

(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2016-222630

(P2016-222630A)

(43) 公開日 平成28年12月28日(2016.12.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02 Z N A	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 3	4 H 0 4 5
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-112941 (P2015-112941)	(71) 出願人	598041566 学校法人北里研究所 東京都港区白金5丁目9番1号
(22) 出願日	平成27年6月3日(2015.6.3)	(71) 出願人	504150782 株式会社プロトセラ 兵庫県尼崎市道意町7丁目1番3号
		(74) 代理人	100106909 弁理士 棚井 澄雄
		(74) 代理人	100188558 弁理士 飯田 雅人
		(72) 発明者	七里 眞義 神奈川県相模原市南区北里1丁目15番1号 学校法人北里研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血管新生関連疾患の治療又は予防剤、スクリーニング方法及びキット

(57) 【要約】

【課題】臨床応用が容易な血管新生関連疾患の治療又は予防剤を提供する。

【解決手段】(a) サリューシン - 若しくはその誘導体、(b) 可溶化したATP合成酵素鎖若しくはその誘導体、(c) サリューシン - に対する特異的結合物質、又は(d) ATP合成酵素鎖に対する特異的結合物質、を有効成分として含有する血管新生関連疾患の治療又は予防剤。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サリュージン - 若しくはその誘導体、A T P 合成酵素 鎖若しくはその誘導体、サリュージン - に対する特異的結合物質、又は A T P 合成酵素 鎖に対する特異的結合物質、を有効成分として含有する血管新生関連疾患の治療又は予防剤。

【請求項 2】

前記血管新生関連疾患が、癌、心筋梗塞、慢性炎症、網膜血管新生症、糖尿病性網膜症又は閉塞性動脈硬化症である、請求項 1 に記載の治療又は予防剤。

【請求項 3】

被検物質の存在下及び非存在下で、サリュージン - と A T P 合成酵素 鎖とを接触させる工程と、

前記被検物質の存在下及び非存在下におけるサリュージン - と A T P 合成酵素 鎖との結合量を定量する工程と、

前記被検物質の存在下におけるサリュージン - と A T P 合成酵素 鎖との結合量が、前記被検物質の非存在下におけるサリュージン - と A T P 合成酵素 鎖との結合量と比較して変化した場合に、前記被検物質を血管新生関連疾患の治療又は予防剤であると判定する工程と、

を含む、血管新生関連疾患の治療又は予防剤のスクリーニング方法。

【請求項 4】

前記血管新生関連疾患が、癌、心筋梗塞、慢性炎症、網膜血管新生症、糖尿病性網膜症又は閉塞性動脈硬化症である、請求項 3 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 5】

サリュージン - 及び A T P 合成酵素 鎖を含む、血管新生関連疾患の治療又は予防剤のスクリーニングキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血管新生関連疾患の治療又は予防剤、血管新生関連疾患の治療又は予防剤のスクリーニング方法、及び血管新生関連疾患の治療又は予防剤のスクリーニングキットに関する。

【背景技術】

【0002】

アンギオスタチンは、38 k D a の分子量を有するプラスミノ - ゲンの断片であり、血管新生、転移癌の増殖の強力な阻害薬であることが知られている（例えば、非特許文献 1 を参照。）。なお、プラスミノ - ゲンはプラスミンの前駆体タンパク質であり、プラスミンは、フィブリンやフィブリノーゲンを分解して血栓を分解するプロテアーゼの一種である。

【0003】

ところで、サリュージン - は、バイオインフォマティクス解析により発明者らが同定した、20 アミノ酸からなる生理活性ペプチドである（例えば、非特許文献 2 を参照。）。サリュージン - は、血圧降下作用、除脈作用、副交感神経刺激活性、動脈硬化促進作用、抗利尿ホルモン分泌刺激作用等の多くの生理活性を示すことが明らかにされているが、その受容体は不明であった。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献 1】O'Reilly M.S., et al., Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma, Cell, 79(2), 315-328, 1994.

【非特許文献 2】Shichiri M., et al., Salusins: newly identified bioactive peptid

10

20

30

40

50

es with hemodynamic and mitogenic activities, Nature Med., 9(9), 1166-1172, 2003

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

アンジオスタチンは、血管新生関連疾患の治療又は予防剤への応用が検討されてきたが、分子量が大きく臨床応用が困難である。そこで本発明は、臨床応用が容易な血管新生関連疾患の治療又は予防剤を提供することを目的とする。本発明はまた、血管新生関連疾患の治療又は予防剤のスクリーニング方法、及び血管新生関連疾患の治療又は予防剤のスクリーニングキットを提供することを目的とする。

10

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は以下の通りである。

(1) サリュースィン - 若しくはその誘導体、A T P 合成酵素 鎖若しくはその誘導体、サリュースィン - に対する特異的結合物質、又はA T P 合成酵素 鎖に対する特異的結合物質、を有効成分として含有する血管新生関連疾患の治療又は予防剤。

(2) 前記血管新生関連疾患が、癌、心筋梗塞、慢性炎症、網膜血管新生症、糖尿病性網膜症又は閉塞性動脈硬化症である、(1)に記載の治療又は予防剤。

(3) 被検物質の存在下及び非存在下で、サリュースィン - とA T P 合成酵素 鎖とを接触させる工程と、前記被検物質の存在下及び非存在下におけるサリュースィン - とA T P 合成酵素 鎖との結合量を定量する工程と、前記被検物質の存在下におけるサリュースィン - とA T P 合成酵素 鎖との結合量が、前記被検物質の非存在下におけるサリュースィン - とA T P 合成酵素 鎖との結合量と比較して変化した場合に、前記被検物質を血管新生関連疾患の治療又は予防剤であると判定する工程と、を含む、血管新生関連疾患の治療又は予防剤のスクリーニング方法。

20

(4) 前記血管新生関連疾患が、癌、心筋梗塞、慢性炎症、網膜血管新生症、糖尿病性網膜症又は閉塞性動脈硬化症である、(3)に記載のスクリーニング方法。

(5) サリュースィン - 及びA T P 合成酵素 鎖を含む、血管新生関連疾患の治療又は予防剤のスクリーニングキット。

【発明の効果】

30

【0007】

本発明によれば、臨床応用が容易な血管新生関連疾患の治療又は予防剤を提供することができる。また、血管新生関連疾患の治療又は予防剤のスクリーニング方法、及び血管新生関連疾患の治療又は予防剤のスクリーニングキットを提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】実験例1におけるS D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す写真である。

【図2】実験例2の結果を示す共焦点蛍光顕微鏡写真である。

【図3】実験例3の結果を示すグラフである。

40

【図4】実験例4の結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0009】

[血管新生関連疾患の治療又は予防剤]

1実施形態において、本発明は、サリュースィン - 若しくはその誘導体、A T P 合成酵素 鎖若しくはその誘導体、サリュースィン - に対する特異的結合物質、又はA T P 合成酵素 鎖に対する特異的結合物質、を有効成分として含有する血管新生関連疾患の治療又は予防剤を提供する。血管新生関連疾患の治療又は予防剤は、血管新生を抑制するものであってもよく、血管新生を促進するものであってもよい。

【0010】

50

(サリュージン - 若しくはその誘導体)

後述する実施例において示すように、発明者らはサリュージン - がインビボで血管新生抑制活性を示すことを明らかにした。したがって、サリュージン - 若しくはその誘導体は、血管新生関連疾患の治療又は予防剤として使用することができる。

【 0 0 1 1 】

本明細書において、血管新生関連疾患としては、例えば、癌、心筋梗塞、慢性炎症、網膜血管新生症、糖尿病性網膜症、閉塞性動脈硬化症等が挙げられる。また、慢性炎症としては、ぜんそく、アトピー性皮膚炎等のアレルギー性疾患に関連する炎症、関節リウマチなどの自己免疫性疾患に関連する炎症等が挙げられる。

【 0 0 1 2 】

サリュージン - のアミノ酸配列を配列番号 1 に示す。サリュージン - はわずか 2 0 アミノ酸からなるペプチドであるため、簡単に合成することができ、臨床応用が容易である。

【 0 0 1 3 】

サリュージン - は、例えば固相合成等により人工的に合成してもよいし、例えばサリュージン - をコードする遺伝子を含む発現ベクターを、無細胞タンパク合成系、又は大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、動物細胞等の適切な宿主中で発現させて精製することにより製造してもよい。

【 0 0 1 4 】

サリュージン - の誘導体としては、例えば、サリュージン - のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ血管新生抑制活性を有するペプチド；サリュージン - 又は上記のペプチドに、例えばポリエチレングリコール等の化合物が結合したものが挙げられる。ポリエチレングリコールを結合することにより、例えば血中安定性を高めること等が可能になる。ここで、1 若しくは数個とは、例えば 1 ~ 1 0 個、例えば 1 ~ 5 個、例えば 1 ~ 3 個を意味する。

【 0 0 1 5 】

(A T P 合成酵素 鎖若しくはその誘導体)

後述する実施例において示すように、発明者らはサリュージン - の受容体が A T P 合成酵素 鎖であることを明らかにした。したがって、遊離状態の (可溶化した) A T P 合成酵素 鎖若しくはその誘導体は、サリュージン - に結合してサリュージン - 受容体への結合を阻害することによってサリュージン - の働きを抑制することにより、サリュージン - の生理活性を調節することができる。したがって、A T P 合成酵素 鎖若しくはその誘導体は、血管新生関連疾患の治療又は予防剤として使用することができる。A T P 合成酵素 鎖のアミノ酸配列を配列番号 2 に示す。

【 0 0 1 6 】

A T P 合成酵素 鎖は、例えば、A T P 合成酵素 鎖をコードする遺伝子を含む発現ベクターを、無細胞タンパク合成系、又は、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、動物細胞等の適切な宿主中で発現させて精製すること等により製造することができる。

【 0 0 1 7 】

A T P 合成酵素 鎖の誘導体としては、例えば、A T P 合成酵素 鎖のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつサリュージン - に対する結合活性を有するペプチド；A T P 合成酵素 鎖又は上記のペプチドに、例えばポリエチレングリコール等の化合物が結合したものが挙げられる。ポリエチレングリコールを結合することにより、例えば血中安定性を高めること等が可能になる。ここで、1 若しくは数個とは、例えば 1 ~ 3 0 個、例えば 1 ~ 2 0 個、例えば 1 ~ 1 0 個、例えば 1 ~ 5 個、例えば 1 ~ 3 個を意味する。

【 0 0 1 8 】

(サリュージン - に対する特異的結合物質)

上述したように、発明者らはサリュージン - がインビボで血管新生抑制活性を示すことを明らかにした。したがって、サリュージン - に対する特異的結合物質は、サリュ

10

20

30

40

50

シン - に結合してサリューシン - の働きを抑制することにより、サリューシン - の生理活性を調節することができる。したがって、サリューシン - に対する特異的結合物質は、血管新生関連疾患の治療又は予防剤として使用することができる。特異的結合物質としては、例えば、抗体、抗体断片、アダマー、受容体等が挙げられる。

【 0 0 1 9 】

抗体は、例えば、マウス等の動物にサリューシン - を抗原として免疫することにより作製することができる。あるいは、ファージライブラリー等の抗体ライブラリーのスクリーニング等により作製することができる。また、抗体断片としては、F v、F a b、s c F v等が挙げられる。ヒトに投与した場合の拒絶反応等を抑制する観点から、抗体及び抗体断片は、ヒト化されているかヒト由来であることが好ましい。

10

【 0 0 2 0 】

アダマーとは、標識物質に対する特異的結合能を有する物質である。アダマーとしては、核酸アダマー、ペプチドアダマー等が挙げられる。サリューシン - に特異的結合能を有する核酸アダマーは、例えば、systematic evolution of ligand by exponential enrichment (S E L E X) 法等により選別することができる。また、サリューシン - に対する特異的結合能を有するペプチドアダマーは、例えば酵母を用いたT w o - h y b r i d法等により選別することができる。

【 0 0 2 1 】

(A T P 合成酵素 鎖に対する特異的結合物質)

上述したように、発明者らはサリューシン - の受容体が A T P 合成酵素 鎖であることを明らかにした。したがって、A T P 合成酵素 鎖に対する特異的結合物質は、A T P 合成酵素 鎖に結合してサリューシン - の A T P 合成酵素 鎖への結合を抑制することにより、サリューシン - の生理活性を調節することができる。したがって、A T P 合成酵素 鎖に対する特異的結合物質は、血管新生関連疾患の治療又は予防剤として使用することができる。特異的結合物質については、上述したものと同様である。

20

【 0 0 2 2 】

[血管新生関連疾患の治療又は予防剤のスクリーニング方法]

1 実施形態において、本発明は、被検物質の存在下及び非存在下で、サリューシン - と A T P 合成酵素 鎖とを接触させる工程と、前記被検物質の存在下及び非存在下におけるサリューシン - と A T P 合成酵素 鎖との結合量を定量する工程と、前記被検物質の存在下におけるサリューシン - と A T P 合成酵素 鎖との結合量が、前記被検物質の非存在下におけるサリューシン - と A T P 合成酵素 鎖との結合量と比較して変化した場合に、前記被検物質を血管新生関連疾患の治療又は予防剤であると判定する工程と、を含む、血管新生関連疾患の治療又は予防剤のスクリーニング方法を提供する。

30

【 0 0 2 3 】

本実施形態のスクリーニング方法により、サリューシン - と A T P 合成酵素 鎖との結合を制御することに基づく血管新生関連疾患の治療又は予防剤をスクリーニングすることができる。血管新生関連疾患については上述したものと同様である。

【 0 0 2 4 】

(サリューシン - と A T P 合成酵素 鎖とを接触させる工程)

本工程において、被検物質の存在下及び非存在下でサリューシン - と A T P 合成酵素 鎖とを接触させる。被検物質としては、例えば化合物ライブラリー等を用いることができる。本工程は、例えば、後述する実験例で示すように、A T P 合成酵素 鎖を発現する細胞の培地に、被検物質の存在下又は非存在下で、蛍光標識したサリューシン - を反応させること等により実施することができる。あるいは、被検物質の存在下又は非存在下で、サリューシン - 又は A T P 合成酵素 鎖を固定した固相に、蛍光標識した A T P 合成酵素 鎖又は蛍光標識したサリューシン - をそれぞれ接触させてもよい。固相としては、例えば、ビーズ等の粒子；スライドガラス、イムノプレート等の板状構造体等が挙げられる。

40

【 0 0 2 5 】

50

(サリューシン - と A T P 合成酵素 鎖との結合量を定量する工程)

本工程において、サリューシン - と A T P 合成酵素 鎖との結合量を定量する。本工程は、例えば、上述した細胞表面に結合した、サリューシン - の蛍光量を測定すること等により実施することができる。あるいは、上述した固相に結合した A T P 合成酵素 鎖又はサリューシン - の蛍光量を測定すること等により実施することができる。

【 0 0 2 6 】

(被検物質が血管新生関連疾患の治療又は予防剤であるか否かを判定する工程)

本工程において、被検物質が血管新生関連疾患の治療又は予防剤であるか否かを判定する。より具体的には、被検物質の存在下におけるサリューシン - と A T P 合成酵素 鎖との結合量が、被検物質の非存在下におけるサリューシン - と A T P 合成酵素 鎖との結合量と比較して変化した場合に、被検物質を血管新生関連疾患の治療又は予防剤であると判定する。

10

【 0 0 2 7 】

変化する場合としては、上記の結合量が増加する場合及び減少する場合があります。サリューシン - と A T P 合成酵素 鎖との結合を変化させる被検物質は、血管新生関連疾患の治療又は予防剤となり得る。例えば、サリューシン - と A T P 合成酵素 鎖との結合量を増加させる被検物質は、血管新生を抑制することにより血管新生関連疾患の治療又は予防剤となり得る。また、サリューシン - と A T P 合成酵素 鎖との結合量を減少させる被検物質は、例えばサリューシン - の過剰な活性を抑制することにより血管新生を適正な範囲にすることにより、血管新生関連疾患の治療又は予防剤となり得る。

20

【 0 0 2 8 】

本実施形態のスクリーニング方法は、例えば、表面プラズモン共鳴現象を利用する測定装置等を用いて実施することもできる。表面プラズモン共鳴現象を利用する測定装置としては、例えば、ピアコア (登録商標、G Eヘルスケアバイオサイエンス社) 等が挙げられる。

【 0 0 2 9 】

[血管新生関連疾患の治療又は予防剤のスクリーニングキット]

1 実施形態において、本発明は、サリューシン - 及び A T P 合成酵素 鎖を含む、血管新生関連疾患の治療又は予防剤のスクリーニングキットを提供する。サリューシン - 又は A T P 合成酵素 鎖は、蛍光色素等で標識されていてもよい。本実施形態のスクリーニングキットは、上述した血管新生関連疾患の治療又は予防剤のスクリーニング方法を実施するのに好適に用いることができる。

30

【 0 0 3 0 】

[その他の実施形態]

1 実施形態において、本発明は、サリューシン - 若しくはその誘導体、A T P 合成酵素 鎖若しくはその誘導体、サリューシン - に対する特異的結合物質、又は A T P 合成酵素 鎖に対する特異的結合物質を、哺乳動物に投与する工程を備える、血管新生関連疾患の治療又は予防方法を提供する。

【 0 0 3 1 】

1 実施形態において、本発明は、血管新生関連疾患の治療又は予防のための、サリューシン - 若しくはその誘導体、A T P 合成酵素 鎖若しくはその誘導体、サリューシン - に対する特異的結合物質、又は A T P 合成酵素 鎖に対する特異的結合物質を提供する。

40

【 0 0 3 2 】

1 実施形態において、本発明は、血管新生関連疾患の治療又は予防剤の製造のための、サリューシン - 若しくはその誘導体、A T P 合成酵素 鎖若しくはその誘導体、サリューシン - に対する特異的結合物質、又は A T P 合成酵素 鎖に対する特異的結合物質の使用を提供する。

【 実施例 】

【 0 0 3 3 】

50

次に実施例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0034】

< 実験例 1 >

[サリューシン - の受容体の同定]

膜タンパク質ライブラリー (membrane protein library、MPL) をスクリーニングすることにより、サリューシン - の受容体を同定した。

【0035】

(膜タンパク質ライブラリーの調製)

まず、ラット、マウス及びブタの様々な臓器由来の組織から膜タンパク質を抽出した。臓器としては、心臓、大脳、小脳、肺、肝動脈、腎臓、骨格筋、視床下部 / 下垂体、大動脈を使用した。

10

【0036】

膜タンパク質の抽出は次のようにして行った。臓器 2 g を 10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) - DNase I (70 U / μ L) - 1 mM DTT の溶液 10 mL に入れてホモジナイズし、2,500 rpm、4 で 5 分間遠心した。上清を回収し、40% 飽和スクロース液 12 mL に重層し、95,000 rpm、4 で 1 時間遠心した。続いて、2 層に分かれた液体の界面に存在する膜タンパク質を回収し、使用するまで -80 で保存した。

【0037】

続いて、抽出した膜タンパク質を、卵黄レシチン及びコレステロールから作製したリポソームと混合し、膜融合させることにより、膜タンパク質が埋め込まれたリポソームを作製した。

20

【0038】

リポソームの作製は次のようにして行った。精製卵黄レシチン (旭化成社) 1 g 及びコレステロール (和光純薬工業社) 0.2 g を 10 mL のクロロホルムに溶解し、室温で真空乾燥した。続いて、10 mM Tris - Cl (pH 7.4) 10 mL を添加して再構成した。続いて、混合液を激しく攪拌してリポソーム懸濁液を得、使用するまで 4 で保存した。

【0039】

続いて、抽出した膜タンパク質 50 mg に 10 mM Tris - Cl (pH 7.4) 5 mL を添加し、超音波処理装置 (型式「INSONATOR 201M」、クボタ社) を用いて超音波処理を行い、リポソーム懸濁液と混合し、凍結融解を 3 回繰り返した。続いて、再び超音波処理を行い、膜タンパク質が埋め込まれたリポソームを得た。

30

【0040】

続いて、膜タンパク質が埋め込まれたリポソームに、ポアサイズ 200 nm のポリカーボネート膜 (型式「Nucleopore」、ワットマン社) を通過させ、直径 200 nm 以下のものを回収し、膜タンパク質ライブラリーとしてスクリーニングに用いた。

【0041】

(膜タンパク質ライブラリーのスクリーニング)

予備検討の結果を踏まえ、NHS - セファロース上にサリューシン - の N 末端を固定したものを使用して、サリューシン - に結合する膜タンパク質の単離を試みた。

40

【0042】

具体的には、NHS - セファロース上に固定したサリューシン - に上述した膜タンパク質ライブラリーを反応させ、サリューシン - に結合する膜タンパク質をアフィニティー精製した。図 1 は、精製物を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS - PAGE) 後、銀染色した結果を示す写真である。図 1 の右側のレーンは分子量マーカーである。

【0043】

図 1 の矢印で示すバンドを切り出して、トリプシン消化 - 液体クロマトグラフィー (L

50

C) - 質量分析 (MS) / MS によりタンパク質解析を行った。その結果、当該タンパク質はラットの ATP 合成酵素鎖であることが明らかとなった。

【0044】

従来、ATP 合成酵素鎖は、ATP 合成酵素の F₁ ドメインに属し、ミトコンドリアの内膜に閉じ込められていると考えられてきた。しかしながら、近年、ATP 合成酵素鎖は、それぞれ一見関連性のないリガンドである、アンギオスタチン、エンテロスタチン、 α -カソモルフィン、アポリポタンパク質 A-I の細胞表面受容体であることが見出されている。なお、アンギオスタチン、エンテロスタチン、 α -カソモルフィン、アポリポタンパク質 A-I は、それぞれ ATP 又は ADP の生成を通じて、血管新生、食餌の摂取、高血圧、リポタンパク質の代謝を制御することが報告されている。

10

【0045】

< 実験例 2 >

[サリューシン - の細胞表面に対する結合能の検討]

FITC 標識したサリューシン - を、いくつかの上皮細胞及び癌由来細胞とインキュベートし、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。図 2 (a) ~ (n) は、実験結果を示す共焦点蛍光顕微鏡写真である。

【0046】

その結果、図 2 (a) に示すように、子宮頸癌細胞株である HeLa 細胞の表面に特に強い蛍光が観察された。

【0047】

また、図 2 (b) に示すように、FITC 標識したサリューシン - の HeLa 細胞に対する結合は、HeLa 細胞を予め ATP 合成酵素鎖に対する抗体とプレインキュベーションすることによって顕著に抑制された。

20

【0048】

また、図 2 (c) ~ (e) に示すように、FITC 標識したサリューシン - の HeLa 細胞に対する結合は、HeLa 細胞を予め過剰量の α -カソモルフィン 5 (図 2 (c))、 α -カソモルフィン 7 (図 2 (d))、エンテロスタチン (図 2 (e)) とプレインキュベーションすることによって顕著に抑制された。 α -カソモルフィン 5、 α -カソモルフィン 7 及びエンテロスタチンは、ATP 合成酵素鎖のリガンドとして同定されたものであり、サリューシン - の結合を競合的に阻害したと考えられる。

30

【0049】

図 2 (f) は、陰性対照として、FITC 標識した無関係のペプチドを HeLa 細胞とインキュベーションした結果である。

【0050】

図 2 (g) 及び (h) は、ATP 合成酵素鎖 (図 2 (g)) 及び ATP 合成酵素鎖 (図 2 (h)) に対する抗体で HeLa 細胞を染色した結果である。その結果、ATP 合成酵素鎖及び ATP 合成酵素鎖が HeLa 細胞の表面に発現していることが確認された。同様の結果がヒト上皮細胞においても確認された (図示せず)。

【0051】

サリューシン - は、ヒト臍静脈内皮細胞 (hUVECs) (図 2 (i))、ヒト皮膚微小血管内皮細胞 (hMVECs) 等の内皮由来細胞にも結合することが確認された。

40

【0052】

しかしながら、例えばラット大動脈内皮細胞 (rAECs)、ラット肺動脈内皮細胞 (rPECs) 等のより大きなサイズの動脈由来の細胞では、サリューシン - の結合はほとんど認められなかった (図示せず)。

【0053】

ヒト単球性白血病細胞株 THP-1 は、150 nM の TPA を添加してマクロファージへと分化誘導すると、FITC 標識したサリューシン - と結合することが確認された (図 2 (j))。この結合は、抗 ATP 合成酵素鎖抗体とプレインキュベーションすることによりわずかに阻害され (図 2 (k))、抗 ATP 合成酵素鎖抗体 (図 2 (l))、

50

過剰量の - カソモルフィン7 (図2 (m)) 及び過剰量のエンテロスタチン (図2 (n)) とプレインキュベーションすることにより完全に阻害された。

【0054】

以上の結果は、これらの細胞においては、ATP合成酵素 鎖がサリューシン - の主な受容体であることを示す。

【0055】

< 実験例3 >

[ATP合成酵素の活性に対するサリューシン - の影響の検討]

内皮細胞表面のATP合成酵素はATPを合成することが知られている。そして、このATP合成能は、低いpH環境下において、アンギオスタチンによって阻害されることが知られている。

10

【0056】

発明者らは、細胞表面のATP合成酵素の活性を、細胞の培地中で合成されるATPを定量することにより測定した。ATPの定量には市販のキット (商品名「CellTiter Glo (商標) ルミネッセンスアッセイ」、プロメガ社) を用いた。

【0057】

96ウェルプレートにサブコンフルエントに培養されたHeLa細胞又はヒト皮膚微小血管内皮細胞 (hMVECs) を血清不含培地で洗浄し、終濃度 $10^{-12} \sim 10^{-7}$ M のサリューシン - 、ピセアタンノール (シグマ社) 、抗ATP合成酵素抗体を含む培地又は培地のみの存在下で30分間静置した。静置は、pH7.2に調整する場合には5% CO_2 環境下で行い、pH6.7に調整する場合には17% CO_2 環境下で行った。続いて、細胞をADPで20秒間処理し、上清を直ちに回収して、合成されたATPを定量した。

20

【0058】

図3 (a) ~ (c) は、実験結果を示すグラフである。グラフ中、縦軸は合成されたATP量 (相対値) を示す。図3 (a) はpH7.2におけるHeLa細胞の結果であり、図3 (b) はpH7.2におけるhMVECsの結果である。その結果、サリューシン - は生理的なpHにおいて、細胞表面のATP合成酵素の活性を濃度依存的に阻害することが明らかとなった。また、図3 (a) に示すように、HeLa細胞を 10^{-6} M の - カソモルフィンとプレインキュベーションすることにより、サリューシン - のATP合成酵素阻害活性が拮抗された。

30

【0059】

また、図3 (a) に示すように、ATP合成酵素の阻害剤であるピセアタンノールはATP合成を顕著に抑制した。また、図3 (a) に示すように、抗ATP合成酵素 鎖 IgG抗体はATP合成酵素の活性を増加させたが、抗ATP合成酵素 鎖 IgG抗体はATP合成酵素の活性に影響を与えなかった。

【0060】

図3 (c) は、pH6.7においてhMVECsを用いて同様の実験を行った結果である。pH6.7では、サリューシン - のATP合成酵素阻害活性がpH7.2よりも顕著であった。なお、pH6.7は、アンギオスタチンがATP合成の阻害作用を示すpHである。

40

【0061】

サリューシン - は、ATP合成酵素 鎖を細胞表面に発現していない、ラット大動脈内皮細胞 (rAECs) 、ラット肺動脈内皮細胞 (rPECs) のATP合成には影響を与えなかった。

【0062】

< 実験例4 >

[血管新生に対するサリューシン - の影響の検討]

マウス肉腫細胞株であるSarcoma180細胞をミリポアチャンバーに入れ、Cr1j : CD1 (ICR) マウスの背部皮下に移植すると、ほとんど血管の無い皮下領域に

50

強力な血管新生を誘導する。この現象を利用したマウス背部皮下法 (dorsal air sac assay) により、血管新生に対するサリュージン - の影響を検討した。

【0063】

ミリポアチャンバーの両側をポアサイズ $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターで覆い、 0.15 mL のリン酸緩衝液 (PBS) に懸濁した 5×10^6 個の Sarcoma 180 細胞で満たし、癌細胞含有チャンバーを作製した。続いて、9~10週齢のメスの Cr1j:CD1 (ICR) マウスの背部皮下に約 8 mL の空気を注入して作製した背部気嚢に癌細胞含有チャンバーを移植した。

【0064】

癌細胞含有チャンバーの移植後のマウスに、0、2、20又は200 ng/kg/日のサリュージン - を5日間静脈注射した。対照として、癌細胞を含まないチャンバーを移植したマウス (図中、「ベヒクル」と示す。)、及び癌細胞含有チャンバーを移植し、サリュージン - の代わりに蒸留水を注射したマウスを使用した。

10

【0065】

処置終了後、マウスをと殺してチャンバーを取出し、チャンバーと接触していた皮膚の新生血管を顕微鏡で観察した。新生血管の特徴である、3mm以上の長さの蛇行性微小血管を全て新生血管として数えた。

【0066】

図4は実験結果を示すグラフである。グラフ中、縦軸は新生血管の数を示す。その結果、サリュージン - は、濃度依存的に血管新生を阻害することが明らかとなった。また、サリュージン - による毒性は認められなかった。この結果は、サリュージン - がインピボで血管新生抑制活性を有することを示す。

20

【0067】

以上の結果から、サリュージン - の細胞表面受容体はATP合成酵素鎖であり、この分子を標的とすることにより、内皮細胞や種々の腫瘍細胞のATP合成能を抑制して血管新生抑制作用を惹起することが考えられた。わずか20アミノ酸からなるサリュージン - は、分子量38kDaのアンギオスタチンに比較して遙かに低分子量であるにもかかわらず、アンギオスタチンと同様の生理活性を示すことから、臨床応用が容易であると考えられる。

30

【産業上の利用可能性】

【0068】

本発明によれば、臨床応用が容易な血管新生関連疾患の治療又は予防剤を提供することができる。また、血管新生関連疾患の治療又は予防剤のスクリーニング方法、及び血管新生関連疾患の治療又は予防剤のスクリーニングキットを提供することができる。

【 図 3 】

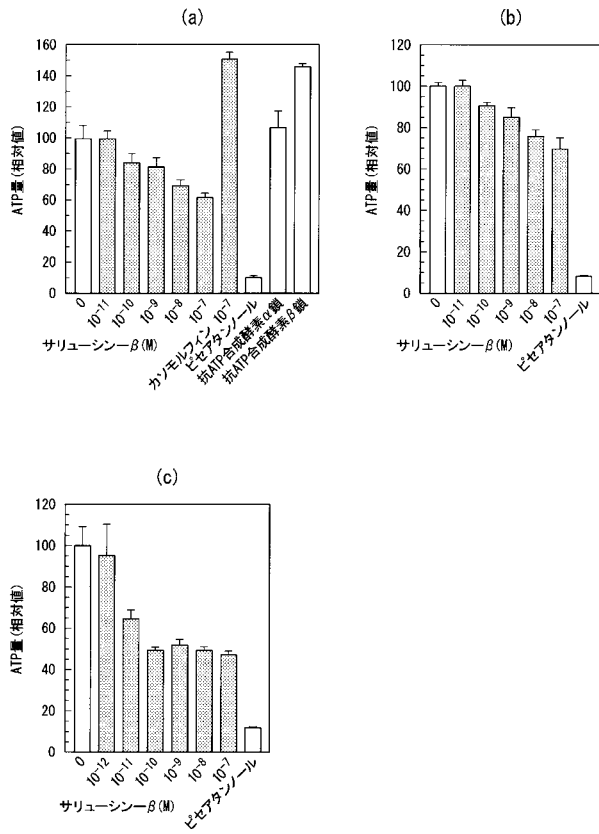


図3

【 図 4 】

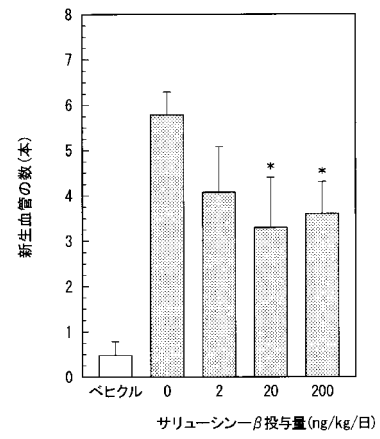


図4

【 図 1 】

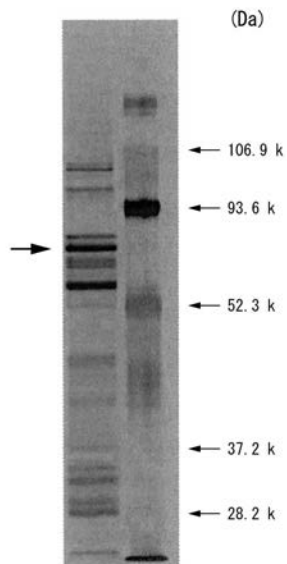


図1

【 図 2 】

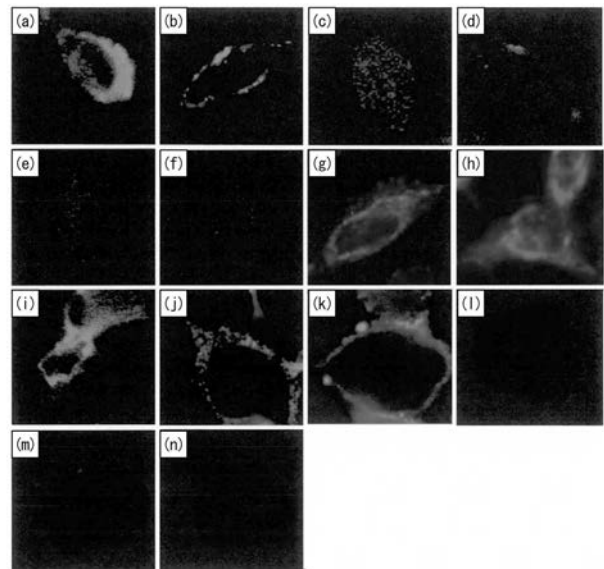


図2

【配列表】

2016222630000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)	
A 6 1 K	38/43	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	37/48	
C 0 7 K	7/08	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
			C 0 7 K	7/08	

(72)発明者 田中 憲次

兵庫県尼崎市道意町7 - 1 - 3 尼崎リサーチ・インキュベーションセンター(ARIC)株式会社
プロトセラ内

(72)発明者 李 良子

兵庫県尼崎市道意町7 - 1 - 3 尼崎リサーチ・インキュベーションセンター(ARIC)株式会社
プロトセラ内

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA17 BA01 BA08 BA18 BA44 DC01 NA14 ZA332 ZA362
ZA402 ZA452 ZB112
4C085 AA13 BB11 BB22 DD88 EE01 GG01
4H045 AA10 AA30 BA17 CA40 EA23 EA50 FA74