

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02017/073232

発行日 平成30年8月30日 (2018.8.30)

(43) 国際公開日 平成29年5月4日 (2017.5.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/711	4 C 0 8 6
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 19 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2017-547680 (P2017-547680)
 (21) 国際出願番号 PCT/JP2016/078775
 (22) 国際出願日 平成28年9月29日 (2016.9.29)
 (31) 優先権主張番号 特願2015-212817 (P2015-212817)
 (32) 優先日 平成27年10月29日 (2015.10.29)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

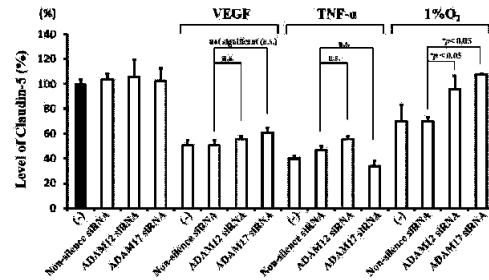
(71) 出願人 304020177
 国立大学法人山口大学
 山口県山口市吉田 1 6 7 7 - 1
 (74) 代理人 100177714
 弁理士 藤本 昌平
 (72) 発明者 池田 栄二
 山口県宇部市南小串 1 丁目 1 - 1 国立大
 学法人山口大学大学院医学系研究科内
 (72) 発明者 有馬 充
 山口県宇部市南小串 1 丁目 1 - 1 国立大
 学法人山口大学大学院医学系研究科内
 Fターム(参考) 4C084 AA13 NA14 ZA011 ZA021 ZA331
 ZA361 ZA831 ZB211 ZC411

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経系血管バリアーの機能回復剤及び神経系疾患治療剤

(57) 【要約】

本発明の課題は、低酸素状態のみならず様々な誘因による血管バリアー破綻に対して作用する神経系血管バリアーの破綻抑制剤及び神経系疾患治療剤を提供することである。解決手段として、(a) ベイシジン (basigin) 遺伝子の発現を抑制する機能性核酸；(b) ベイシジンの生理活性を消失又は減退する機能性核酸；(c) 上記(a)又は(b)の機能性核酸をコードするDNAを含む該機能性核酸発現ベクター；のいずれかを有効成分とする神経系血管バリアーの破綻抑制剤又は神経系疾患治療剤を調整する。神経系疾患としては、脳神経系疾患又は網膜神経系疾患が好ましい。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下の (a) ~ (c) のいずれかを有効成分とする神経系血管バリアーの破綻抑制剤。

(a) ベイシジン (basigin) 遺伝子の発現を抑制する機能性核酸 ;

(b) ベイシジンの活性を消失又は減退する機能性核酸 ;

(c) 上記 (a) 又は (b) の機能性核酸をコードする DNA を含む該機能性核酸発現ベクター ;

【請求項 2】

ベイシジン遺伝子の発現を抑制する機能性核酸が siRNA であることを特徴とする請求項 1 記載の神経系血管バリアー破綻抑制剤。

10

【請求項 3】

ベイシジン遺伝子の発現を抑制する機能性核酸が、配列番号 1 に示すヌクレオチドのセンス鎖配列と配列番号 2 に示すその相補的なアンチセンス鎖配列から構成される siRNA、又は、配列番号 3 に示すヌクレオチドのセンス鎖配列と配列番号 4 に示すその相補的なアンチセンス鎖配列から構成される siRNA であることを特徴とする請求項 2 記載の神経系血管バリアー破綻抑制剤。

【請求項 4】

以下の (a) ~ (c) のいずれかを有効成分とする神経系血管バリアーの破綻に起因する神経系疾患治療剤。

(a) ベイシジン (basigin) 遺伝子の発現を抑制する機能性核酸 ;

(b) ベイシジンの活性を消失又は減退する機能性核酸 ;

(c) 上記 (a) 又は (b) の機能性核酸をコードする DNA を含む該機能性核酸発現ベクター ;

20

【請求項 5】

神経系疾患が、脳神経系疾患又は網膜神経系疾患であることを特徴とする請求項 4 記載の神経系疾患治療剤。

【請求項 6】

神経系疾患が、脳浮腫又は網膜浮腫であることを特徴とする請求項 5 記載の神経系疾患治療剤。

【請求項 7】

ベイシジン遺伝子の発現を抑制する機能性核酸が siRNA であることを特徴とする請求項 4 ~ 6 のいずれか記載の神経系疾患治療剤。

30

【請求項 8】

ベイシジン遺伝子の発現を抑制する機能性核酸が、配列番号 1 に示すヌクレオチドのセンス鎖配列と配列番号 2 に示すその相補的なアンチセンス鎖配列から構成される siRNA、又は、配列番号 3 に示すヌクレオチドのセンス鎖配列と配列番号 4 に示すその相補的なアンチセンス鎖配列から構成される siRNA であることを特徴とする請求項 7 記載の神経系疾患治療剤。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】**

40

【0001】

本発明は低酸素状態のみならず様々な誘因による神経系血管バリアー破綻に対して作用する神経系血管バリアー破綻抑制剤及び神経系疾患治療剤に関する。

【背景技術】**【0002】**

成体の神経組織 (脳、網膜、脊髄など) では、血液と神経組織の間に血管バリアー (血液脳関門、血液網膜関門など) が形成され、神経細胞が正常に機能できる至適組織微小環境が維持されており、組織特異的に分化した血管系が有するバリアー機能により他組織から区画化されている。成体神経組織の血管バリアー機能は個体発生過程において誘導されるが、いったん誘導された血管バリアー機能も常に一定の状態にあるわけではなく、成体

50

は血管バリアー機能を増強したり減弱させたりすることにより、神経細胞が正常に機能するための至適微小環境を維持している。一方、虚血性脳疾患などの難治性神経系疾患においては、血管バリアー機能が破綻し組織微小環境の攪乱が生じることが、病態を悪化させる大きな要因として働いている。したがって、血管バリアー機能の調節因子は、それら難治性疾患の病態悪化を妨げるための新規治療法開発の標的となることが期待される。

【0003】

神経系血管バリアー機能の本体は、血管の内皮細胞間に形成されるタイトジャンクション (tight junction: 以下、TJ) 網に依存することから、TJ構成分子を研究することが、血管バリアー調節機構の解明に向けた戦略の中心となっている。TJ構成分子としては、occludin、claudin (27メンバーからなるファミリーを形成)、junctional adhesion molecule A (JAM-A)などが特定されているが、生理的状態の神経系血管内皮細胞の細胞膜に発現・局在しているクローディン-5 (claudin-5: claudin family membersの一つ)が血管バリアー機能に必須であることが報告されている (非特許文献1参照)。また、本発明者らは、1) 難治性神経系疾患の血管内皮細胞の細胞膜からのクローディン-5の消失、2) 血管バリアー機能の破綻、3) 病態悪化、というカスケードを報告した (非特許文献2参照)。しかしながら、血管バリアー機能の制御機構については、いまだ多くが不明のままである。

10

【0004】

神経系血管バリアーの破綻は、神経毒性分子の組織内侵入を許すとともに、血漿成分の浸出による組織浮腫を惹起する。浮腫が一定期間を超えて持続すると神経系組織に不可逆的な障害が加わる。現在の医療では、血管バリアー破綻による脳浮腫に対しては、グリセオールの静脈内投与により血漿膠質浸透圧を上げ、組織間質液を血管内に移動させる治療が主流となっている。副腎皮質ステロイド投与も浮腫に有効との考えもあるが、その浮腫軽減機構は明らかではなく、副作用も多く併発することから治療適応は狭い。

20

【0005】

また、難治性神経疾患において血管バリアーを破綻させる種々の誘因が知られているが、本発明者らは、誘因として組織低酸素状態に焦点を当てた解析を行い、ADAM12及びADAM17を血管バリアー破綻の責任因子として特定し、それらを標的とした治療薬の有用性を示した (特許文献1、非特許文献3参照)。ADAM12及びADAM17を標的とした治療薬は、主として低酸素状態を誘因とした血管バリアー破綻に対して有用である。

30

【0006】

一方、多くの神経系疾患における血管バリアー破綻には低酸素状態が誘因として働くものの、実際には、低酸素状態以外の種々の誘因が混在して血管バリアー破綻に関与している。そのため、ADAM12及び/又はADAM17を標的とした治療薬は神経系疾患の病態改善に寄与するが、血管バリアー破綻の抑制が完全ではない可能性が残る。そこで、低酸素状態のみならず様々な誘因による血管バリアー破綻に対して作用する神経系疾患治療薬が求められていた。

【0007】

ところで、ベイシジンは細胞膜に局在するイムノグロブリンスーパーファミリーに属する糖タンパク質であり、EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer)、CD147 (cluster of differentiation 147)、HT7、OX-47とも称されている。かかるベイシジンをターゲットとするsiRNAがMMP-9を減少させること、及び、ベイシジンをターゲットとする抗体が、肝細胞がんと共培養したヒト繊維芽細胞におけるMMP-2を増減させること (特許文献2参照) や、ベイシジン抗体が、がんや炎症性疾患の診断、治療に用いることができること (特許文献3、4参照) や、ベイシジン抗体が、血管新生に関与する悪性疾患の診断又は治療に用いることができること (特許文献5、6参照) が報告されているが、ベイシジンと血管バリアー破綻との関係は示されていない。

40

【先行技術文献】

50

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】国際公開第2014/174834号パンフレット

【特許文献2】国際公開第2013/150518号パンフレット

【特許文献3】特開平6-225763号公報

【特許文献4】中国特許出願公開第104086654号明細書

【特許文献5】特表2012-506369号公報

【特許文献6】特表2007-530538号公報

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Nitta T, et al. J. Cell Biol.(2003) 161:653-660

【非特許文献2】Koto T, et al. Am. J. Pathol.(2007) 170:1389-1397

【非特許文献3】Cui D, et al. Sci. Rep. 5:12796(2015) doi:10.1038/srep12796

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明の課題は、低酸素状態のみならず様々な誘因による血管バリアー破綻に対して作用する神経系血管バリアーの破綻抑制剤及び神経系疾患治療剤を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、多くの神経系疾患において血管バリアー破綻の誘因として存在する組織低酸素状態に焦点をあてた解析を行い、血管内皮細胞に発現しているADAM12とADAM17が低酸素刺激による血管バリアー破綻の責任因子として特定し、それらを標的とした治療薬の有用性を示した。しかし、低酸素状態以外にも血管バリアー破綻の誘因は存在し、多くの神経系疾患においては、それらの誘因が混在して血管バリアー破綻を来すと考えられる。ADAM12とADAM17は、主として低酸素状態を誘因とした血管バリアー破綻に関与する因子であることから、もしも様々な誘因による血管バリアー破綻に共通した責任因子を特定できれば、多くの神経系疾患に適応可能なより汎用性の高い新規治療法の確立が期待されると考え研究を進めた。そして、低酸素状態と共に炎症などの誘因による血管バリアー破綻に共通する責任因子としてベシジン(basigin)に着目した。ベシジンが報告されて約30年間が経過する(当初はHT7として報告; [Risau W, et al. EMBO(1986) J. 5, 3179-3183])。多くの研究者によるベシジンの解析にも拘わらず、その血管バリアーにおける機能は不明のままである。これまでの解析は全て、「血管バリアー形成内皮細胞に特異的に発現している分子」は「血管バリアー機能を誘導し維持するために働く分子」との視点に立ったものであった。そこで、本発明者らは、発想を逆転し、「血管バリアー形成内皮細胞に特異的に発現している分子」は「必要な時に血管バリアーを開くために働く分子」ではないかとの仮説を立て、本発明の研究計画の着想に至り解析を進めた。その結果、神経系血管内皮細胞に発現するベシジンは、種々の誘因による血管バリアー破綻に共通した責任因子であること、神経系疾患における治療標的として有用であることが明らかとなり、本発明を完成した。

【0012】

すなわち、本発明は、以下に示すとおりのものである。

[1] 以下の(a)~(c)のいずれかを有効成分とする神経系血管バリアーの破綻抑制剤。

(a) ベシジン(basigin)遺伝子の発現を抑制する機能性核酸;

(b) ベシジンの活性を消失又は減退する機能性核酸;

(c) 上記(a)又は(b)の機能性核酸をコードするDNAを含む該機能性核酸発現ベクター;

[2] ベシジン遺伝子の発現を抑制する機能性核酸がsiRNAであることを特徴とする上記[1]記載の神経系血管バリアーの破綻抑制剤。

10

20

30

40

50

[3] ベイシジン遺伝子の発現を抑制する機能性核酸が、配列番号 1 に示すヌクレオチドのセンス鎖配列と配列番号 2 に示すその相補的なアンチセンス鎖配列から構成される s i R N A、又は、配列番号 3 に示すヌクレオチドのセンス鎖配列と配列番号 4 に示すその相補的なアンチセンス鎖配列から構成される s i R N Aであることを特徴とする上記 [2] 記載の神経系血管バリアーの破綻抑制剤。

[4] 以下の (a) ~ (c) のいずれかを有効成分とする神経系血管バリアーの破綻に起因する神経系疾患治療剤。

(a) ベイシジン (basigin) 遺伝子の発現を抑制する機能性核酸 ;

(b) ベイシジンの活性を消失又は減退する機能性核酸 ;

(c) 上記 (a) 又は (b) の機能性核酸をコードする D N A を含む該機能性核酸発現ベクター ;

[5] 神経系疾患が、脳神経系疾患又は網膜神経系疾患であることを特徴とする上記 [4] 記載の神経系疾患治療剤。

[6] 神経系疾患が、脳浮腫又は網膜浮腫であることを特徴とする上記 [5] 記載の神経系疾患治療剤。

[7] ベイシジン遺伝子の発現を抑制する機能性核酸が s i R N A であることを特徴とする上記 [4] ~ [6] のいずれか記載の神経系疾患治療剤。

[8] ベイシジン遺伝子の発現を抑制する機能性核酸が、配列番号 1 に示すヌクレオチドのセンス鎖配列と配列番号 2 に示すその相補的なアンチセンス鎖配列から構成される s i R N A、又は、配列番号 3 に示すヌクレオチドのセンス鎖配列と配列番号 4 に示すその相補的なアンチセンス鎖配列から構成される s i R N A であることを特徴とする上記 [7] 記載の神経系疾患治療剤。

【発明の効果】

【 0 0 1 3 】

本発明により、低酸素状態のみならず様々な誘因による血管バリアー破綻に対して作用する神経系血管バリアーの破綻抑制剤及び神経系疾患治療剤を提供することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 4 】

【図 1】マウス脳血管内皮細胞株 (b E N D . 3 細胞) を培養し、ベイシジン (以下、「 B S G 」ともいう) s i R N A # 1、B S G s i R N A # 2、N o n - s i l e n c e s i R N A を導入後、さらに T N F - 、 V E G F を添加してから 6 時間培養後、又は低酸素処理直後におけるクロードイン - 5 の発現と局在を免疫染色により調べた結果を示す図である。

【図 2】図 1 におけるクロードイン - 5 タンパク質の発現を定量化した結果を示す図である。

【図 3】経皮内電気抵抗値 (T E E R) を測定する方法の概念図である。

【図 4】 T N F - 又は V E G F を添加してから 3、6、9 時間培養後における、細胞単層の経皮内電気抵抗値 (T E E R) を測定した結果を示す図である。

【図 5】参考例において、マウス脳血管内皮細胞株 (b E N D . 3 細胞) を培養し、 A D A M 1 2 s i R N A、A D A M 1 7 s i R N A、N o n - s i l e n c e s i R N A を導入後、さらに T N F - 、 V E G F を添加してから 6 時間培養後、又は低酸素処理後のクロードイン - 5 タンパク質の発現を定量化した結果を示す図である。

【図 6】実施例 2 において、正常マウス及びストレプトゾトシン投与マウスに、 B S G s i R N A # 1 又は 2、及び N o n - s i l e n c e s i R N A を硝子体内に注射し、トレーサーを投与後にトレーサーの漏出を共焦点顕微鏡にて観察した結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 5 】

本発明における神経系疾患治療剤としては、(a) ベイシジン (basigin) 遺伝子の発現を抑制する機能性核酸 ; (b) ベイシジンの活性を消失又は減退する機能性核酸 ; (c

10

20

30

40

50

）上記（a）又は（b）の機能性核酸をコードするDNAを含む該機能性核酸発現ベクター；のいずれかを有効成分とする神経系血管バリアーの破綻抑制剤（以下、「本発明の神経系血管バリアーの破綻抑制剤」という場合がある）や、上記（a）～（c）のいずれかを有効成分とする神経系血管バリアーの破綻に起因する神経系疾患治療剤（以下、「本発明の神経系疾患治療剤」という場合がある）であれば特に制限されず、クローディン-5の消失を抑制すると共に、神経系血管バリアー機能の破綻を抑制することや、副作用が少なく効果的に神経系血管バリアーの破綻に起因する神経系疾患治療をすることができる。

【0016】

また、本発明の神経系血管バリアーの破綻抑制剤の別の態様としては、（a）ベシジン遺伝子の発現を抑制する機能性核酸；（b）ベシジンの活性を消失又は減退する機能性核酸；（c）上記（a）又は（b）の機能性核酸をコードするDNAを含む該機能性核酸発現ベクター；のいずれかを対象に投与することを特徴とする神経系血管バリアーの破綻抑制方法や、神経系血管バリアーの破綻抑制剤として使用するための、（a）ベシジン遺伝子の発現を抑制する機能性核酸；（b）ベシジンの生理活性を消失又は減退する機能性核酸；（c）上記（a）又は（b）の機能性核酸をコードするDNAを含む該機能性核酸発現ベクター；のいずれかや、（a）ベシジン遺伝子の発現を抑制する機能性核酸；（b）ベシジンの生理活性を消失又は減退する機能性核酸；（c）上記（a）又は（b）の機能性核酸をコードするDNAを含む該機能性核酸発現ベクター；のいずれかの、神経系血管バリアーの破綻抑制剤の調製における使用を挙げることができる。

10

【0017】

さらに、本発明の神経系疾患治療剤の別の態様としては、（a）ベシジン遺伝子の発現を抑制する機能性核酸；（b）ベシジンの活性を消失又は減退する機能性核酸；（c）上記（a）又は（b）の機能性核酸をコードするDNAを含む該機能性核酸発現ベクター；のいずれかを対象に投与することを特徴とする神経系血管バリアーの破綻に起因する神経系疾患治療方法や、神経系血管バリアーの破綻に起因する神経系疾患治療剤として使用するための、（a）ベシジン遺伝子の発現を抑制する機能性核酸；（b）ベシジンの生理活性を消失又は減退する機能性核酸；（c）上記（a）又は（b）の機能性核酸をコードするDNAを含む該機能性核酸発現ベクター；のいずれかや、（a）ベシジン遺伝子の発現を抑制する機能性核酸；（b）ベシジンの生理活性を消失又は減退する機能性核酸；（c）上記（a）又は（b）の機能性核酸をコードするDNAを含む該機能性核酸発現ベクター；のいずれかの、神経系血管バリアーの破綻に起因する神経系疾患治療剤の調製における使用を挙げることができる。

20

30

【0018】

ベシジンは、細胞膜に局在するイムノグロブリンスーパーファミリーに属する糖タンパク質であり、EMMPRI N (extracellular matrix metalloproteinase inducer)、CD147 (cluster of differentiation 147)、HT7、OX-47とも称されている。

【0019】

本発明において、ベシジン遺伝子の発現を抑制する機能性核酸としては、ベシジン遺伝子の発現を抑制するsiRNA、アンチセンスRNA、miRNA、shRNA、リボザイムを挙げることができ、ベシジン遺伝子の発現を抑制するsiRNAを好適に挙げることができる。また、本発明において、ベシジンの活性を消失又は減退する機能性核酸としては、ベシジンが血管バリアーを開く機能を消失又は減退するアプタマーを挙げることができる。上記機能性核酸はベシジン遺伝子の配列情報に基づいて設計することができ、例えば以下の文献に記載の方法で設計することができる (Wadhwa, R, et al. Reviews in Mutat. Res. (2004) 567:71-84, Wadhwa, R. et al. Current Opinions in Molecular Therapeutics. (2004) 6:367-372, Wadhwa, R. et al. EMBO (2003) 4:595-601)。また、かかる機能性核酸は公知の合成による方法及び遺伝子組換え技術を用いる方法により作製することができる。

40

【0020】

50

上記ベシジン遺伝子の発現を抑制する s i R N A とは、ベシジン遺伝子の m R N A に相同なヌクレオチドのセンス鎖配列と、その相補的なアンチセンス鎖配列とからなり、ベシジン遺伝子の発現を抑制する二本鎖 R N A を意味する。二本鎖 R N A の長さは、好ましくは 17 ~ 27 塩基対、より好ましくは 18 ~ 20 塩基対である。ベシジン遺伝子の発現を抑制する s i R N A としては、具体的には、配列番号 1 に示すヌクレオチドのセンス鎖配列と配列番号 2 に示すその相補的なアンチセンス鎖配列から構成される s i R N A、又は配列番号 3 に示すヌクレオチドのセンス鎖配列と配列番号 4 に示すその相補的なアンチセンス鎖配列から構成される s i R N A を好適に挙げることができる。また、それぞれの鎖の 3' 側には、オーバーハング配列、好ましくはチミン、グアニン、シトシン、アデニンのいずれかから選択される 2 塩基をもたせることにより、ベシジン遺伝子の発現抑制作用を増強することもできる。

10

【0021】

上記機能性核酸をコードする D N A を含む該機能性核酸発現ベクターとしては、上記機能性核酸を発現可能なベクターであれば特に制限されないが、たとえば機能性核酸が s i R N A の場合には、ベシジンの特定ヌクレオチドのセンス鎖配列 - リンカー - その相補的なアンチセンス鎖配列からなる二本鎖 R N A 発現カセットをプロモーターの下流に挿入することにより作製することができる。かかる機能性核酸発現ベクター作製に用いるベクターは、市販品を含め公知のものを用いることができるが、哺乳動物に導入する場合にはウイルスベクターであることが好ましい。ウイルスベクターとしては、例えば、マウス白血病レトロウイルスベクターや、アデノ随伴ウイルスベクターや、アデノウイルスベクター

20

【0022】

前記神経系血管バリアーの破綻に起因する神経系疾患としては、好ましくは血管バリアー機能が破綻して組織微小環境の攪乱が生じることによる疾患を挙げることができ、より好ましくは脳浮腫、脳梗塞、血管性認知症、虚血性脳疾患などの脳神経系疾患、又は網膜浮腫などの網膜神経系疾患を挙げることができ、特に好ましくは脳浮腫又は網膜浮腫を挙げることができる。なお、神経系血管とは、神経系組織の血管であり、神経系組織以外の組織における血管は含まれない。

30

【0023】

前記神経系血管バリアーとは、血液と神経系の組織液との物質交換を制限する機構を意味し、血液と脳の組織液との物質交換を制限する血液脳関門や、血液と網膜の組織液との物質交換を制限する血液網膜関門を好適に挙げることができる。

【0024】

本発明において、血管バリアーの破綻とは、血液と神経系の組織液との物質交換を制限する機構が機能しないことを意味する。かかる血管バリアーの破綻により、神経毒性分子の組織内侵入や血漿成分の浸出などの血管バリアー機能の障害が生じることとなる。

【0025】

本発明の神経系血管バリアーの破綻抑制剤又は神経系疾患治療剤は、ベシジン遺伝子の発現を抑制する機能性核酸、ベシジンの活性を消失又は減退する機能性核酸や、かかる機能性核酸をコードする D N A を含む該機能性核酸発現ベクターを有効成分としていればよく、賦形剤、結合剤、滑沢剤、崩壊剤、防腐剤、等張化剤、安定化剤、分散剤、酸化防止剤、着色剤、香味剤、緩衝剤などの製剤化のために通常使用され薬学的に許容される添加物を含んでいてもよい。製剤の剤型としては散剤、顆粒剤などの固形製剤であってもよいが、優れた神経系疾患治療効果を得る観点からは、溶液剤、乳剤、懸濁剤などの液剤とすることが好ましい。

40

【0026】

本発明の神経系血管バリアーの破綻抑制剤の投与方法としては所望の神経系血管バリア

50

一の破綻抑制効果が得られる限り特に制限されず、また、本発明の神経系疾患治療剤の投与方法としては、所望の神経系疾患治療効果が得られる限り特に制限されず、所貴いずれの投与方法も静脈内投与、経口投与、筋肉内投与、皮下投与、経皮投与、経鼻投与、経肺投与などを挙げることができ、特に網膜神経系疾患においては、硝子体内投与を挙げることができる。また、本発明の神経系血管バリアーの破綻抑制剤又は神経系疾患治療剤の投与量は特に制限されず、被検者や被検動物の体調、病状、体重、年齢、性別などによって適宜調整することができる。投与量としては、例えば1日あたり、 $0.01 \mu\text{g} \sim 100 \text{g} / \text{kg}$ 体重、より好ましくは $0.1 \mu\text{g} \sim 10 \text{g} / \text{kg}$ 体重、さらに好ましくは $1 \mu\text{g} \sim 1 \text{g} / \text{kg}$ 体重を挙げることができ、本発明の神経系血管バリアーの破綻抑制剤を他の神経系血管バリアーの破綻抑制剤と併用してもよく、また、本発明の神経系疾患治療剤を他の神経系疾患治療剤と併用してもよい。本発明の神経系血管バリアーの破綻抑制剤又は神経系疾患治療剤の投与回数や投与期間なども特に制限されず、1日あたりの投与量を1日1回又は数回に分けて投与することもできる。また投与対象の細胞、組織の由来や生体は特に制限されず、好ましくは哺乳類であり、例えばヒト、サル、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ネコ、ラット、マウス、ハムスターなどを例示することができ、中でもヒトを例示することができる。

10

【0027】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

20

【実施例1】

【0028】

[マウス脳血管内皮細胞株の単層培養を用いた *in vitro* 系解析]

本発明者らはこれまでに、上述のように1) 難治性神経系疾患の血管内皮細胞の細胞膜からのクロードイン-5の消失、2) 血管バリアー機能の破綻、3) 病態悪化、というカスケードを明らかにして報告した。そこで、1次スクリーニングとして、対象因子の発現を特異的に抑制する *siRNA* を作製し、種々の刺激(低酸素、サイトカインなど)によるマウス脳血管内皮細胞株(bEND.3細胞)の細胞膜からのクロードイン-5消失に共通した阻害効果を示す *siRNA* を、血管バリアー破綻に対する治療薬候補とした。そのなかでベイシジンに対する *siRNA* を候補とし、かかる候補 *siRNA* の血管バリアー破綻に対する治療薬としての有用性について、以下に示す方法で *in vitro* 系を用いた機能的解析を行った。

30

【0029】

ベイシジンに対する *siRNA* (ベイシジン特異的 *siRNA* (BSG *siRNA*)) として、以下の表1に示すBSG *siRNA* #1(センス鎖配列: 配列番号5、アンチセンス鎖配列: 配列番号6)、BSG *siRNA* #2(センス鎖配列: 配列番号7、アンチセンス鎖配列: 配列番号8)の2種類、及びNon-silence *siRNA* (Silencer(登録商標) Select Negative Control #1 *siRNA*: カタログ番号4390843)をThermo Fisher Scientific社から購入した。なお、配列番号5~12中、小文字で表される塩基配列はオーバーハング配列を表す。

40

【0030】

マウス脳血管内皮細胞株(bEND.3細胞: ATCCより購入)をそれぞれ4ディッシュ用意し、10% FBS(ウシ胎児血清)入りのDMEM培地(シグマ・アルドリッチ社製)を用いて、37℃、95%エアー、5% CO₂ 条件下で培養した。コンフェルトになってからさらに5.5日後に上記各 *siRNA* を終濃度が10 nMとなるように導入した。導入36時間後に、4ディッシュのうち1ディッシュはVEGFを、1ディッシュはTNF- α を50 ng/mlとなるように加え、1ディッシュは添加無しとし、正常酸素状態でそれぞれさらに3時間、6時間、9時間培養した。また、4ディッシュのうち残りの1ディッシュは *siRNA* 導入36時間後に、30分間ほど1%低酸素状態とした。

【0031】

【表 1】

	Sense	Antisense
BSGsiRNA#1	GCAUCCUACCCUCCUAAUUAtt (配列番号5)	UAAUAGGAGGGUAGGAUGCAt (配列番号6)
BSGsiRNA#2	CAACCUUGACGUAAAUGUUtt (配列番号7)	AACAUUUACGUCAAGGUUGct (配列番号8)

【0032】

TNF- α 、VEGFを添加してから6時間培養後、又は低酸素処理直後におけるクローデイン-5の発現と局在を、1次抗体としてRabbit anti-mouse claudin-5 (Thermo Fisher Scientific社製)、2次抗体としてAlexaFluor (登録商標) 488 Goat anti-Rabbit IgG抗体 (Thermo Fisher Scientific社製) を用いた免疫染色により調べた結果を図1に示す。また、図1におけるクローデイン-5タンパク質の発現を上記非特許文献3に記載の方法に準じて定量化した結果を図2に示す。具体的には、1検体あたり、3視野を無作為に選出して写真を撮影し、1枚の写真につき3本のラインを引き、細胞膜との交点におけるクローデイン-5の蛍光強度を測定し、平均値を算出した。同様に1群あたり3検体ずつ測定を行い、平均値を比較した。

10

【0033】

さらに、血管バリアーの機能的指標として、TNF- α 又はVEGFを添加して3、6、9時間培養後における、細胞単層の経皮内電気抵抗値 (TEER) を上記非特許文献2に記載の方法に従って図3に示すように測定した結果を図4に示す。

20

【0034】

(結果)

図1、2に示すように、siRNA無し若しくはNon-silence siRNAを導入した場合には、VEGF添加、TNF- α 添加、低酸素状態の全ての病的刺激によってbEND.3細胞の細胞膜からのクローデイン-5消失現象が観察された。一方、BSGsiRNA#1又は2をbEND.3細胞に導入してベシジンの発現を阻害したところ、VEGF添加、TNF- α 添加、低酸素状態のいずれもbEND.3細胞の細胞膜からのクローデイン-5消失現象が抑制された。さらに、図4に示すように、VEGF添加、TNF- α 添加におけるbEND.3細胞単層のTEERを経時的に測定したところ、BSGsiRNA#1又は2は、VEGF添加、TNF- α 添加によるTEER低下を抑制することが明らかとなった。したがって、ベシジン遺伝子の発現を抑制する機能性核酸は、低酸素状態のみならずVEGFやTNF- α などの様々な誘因による血管バリアー破綻に対して作用することが明らかとなった。

30

【0035】

[参考例]

上記BSGsiRNA#1又は2の代わりに以下の表2に示すADAM12siRNA (センス鎖配列: 配列番号9、アンチセンス鎖配列: 配列番号10)、ADAM17siRNA (センス鎖配列: 配列番号11、アンチセンス鎖配列: 配列番号12) の2種類を用いて、上記と同様にbEND.3細胞の細胞膜からのクローデイン-5消失現象を調べた。結果を図5に示す。

40

【0036】

【表 2】

	Sense	Antisense
ADAM12siRNA	GCUACCACCUUGACUCUGAtt (配列番号9)	UCAGAGUACAGGUGGUAGCgt (配列番号10)
ADAM17siRNA	GGACGUAAUUGAGCGAUUUtt (配列番号11)	AAAUCGCUCAAUUACGUCtg (配列番号12)

【0037】

50

図5に示すように、低酸素処理による細胞膜からのクローディン-5消失現象は、ADAM12 siRNA又はADAM17 siRNAによって抑制されるが、VEGF添加、TNF- α 添加による細胞膜からのクローディン-5消失現象は、ADAM12 siRNA又はADAM17 siRNAによって抑制されないことが確認された。したがって、ADAM12又はADAM17は、あくまで低酸素状態を誘因とした血管バリアー破綻に関与する因子であるに過ぎないことが明らかとなった。

【実施例2】

【0038】

[マウスの網膜組織を用いたin vivo系解析]

VEGFやTNF- α などの病的刺激は異なる細胞内シグナル伝達系を介して働くことから、ベシジンは、異なる細胞内シグナル伝達系に共通した下流において血管バリアー機能を調節する因子(バリアーを開く因子)であると解釈される。したがって、ベシジン遺伝子の発現を抑制する機能性核酸は、種々の誘因が混在して血管バリアー破綻が起こる神経系疾患に対する有用な治療標的をなることが示唆される。そこで、ベシジンの治療標的としての有用性について、以下に示す方法でマウスを用いたin vivo系を用いた機能的解析を行った。なお、網膜は、個体発生の過程で中枢神経系が出芽する形で形成される組織であり、脳と同様に中枢神経系の一部である。網膜の血管系は、長軸方向に全長に渡って2次元的に観察・評価することが可能であるため、本研究では、中枢神経系の代表として網膜を解析材料として用いた。

10

【0039】

20

7週齢のC57B6/Nマウスを4時間絶食し、血糖と体重を測定した。次に、150 mg/kgのストレプトゾトシン(Streptozotocin:クエン酸緩衝液に溶解)を腹腔内注射した。さらにストレプトゾトシン注射から4日後に4時間絶食し、血糖と体重を測定し、血糖値が250 mg/dl以上のマウスを血液網膜関門破綻モデルマウスとした。

【0040】

正常マウス(クエン酸緩衝液を腹腔内注射したC57B6/Nマウス)と上記で得られた血液網膜関門破綻モデルマウスの硝子体内に、BSG siRNA #1又は2、又はNon-silence siRNAを注射(10 nMを1 μ l)した。硝子体への注射から3日後(ストレプトゾトシン投与から7日後)に各々のマウスに、トレーサーとして蛍光色素を心臓内投与した後、網膜伸展標本を作製し、注入したトレーサーの漏出を共焦点顕微鏡にて観察することで網膜血管の透過性(血液網膜関門機能の指標)を評価した。トレーサーとしては、Tetramethylrhodamine-conjugated lysine fixable dextran(10kDa;Thermo Fisher Scientific社製)及びHoechst stain H33252(534Da;Thermo Fisher Scientific社製)の2つの蛍光色素を用いた。結果を図6に示す。

30

【0041】

図6に示すように、siRNA注射なし(-)又はNon-silence siRNAを注射した場合のストレプトゾトシン投与血液網膜関門破綻モデルマウスは、血管内投与した色素の網膜血管からの漏出亢進が認められた(図6の下段左枠)。一方、その血液網膜関門破綻モデルマウスの硝子体内にBSG siRNA #1又は2を投与した場合には、網膜血管からの色素漏出は、正常マウスの網膜血管と同程度の透過性まで抑制された(図6の下段右枠)。これらの結果は、種々の誘因が混在して血管バリアー破綻を来している神経系疾患において、血管バリアー機能を回復させるための治療標的としてベシジンが有用であること、換言すれば、ベシジン遺伝子の発現を抑制する機能性核酸を用いれば、血管バリアー機能を回復させて神経系疾患を治療できることが可能であることを示している。

40

【0042】

これらの結果より、本発明によって、いまだ有効な治療法がない難治性神経系疾患において、浮腫改善のみならず神経毒性分子の組織内侵入の阻害も含め、病態悪化のカスケードを人為的に制御し、病態の改善につながる治療を行うことが可能となる。

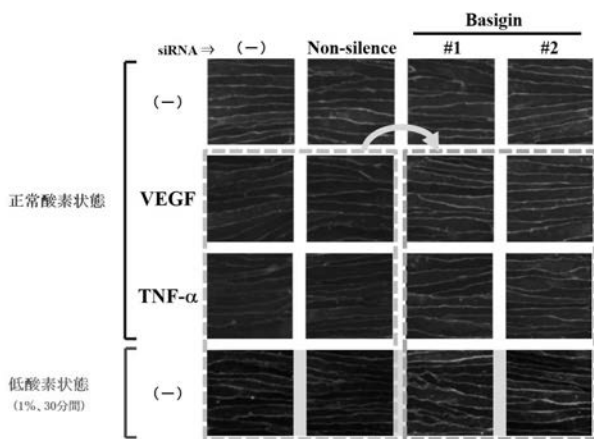
【産業上の利用可能性】

50

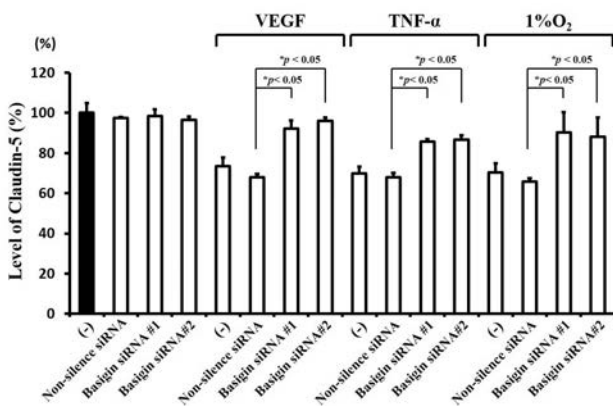
【 0 0 4 3 】

神経系血管バリアの破綻に起因する脳浮腫、網膜浮腫、虚血性脳疾患などの神経系疾患に対する新規治療薬として利用される。

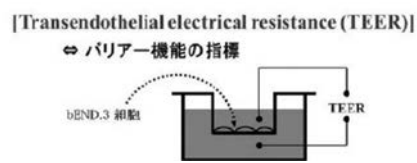
【 図 1 】



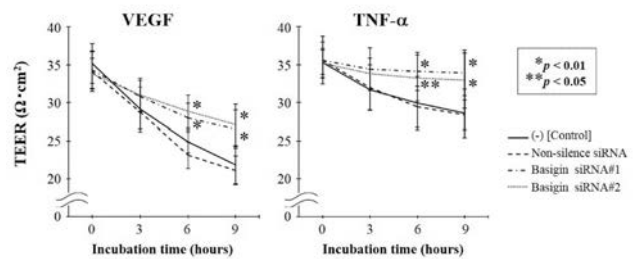
【 図 2 】



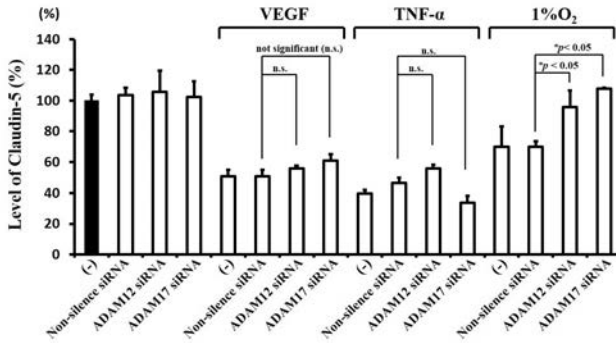
【 図 3 】



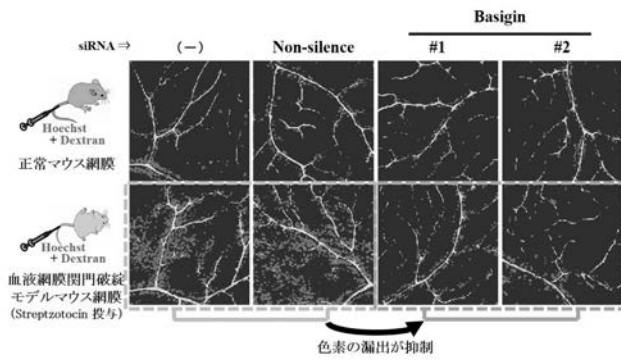
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 配列表 】

2017073232000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成29年2月8日(2017.2.8)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

以下の (a) ~ (c) のいずれかを有効成分とする神経系血管バリアーの機能回復剤。

(a) ベイシジン (b a s i g i n) 遺伝子の発現を抑制する機能性核酸；

(b) ベイシジンの活性を消失又は減退する機能性核酸；

(c) 上記 (a) 又は (b) の機能性核酸をコードする DNA を含む該機能性核酸発現ベクター；

【 請求項 2 】

ベイシジン遺伝子の発現を抑制する機能性核酸が s i R N A であることを特徴とする請求項 1 記載の神経系血管バリアーの機能回復剤。

【 請求項 3 】

ベイシジン遺伝子の発現を抑制する機能性核酸が、配列番号 1 に示すヌクレオチドのセンス鎖配列と配列番号 2 に示すその相補的なアンチセンス鎖配列から構成される s i R N A、又は、配列番号 3 に示すヌクレオチドのセンス鎖配列と配列番号 4 に示すその相補的なアンチセンス鎖配列から構成される s i R N A であることを特徴とする請求項 2 記載の神経系血管バリアーの機能回復剤。

【請求項 4】

以下の (a) ~ (c) のいずれかを有効成分とする神経系血管バリアーの破綻を来している神経系疾患の治療剤。

(a) ベイシジン (b a s i g i n) 遺伝子の発現を抑制する機能性核酸；

(b) ベイシジンの活性を消失又は減退する機能性核酸；

(c) 上記 (a) 又は (b) の機能性核酸をコードする DNA を含む該機能性核酸発現ベクター；

【請求項 5】

神経系疾患が、脳神経系疾患又は網膜神経系疾患であることを特徴とする請求項 4 記載の神経系疾患の治療剤。

【請求項 6】

神経系疾患が、脳浮腫又は網膜浮腫であることを特徴とする請求項 5 記載の神経系疾患の治療剤。

【請求項 7】

ベイシジン遺伝子の発現を抑制する機能性核酸が s i R N A であることを特徴とする請求項 4 ~ 6 のいずれか記載の神経系疾患の治療剤。

【請求項 8】

ベイシジン遺伝子の発現を抑制する機能性核酸が、配列番号 1 に示すヌクレオチドのセンス鎖配列と配列番号 2 に示すその相補的なアンチセンス鎖配列から構成される s i R N A、又は、配列番号 3 に示すヌクレオチドのセンス鎖配列と配列番号 4 に示すその相補的なアンチセンス鎖配列から構成される s i R N A であることを特徴とする請求項 7 記載の神経系疾患の治療剤。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0001

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0001】

技術分野

[0001]

本発明は低酸素状態のみならず様々な誘因による神経系血管バリアー破綻に対して作用する神経系血管バリアー破綻抑制剤及び神経系疾患治療剤に関する。

背景技術

[0002]

成体の神経組織（脳、網膜、脊髄など）では、血液と神経組織の間に血管バリアー（血液脳関門、血液網膜関門など）が形成され、神経細胞が正常に機能できる至適組織微小環境が維持されており、組織特異的に分化した血管系が有するバリアー機能により他組織から区画化されている。成体神経組織の血管バリアー機能は個体発生過程において誘導されるが、いったん誘導された血管バリアー機能も常に一定の状態にあるわけではなく、成体は血管バリアー機能を増強したり減弱させたりすることにより、神経細胞が正常に機能するための至適微小環境を維持している。一方、虚血性脳疾患などの難治性神経系疾患においては、血管バリアー機能が破綻し組織微小環境の攪乱が生じることが、病態を悪化させる大きな要因として働いている。したがって、血管バリアー機能の調節因子は、それら難治性疾患の病態悪化を妨げるための新規治療法開発の標的となることが期待される。

[0003]

神経系血管バリアー機能の本体は、血管の内皮細胞間に形成されるタイトジャンクション (t i g h t j u n c t i o n : 以下、TJ) 網に依存することから、TJ 構成分子を研究することが、血管バリアー調節機構の解明に向けた戦略の中心となっている。TJ 構成分子としては、o c c l u d i n、c l a u d i n (27メンバーからなるファミリーを形成)、j u n c t i o n a l a d h e s i o n m o l e c u l e A (JAM

- A) などが特定されているが、生理的状态の神経系血管内皮細胞の細胞膜に発現・局在しているクローデイン - 5 (c l a u d i n - 5 : c l a u d i n f a m i l y m e m b e r s

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2016/078775
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K31/713(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P7/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P27/02(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)i 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) A61K31/713, A61K48/00, A61P7/00, A61P25/00, A61P27/02, C12N15/113 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 1996-2016 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TU, Y. et al., Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer is Associated with Severity of Brain Oedema Following Experimental Subarachnoid Haemorrhage in Rats, The Journal of International Medical Research, 2012, Vol.40, p.1089-1098, ISSN 0300-0605, particularly, Abstract, page 1095, left column, line 3 to page 1096, right column, line 13, Figure 3	1-8
Y	JP 2015-524418 A (Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale), 24 August 2015 (24.08.2015), claims 1 to 4 & WO 2014/016152 A1 claims 1 to 4 & US 2015/0110806 A1 & EP 2877492 A1 & CN 104736563 A	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 02 November 2016 (02.11.16)		Date of mailing of the international search report 15 November 2016 (15.11.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/078775

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WEI, M. et al., Increased CD147 (EMMPRIN) expression in the rat brain following traumatic brain injury, <i>Brain Research</i> , 2014, Vol.1585, p.150-158, ISSN 0006-8993	1-8
A	MORENO, V. et al., An EMMPRIN- γ -catenin-Nm23 complex drives ATP production and actomyosin contractility at endothelial junctions, <i>Journal of Cell Science</i> , 2014, Vol.127, p.3768-3781, ISSN 0021-09533	1-8
A	HUET, E. et al., EMMPRIN Modulates Epithelial Barrier Function through a MMP-Mediated Occludin Cleavage, <i>The American Journal of Pathology</i> , 2011, Vol.179, No.3, p.1278-1286, ISSN 0002-9440	1-8

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 7 8 7 7 5	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K31/713(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P7/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P27/02(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)i			
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. A61K31/713, A61K48/00, A61P7/00, A61P25/00, A61P27/02, C12N15/113			
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 1971-2016年 日本国実用新案登録公報 1996-2016年 日本国登録実用新案公報 1994-2016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) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)			
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	
Y	TU, Y. et al., Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer is Associated with Severity of Brain Oedema Following Experimental Subarachnoid Haemorrhage in Rats, The Journal of International Medical Research, 2012, Vol. 40, p. 1089-1098, ISSN 0300-0605, 特に Abstract, p. 1095 左欄第3行-p. 1096 右欄第13行, Figure 3	1-8	
❖ 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 02.11.2016		国際調査報告の発送日 15.11.2016	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 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) 高橋 樹理	4C 4498
		電話番号 03-3581-1101 内線 3452	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2016/078775
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
Y	JP 2015-524418 A (アンステイテュ ナショナル ドウ ラ サン テ エ ドウ ラ ルシエルシュ メディカル) 2015.08.24, 請求項 1-4 & WO 2014/016152 A1, claims 1-4 & US 2015/0110806 A1 & EP 2877492 A1 & CN 104736563 A	1-8
A	WEI, M. et al., Increased CD147 (EMMPRIN) expression in the rat brain following traumatic brain injury, Brain Research, 2014, Vol.1585, p.150-158, ISSN 0006-8993	1-8
A	MORENO, V. et al., An EMMPRIN- γ -catenin-Nm23 complex drives ATP production and actomyosin contractility at endothelial junctions, Journal of Cell Science, 2014, Vol. 127, p. 3768-3781, ISSN 0021-09533	1-8
A	HUET, E. et al., EMMPRIN Modulates Epithelial Barrier Function through a MMP-Mediated Occludin Cleavage, The American Journal of Pathology, 2011, Vol. 179, No. 3, p. 1278-1286, ISSN 0002-9440	1-8

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 9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P 7/10 (2006.01)	A 6 1 P	7/10	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
	C 1 2 N	15/113	Z N A Z

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, DJ, 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, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA02 ZA33 ZA36
ZA83 ZB21 ZC41

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。