

(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2019-123679

(P2019-123679A)

(43) 公開日 令和1年7月25日(2019.7.25)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|---------------------------------|---------------------|-------------|
| A 6 1 K 31/165 (2006.01) | A 6 1 K 31/165 | 4 C 0 7 6 |
| A 6 1 K 31/135 (2006.01) | A 6 1 K 31/135 | 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 19/02 (2006.01) | A 6 1 P 19/02 | |
| A 6 1 K 47/34 (2017.01) | A 6 1 K 47/34 | |

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-3932 (P2018-3932)
 (22) 出願日 平成30年1月15日 (2018.1.15)

(71) 出願人 304019399
 国立大学法人岐阜大学
 岐阜県岐阜市柳戸1番1

(74) 代理人 100118706
 弁理士 青山 陽

(72) 発明者 小川 寛恭
 岐阜県岐阜市柳戸1番1 国立大学法人岐阜大学内

(72) 発明者 竹内 健太郎
 岐阜県岐阜市柳戸1番1 国立大学法人岐阜大学内

Fターム(参考) 4C076 AA29 AA30 BB01 CC09 EE24
 FF06 FF31 FF34
 4C206 AA01 AA02 GA02 GA30 MA04
 MA05 MA63 MA72 NA11 NA12
 NA14 ZA96 ZC02

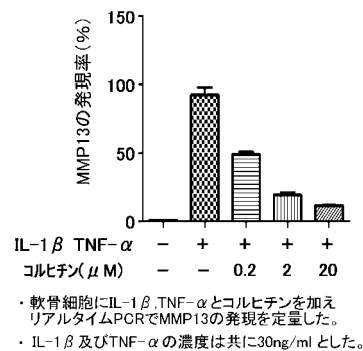
(54) 【発明の名称】 MMP 1 3 発現抑制剤及びそれを利用した変形性関節症治療薬

(57) 【要約】

【課題】MMP発現抑制剤及びそれを用いた変形性関節症治療薬を提供することを提供する。

【解決手段】本発明のMMP13発現抑制剤はコルヒチン及び/又はメデコルシンを含有することを特徴とする。軟骨培養細胞へのコルヒチンやメデコルシンを投与することによりMMP13の発現が顕著に抑制される。また、本発明の変形性関節症治療薬はコルヒチンを含有することを特徴とする。脛骨半月板靭帯を切除したマウスでは軟骨に著しい変形や欠損が認められたのに対して、コルヒチンを投与したマウスでは、その様な軟骨変性や欠陥は認められず、変形性関節症治療薬として効果があることが分かった。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

コルヒチン及び / 又はデメコルシンを含有することを特徴とするMMP13発現抑制剤。

【請求項 2】

コルヒチン及び / 又はデメコルシンを含有することを特徴とする変形性関節症治療薬。

【請求項 3】

コルヒチン及び / 又はデメコルシンが乳酸 - グリコール酸共重合体からなる粒子中に分散されていることを特徴とする請求項 2 に記載の変形性関節症治療薬。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】**

10

【0001】

本発明はMMP13発現抑制剤及びそれを利用した変形性関節症治療薬に関する。

【背景技術】**【0002】**

変形性関節症は、関節軟骨の老化や筋力の低下によって軟骨の変性・破壊を生じる疾患である。現在、初期～進行期変形性関節症に対しては、消炎鎮痛剤やヒアルロン酸注射などを使用した対症療法しかなく、病態を改善できる治療薬はない（例えば特許文献1参照）。このため、病期は徐々に進行することになる。末期関節症に対しては人工関節置換術が行われているが、手術侵襲が大きく、高齢で併存症のある患者は手術合併症のリスクが高く、誰もを受けられる訳ではない。さらには、高額な治療費による国家財政の圧迫などの問題がある。

20

【先行技術文献】**【特許文献】****【0003】**

【特許文献1】特開2013-209417号公報

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0004】**

本発明は、上記従来の実情に鑑みてなされたものであり、MMP発現抑制剤及びそれを用いた変形性関節症治療薬を提供することを解決すべき課題としている。

30

【課題を解決するための手段】**【0005】**

本発明者らは、上記課題を解決するため、MMP13に注目した。MMPとはMatrix metalloproteinaseの略であり、活性中心に金属イオンが配座しているタンパク質分解酵素の総称である。MMPには多くの種類が存在するが、そのうちの一種であるMMP13は関節炎の軟骨、リウマチの滑膜などの組織で新たに発見されたMMPであり、軟骨の主成分である2型コラーゲンを分解する酵素である。MMP13はレチノイン酸やTNFやIL-1のような炎症性メディエーターの刺激によって産生量が上昇することから、MMP13の発現を抑える薬剤が見つかれば、変形性関節症の治療効果が期待できる。このため、MMP13の発現を抑制するドラッグスクリーニングを行い、変形性関節症治療薬としての効果を調べることにした。

40

【0006】

数多くの既存の薬について、変形性関節症治療薬へのドラッグリポジショニングの可能性について鋭意研究を行った結果、軟骨培養細胞へのコルヒチンやデメコルシンを投与することによりMMP13の発現が抑制されることを見出した。そしてさらには、外傷性変形性関節症モデルマウスへコルヒチンを投与したところ、軟骨変性を防止できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】

すなわち、本発明のMMP13発現抑制剤はコルヒチン及び / 又はデメコルシンを含有することを特徴とする。

本発明者らの試験結果によれば、軟骨培養細胞へのコルヒチンやデメコルシン投与によ

50

りMMP13の発現が顕著に抑制される。

【0008】

また、本発明の変形性関節症治療薬はコルヒチン及び/又はデメコルシンを含有することを特徴とする。

本発明者らの試験結果によれば、脛骨半月板靭帯を切除したマウスでは軟骨に著しい変形や欠損が認められたのに対して、コルヒチンを投与したマウスでは、その様な軟骨変性や欠陥は認められず、変形性関節症治療薬として効果があることが分かった。デメコルシンについても、MMP13発現抑制効果を有することから、同様の変形性関節症治療薬として効果を有することが分かる。

【0009】

本発明の変形性関節症治療薬では、コルヒチン及び/又はデメコルシンが乳酸-グリコール酸共重合体からなる粒子中に分散されていることが好ましい。こうであれば、有効成分であるコルヒチンやデメコルシンの細胞内へのデリバリーが容易となり、吸収部位での薬物濃度が上がり、薬物の吸収性が向上し、薬効の持続性を保つこともできる。

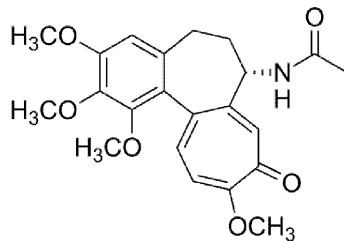
【発明を実施するための形態】

【0010】

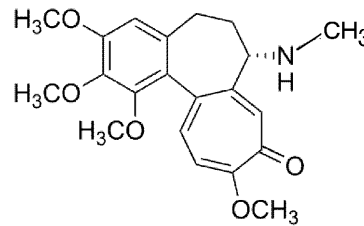
本発明のMMP13発現抑制剤はコルヒチン及び/又はデメコルシンを含有することを特徴とする。コルヒチン及びデメコルシンは下記化学構造式を有する化合物であり、微小管の主要蛋白質であるチューブリンに結合して重合を阻害し、微小管の形成を妨げる作用が知られている。細胞分裂を阻害するほか、好中球の活動を阻害し、抗炎症作用を奏するため、従来から痛風発作への鎮痛・消炎剤として用いられているが、MMP13発現抑制効果は知られていない。特に、デメコルシンはコルヒチンよりはるかに毒性が弱いという利点を有する。

【0011】

【化1】



コルヒチン



デメコルシン

【0012】

コルヒチン及びデメコルシンは、そのままの状態、または適当な媒体で希釈して、あるいは医薬品の製造分野において公知の方法により、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、徐放製剤または液剤等、種々の医薬品の形態で使用することができる。また、コルヒチンやデメコルシンは乳酸-グリコール酸共重合体からなる粒子中に分散されていることが好ましい。乳酸-グリコール酸共重合体は生体との相互作用が顕著であるため、粘膜層内への滞留・付着性が増し、有効成分であるコルヒチンやデメコルシンの細胞内へのデリバリーがされやすくなる。このため、吸収部位での薬物濃度が上がり、薬物の吸収性が向上し、薬効の持続性を保つこともできる。また、エンドサイトーシスにより細胞内に導入されやすくなる。

【0013】

これらの医薬品形態においては、適当な媒体を添加してもよい。そのような媒体としては、医薬的に許容される賦形剤、例えば結合剤(例えばシロップ、アラビアゴム、ゼラチン、ソルビトール、トラガントまたはポリビニルピロリドン)、充填剤(例えば乳糖、砂糖、トウモロコシ澱粉、リン酸カルシウム、ソルビトールまたはグリシン)、滑沢剤(例えばステアリン酸マグネシウム、タルクまたはポリエチレングリコール)、崩壊剤(例えば馬鈴

10

20

30

40

50

薯澱粉)または湿潤剤(例えばラウリル硫酸ナトリウム)等が挙げられる。

【0014】

以下、本発明の実施例について詳細を述べる。

<培養細胞へのコルヒチンの投与試験>

・軟骨細胞の培養

軟骨細胞株SW1353を6ウェルの培養プレートに播き(5 x 105個/ウェル)、10%ウシ胎児血清(Invitrogen、カールスバッド、カリフォルニア州)、ペニシリン100 U/ml、ストレプトマイシン100 µg/ml並びにIL-1 (30ng/ml),TNF- (30ng/ml)及びコルヒチン(2 µM)を添加したダルベッコ変法イーグル培地/Hams F-12培地(和光純薬工業、大阪)中で、37 °C、5%CO₂、加湿空気下で24時間培養した。

10

【0015】

・逆転写定量ポリメラーゼ連鎖反応(RT-qPCR)

培養した軟骨細胞から全RNAを抽出し、RT-qPCRに供した(各時点でn=3)。MMP13のmRNAの発現レベルをGAPDHを用いて正規化した。プライマー配列は、請求に応じて提供可能である。

【0016】

・統計解析

パラメータは両側unpaired t検定を用いた。

【0017】

(結果)

20

培養したSW1353軟骨細胞におけるコルヒチンの投与影響を示したグラフを図1に示す。このグラフから、IL-1 及びTNF- を添加し、コルヒチンを添加しなかった細胞中のMMP13の発現率に比べて、コルヒチンを添加した場合には、その添加した濃度が増すに従ってMMP13の発現率が低下した。以上の結果から、コルヒチンにはMMP13の発現を抑制する効果があることが分かった。

【0018】

<外傷性変形性関節症モデルマウスへのコルヒチンの投与試験>

・実験に供したマウス

すべての動物実験は、国立大学法人岐阜大学医学部施設内動物実験委員会によって承認されたプロトコルに準拠して実施した。

30

【0019】

・外傷性変形性関節症モデルマウスの作成

・実施例1

実施例1では、10週齢のマウスに対して、三種混合麻酔(塩酸メドミジン0.3mg/kg+ミダゾラム4mg/kg+酒石酸ブトルファンール5mg/kg)の腹腔内注入とジエチルエーテルの吸入を組み合わせた全身麻酔下で、10週齢のマウスの膝関節の前面で皮膚を縦軸方向に10 mm切開して膝蓋腱内側縁から関節内に侵入し、脛骨半月板靭帯を切除して外傷性変形性関節症モデルマウスを作成した。手術後、飲水ボトルにコルヒチンを0.02mg/mlの濃度で含む飲料水を入れ、1日あたり0.74mgを12週間投与した。なお、試験中においてマウスは自由に歩行させた。

40

・比較例1

比較例1では、飲水ボトルにコルヒチンを含まない水を入れて与えた。その他については実施例1と同様であり、説明を省略する。

【0020】

(評価)

12週間飼育した実施例1及び比較例1のマウスについて、以下の試験を行った。

(膝関節内側関節軟骨の光学顕微鏡による組織学的観察)

膝関節に厚さ5 µmの矢状切開を施し、サフラニンO及びアルシアンブルーで染色し、切片を、DP21カメラ(オリンパス、東京)を装着したCKX41顕微鏡を用いて40倍の倍率で観察した。

50

【0021】

(結果)

図2に示すように、コルヒチンを投与しなかった比較例1のマウスでは、著しい軟骨欠損が観察されたのに対して、コルヒチンを投与した実施例1のマウスでは、軟骨の変性や欠損は観察されなかった。以上の結果から、コルヒチンは変形性関節症の治療薬として効果を有することが分かった。

【0022】

<培養細胞へのデメコルシンの投与試験>

・軟骨細胞の培養

軟骨細胞株SW1353を6ウェルの培養プレートに播き(5 x 10⁵個/ウェル)、10%ウシ胎児血清(Invitrogen、カールスバッド、カリフォルニア州)、ペニシリン100 U/ml、ストレプトマイシン100 µg/ml並びにIL-1 (30ng/ml)、TNF- (30ng/ml)及びデメコルシン(1, 10, 100 µM)を添加したダルベッコ変法イーグル培地/Hams F-12培地(和光純薬工業、大阪)中で、37 °C、5%CO₂、加湿空気下で24時間培養した。

10

【0023】

・逆転写定量ポリメラーゼ連鎖反応(RT-qPCR)

培養した軟骨細胞から全RNAを抽出し、RT-qPCRに供した(各時点でn=3)。MMP13 mRNAの発現レベルをGAPDHを用いて正規化した。プライマー配列は、請求に応じて提供可能である。

【0024】

・統計解析

パラメータは両側unpaired t検定を用いた。

20

【0025】

(結果)

培養したSW1353軟骨細胞におけるデメコルシンの投与影響を示したグラフを図3に示す。このグラフから、IL-1 及びTNF- を添加し、デメコルシンを添加しなかった細胞中のMMP13の発現率に比べて、コルヒチンを添加した場合には、その添加した濃度が増すに従ってMMP13の発現率が低下した。以上の結果から、デメコルシンにはMMP13の発現を抑制する効果があることが分かった。

【0026】

この発明は上記発明の実施の態様及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

30

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】培養細胞へのコルヒチンの投与試験の結果を示すグラフである。

【図2】コルヒチンを投与したマウスと投与しなかったマウスにおける膝関節内側関節軟骨の光学顕微鏡写真である。

【図3】培養細胞へのデメコルシンの投与試験の結果を示すグラフである。

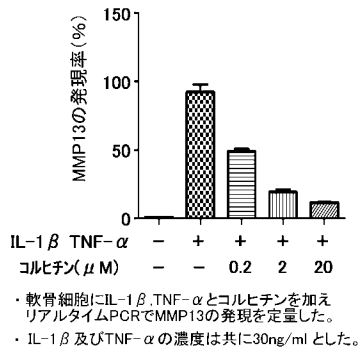
【産業上の利用可能性】

40

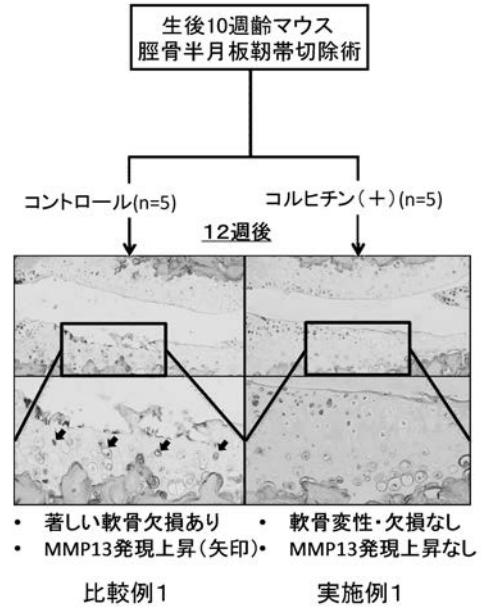
【0028】

コルヒチンやデメコルシンを含有する本発明のMMP発現抑制剤は、MMP13の発現を抑制する効果を有することから、変形性関節症の原因究明のためのツールとして利用可能である。また、外傷性変形性関節症モデルマウスへのコルヒチンの投与により軟骨の変性や欠損は治癒することから、コルヒチンを含有する本発明の変形性関節症治療薬は、変形性関節症を治癒する医薬品として利用することができる。

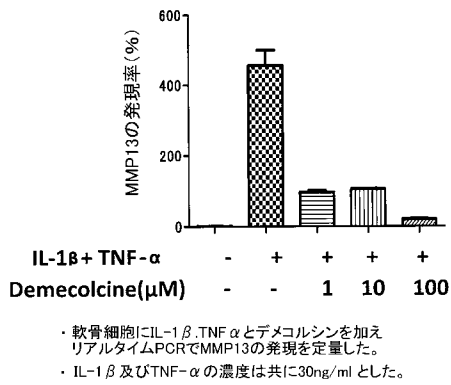
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.

A 6 1 K 9/14 (2006.01)

F I

A 6 1 K 9/14

テーマコード(参考)