが明らかとなったので、次に、DNA断片C、E、Fを含む広いプロモーター領域二本鎖DNAによる転写能抑制効果を解析した。BDNFエクソン1のプロモーター領域S3-AS2を3

50

分割して、オーバーラップする3つの断片を作製した。具体的には、アンチセンスプライマーAS4（配列番号27）およびAS5（配列番号28）を作製し、ラットS3-AS4（240bp；配列番号29）、S4-AS5（308bp；配列番号30）、S5-AS2（432bp；配列番号6）をPCRで増幅後、精製、濃縮した（図12）。コントロールとして、プラスミドpBluescriptKSのM13プライマーの間（M4とRVプライマーとの間の246bp）をPCRで増幅後、精製、濃縮した。ラットプロモーター領域S3-AS4、S4-AS5、S5-AS2に対応するヒトプロモーター領域S3-AS4、S4-AS5、S5-AS2の塩基配列をそれぞれ配列番号31、32、3に示す。

【0066】

各二本鎖DNA断片（ラットS3-AS4、S4-AS5、S5-AS2、コントロール）0.6μg存在下にて、ヒトS3-AS2およびラットS3-AS2を有しているホタルルシフェラーゼレポータープラスミドpGL4.14（0.18μg）、およびウミシイタケルシフェラーゼレポータープラスミドpTK-hRG（0.02μg）を、ラットグリオーマ細胞株C6細胞に導入し、導入24時間後にDual-Luciferaseアッセイを行った。ポジティブコントロールとしてDNA断片C（0.6μg）も一緒に行った。その結果、プロモーター領域S3-AS4、S4-AS5、S5-AS2は、プロモーターS3-AS2領域の転写活性を抑制することを確認した（図13）。S4-AS5、S5-AS2は単独ではやや抑制効果は弱い、S3-AS4と混在させて投与すれば、より効果的であると考えられる。

【0067】

以上により、BDNF遺伝子の遺伝子発現に重要な発現調節領域に対する二本鎖ポリヌクレオチドはインビトロおよびインビボの両方においてBDNFのエクソン1バリエーションの発現を有意に抑制し、機能性ポリヌクレオチドとして用いることにより疼痛抑制することが可能であることがわかった。特に、実施例1（図2）に示すように、エクソン1上流の調節領域の、S3-AS2間のDNA配列は全体にわたって活性を有している、実際に抑制効果を確認したS3-AS2間の中の一部からなる二本鎖DNAだけでなく、S3-AS2の全長二本鎖DNAを用いるとより効果的に抑制能を示すことができると考えられる。

【0068】

急性痛に関する様々な製剤が知られているが、慢性疼痛に効果的な製剤はほとんど知られておらず、しかもいずれもBDNFを標的としたものではない。本発明を用いる疼痛抑制は、交通事故や手術後の後遺症、癌性疼痛、糖尿病などに有効であると考えられる。また、癌細胞は癌化した後にBDNFを合成していることが報告されている（非特許文献3参照）。BDNFは神経を引き寄せる作用があることより、癌の耐え難い痛みの原因の1つはBDNFに起因している可能性がある。本発明を用いるBDNFの発現抑制は、末期癌、癌の骨転移などの癌性疼痛の治療に有効であると考えられる。

【0069】

このように、本発明者らはBDNFの発現を阻害すると疼痛を抑制することが可能であることを示した。よって、BDNFの発現を阻害する物質は疼痛治療剤になり得る。本発明者らが作り出した、C6ラットグリオーマ培養細胞にてBDNF発現量の増減を測定するシステムは、新規の疼痛治療剤をスクリーニングする新しい技術である。より詳細には、本システムは、実施例1および2で使用した「BDNFのエクソン1上流領域を有しているルシフェラーゼプラスミドが導入されたラットグリオーマC6培養細胞」である。本システムは、好ましくは、当該ルシフェラーゼプラスミドをラットグリオーマC6培養細胞にトランスフェクション（遺伝子導入）後、ハイグロマイシン存在下で培養し、当該ルシフェラーゼプラスミドが導入されたラットグリオーマC6培養細胞のみを株化した当該ルシフェラーゼプラスミド導入ラットグリオーマC6培養細胞株であり得る。ルシフェラーゼプラスミドはハイグロマイシン耐性遺伝子を有している、ハイグロマイシン存在下で培養することにより、導入細胞のみを純化することができる。用いる細胞としては、

10

20

30

40

50

C6細胞に限定されず、DRGの初代培養細胞であっても他のBDNF生産細胞であってもよい。BDNF発現量を検出する方法としては、ルシフェラーゼアッセイに限定されず、RT-PCR法、マイクロアレイを用いる方法、抗体を用いたウエスタンブロット法、ELISA法などであってもよい。cDNAの増幅も必要に応じて行われればよく、好ましい方法としては、PCR法、LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法 (栄研化学株式会社)、ICAN (Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids) 法 (宝酒造株式会社) などが挙げられる。

【0070】

発明の詳細な説明の項においてなされた具体的な実施形態または実施例は、あくまでも、本発明の技術内容を明らかにするものであって、そのような具体例にのみ限定して狭義に解釈されるべきものではなく、本発明の精神と次に記載する請求の範囲内において、いろいろと変更して実施することができるものである。

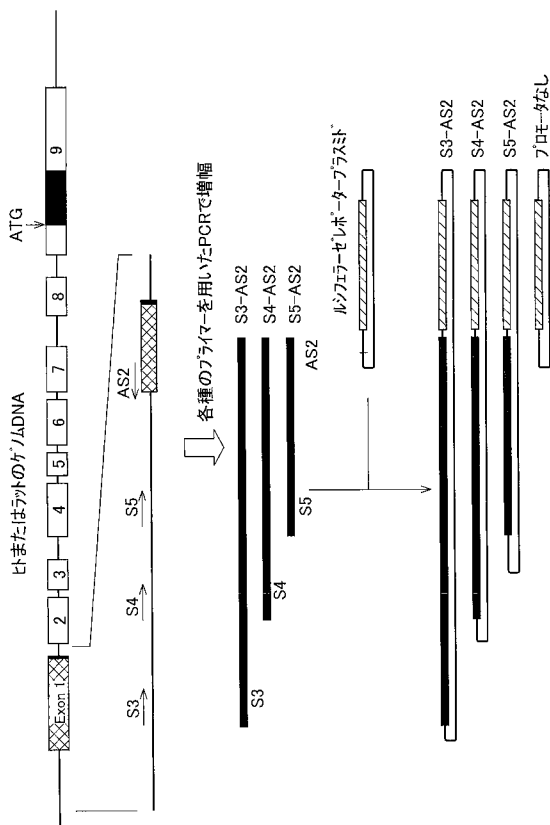
10

【産業上の利用可能性】

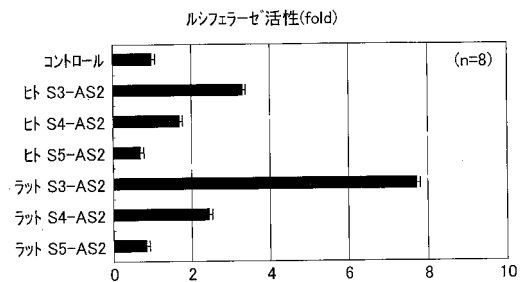
【0071】

本発明を用いれば、難治性慢性疼痛に代表される疼痛の治療が可能になるので、医療分野および医薬品分野において大いに貢献し得る。

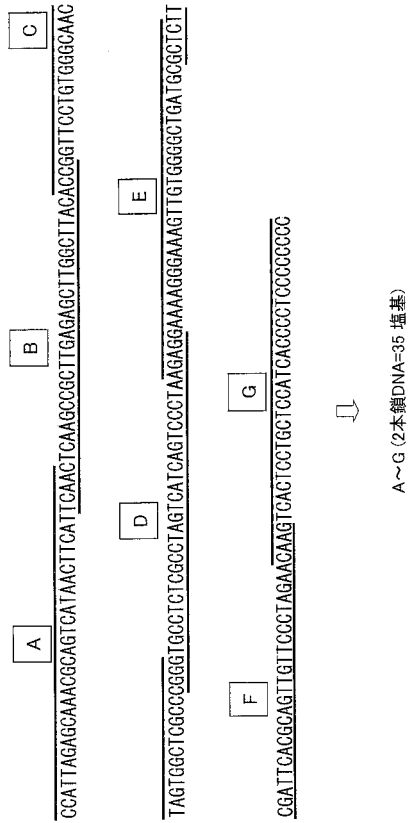
【図1】



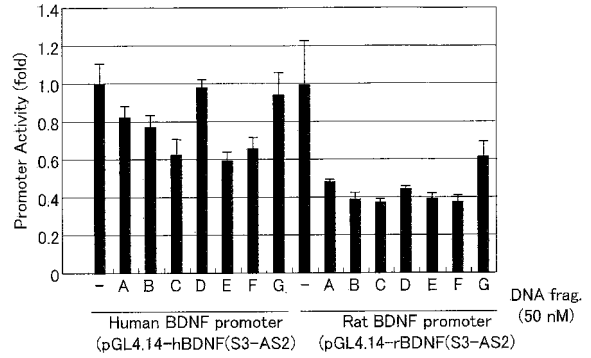
【図2】



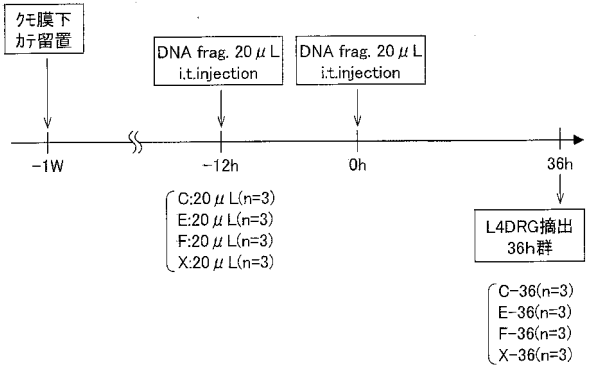
【 図 3 】



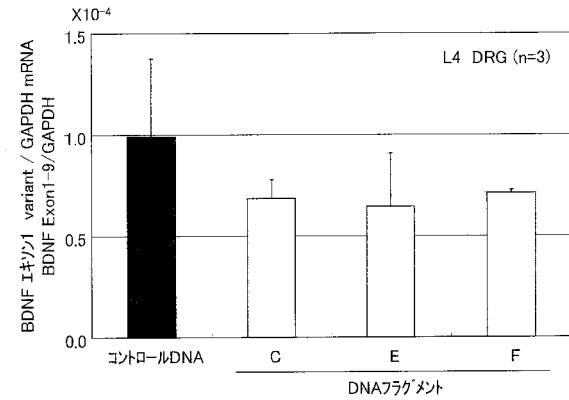
【 図 4 】



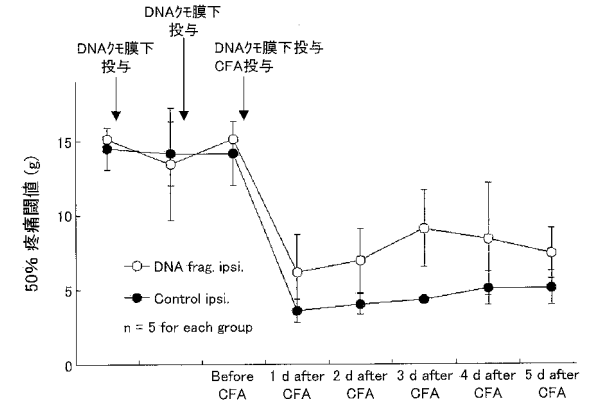
【 図 5 】



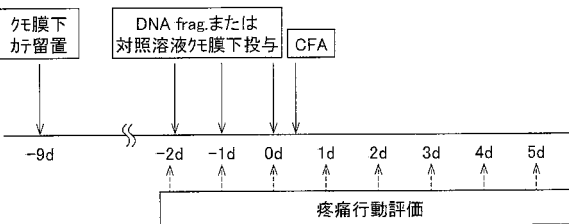
【 図 6 】



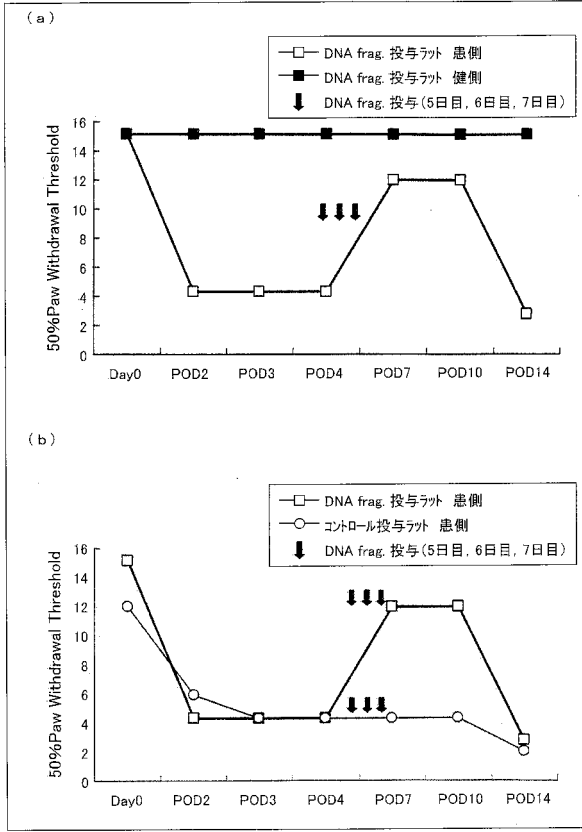
【 図 8 】



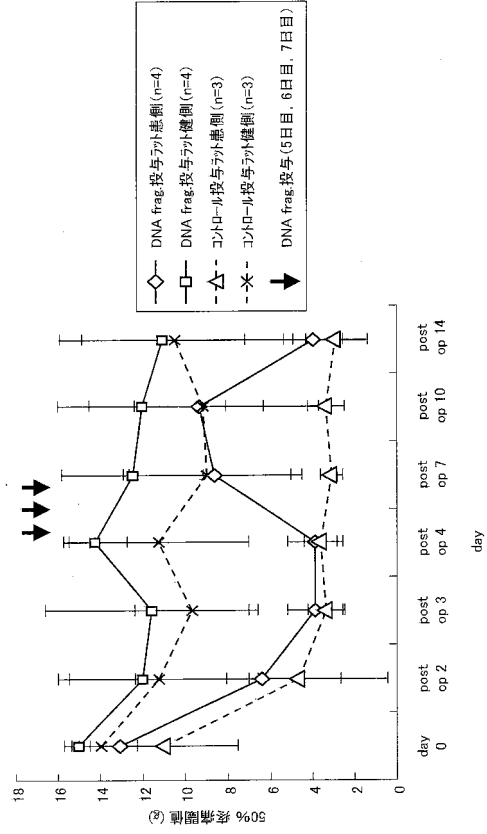
【 図 7 】



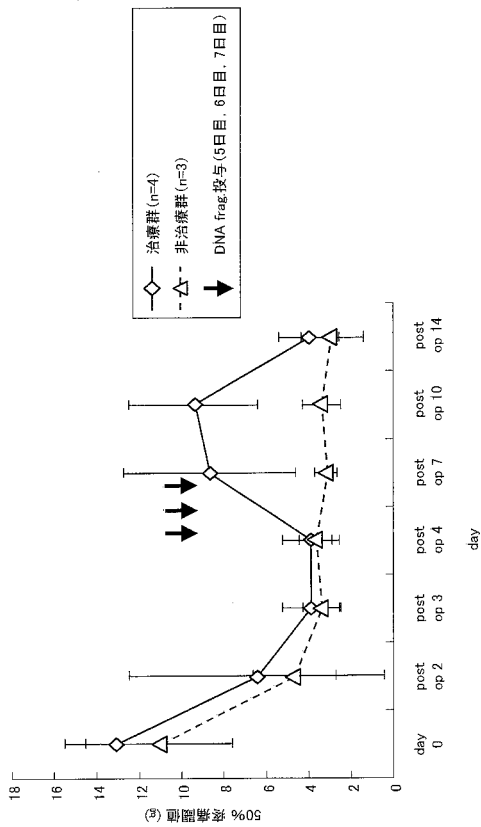
【 図 9 】



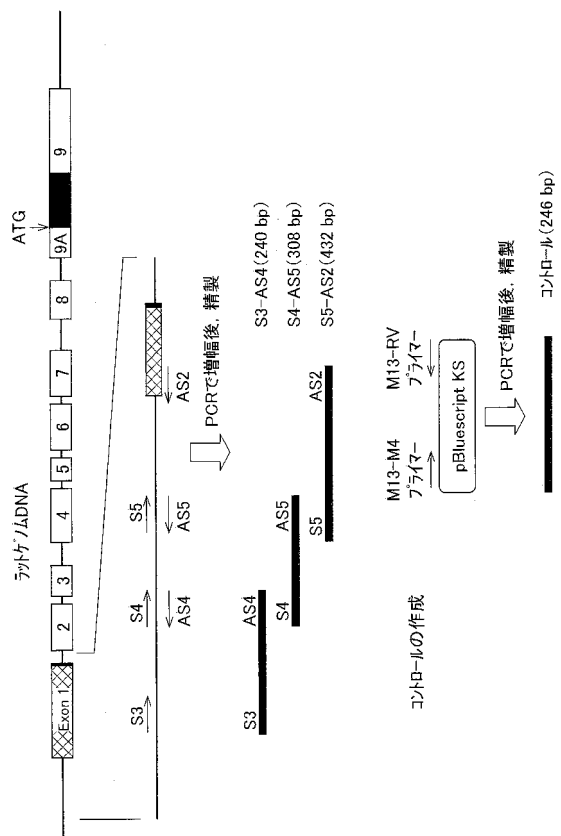
【 図 10 】



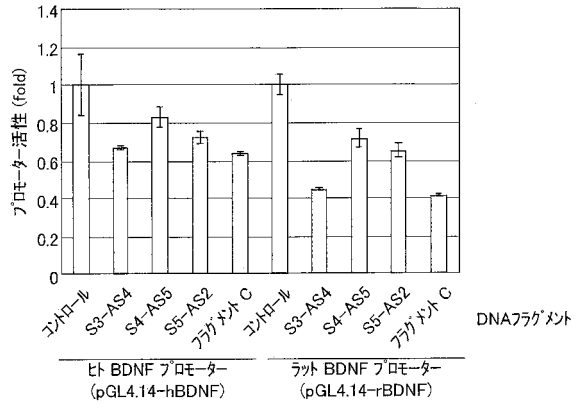
【 図 11 】



【 図 12 】



【 図 13 】



【 配列表 】

0005545211000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 大内田 守

日本国岡山県岡山市北区鹿田町二丁目5番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
内

審査官 吉田 知美

(56)参考文献 Timmusk T. et al., Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene, *Neuron*, 1993年, Vol.10, p.475-89

松岡義和 他, 炎症性疼痛あるいはNGF刺激下におけるBDNF遺伝子のプロモーター選択的な発現誘導, *生化学*, 2008年12月4日, 2P-0986

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09

A61K 31/7088

A61P 25/04

CA/REGISTRY(STN)

WPI/BIOSIS(DIALOG)

JSTPlus(JDreamII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq